



**HAL**  
open science

# Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène : effets du genre et de l'entraînement en endurance chez le rat Wistar et l'anguille européenne

Firas Farhat

► **To cite this version:**

Firas Farhat. Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène : effets du genre et de l'entraînement en endurance chez le rat Wistar et l'anguille européenne. Biologie cellulaire. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0018 . tel-02012420

**HAL Id: tel-02012420**

**<https://theses.hal.science/tel-02012420>**

Submitted on 8 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

The logo for the University of Brittany Occidental (WBO) consists of the letters 'WBO' in a stylized, white, sans-serif font.

université de bretagne  
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

présentée par

**Firas FARHAT**

Préparée à l'UFR Sciences et Techniques

**Fonction mitochondriale et espèces réactives  
dérivées de l'oxygène : effets du genre et de  
l'entraînement en endurance chez le rat  
Wistar et l'anguille européenne**

**Thèse soutenue le 20 Mars 2015**

devant le jury composé de :

- Mme **Valérie Bolliet**, Pr. Univ-Pau  
**Rapporteur**
- Mr **Vincent Pialoux**, MCF-HDR. Univ-Lyon1  
**Rapporteur**
- Mme **Christine Moisan**, Pr. Univ-Brest (directrice de thèse)  
**Examineur**
- Mme **Aline Amérand**, MCF. Univ-Brest (co-encadrante)  
**Examineur**
- Mme **Carole Groussard**, MCF. Univ-Rennes2  
**Examineur**
- Mr **Bernard Simon**, Pr. Univ-Brest  
**Examineur**



# Contenu

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des travaux scientifiques issus de ce travail</b> .....	<b>7</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>8</b>
<b>Avant propos:</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Etat de l'art (Revue bibliographique):</b> .....	<b>12</b>
I.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) : .....	12
I.1.1. Historique : .....	12
I.1.2. Les différents types de ROS : .....	12
I.1.3. Les systèmes antioxydants : .....	15
I.1.4. Les cibles biologiques des ROS: .....	17
I.1.5. Effets bénéfiques // effets délétères des ROS : .....	19
I.1.6. Les principales localisations des ROS : .....	20
I.2. La mitochondrie : .....	22
I.2.1. Généralités : .....	22
I.2.2. La phosphorylation oxydative : .....	24
I.2.3. La mitochondrie est la source principale de production des ROS : .....	26
I.2.4. La fonction mitochondriale est une cible des ROS : .....	27
I.3. Relation entre radicaux libres et exercice physique : .....	28
I.3.1. Métabolisme musculaire et activité physique : .....	28
I.3.2. Stress oxydant et activité physique : .....	32
I.3.3. Réponse musculaire à l'exercice : .....	34
I.4. Effets du genre sur le métabolisme énergétique et radicalaire : .....	38
I.4.1. Les réponses du métabolisme énergétique selon le genre : .....	39
I.4.2. Balance oxydants/antioxydants selon le genre: .....	40
I.4.3. Les réponses d'adaptation à l'entraînement selon le genre: .....	41
<b>II. Objectifs et hypothèses :</b> .....	<b>43</b>
<b>III. Matériels et méthodes :</b> .....	<b>45</b>
III.1. L'animalerie : .....	45
III.2. Les animaux : .....	45
III.2.1. Les rats : .....	45
III.2.2. Les anguilles : .....	46



III.3. Protocoles d'entraînement: .....	47
III.3.1. Chez le rat Wistar: .....	47
III.3.2. Chez l'anguille européenne: .....	48
III.4. Matériel biologique : .....	50
III.4.1. Prélèvements tissulaires :.....	50
III.4.2. Préparations tissulaires : .....	51
III.4.3. Analyse des paramètres de la fonction mitochondriale et du stress oxydant:.....	52
<b>IV. Résultats :.....</b>	<b>59</b>
IV.1. Effet d'un entraînement en endurance sur la performance physique : .....	59
IV.1.1. Chez le rat Wistar : .....	60
IV.1.2. Chez l'anguille européenne : .....	60
IV.2. Effet du genre et de l'entraînement sur la fonction mitochondriale et les réponses radicalaires dans le muscle cardiaque et squelettique : .....	62
IV.2.1. Chez le rat Wistar : .....	62
IV.2.2. Chez l'anguille européenne : .....	66
<b>V. Discussion : .....</b>	<b>69</b>
V.1. Etude des effets de l'entraînement en endurance sur la performance physique <i>in vivo</i> : .....	71
V.1.1. Performance de course chez le rat Wistar : .....	72
V.1.2. Performance de nage chez l'anguille européenne : .....	74
V.2. Validation des techniques de mesures <i>in vitro</i> sur les fibres musculaires perméabilisées : .....	75
V.3 Effet du genre sur la fonction mitochondriale et les radicaux libres : .....	78
V.3.1. Chez le rat Wistar: .....	78
V.3.2. Fonction mitochondriale et métabolisme radicalaire selon le sexe chez l'anguille européenne argentée ( <i>Anguilla anguilla L.</i> ):.....	82
V.4. Effets de l'entraînement en endurance sur la fonction mitochondriale et le métabolisme radicalaire : .....	86
V.4.1. Effets de l'entraînement à la course sur la fonction mitochondriale et le métabolisme radicalaire chez le rat Wistar mâle et femelle:.....	86
V.4.2. Effet de l'entraînement en endurance sur la fonction mitochondriale et le métabolisme radicalaire chez l'anguille européenne argentée mâle et femelle : .....	93
V.5. Approche comparative et intégrative des réponses métaboliques et radicalaires à l'entraînement : .....	99
V.5.1. Comparaison des effets de l'entraînement chez les deux espèces : .....	99
V.5.2. Analyse en composantes principales (ACP) : .....	100
<b>VI. Conclusions et perspectives :.....</b>	<b>104</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>108</b>
<b>Liste des figures et des tableaux .....</b>	<b>124</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>127</b>



# Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu ma directrice de thèse, le **Professeur Christine Moisan**, je lui suis largement redevable pour m'avoir scientifiquement guidé, encouragé et conseillé tout au long de ces trois années, à la fois difficiles et riches de rebondissement tant sur le plan personnel que sur le plan scientifique, mais aussi pour m'avoir autorisé à faire de l'enseignement, d'effectuer la formation d'expérimentation animale et de participer au congrès international Society for Experimental biology-Manchester SEB 2014.

Je tiens aussi à remercier ma co-encadrante, **Mme Aline Amérand, Maître de conférences**, pour mon encadrement scientifique, pour tous ses conseils concernant l'organisation du travail et pour m'avoir permis de participer aux enseignements de physiologie. Je lui adresse mes vifs remerciements et ma reconnaissance.

Je remercie également le **Professeur Bernard Simon**. Merci pour votre aide très précieuse en termes de statistiques, d'analyse des résultats et de conseils concernant la rédaction de ce manuscrit.

Mes remerciements vont aussi à **Mr Philippe Sébert**, directeur du laboratoire à mon arrivée en stage de M2, qui n'a pas hésité à m'apporter son aide et son expérience essentiellement concernant le modèle anguille avant son départ à la retraite. Merci infiniment.

Je tiens à remercier le **Professeur Valérie Bolliet** de l'université de Pau, de bien vouloir être rapporteur et faire partie du jury de ce travail de thèse, mais aussi pour ses conseils scientifiques concernant le modèle anguille lors de la soutenance de mi-parcours.

Je tiens à remercier **Mr Vincent Pialoux, Maître de conférences-HDR** à l'université de Lyon, d'avoir accepté d'être rapporteur et de faire partie du jury de thèse.

Je tiens à remercier **Mme Carole Groussard, Maître de conférences** à l'université de Rennes 2, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse et pour ses conseils scientifiques concernant le modèle rat lors de la soutenance de mi-parcours.

Mes remerciements vont également au **Professeur Jacques Mansourati**, directeur du laboratoire à mon arrivée en thèse, pour m'avoir accepté au sein de l'équipe ORPHY.





Je remercie, **Mme Christelle Goanvec, Maître de conférences** et **Mme Annie Feray Maître de conférence** de m'avoir permis de participer à leur protocole de course de rats et d'obtenir ainsi des prélèvements tissulaires

Je remercie **Mme Hélène Olivier, Maître de conférences**, pour son aide concernant le dosage de l'ATP et de sa présence au cours du congrès de la SEB.

Je remercie **Mme Karine Pichavant, Maître de conférences-HDR** et **Mr Michael Theron, Maître de conférences** de m'avoir permis de participer au projet de recherche s'intéressant à l'athérosclérose.

Je remercie **Mr Marc Belhomme** et **Mr Patrick Calvès**, pour leur soutien technique et leur contribution au bon déroulement de ce travail de thèse.

Je remercie **Mme Jocelyne Peron**, pour son soutien administratif concernant les missions et les bons de commandes de produits et d'animaux.

Je remercie **Mr Eric Quemener, Maître de conférences**, de m'avoir permis d'effectuer des enseignements en biologie cellulaire.

Je remercie **Mr Yannick Perraud, pêcheur professionnel**, de nous avoir fourni les anguilles mâles et femelles.

Merci à **Florine, Ola et Julie**, avec qui j'ai partagé le bureau des doctorants, pour la bonne humeur et les bons moments.

Je remercie tous les **autres membres de l'équipe Orphy** qui ont contribué directement ou indirectement au bon déroulement de ce travail de thèse.

Je remercie **l'école doctorale SICMA** pour le soutien financier de la thèse et pour sa contribution au financement de la formation d'expérimentation animale.

Je remercie mes vieux amis **Housseem, Bilel, Helmi, Zied** et ceux que j'ai connus durant ces trois années de thèse pour tous les bons moments que nous avons partagés.

Enfin, mes remerciements ne seront pas complets sans mentionner tous les membres de la famille qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de ces trois années. Je remercie mon **papa**, ma **maman**, **Ramsis** et **Fourat**, mes deux frères, pour leur soutien, sans oublier les autres membres de ma famille tantes oncles, cousins et cousines surtout **Dhia, Haider et Fredj**.



## Abstract

### Mitochondrial function and reactive oxygen species: effects of gender and endurance training in Wistar rat and European eel

Mitochondrion is the main site of aerobic energy (ATP) and reactive oxygen species (ROS) productions. Mitochondrial function is closely linked to ROS, which, according their rate, can alter or optimize energy efficiency. Structural and functional plasticity of mitochondria is essential to maintain homeostasis in any situation that requires metabolic adjustments as physical exercise. The adaptive mechanisms of mitochondrial function and ROS during training and the impact of gender on these responses are still far from being solved. In this perspective, two animal models (Wistar rat and European eel) were chosen.

The effects of endurance training of the same intensity (70% of maximal aerobic speed running or swimming) were studied in Wistar rat and silver European eel. The latter is an enduring species capable of performing a spawning migration of 6000 km and characterized by sexual dimorphism in size. *In vitro* measurements of oxygen consumption, free radical and ATP productions were carried out simultaneously from heart and skeletal muscle permeabilized fibers. The vulnerability or resistance of the mitochondrial function to a ROS generating system exposure (mimicking oxidative stress) was also studied.

Before training, in rat, female has a mitochondrial function energetically more efficient and more resistant to ROS, whereas in eel, this metabolic and radical profile is observed rather in male. After training, whatever the species, the improved physical performance observed is associated with various metabolic and radical changes which depending on gender and species. In rats, the improving of mitochondrial function translates differently according to gender. In male, training induces improvement in energy efficiency through a better coupling between oxidation and phosphorylation and/or better use of electrons at the respiratory chain level. In female, increasing in ATP production may be related to the increase in mitochondrial oxygen consumption. As in rats, training induces globally in eel an improvement in energy efficiency and resistance of mitochondrial function to ROS, but only in male.

All these results show metabolic and radical responses depending on gender. Whatever the species, training seems to be most beneficial in males than in females in terms of mitochondrial energy efficiency and resistance of mitochondrial function to oxidative stress. In the context of eel migration, these adaptations allow to male, largely smaller than female, a higher swim efficiency, allowing their synchronization on breeding site.

Interspecific similarities in training response by gender confirm the interest of fish model's using in the field of exercise physiology.

**Keywords:** Wistar rats; European eel; Gender; Fish model; Endurance training; Mitochondrial function; ROS.



## Résumé

### Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène : effets du genre et de l'entraînement en endurance chez le rat Wistar et l'anguille européenne

La mitochondrie est le siège principal de la production d'énergie sous forme d'ATP en conditions aérobies, mais aussi d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS). La fonction mitochondriale est étroitement liée à la production de ROS puisque ces derniers, selon leur taux, peuvent altérer ou optimiser le rendement énergétique. La plasticité structurale et fonctionnelle de la mitochondrie est essentielle au maintien de l'homéostasie dans toute situation qui nécessite des ajustements métaboliques comme l'exercice physique. Les mécanismes adaptatifs de la fonction mitochondriale et des ROS lors de l'entraînement sont encore loin d'être élucidés ainsi que l'impact du genre sur ces réponses. Dans cette perspective, deux modèles animaux (rat Wistar et anguille européenne) ont été choisis.

Les effets d'un entraînement en endurance de même intensité (70% de la vitesse maximale aérobie de course ou de nage) ont été étudiés chez le rat Wistar et l'anguille européenne argentée. Cette dernière est une espèce endurente capable d'effectuer une migration de reproduction de 6000 km et caractérisée par un dimorphisme sexuel de taille. Des mesures *in vitro* de la consommation d'oxygène, la production radicalaire et d'ATP ont été effectuées simultanément à partir de fibres perméabilisées de cœur et de muscle squelettique. La vulnérabilité ou résistance de la fonction mitochondriale à l'exposition à un système générateur de ROS (mimant un stress oxydant) a également été étudiée.

Avant entraînement, chez le rat Wistar, la femelle présente une fonction mitochondriale plus efficiente énergétiquement et plus résistante aux ROS, alors que chez l'anguille, ce profil métabolique et radicalaire est plutôt observé chez le mâle. Après entraînement, quelle que soit l'espèce, la meilleure performance physique observée s'accompagne de modifications métaboliques et radicalaires différentes selon le genre et l'espèce. Chez le rat, l'amélioration de la fonction mitochondriale se traduit différemment selon le sexe. Chez le mâle, l'entraînement induit une amélioration du rendement énergétique via un meilleur couplage entre oxydation et phosphorylation et/ou une meilleure utilisation des électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Chez la femelle, l'augmentation de la production d'ATP serait liée à l'augmentation de la consommation d'oxygène mitochondriale. Comme chez le rat, l'entraînement induit globalement chez l'anguille une amélioration du rendement énergétique et de la résistance de la fonction mitochondriale aux ROS, mais uniquement chez le mâle.

L'ensemble de ces résultats montre des réponses métaboliques et radicalaires dépendantes du genre. Quelle que soit l'espèce, l'entraînement semble être chez le mâle plus bénéfique que chez la femelle en termes d'efficacité énergétique mitochondriale et de résistance de la fonction mitochondriale à un stress oxydant. Dans le contexte de la migration de l'anguille, ces adaptations permettraient au mâle, largement plus petit que la femelle, une efficacité de nage supérieure, permettant leur synchronisation d'arrivée sur le lieu de reproduction.

Les similitudes interspécifiques de réponse à l'entraînement selon le genre confortent l'intérêt d'utilisation du modèle poisson dans le champ de la physiologie de l'exercice.

**Mots clés :** Rat Wistar ; Anguille européenne ; Genre ; Modèle poisson ; Entraînement de type endurance ; Fonction mitochondriale ; ROS.



# Liste des travaux scientifiques issus de ce travail

## Publications

Farhat, F., Dupas, J., Amérand, A., Goanvec, C., Feray, A., Simon, B., Guegueniat, N., and Moisan, C. (2014). Effect of exercise training on oxidative stress and mitochondrial function in rat heart and gastrocnemius muscle. Redox Report. DOI: 10.1179/1351000214Y.0000000105.

Farhat, F., Amérand, A., Belhomme, M., Calvès, P., Sébert, P., Moisan. Hydrostatic pressure as temperature modulates cardiac performance in European eel (*Anguilla anguilla* L.).(Soumis dans Journal of Thermal Biology)

## Communications orales et affichées

Moisan C, Sébert P, Farhat F, Belhomme M, Amérand A. Effet de l'entraînement à la nage sur la relation métabolisme et production radicalaire chez l'anguille européenne argentée mâle. Communication orale lors de la « Rencontre GRISAM consacrées à l'Anguille 2012 », Rochefort (France).

Farhat F, Bouchekioua S, Moisan C, Amérand A. Effect of swimming training on muscle reactive oxygen species (ROS) and metabolism in male European silver eel. Présentation affichée lors de la « journée SFR ScInBios 2012 » à l'UFR sciences et techniques de Rennes.

Farhat F, Dupas J, Amérand A, Devaux J, Goanvec C, Feray A, Guegueniat N, Moisan C. Fonction mitochondriale et vulnérabilité aux espèces réactives dérivées de l'oxygène: effet d'un exercice physique de type chronique. Communication orale lors de la « journée SFR ScInBios 2013 » à la faculté de médecine de Brest et la « journée des doctorants ED SICMA 2013 » à l'UFR sciences et techniques de Lorient.

Farhat, F., Dupas, J., Amérand, A., Goanvec, C., Feray, A., Simon, B., Guegueniat, N., and Moisan. Effect of training on oxidative stress and mitochondrial function in rat heart and gastrocnemius muscle. Communication orale lors du congrès international « Society for Experimental biology-Manchester 2014» (Angleterre).





## Abréviations

ADP : Adénosine Diphosphate	NO <sup>•</sup> : Monxyde d'azote
ANT : ATP–ADP translocase	NOS : NO Synthase
ATP : Adénosine Triphosphate	O <sub>2</sub> : Dioxygène
Bat : Battements de queue	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> : Anion Superoxyde
CAT : Catalase	<sup>•</sup> OH: Radical Hydroxyle
COX : Cytochrome Oxydase	P : Poids
Cs : Citrate Synthase	P/M: Pyruvate/Malate
DHBA : Acide Dihydroxybenzoïque	Q : Ubiquinone
FADH <sub>2</sub> : Flavine Mononucléotide réduite	QH <sub>2</sub> : Ubiquinol
e <sup>-</sup> : Electron	QH <sup>•</sup> : Semiquinone.
Fe <sup>2+</sup> : Fer ferreux	ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène)
Fe <sup>3+</sup> : Fer ferrique	SOD: Superoxyde Dismutase
FeCl <sub>2</sub> : Chlorure de fer	Mn-SOD : Superoxyde Dismutase mitochondriale
GMPC : Guanosine 3',5'-MonoPhosphate cyclique	Cu,Zn-SOD : Superoxyde Dismutase cytoplasmique
GPx : Glutathion Peroxydase	Ucrit: Vitesse Critique de nage
GSH : Glutathion réduit	RNS : Reactive Nitrogen Species
GSSG : Glutathion oxydé	VMA : Vitesse Maximale Aérobie
H <sup>+</sup> : Proton	V <sub>0</sub> : Conditions non phosphorylantes
H <sub>2</sub> O : Eau	V <sub>max</sub> : Conditions phosphorylantes
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène	V <sub>ATP</sub> : Production d'ATP
HPLC : Chromatographie Liquide Haute performance	VO <sub>2</sub> : Consommation d'Oxygène
KCN : Cyanure de potassium	VO <sub>2(entier)</sub> : Consommation d'Oxygène de l'animal entier
Lc : Longueur corporelle	VO <sub>2(max)</sub> : Consommation mitochondriale d'oxygène en conditions phosphorylantes
LOOH : Peroxyde lipidique	VO <sub>2(0)</sub> : Consommation mitochondriale d'oxygène en conditions non phosphorylantes
MDA : Malondialdéhyde	
MR : Milieu de Respiration	
NADH, H <sup>+</sup> : Nicotinamine Adénine Dinucléotide (forme réduite)	
NF-kB : Nuclear Factor-kappa B	



## Avant propos:

*« Living with the risk of oxidative stress is a price that organisms must pay for more efficient bioenergetics » (Skulachev, 1996)*

L'oxygène est un accepteur d'électrons universel qui permet aux organismes aérobies d'utiliser l'énergie issue de la transformation des nutriments. Ces processus cataboliques génèrent des radicaux libres et autres espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS de l'anglais Reactive Oxygen Species). En conditions physiologiques normales, la majorité des ROS est produite par la chaîne respiratoire mitochondriale qui transforme en eau l'oxygène pour produire de l'ATP, la seule forme d'énergie directement utilisable par les cellules. La formation de ROS est donc physiologique voire nécessaire puisque ces substances participent aux phénomènes de régulation et d'homéostasie cellulaire (signalisation cellulaire, apoptose...). Cependant, ces ROS peuvent devenir toxiques en réagissant avec des constituants cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides) particulièrement dans des situations où les systèmes naturels antioxydants sont dépassés, cet état est qualifié de stress oxydatif.

L'activité mitochondriale implique donc des **liens étroits entre la consommation d'oxygène, la production des ROS et l'efficacité énergétique. La régulation de ces mécanismes est déterminante dans toute situation normale ou pathologique pour l'adaptation de l'individu et sa capacité à maintenir ou développer une performance.** Ces aspects fondamentaux largement ubiquitaires sont abordés au laboratoire ORPHY selon une perspective de physiologie comparée appliquée à différents contextes du champ biologie-santé dont celui de **l'activité physique qui sera abordé dans ce travail de thèse.**

**L'activité physique**, au cours de laquelle la consommation d'oxygène peut être multipliée par 20 par rapport aux conditions de repos, est à la fois reconnue potentiellement génératrice de stress oxydatif mais également comme moyen d'améliorer la santé. Pour la grande majorité des animaux, l'exercice physique est essentiel à la survie. Chez les vertébrés inférieurs comme le poisson, la nage est étroitement liée à son développement (croissance, prédation etc..). Chez certaines espèces migratrices comme le saumon ou encore l'anguille européenne, la capacité de nage est même déterminante pour leur reproduction et donc la survie de leur espèce. Chez l'homme, s'il n'est pas aussi évident que l'activité physique est déterminante pour sa survie, de nombreux travaux ont mis en évidence ces dernières années les bienfaits de l'exercice physique en particulier de type **endurance** sur la santé et notamment sur la prévention de pathologies largement représentées par les maladies cardiovasculaires.



Quelle que soit l'espèce animale, il est clair que la performance physique est largement déterminée d'une part par les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles **des muscles squelettiques** et du **système cardiovasculaire** et d'autre part par leur capacité d'adaptation ou plasticité. Parmi les déterminants de cette performance, les ROS sont largement étudiés. En effet, au cours de l'exercice physique, la demande énergétique s'accroît de manière importante pour assurer le fonctionnement musculaire et le maintien de l'homéostasie. Cela nécessite des ajustements métaboliques permanents qui impliquent notamment la respiration mitochondriale source majeure de production des ROS. Globalement, il est admis que la production accrue de ROS pendant l'effort est essentiellement due à l'augmentation de la consommation d'oxygène. Ainsi, un entraînement en endurance de type aérobie modéré induit des modifications au niveau de la production radicalaire qui influent certainement sur cette fonction mitochondriale et son efficacité. Enfin, les ROS, produits à faible dose, exerceraient un rôle de médiateur de la signalisation cellulaire en régulant notamment l'expression génique de certaines enzymes dont celles impliquées dans la défense antioxydante.

**Les mécanismes adaptatifs de la fonction mitochondriale et des ROS à l'exercice sont encore loin d'être élucidés.** Dans la littérature concernant le mammifère, les réponses radicalaires et les modifications de la fonction mitochondriale après entraînement sont souvent étudiés indépendamment et sont très variables voire parfois contradictoires. Par ailleurs, il n'est pas rare que des études comparent les résultats d'individus de **genre** différent. A ce jour, peu de travaux se sont intéressés aux différences sexuelles de l'homéostasie des ROS. Pourtant, les hormones sexuelles, en particulier les œstrogènes sont souvent rapportés comme des éléments protecteurs contre le stress oxydatif. Certaines études ont montré que les adaptations à l'exercice des capacités antioxydantes pouvaient être différentes selon le sexe en particulier que les rats femelles étaient plus résistants au stress oxydatif que les mâles. D'autres études ne relèvent aucune différence.

**Dans ce contexte, l'approche intégrative des effets de l'entraînement sur les relations entre fonction mitochondriale, ROS et performance ainsi que l'étude de l'impact du genre ont ainsi toute leur pertinence.**

D'un point de vue méthodologique, deux modèles animaux seront utilisés : **le rat** qui a fait l'objet de nombreux travaux de référence, mais également **le poisson** dont nous souhaitons montrer toute la pertinence d'utilisation dans le champ de la physiologie de l'exercice. En effet, ces dernières années, les quelques études effectuées chez le poisson semblent révéler une ubiquité des mécanismes en particulier au niveau de la physiologie cardiaque. Des mesures seront effectuées *in vivo* et *in vitro* de manière à mettre en lien différents niveaux d'organisation biologique depuis la cellule jusqu'au niveau organismique.



Ce manuscrit est organisé de la manière suivante : un état de l'art actualisant les données sur les ROS, la mitochondrie et les réponses métaboliques et radicalaires à l'entraînement sera d'abord effectué. Puis seront abordés successivement les objectifs de thèse, le matériel et méthodes, les résultats, la discussion et une partie conclusion-perspectives.





# **I. Etat de l'art (Revue bibliographique):**

## **I.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) :**

### **I.1.1. Historique :**

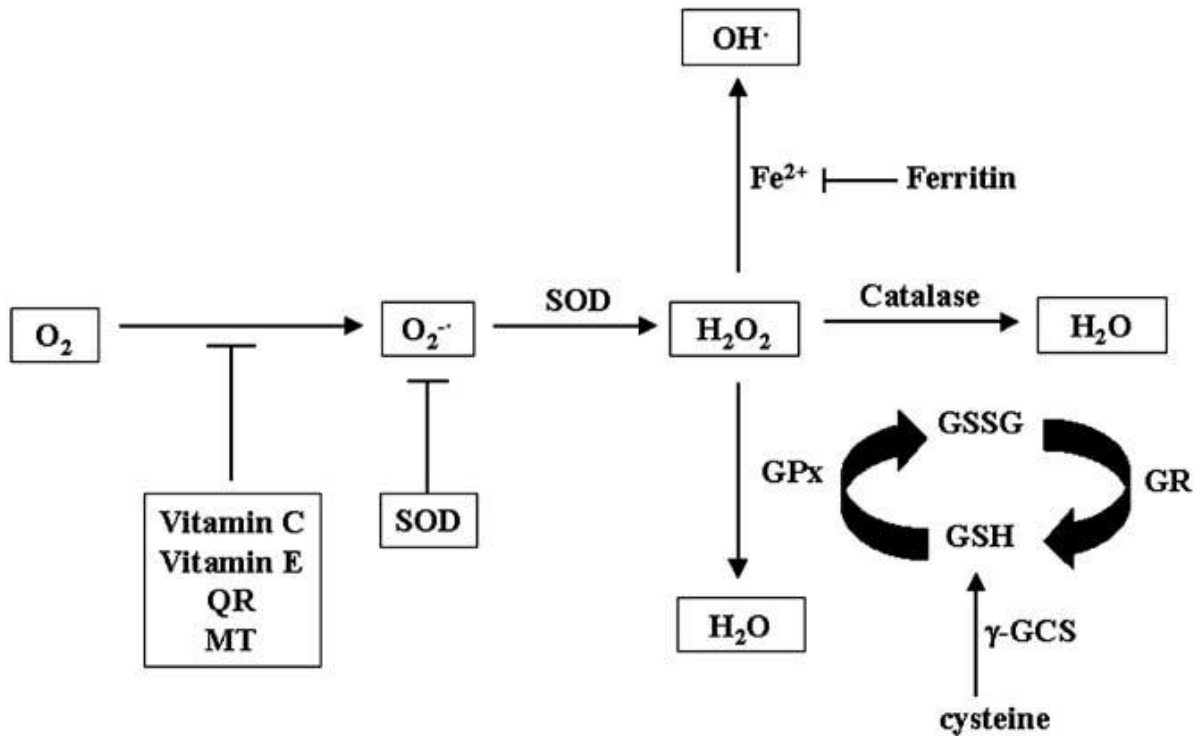
Chez les êtres vivants, l'oxygène est indispensable à la production d'énergie. Son utilisation par l'organisme est contrôlée par un grand nombre d'enzymes qui le rendent chimiquement actif. En 1954, la théorie de sa potentielle toxicité voit le jour avec la publication de Gerschman et al. (1954) qui montre que la survie de souris placées dans un environnement saturé en oxygène diminue lorsqu'elles sont exposées aux rayons-X, suggérant ainsi que la toxicité de l'oxygène était due à sa réduction partielle.

Deux ans plus tard, la production et l'effet des espèces qui dérivent de l'oxygène au sein des systèmes biologiques ont commencé à susciter l'intérêt. En 1956, Denham Harman suggère que le vieillissement et les maladies dégénératives sont attribués essentiellement à un effet délétère des radicaux libres sur les constituants cellulaires (ADN, protéines et lipides). Il émet alors l'hypothèse que ces radicaux libres proviennent probablement en grande partie des réactions qui, d'un côté, impliquent l'oxygène moléculaire dans la cellule et qui d'un autre côté sont catalysées soit par les enzymes d'oxydation au niveau tissulaire soit par interaction avec des traces de métaux tels que le fer (Harman, 1956).

Jusqu'aux années 70, les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS de l'anglais Reactive Oxygen Species) étaient surtout connues pour leurs effets délétères. Cependant, à la fin des années 70, (Mittal et Murad, 1977) ont montré dans le foie du rat, que certaines ROS, comme l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, stimuleraient l'activation de la guanylate cyclase et la formation d'un second messager, la guanosine 3',5'-monophosphate cyclase (GMPc). Cette étude proposait pour la première fois un rôle physiologique important des ROS, agissant à faible concentration comme des messagers cellulaires et débutait alors l'ère des éventuels effets biologiques positifs des ROS. Depuis, les travaux étudiant l'implication des ROS et des espèces réactives dérivées de l'azote (RNS, de l'anglais Reactive Nitrogen Species) en physiologie, en biologie cellulaire et en médecine ont largement pris de l'ampleur (Valko et al., 2007 ; Dröge, 2002).

### **I.1.2. Les différents types de ROS :**

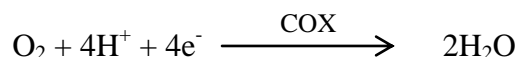
Dans cette partie, les RNS largement représentées par le monoxyde d'azote (NO<sup>\*</sup>) ne seront pas développés. Ils sont tout comme les ROS des produits du métabolisme cellulaire et agissent



**Figure 1 : Cascade de formation des ROS et mécanismes de défense antioxydants cellulaires** (Li et al., 2003). Les principaux ROS générées sont : l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ , l'espèce dérivée de l'oxygène la plus réactive). Le système de défense antioxydante est constitué de systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase SOD, catalase CAT et la glutathion peroxydase (GPx) et de systèmes non enzymatiques (ferritine, vitamines C et E, quinone réductase QR, et métallothionéine MT). GSSG, GSH et GR sont respectivement les glutathions oxydé, réduit et réductase.

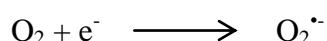
également en tant que messagers secondaires de nombreuses fonctions physiologiques.

L'oxygène moléculaire est lui-même un biradical. Il possède deux électrons non appariés mais sa réactivité est limitée. Environ 98% de l'oxygène consommé par la cellule est réduit de manière tétravalente par la cytochrome oxydase (COX) pour produire de l'eau :



Cependant, 1 à 2% de l'oxygène consommé subit une cascade de transformation pour aboutir aux espèces réactives dérivées de l'oxygène (Turrens, 1997). Les ROS regroupent les radicaux libres qui sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire non apparié (représentés par un ‘•’ dans le symbole chimique), et d'autres comme le peroxyde d'hydrogène caractérisés par une grande réactivité mais ne possédant pas de caractère radicalaire.

La cascade de formation des ROS (figure 1) débute par une réduction univalente de l'oxygène pour former l'**anion superxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)** :



Ce radical est thermodynamiquement instable mais n'attaque pas de manière significative les constituants cellulaires. Cependant, il initie la formation d'autres oxydants dont l'effet est considérable (Fridovich, 1997). Il est d'abord dismuté très rapidement de façon spontanée ou par action de la superoxyde dismutase (SOD) entraînant la production du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :

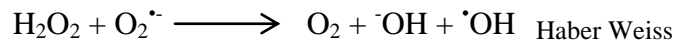
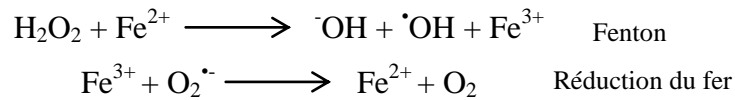


La molécule de **peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** ne fait pas partie des radicaux libres car tous ses électrons sont appariés. Cependant, son potentiel toxique est plutôt dû à sa capacité à former non seulement l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, un état métastable très actif de la molécule de dioxygène, mais aussi à sa capacité à réagir avec les cations métalliques et avec l'anion superoxyde pour former le **radical hydroxyle (•OH)**.

Les radicaux hydroxyles sont les ROS les plus dommageables en raison de leur grande réactivité avec des constantes de vitesse k (•OH + substrat) comprises entre 10<sup>8</sup> et 10<sup>10</sup> mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>. La durée de vie de ces radicaux est inférieure à la microseconde et la distance qu'ils peuvent parcourir est inférieure à une dizaine de nm (Gardès-Albert et al., 2003).

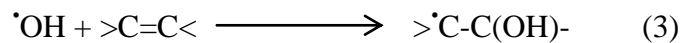
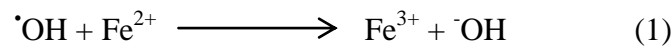


La production de  $\cdot\text{OH}$  est initiée par la réaction de Fenton entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{Fe}^{2+}$ . Ce fer ferreux provient de la réaction entre le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . La résultante de ces deux réactions est nommée réaction d'Haber-Weiss (Pollack et Leeuwenburgh, 1999):

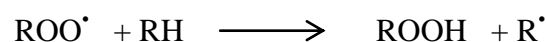
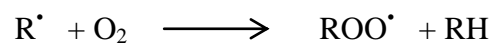


Le radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$  et l'anion hydroxyde  $\text{OH}^-$  sont deux espèces chimiques distinctes. Alors que  $\text{OH}^-$  a tous ses électrons périphériques appariés,  $\cdot\text{OH}$  a un électron célibataire sur sa couche externe.

Les  $\cdot\text{OH}$  exercent leur toxicité vis-à-vis des constituants des cellules y compris les macromolécules telles que l'ADN, les lipides membranaires et les protéines (Auten et Davis, 2009). Ils peuvent agir soit en arrachant un électron (réaction 1 ci-dessous), soit en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH, réaction 2), soit encore en interférant avec les doubles liaisons (réaction 3) :



L'ensemble de ces mécanismes montrent que les radicaux hydroxyles sont des oxydants puissants. Par exemple pour la réaction 2 ci-dessus, lorsque le radical hydroxyle réagit avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, il initie des réactions en chaînes de peroxydation lipidique : les radicaux libres ( $\text{R}\cdot$ ) générés sont susceptibles de réagir à leur tour avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes ( $\text{ROO}\cdot$ ), eux-mêmes susceptibles d'induire des peroxydations lipidiques :



L'impact délétère des ROS dont ceux des radicaux hydroxyles sur les constituants cellulaires sera développé plus loin (Cf I.1.4).



### I.1.3. Les systèmes antioxydants :

La production des ROS est régulée par l'action d'antioxydants. Ces derniers sont des molécules susceptibles d'inhiber directement la production des ROS, de limiter leur propagation ou leur destruction. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces ou encore en les piégeant pour former un composé stable (Noori, 2012).

Il existe 2 grands types de défenses antioxydantes : les systèmes non enzymatiques et les systèmes enzymatiques (figure 1).

#### I.1.3.1. Les systèmes non enzymatiques :

Il agissent en piégeant les radicaux libres et en captant l'électron célibataire, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Coulter et al., 2006). Ils comprennent des antioxydants exogènes essentiellement apportés par l'alimentation comme le  $\beta$ -carotène, la vitamine E et la vitamine C qui ne sont pas synthétisés par l'organisme ainsi que des antioxydants endogènes comme le glutathion, l'acide urique, le coenzyme Q, la mélatonine ou encore les œstrogènes. Voici quelques exemples : le caractère hydrophobe de **la vitamine E** lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Aux concentrations physiologiques, **la vitamine C** est capable d'empêcher l'oxydation des LDL (de l'anglais Low Density Lipoprotein). De plus lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée. La plupart des **caroténoïdes** comme le  $\beta$ -carotène interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés (APGI). **Le glutathion**, première ligne de défense antiradicalaire est un tripeptide. Sa forme réduite (GSH) joue un rôle dans la détoxification en réagissant avec  $H_2O_2$  ou ROOH (Hatcher et al., 1995). Grâce à son pouvoir réducteur, il est impliqué dans la prévention de l'oxydation des groupements thiols et il piège les ROS en réagissant notamment avec le radical hydroxyle.

Au niveau cellulaire, il semble actuellement évident que **les œstrogènes** (œstradiol, œstrone, œstriol) exercent des propriétés antioxydantes. Pourtant la plupart des travaux ont surtout examiné la capacité des œstrogènes à protéger l'intégrité membranaire plutôt que du stress oxydatif. Ces hormones, tout comme les vitamines C et E, sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique des LDL *in vitro* (McManus et al., 1996).





Ces propriétés antioxydantes pourraient participer aux effets bénéfiques de l'hormonothérapie chez la femme ménopausée vis-à-vis des pathologies cardiovasculaires.

### ***1.1.3.2. Les systèmes enzymatiques :***

Ils constituent la défense antioxydante la plus efficace. Ces enzymes existent à l'état endogène et permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases, la catalase et la glutathion peroxydase.

#### ***1.1.3.2.1. La superoxyde dismutase (SOD) :***

La superoxyde dismutase est une métalloenzyme. Elle peut être cytoplasmique sous forme de Cu/Zn-SOD ou mitochondriale sous forme Mn-SOD (Zelko et al., 2002). Ces différents types de SOD catalysent la même réaction en accélérant la vitesse de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène:



L'  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit par la SOD doit être rapidement métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase pour éviter la formation des  $\cdot\text{OH}$ .

#### ***1.1.3.2.2. La catalase (CAT) :***

La catalase est une enzyme héminique majeure de détoxification radicalaire qui est présente majoritairement dans les peroxysomes, les érythrocytes et dans les mitochondries. Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène :



#### ***1.1.3.2.3. La glutathion peroxydase (GPx) :***

La GPx est une enzyme qui se localise dans la mitochondrie et dans le cytosol. Elle décompose les hydroperoxydes d'origine lipidiques (ROOH) et le peroxyde d'hydrogène. L'enzyme possède une

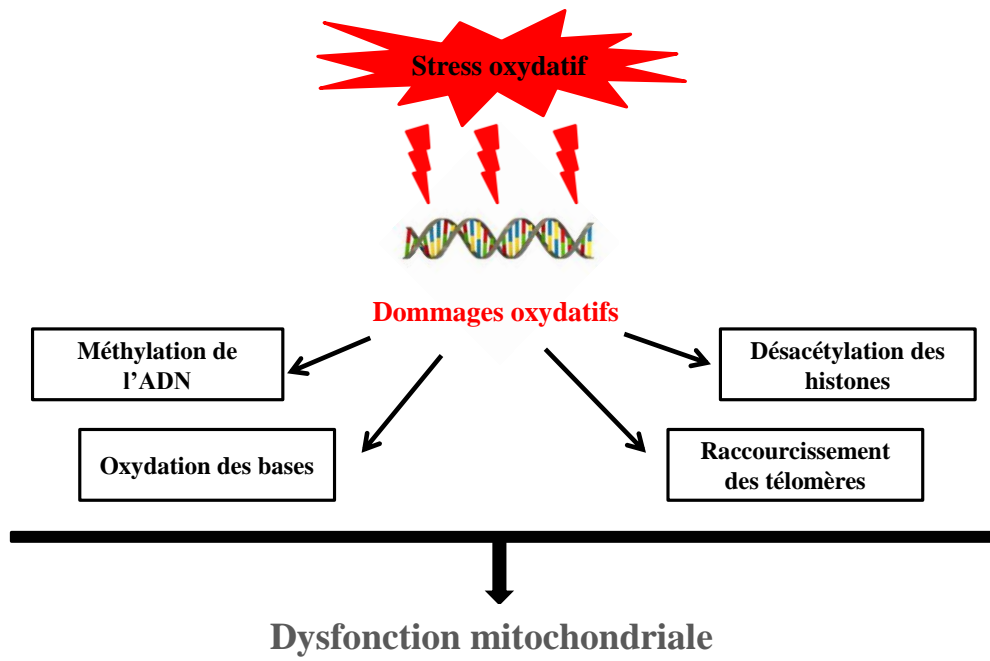
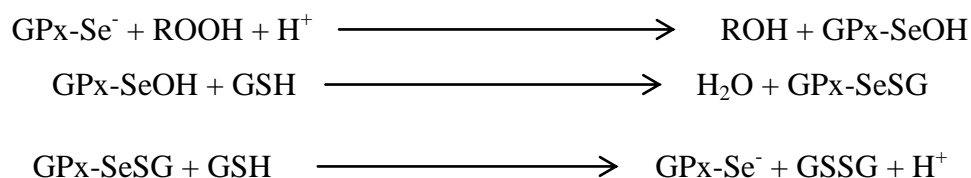


Figure 2 : Les dommages de l'ADN mitochondrial dus au stress oxydatif. D'après (Cooke, 2003).

grande spécificité pour le glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène au cours des réactions de décomposition, il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG) (Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013) :

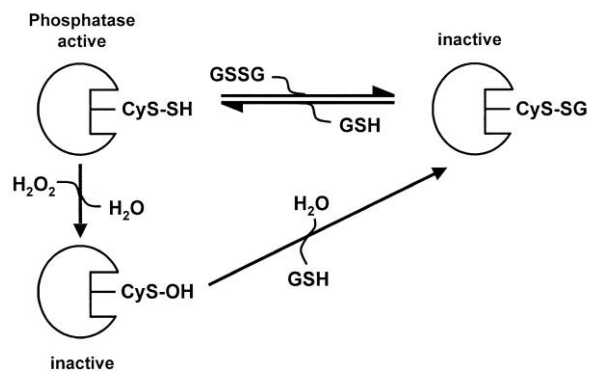


#### **I.1.4. Les cibles biologiques des ROS:**

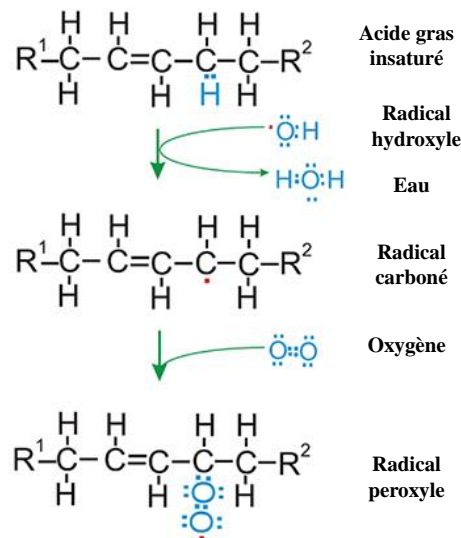
Les ROS peuvent être responsables, d'une manière directe ou indirecte, de dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...). Si cette production radicalaire est importante et/ou les systèmes antioxydants ne sont pas suffisamment efficaces, une cascade radicalaire se met en place rapidement et affecte les tissus avoisinants.

##### ***I.1.4.1 Oxydation de l'ADN :***

L'ADN (nucléaire et/ou mitochondrial) est une cible privilégiée de l'oxydation (figure 2). Le plus souvent, ce sont les bases azotées (purine et/ou pyrimidine) qui sont les cibles privilégiées. Le radical hydroxyle est particulièrement impliqué dans l'oxydation de l'ADN. Il peut par exemple réagir avec les purines en se liant à la double liaison en 5,6 des pyrimidines pour former des pyrimidines glycols ou à la double liaison en 7,8, formant ainsi le 8-oxo-7,8-dihydrodésoxyguanosine (8-oxo-dG). Ce dernier par exemple possède un fort pouvoir mutagène conduisant à des transversions de type G-T (Chatgililoglu et O'Neill, 2001). Il est maintenant communément admis que ces lésions générées par oxydation de l'ADN sont impliquées dans le vieillissement, la mutagenèse, la carcinogenèse, l'inflammation ou encore la mort cellulaire (Cooke, 2003).



**Figure 3 : Les voies d'inhibition de la tyrosine phosphatase des protéines par les ROS ou par des changements de l'état redox thiol / disulfure.** Un résidu de cystéine dans le site catalytique de la phosphatase est essentiel pour son activité catalytique. L'inactivation peut se produire soit par réaction avec le peroxyde d'hydrogène pour former un dérivé acide sulfénique ou par réaction avec le glutathion disulfure, ce qui entraîne la formation des glutathionation du résidu cystéine. La réactivation peut se produire par réaction avec le glutathion réduit ou d'autres composés thiol (Dröge, 2002).



**Figure 4 : Illustration de l'oxydation des lipides.** La peroxydation lipidique est une réaction autocatalytique qui se définit par un enchaînement de réactions radicalaires : une première réaction produit un radical carboné par rupture homolytique d'une liaison carbone-hydrogène. Ce premier produit réagit ensuite avec l'oxygène pour former le radical peroxy. D'après (Aikens et Dix, 1993)

#### ***1.1.4.2. Oxydation des protéines :***

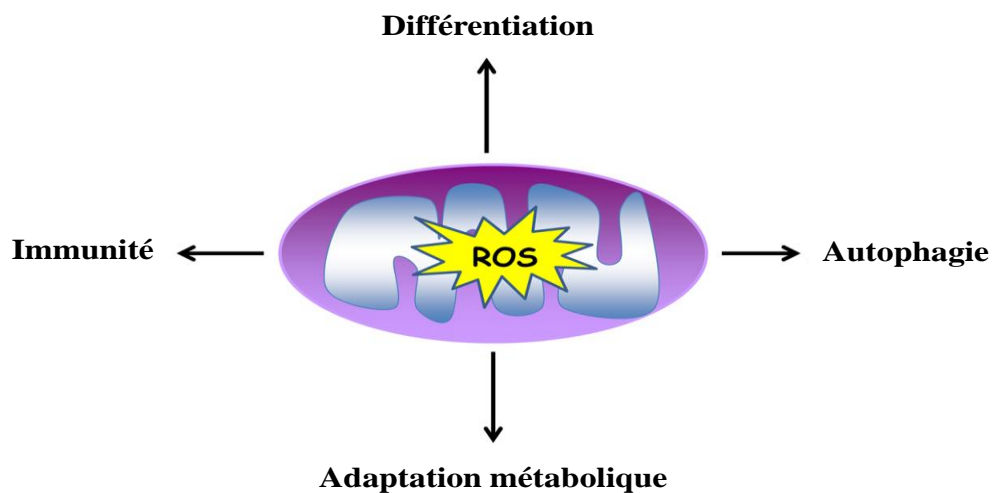
Les protéines sont oxydées en permanence dans des conditions physiologiques normales. Tous les résidus d'acides aminés d'une protéine sont soumis à des attaques radicalaires par les ROS et les RNS. Les résidus Tyr, Phe, Trp, His, Met et Cys sont les sites cibles privilégiés pour les radicaux hydroxyles. De plus en plus de preuves suggèrent que les ROS peuvent causer des modifications post-traductionnelles visant à modifier ou inhiber des voies de signalisation. Par exemple (figure 3), l' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut oxyder les groupes thiols (-SH) sur les résidus de cystéine pour former de l'acide sulfénique (-SOH), qui peut réagir avec des thiols adjacents pour former une liaison disulfure (-SS-), ou avec des amides pour former un amide de sulfényle (-SN-) (Kirkland, 1991). Chacune de ces modifications peut modifier l'activité de la protéine cible, altérant ainsi sa fonction dans une voie de signalisation par exemple. La réaction des protéines avec les ROS peut également conduire à la formation de nouveaux radicaux organiques (Davies et al., 1995)

Les modifications oxydatives des protéines sont associées au vieillissement et à un certain nombre de maladies, y compris la maladie d'Alzheimer, la dystrophie musculaire, l'athérosclérose, le diabète, la maladie de Parkinson et bien d'autres (Berlett et Stadtman, 1997)

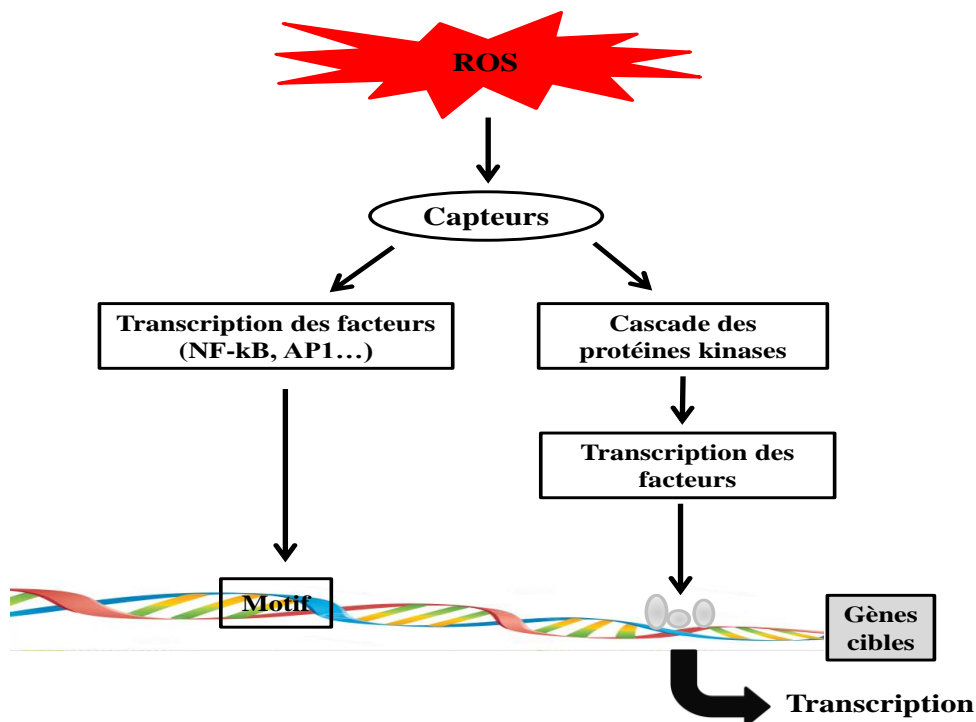
#### ***1.1.4.3. Oxydation des lipides :***

Les lipides sont non seulement une réserve d'énergie, mais aussi des constituants essentiels des membranes cellulaires. La peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des membranes cellulaires sont la cible principale des ROS. La position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre deux doubles liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation par les métaux et les radicaux libres (figure 4). Les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes ( $\text{ROO}^\bullet$ ) sont les plus réactifs vis-à-vis des acides gras polyinsaturés. Ils peuvent entraîner des réactions en chaînes, amplifiant ainsi la réaction d'oxydation. La peroxydation lipidique entraîne en effet la formation en cascade d'éléments radicalaires qui agissent à leur tour au niveau de différentes cibles (protéines, ADN ... etc.). Elles induisent la formation de métabolites comme le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonène (4-HNE) qui peuvent non seulement altérer la fluidité et la fonction des membranes (Chen et Yu, 1994) mais qui sont aussi capables de réagir avec l'ADN et de former des adduits mutagènes.

Ainsi, il en résulte une inactivation des enzymes membranaires, une augmentation de la perméabilité membranaire, ainsi qu'une altération du fonctionnement des mitochondries par inhibition de la chaîne respiratoire.



**Figure 5 : Rôle physiologique des espèces réactives dérivées de l'oxygène** (Sena et Chandel, 2012). Les espèces réactives dérivées de l'oxygène jouent un rôle dans divers processus cellulaires y compris la différenciation, l'autophagie, l'adaptation métabolique, et l'activation des cellules immunitaires.



**Figure 6 : Les principales voies de signalisation activées en réponse à un stress oxydatif.** Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) servent de molécules de signalisation. Les ROS peuvent activer la transcription de gènes de deux manières : ou bien par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que NF-kB, AP-1, qui peuvent interagir directement avec des motifs d'ADN spécifiques dans les promoteurs de gènes cibles, ou bien via l'activation de cascades de MAPK, qui à leur tour activent les facteurs de transcription qui déclenchent la transcription des gènes cibles. NF-kB = facteur nucléaire kB; AP-1 = activateur de la protéine-1. D'après Helenius et al. (1996) et Son et al. (2011).

### **I.1.5. Effets bénéfiques // effets délétères des ROS :**

Le rôle physiologique des ROS n'est plus à démontrer. Ils participent aux phénomènes de régulation et d'homéostasie cellulaire (figure 5). En effet, la production de ROS continue et en faible quantité dans nos différents tissus est maintenant reconnue comme un mécanisme central de signalisation (figure 6) pour une vaste gamme de voies métaboliques (Sena et Chandel, 2012). Les ROS interviennent ainsi dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (croissance, différenciation, apoptose...), de la production d'énergie, du fonctionnement des canaux ioniques et de la réponse inflammatoire.

Les ROS sont capables d'exercer un rôle inducteur vis-à-vis de certains gènes qui codent pour des facteurs de transcription ayant un rôle dans la signalisation de protéines en réponse à plusieurs stress comme l'hypoxie, le choc thermique ou encore le choc inflammatoire.

En condition d'hypoxie, les ROS augmentent la transcription des gènes codant pour la famille des facteurs inductibles (HIF). Ces derniers orchestrent la promotion de l'expression de l'érythropoïétine (EPO), ainsi que l'activation du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et les enzymes de la glycolyse. Ces protéines vont ainsi permettre d'améliorer la production de globules rouges dans le sang, de promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et de maintenir la production d'ATP.

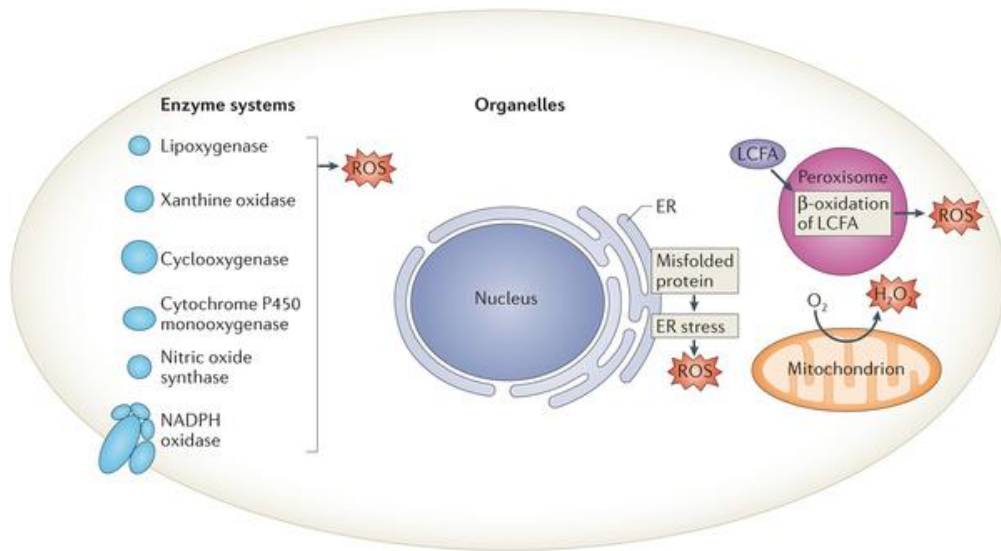
Madamanchi et al. (2001) ont montré que l' $H_2O_2$  régule la production de molécules chaperonnes comme le HSP70 (Heat Shock Protein 70) via l'induction de la liaison des STATs (de l'anglais Signal Transducers and Activators of Transcription) sur les sites de fixation du promoteur du HSP70, permettant ainsi aux cellules du muscle lisse vasculaire de s'adapter au stress oxydatif.

Au cours de choc inflammatoire, les ROS sont impliqués dans l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), une protéine impliquée dans l'activation de la phagocytose et dans la réponse au stress cellulaire (Ji, 2007). Il semble de plus que la NF- $\kappa$ B joue un rôle dans le processus du vieillissement. Le blocage de cette protéine a induit une augmentation de la longévité chez la souris (Salminen et Kaarniranta, 2009), ce qui supporte l'implication des ROS dans la régulation du vieillissement.

Les ROS modulent également de nombreuses réponses physiologiques au niveau du muscle squelettique et cardiaque. Ainsi lors d'un exercice physique chronique, l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes est activée via des protéines sensibles au statut redox comme la NF- $\kappa$ B et la JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Ji, 2007). Ces aspects seront plus spécifiquement développés dans la partie I.3.

Les taux de ROS ont donc besoin d'être finement régulés. L'organisme ne cherche pas à les détruire mais à contrôler leur niveau par une régulation fine des gènes antioxydants et de leurs





Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 7 : Sources intracellulaires des espèces réactives dérivées de l'oxygène ROS (Holmström et Finkel, 2014).** Il existe des sources de ROS non enzymatiques représentés particulièrement par la mitochondrie et d'autres qui sont enzymatiques comme la cyclooxygénase, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase.

mécanismes d'adaptation. **Où finit le rôle physiologique des ROS et où commence leur toxicité ?** Il est actuellement difficile de répondre à cette question. La toxicité des ROS (stress oxydant) résulte de l'excès de production des ROS ou d'un défaut de la capacité antioxydante. Les pathologies dans lesquelles interviennent les ROS sont nombreuses. Leurs effets potentiellement délétères vis-à-vis des constituants cellulaires peuvent conduire à une variété de maladies chroniques et dégénératives (cardiovasculaires, Alzheimer, cancer, maladies inflammatoires, asthme et diabète) (Pham-Huy et al., 2008).

Le stress oxydant est impliqué non seulement dans l'étiologie de plusieurs maladies plurifactorielles mais aussi dans les réponses à diverses situations comme par exemple lors d'un exercice aigu et intense ou de l'ischémie-reperfusion.

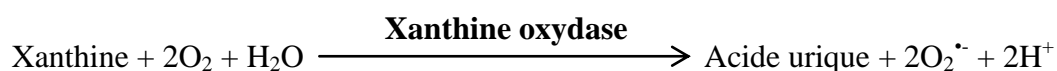
Les réponses adaptatives lors de l'exercice seront développées dans la partie I.3.

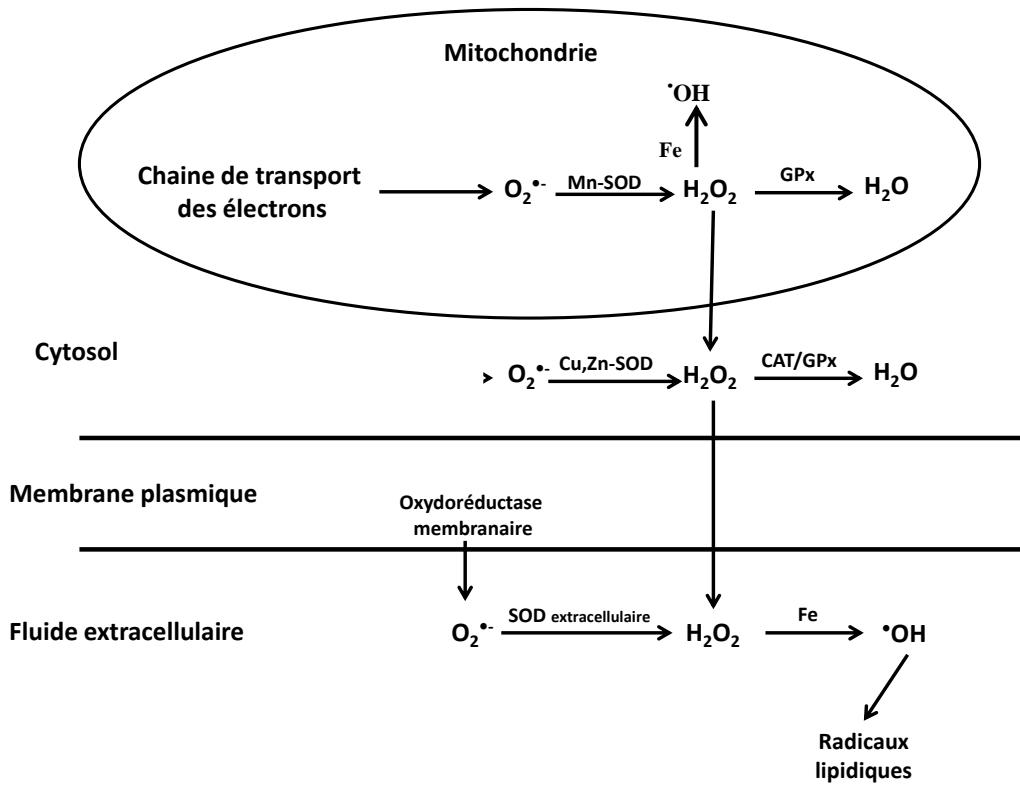
### **I.1.6. Les principales localisations des ROS :**

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources enzymatiques et non enzymatiques de ROS (Gandhi et Abramov, 2012) (figure 7). Les principales enzymes concernées sont la xanthine oxydase et la NADPH oxydase. Toutefois, la source qui fera ici l'objet d'une attention particulière se situe dans la mitochondrie au niveau de la chaîne respiratoire.

#### ***I.1.6.1. La xanthine oxydase :***

La xanthine oxydase est une molybdo-enzyme cytoplasmique. Chez les mammifères, sa localisation est principalement hépatique et intestinale. Elle catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine notamment lors des processus d'ischémie-reperfusion. Contrairement à la xanthine déshydrogénase (forme native) qui agit en conditions aérobies et qui utilise les mêmes substrats (hypoxanthine ou xanthine) ainsi que le NAD comme cofacteur pour produire la NADH et l'acide urique, la xanthine oxydase utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons produisant ainsi l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Chung et al., 1997):

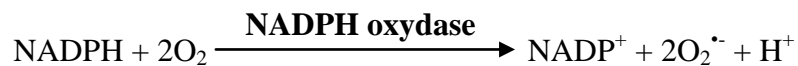




**Figure 8 : Illustration des différents sites et interactions de ROS produites par les cellules du muscle squelettique (Jackson, 2005).** L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et l'ion hydroxyle ( $\cdot OH$ ) produits dans la mitochondrie peuvent difficilement traverser la membrane mitochondriale par contre le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peut facilement traverser la membrane mitochondriale et la membrane plasmique et initier ainsi la formation du  $\cdot OH$  au niveau des fluides extracellulaires.

### ***1.1.6.2. La NADPH oxydase :***

La NADPH oxydase est une enzyme membranaire. Elle est localisée essentiellement dans les cellules phagocytaires et joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Babor, 1999). Elle est également localisée dans les cellules non phagocytaires comme les cellules endothéliales vasculaires et les fibroblastes. Au niveau vasculaire, la NADPH oxydase est activée par l'angiotensine II et la thrombine via les récepteurs couplés à la protéine G (Brandes et Kreuzer, 2005), catalysant ainsi la formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:



### ***1.1.6.3. La mitochondrie, principale source des ROS :***

Dans la plupart des cellules, la mitochondrie est le siège principal de la production d'énergie mais aussi la principale source de ROS puisqu'elle produit 90% des ROS cellulaires. D'après Cadenas et Davies (2000), lors de l'activité de la chaîne respiratoire, environ 98% de l'oxygène est réduit en eau et entre 1% et 2% de cet oxygène est transformé en anion superoxyde. Toutefois, des études plus récentes ont rapporté que seulement 0,15% de la consommation d'oxygène au niveau mitochondriale est convertie en ROS (Brand, 2010). Cette production radicalaire physiologique est liée à une fuite d'électrons localisée au niveau de l'ubiquinone qui transfère les électrons du complexe I ou II au complexe III (ces mécanismes seront développés dans la partie I.2) L'O<sub>2</sub> subit alors une réduction univalente et se transforme en anion superoxyde lui-même à l'origine de la formation des autres ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et <sup>•</sup>OH) (Turrens, 2003). La diffusion des ROS (de la mitochondrie vers le cytoplasme) dépend en partie de leur nature chimique (Jackson, 2005). L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est une espèce chimique polarisée. Elle peut donc difficilement traverser les membranes hydrophobes comme la membrane mitochondriale (sauf via les canaux ioniques). L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> d'origine mitochondriale n'est donc pas directement responsable d'une augmentation du taux de ROS dans le milieu extracellulaire. Cependant, au sein de la mitochondrie, l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est transformé en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sous l'action de Mn-SOD. Contrairement à l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut facilement traverser la membrane mitochondriale (figure 8). Ainsi, des études ont montré que la majeure partie de l'augmentation extracellulaire du taux de peroxyde d'hydrogène au cours de l'activité contractile musculaire peut provenir principalement des mitochondries et diffuser à travers les membranes subcellulaires et plasmiques. Quant aux <sup>•</sup>OH, espèces chimiquement neutres mais très réactives, ils diffusent peu et exercent donc leurs effets localement.

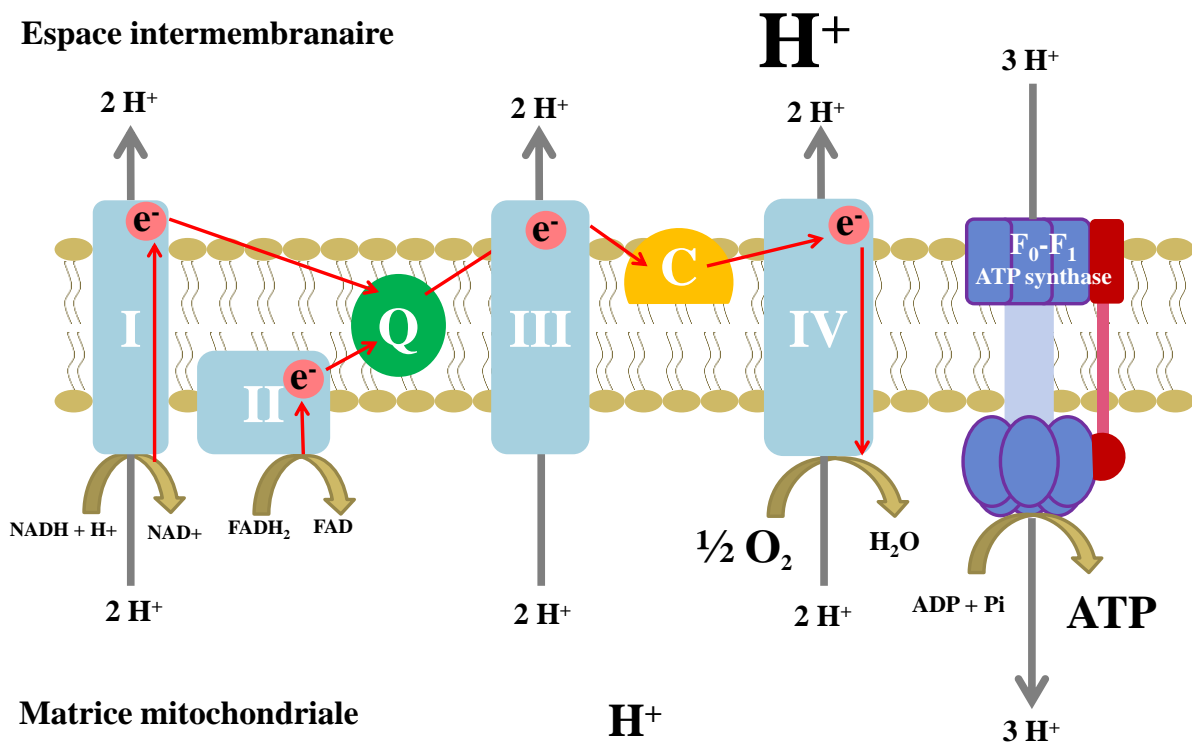
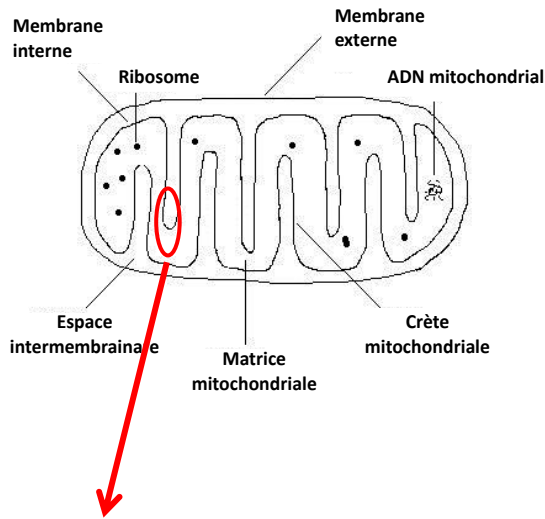


Figure 9 : Structure de la mitochondrie et fonctionnement de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative.

## **I.2. La mitochondrie :**

### **I.2.1. Généralités :**

#### ***I.2.1.1. Historique :***

Jusqu'au début des années 20, sur la base d'observations morphologiques, la mitochondrie était perçue comme un organite cellulaire pourvu de protéines et de lipides et lié à la respiration cellulaire. La chaîne respiratoire mitochondriale fut décrite pour la première fois en 1925 lors de la découverte des cytochromes par David Keilin (1925). Le lien entre mitochondrie et respiration cellulaire a été confirmé par Albert Claude (1944) après avoir réussi à isoler la cytochrome oxydase et d'autres enzymes de la chaîne respiratoire à partir d'extraits mitochondriaux. Par la suite, c'est en 1957, que le terme de « centrale énergétique » de la cellule fut donné par Philip Siekevitz, représentant la mitochondrie comme un organite possédant son propre ADN et dont la fonction première est la production d'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire.

En 1961, la théorie décrivant la synthèse d'ATP par l'intermédiaire d'un couplage électrochimique de protons au niveau mitochondrial fut émise par Peter (Mitchell, 1961). Ce biochimiste a proposé qu'un gradient de concentration électrochimique de protons à travers les membranes internes des mitochondries puisse être mis à profit pour fabriquer de l'ATP. Cette importante contribution à la compréhension du transfert d'énergie biologique par la formulation de la théorie chimiosmotique lui a permis de recevoir le prix Nobel de chimie de 1978. Le mécanisme enzymatique de la synthèse de l'ATP et le rôle central de l'ATP synthase dans ce processus fut élucidé par Paul Boyer et John Walker dans les années 80, ce qui leur a permis l'obtention du prix Nobel de chimie cette même année (Boyer, 1997).

#### ***I.2.1.2. Structure :***

La mitochondrie est composée de deux compartiments (matrice et espace intermembranaire) délimités par deux membranes (interne et externe). Elle possède son propre ADN (ADNmt) qui code pour treize protéines de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative (figure 9). La membrane externe est une bicouche phospholipidique relativement simple, contenant des porines qui la rendent perméable aux molécules hydrophiles de faible masse moléculaire telles que les anions, les cations, les acides gras, le pyruvate ou les nucléotides.



La structure de la membrane interne est très différente. Elle forme des invaginations qui apparaissent sous forme de crêtes augmentant ainsi sa surface. Elle est beaucoup moins perméable que la membrane externe mitochondriale et héberge des transporteurs, les enzymes de la chaîne respiratoire et le complexe  $F_0-F_1$  ATP synthase.

L'espace inter-membranaire contient des protons qui proviennent du fonctionnement de la chaîne respiratoire ainsi que des enzymes de type kinases comme par exemple la créatine kinase qui catalyse la conversion de la créatine en phosphocréatine, impliquant la conversion de l'ATP en ADP.

Enfin, la matrice contient des enzymes intervenant dans les phénomènes de réplication, de transcription, et de traduction du matériel génétique mitochondrial, mais aussi des enzymes qui sont responsables de la  $\beta$ -oxydation, des réactions du cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) et de défense antioxydante (Mn-SOD).

Pendant longtemps, les mitochondries ont été considérées comme des structures ovoïdes bien individualisées. Il a été récemment montré qu'elles sont en réalité organisées en réseaux qui constituent une structure dynamique qui fissionne et fusionne constamment au sein de la cellule (Blick et al., 2013)

#### ***1.2.1.2. Fonctions :***

Même si la mitochondrie a pour principale fonction de produire de l'énergie, elle est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires. Elle intervient par exemple dans la régulation du taux de calcium cytoplasmique. Des études ont montré que l'absorption de  $Ca^{2+}$  mitochondrial était un véritable mécanisme cellulaire suggérant que les mitochondries joueraient un rôle de tampon physiologique du  $Ca^{2+}$  qui prévient et/ou retarde la propagation de la vague calcique dans d'autres compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique (Williams et al., 2013).

La mitochondrie joue également un rôle clé dans l'activation de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Chez les mammifères, lorsque la voie apoptotique mitochondriale est activée, des mégapores membranaires se créent, ce qui permet le passage du cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c déclenche alors une cascade de réactions qui aboutissent à l'activation de caspases, protéines directement responsables du phénomène apoptotique (Estaquier et al., 2012). **Néanmoins, le rôle physiologique primordial de la mitochondrie est la production d'énergie sous forme d'ATP au niveau de sa membrane interne via la phosphorylation oxydative.**





## **I.2.2. La phosphorylation oxydative :**

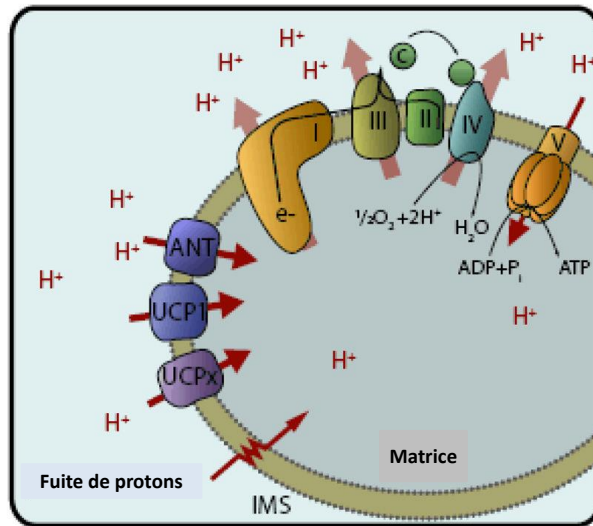
### ***I.2.2.1. Son fonctionnement :***

La phosphorylation oxydative correspond à la consommation d'oxygène au niveau de la respiration mitochondriale associée à une phosphorylation de l'ADP en ATP. La mitochondrie est l'organite qui permet que l'énergie contenue dans les liaisons moléculaires des métabolites provenant des aliments ingérés, soit convertie en ATP (figure 9). Au niveau de la matrice mitochondriale, le catabolisme des glucides, acides gras et acides aminés, via le cycle de Krebs et la  $\beta$  oxydation, permet de fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits sous forme de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  et de  $\text{FADH}_2$ . Ces molécules sont réoxydées par transfert de leurs électrons sur l'oxygène, accepteur final des électrons. Cette étape est réalisée par l'intermédiaire d'une chaîne de transport constituée de complexes protéiques au travers desquels les électrons vont transiter en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction. Chaque couple d'électrons est d'abord transféré au complexe I pour le  $\text{NADH} + \text{H}^+$  et sur le complexe II pour le  $\text{FADH}_2$ . La coenzyme Q assure ensuite le transfert des électrons jusqu'au complexe III. Le cytochrome C permet alors le transfert des électrons vers le complexe IV (COX) qui permet la réduction de l'oxygène en eau. Au niveau des complexes protéiques I, III et IV, le transfert des électrons s'accompagne d'un transfert de protons contre le gradient de concentration de la matrice vers l'espace inter-membranaire. L'accumulation des protons dans l'espace inter-membranaire crée un gradient électrochimique par combinaison avec la différence de potentiel trans-membranaire (-150 mV). Ce gradient est utilisé par la  $\text{F}_0\text{-F}_1$  ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'ATP ainsi formé est alors exporté dans le cytosol grâce à la translocase des nucléotides adényliques (ANT). Cet enzyme échange l'ATP mitochondrial contre l'ADP cytosolique.

### ***I.2.2.2. Sa régulation :***

#### ***I.2.2.2.1. Notion de contrôle respiratoire :***

La dépendance de la vitesse de consommation d' $\text{O}_2$  vis-à-vis de la disponibilité en ADP et donc de l'utilisation de l'ATP est appelée « contrôle respiratoire ». Ce dernier va permettre aux mitochondries d'adapter leur fonctionnement à la demande énergétique. Ainsi deux états respiratoires ont été mis en évidence sur des mitochondries isolées :



**Figure 10 : Transfert et fuite des protons à travers la membrane interne mitochondriale** (Jastroch et al., 2010). Les protons sont transférés contre le gradient de concentration hors de la matrice vers l'espace intermembranaire (IMS) par des complexes I, III et IV de la chaîne de transport d'électrons. Cela établit une force proton motrice ( $\Delta p$ ) à travers la membrane interne. Les protons retournent dans la matrice par l'ATP synthase ce qui permet d'utiliser le  $\Delta p$  pour la synthèse d'ATP. Tous les autres moyens retours des protons constituent la fuite. Les mécanismes de fuite de protons comprennent les mouvements directs à travers la membrane phospholipidique, la diffusion à travers les protéines membranaires, ou le transport inductible par la translocase adénine nucléotide (ANT) ou les protéines de découplage (UCP).

\* *un état de repos (stade 4)* : en absence de phosphorylation, les oxydations sont limitées par l'accumulation de protons dans l'espace inter-membranaire. La consommation d'O<sub>2</sub> est dite basale.

\* *un état activé (stade 3)* : en présence d'ADP, l'ATP synthase est stimulée et phosphoryle l'ADP en ATP.

La théorie chimiosmotique de Peter Mitchell (1961) explique ce mécanisme de contrôle respiratoire puisque l'ajout d'ADP qui stimule l'ATP synthase, s'accompagne d'une diminution du gradient de H<sup>+</sup>. Les complexes enzymatiques qui transfèrent les H<sup>+</sup> vers l'espace inter-membranaire sont alors stimulés ce qui entraîne une augmentation de la respiration (Kadenbach, 2003). *In vivo*, le fonctionnement mitochondrial oscille entre les stades 3 et 4.

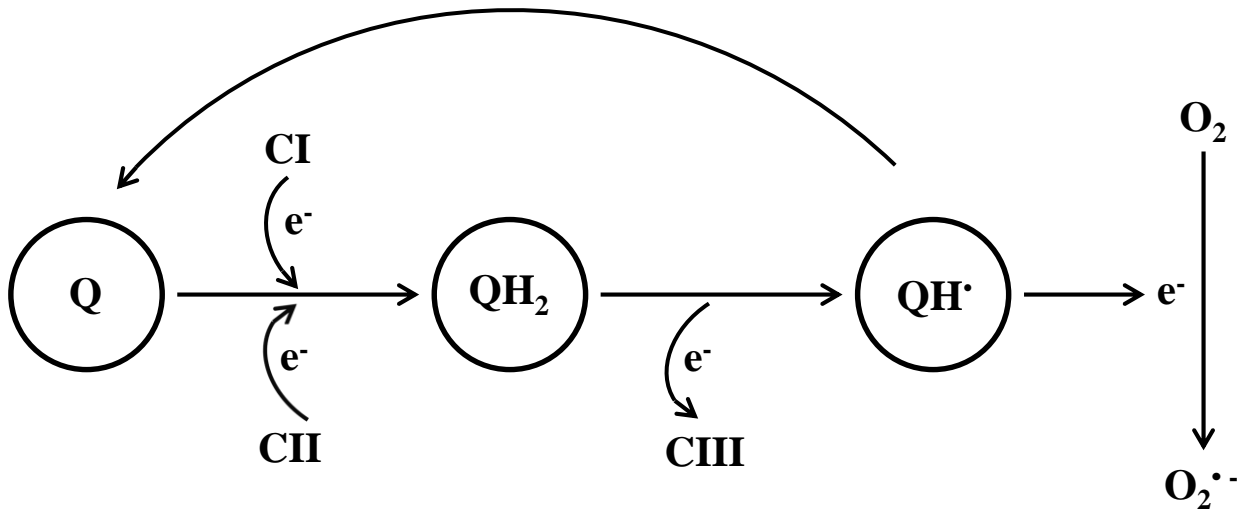
#### *1.2.2.2.2. Contrôle de l'efficacité de la production d'ATP :*

L'efficacité de la synthèse d'ATP est définie par la quantité d'ATP produite par molécule d'oxygène consommée (rapport ATP/O). Ce ratio varie selon les substrats entre 1,5 et 2,5. Ce rendement peut aussi être influencé soit par la modification de la force protomotrice (découplage extrinsèque) soit par modification de l'efficacité du transfert des H<sup>+</sup> (découplage intrinsèque).

*A- Découplage extrinsèque* : il s'agit de l'augmentation de la perméabilité membranaire (fuite ou leak) aux protons (figure 10) et aux cations, ce qui engendre une diminution du gradient de H<sup>+</sup>. Cette fuite de H<sup>+</sup> à l'origine du découplage peut être **basale** (influencée par la propriété physicochimique de la membrane) ou **inductible** (dépendante de facteurs comme les protéines découplantes (UCP) ou les acides gras) :

\* *fuite basale* : le couplage par la force protomotrice entre respiration mitochondriale et synthèse d'ATP n'est pas parfait. Une partie des H<sup>+</sup> retournent dans la matrice par simple diffusion. Cette fuite de H<sup>+</sup> basale peut représenter jusqu'à 50% du métabolisme de base du muscle squelettique chez le rat (Jastroch et al., 2010). Une participation des ANT à la fuite basale a été mise en évidence dans le tissu adipeux brun.

\* *fuite inductible* : dans les années 80, une famille de protéines découplantes, les UCP (de l'anglais Uncoupling Protein) a été découverte (Lin et Klingenberg, 1980). Ce sont des protéines mitochondriales localisées au niveau de la membrane interne. Il avait été établi qu'elles étaient exclusives du tissu adipeux brun chez les mammifères et qu'elles étaient impliquées dans la thermogénèse (production de chaleur) en réponse à l'exposition au froid. Plusieurs isoformes, UCP 1 à UCP 5, ont depuis été mis en évidence dans différents tissus, même si, à ce jour, leurs rôles ne



**Figure 11 : Sites et mécanisme de la fuite d'électrons.** Dans le complexe III, QH<sub>2</sub> est oxydé en QH•. Ce dernier catalyse le transfert direct d'un électron à l'oxygène induisant ainsi la formation de l'O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>. Q, QH<sub>2</sub> et QH• sont respectivement l'ubiquinone, l'ubiquinol et la semiquinone. D'après Jastroch et al. (2010).

sont pas totalement définis. Les UCP 2 et 3 transporteraient les  $H^+$  selon le gradient de concentration et interviendraient dans la baisse de production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, Brand et al. (2004) ont suggéré que les UCP pourraient répondre à une augmentation de la production d'anion superoxyde en provoquant un découplage modéré (mild uncoupling). La dissipation du gradient de  $H^+$  servirait ainsi à atténuer la production de ROS (Skulachev, 1996).

*B- Découplage intrinsèque* : il est défini par une diminution d'activité de transfert des  $H^+$  (patinage ou 'slipping') par les complexes de la chaîne respiratoire. Lorsque les complexes sont parfaitement couplés, le rapport entre le flux d'électrons et le flux de protons expulsé est constant. Si ces complexes patinent, il y'a une perte d'efficacité, l'expulsion de protons devient moindre pour un même flux d'électrons (Murphy, 1989).

### **I.2.3. La mitochondrie est la source principale de production des ROS :**

La production de ROS est liée au flux d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale et au degré de réduction des transporteurs d'électrons. La fuite d'électrons se produit principalement au niveau de l'ubiquinone (coenzyme Q). En conditions d'acheminement parfait des électrons, la coenzyme Q accepte les électrons provenant des complexes I et II, pour les faire passer au complexe III. Cependant, le cycle de l'ubiquinone décrit une série de réactions d'oxydation et de réduction. L'ubiquinone est réduite par la prise en charge des électrons provenant des complexes I ou II, produisant l'ubiquinol ( $QH_2$ ). Cette forme réduite est oxydée par le complexe III et se transforme en une forme radicalaire de l'ubiquinone, la semiquinone ( $QH^\bullet$ ). Le  $QH^\bullet$  catalyse le transfert direct d'un électron à l'oxygène induisant la réduction univalente de ce dernier et ainsi sa transformation en anion superoxyde (figure 11) (Jastroch et al., 2010).

Tout processus qui tend à diminuer la demi-vie du radical  $QH^\bullet$  diminue la probabilité de formation de ROS. Ainsi la production de ROS est plus élevée en stade 4 qu'en stade 3.

En stade 4, le potentiel membranaire est élevé (en raison d'une augmentation de la force protomotrice), la production d'anion superoxyde augmente. La consommation d' $O_2$  résiduelle (découplée de la synthèse d'ATP) est essentiellement liée au maintien du potentiel membranaire en réponse à la fuite basale de protons (Mailloux et Harper, 2011). En stade 3, le potentiel membranaire est faible (en raison de la diminution du gradient de protons), la production d'anion superoxyde diminue. La consommation d' $O_2$  est alors essentiellement liée au retour des protons via le complexe  $F_0-F_1$  ATP synthase. La production radicalaire est donc variable selon les



stades respiratoires 3 ou 4. Ainsi, selon la demande énergétique, des modulations de l'activité mitochondriale et de la production de ROS seront observées.

#### **I.2.4. La fonction mitochondriale est une cible des ROS :**

Si la mitochondrie est largement considérée comme l'une des principales sources de ROS intracellulaires, elle n'en demeure pas moins la principale cible en raison de sa forte teneur en protéines (entre 60 et 75%), de sa composition membranaire en lipides (20 à 30%) et de la proximité directe de l'ADN mitochondrial (qui code plusieurs sous unités de la chaîne respiratoire et d'autres constituants de la structure mitochondriale) avec la chaîne respiratoire.

Les ROS sont ainsi potentiellement délétères vis-à-vis du fonctionnement mitochondrial notamment vis-à-vis de la phosphorylation oxydative à différents niveaux.

##### ***I.2.4.1. Altération de la respiration mitochondriale et du complexe $F_0-F_1$ ATP synthase :***

Les ROS peuvent altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale soit directement par oxydation protéique, soit indirectement par oxydation de l'ADN mitochondrial (altération de la synthèse de complexes de transport des électrons) ou par peroxydation lipidique (modification des propriétés physico-chimiques des membranes mitochondriales). Cardoso et al. (1999) ont montré qu'un stress oxydatif peut ainsi inhiber les complexes I, II et III induisant une dysfonction du transport des électrons au sein de la chaîne respiratoire, une diminution de la disponibilité en oxygène et un découplage entre potentiel membranaire et gradient protonique. Les ROS peuvent aussi influencer sur le fonctionnement du complexe  $F_0-F_1$  ATP synthase directement par oxydation protéique ou indirectement par oxydation de l'ADN mitochondrial. Rexroth et al. (2012) ont montré que les ROS peuvent oxyder les sites tryptophane localisés au niveau de la sous unité  $\alpha$  de la  $F_0-F_1$  ATP synthase, ce qui induirait ainsi la perturbation de son intégrité structurelle et une altération de la production d'ATP.

##### ***I.2.4.2. Altération de la perméabilité membranaire mitochondriale :***

La peroxydation des lipides de la membrane mitochondriale induit une perméabilité non spécifique de la membrane mitochondriale qui devient plus perméable pour les ions et pour les protons. L'oxydation des nucléotides pyrimidiques mitochondriaux peut initier une entrée de calcium vers la mitochondrie par augmentation de la perméabilité membranaire non spécifique. Le calcium





peut potentiellement accentuer la production radicalaire mais aussi induire une altération des systèmes de détoxification du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme la glutathion peroxydase. Il en résulte ainsi une accumulation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la mitochondrie (Kowaltowski et Vercesi, 1999).

#### ***1.2.4.3. Altérations des activités des enzymes du cycle de Krebs :***

Une surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut inhiber l'activité des différentes enzymes impliquées dans le cycle de Krebs comme la succinate déshydrogénase, la  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase ou l'aconitase (Cantu et al., 2009; Tretter et Adam-Vizi, 2004). Il en résulte une limitation de la disponibilité en NADH pour la chaîne respiratoire. Ici, l'altération de la production d'énergie se fait ainsi via une limitation de l'apport des métabolites délivrant le flux d'électrons (NADH, FADH<sub>2</sub>) aux complexes I et II.

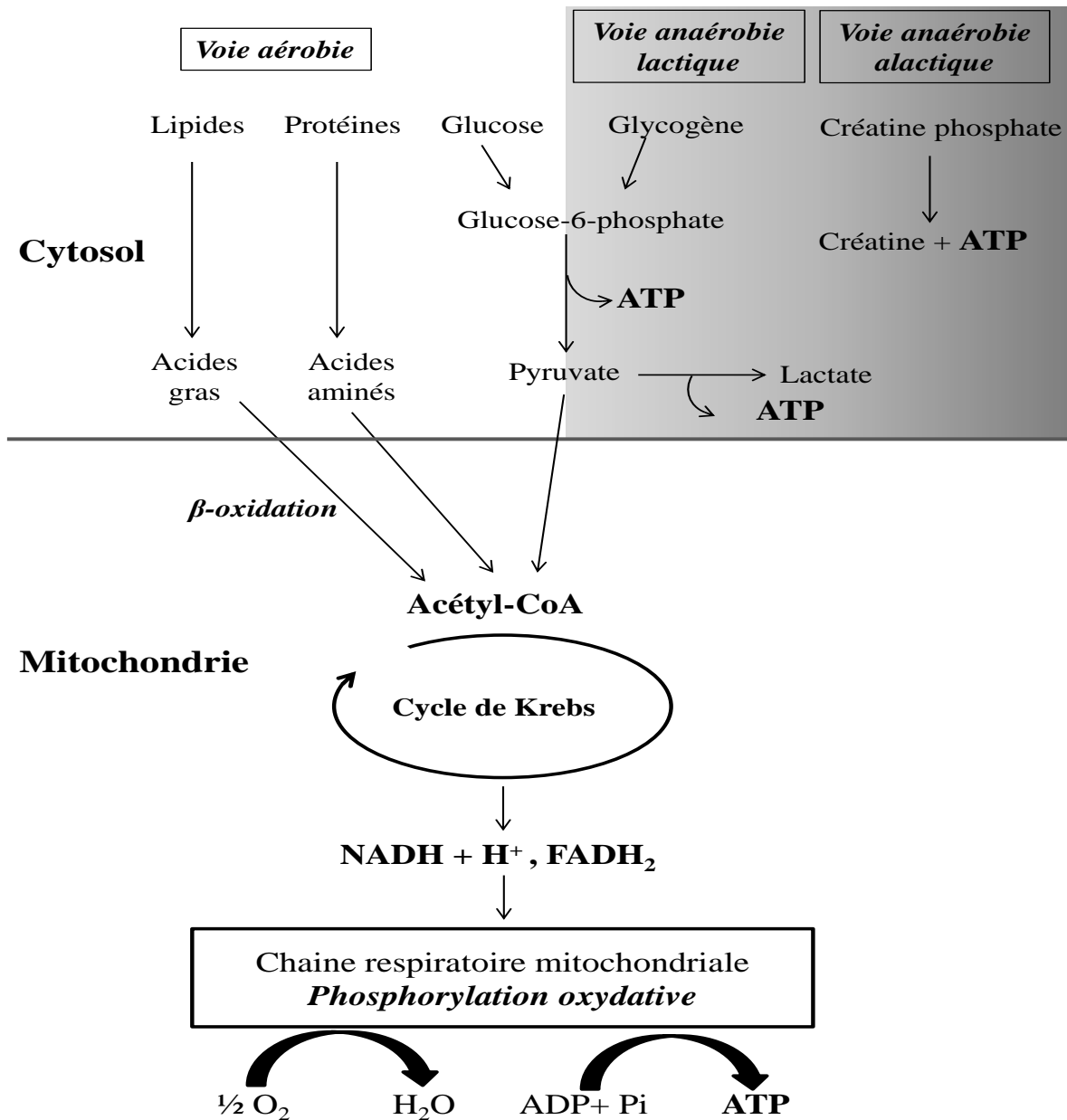
### **I.3. Relation entre radicaux libres et exercice physique :**

Depuis ces 30 dernières années, le rôle des ROS en physiologie de l'exercice a reçu une attention considérable. Il est clairement établi que la formation des ROS en réponse à un effort physique important (exercice intense inaccoutumé et/ou prolongé) peut entraîner un stress oxydatif et donc des dommages structuraux au niveau tissulaire (Davies et al., 1982). Plus récemment (Gomez-Cabrera et al., 2008) ont montré le rôle important des ROS comme molécules de signalisation cellulaire. L'implication des ROS dans la modulation de l'expression génique via les voies de transcription redox représente un mécanisme de régulation important notamment dans les adaptations à l'entraînement. Ainsi, ces mécanismes cellulaires adaptatifs participeraient aux bienfaits de l'activité physique régulière dans la prévention primaire et secondaire de pathologies chroniques plus particulièrement cardiovasculaires.

Dans ce chapitre seront apportés quelques éléments relatifs aux différents types d'exercice et réponses métaboliques et radicalaires au niveau musculaire, squelettique et cardiaque, en se référant à des travaux chez le mammifère et le poisson.

#### **I.3.1. Métabolisme musculaire et activité physique :**

Il existe différents types d'exercice physique. Les principales caractéristiques d'une activité physique donnée sont l'intensité, la durée et la fréquence. Les réponses métaboliques et/ou radicalaires sont étroitement liées au type d'exercice physique considéré.



**Figure 12 : Filières métaboliques aérobie et anaérobie.** Au cours du métabolisme aérobie, l'ATP est synthétisé grâce à l'énergie fournie par l'oxydation (utilisation de l' $\text{O}_2$ ) des glucides, lipides, et quelques protides. Au cours du métabolisme anaérobie (présenté dans le rectangle gris), la dégradation du glycogène engendre de l'acide lactique, c'est l'anaérobie lactique. Lorsque l'énergie est tirée de la dégradation directe de l'ATP qui est produit à partir de la créatine phosphate, il n'y a pas de production de lactate ; il s'agit de l'anaérobie alactique. D'après Mortelette (2010)

### ***1.3.1.1. Voies métaboliques impliquées dans l'exercice musculaire :***

L'énergie musculaire est fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Ce dernier peut être produit via trois voies métaboliques : aérobie, anaérobie lactique et anaérobie alactique (figure 12).

#### **1.3.1.1.1. Le métabolisme aérobie :**

Dans ce système, l'ATP est généré via la dégradation, en présence d'oxygène, des sucres et des lipides et en moindre degré des protéines. La dégradation du glucose conduit à la formation du pyruvate. Ce dernier est décarboxylé, entre dans le cycle de Krebs et fournit les équivalents réduits à la chaîne respiratoire mitochondriale ( $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ). L'oxydation des lipides (stockés sous forme de triglycérides) dans le cytosol conduit à la formation des acides gras qui pénètrent dans la mitochondrie et sont transformés par  $\beta$ -oxydation en acétyl CoA. Ce dernier entre dans le cycle de Krebs produisant ainsi les équivalents réduits. Enfin, l'hydrolyse des protéines fournit les acides aminés dont la dégradation conduit également à la formation de l'acétyl CoA. Chez l'homme, la réserve en glucose n'est pas grande (0,8g/L de sang), mais les réserves en lipides sont considérables (en moyenne 10 kg de lipides pour une personne de 70 kg). **Ainsi, l'exercice physique qui utilise cette voie métabolique est de type endurance, c'est-à-dire peu puissant et peut être maintenu sur une longue durée.**

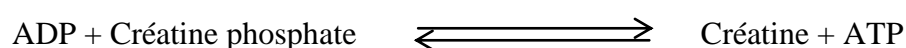
#### **1.3.1.1.2. Le métabolisme anaérobie lactique:**

Ce type de métabolisme utilise les réserves en glycogène (15g/Kg dans le muscle et 15 à 50 g/Kg dans le foie). La dégradation du glycogène musculaire en absence d'oxygène conduit à la formation d'ATP et de lactate. Ce dernier se répand par voie sanguine et est capté par les autres tissus. Au niveau du cœur, le lactate est transformé en substrats énergétiques (pyruvate) et au niveau du foie en glucose.

**L'exercice physique qui utilise majoritairement ce type de métabolisme est puissant et court (moins d'une minute si l'effort est maximal). Lorsqu'il se prolonge, l'accumulation du lactate induit une acidose qui perturbe l'activité musculaire.**

#### **1.3.1.1.3. Le métabolisme anaérobie alactique:**

C'est une filière énergétique très puissante. Lorsque le muscle commence à se contracter au début d'une activité physique, l'ATP est fournie de façon très rapide via une source secondaire présente dans le muscle : la créatine-phosphate.



Type d'exercice	Métabolisme	Type de fibres majoritairement utilisées	Substrats énergétiques
<p><b>Très intense et très bref</b></p> <p>D'une fraction seconde à 10-20s</p> <p>- Mammifère : saut, lancer, sprint</p> <p>- Poisson : nage accélérée (de l'anglais, burst type swimming)</p>	<p>Anaérobie alactique +++</p> <p>Glycolyse anaérobie ++</p>	<p>Rapides</p>	<p>Réserves cellulaires d'ATP et de créatine phosphate puis de glycogène</p>
<p><b>Intense et limité</b></p> <p>- Mammifère : course rapide de 20s à 10min</p> <p>- Poisson : nage prolongée (de l'anglais, prolonger swimming)</p>	<p>Anaérobie alactique ++</p> <p>Glycolyse anaérobie +++</p> <p>Aérobie ++</p>	<p>Rapides ++</p> <p>Intermédiaires +++</p> <p>Lentes +</p>	<p>Utilisation majoritaire des stocks de glycogène</p>
<p><b>Peu intense et continu</b></p> <p>De 10min à une heure ou plus</p> <p>- Mammifère : course d'endurance</p> <p>- Poisson : nage soutenue (de l'anglais, sustained swimming)</p>	<p>Glycolyse anaérobie +</p> <p>Aérobie +++</p>	<p>Rapides +</p> <p>Lentes +++</p>	<p>Utilisation majoritaire des stocks de lipides</p>

**Tableau 1 : Types d'exercice en fonction de l'intensité et les différents types de fibres musculaires et de filières énergétiques sollicités. D'après Mortelette (2010).**

Cette source d'énergie ne nécessite pas la présence d'oxygène et ne s'accompagne pas de formation d'acide lactique. La créatine phosphate constitue un réservoir immédiatement disponible, mais très limité. **Ce qui fait que le processus anaérobie alactique ne peut pas durer plus que quelques secondes. Si l'effort continue, il y aura recours aux autres sources de production d'ATP (filière aérobie et/ou anaérobie lactique).**

#### *1.3.1.2. Les différents types de fibres musculaires :*

Les muscles du mammifère sont hétérogènes et contiennent 3 catégories de fibres en proportion variables. Chez le poisson, ces différentes catégories musculaires sont bien distinctes. Cette typologie musculaire fait du poisson un outil méthodologique intéressant dans le champ de la physiologie de l'exercice.

Les différentes catégories de fibres se différencient essentiellement par les processus métaboliques qu'elles utilisent préférentiellement pour produire l'énergie (tableau 1).

##### *1.3.1.2.1. Les fibres lentes (de type I):*

Ces fibres sont caractérisées par un fort pouvoir oxydatif car elles sont riches en mitochondries et en myoglobine (transporteur intracellulaire principal de l'O<sub>2</sub> dans le muscle) et sont très vascularisées. Elles utilisent donc de préférence le processus aérobie. Elles sont faibles en terme de force mais très endurantes et résistantes à la fatigue.

Chez le mammifère, les fibres de type I sont abondantes dans les muscles lents (muscle cardiaque et muscles qui permettent le maintien de la posture). Chez le poisson, ce type de fibre est représenté par le muscle rouge superficiel (entre 8 et 10% de la masse musculaire squelettique).

##### *1.3.1.2.2. Les fibres rapides (de type IIb):*

Ces fibres sont les plus volumineuses et pauvres en mitochondries. Elles sont riches en glycogène et utilisent presque exclusivement le métabolisme anaérobie lactique et alactique pour produire l'ATP. Elles sont caractérisées par une contraction très rapide et sont rapidement fatigables. Chez le mammifère, ces fibres de type IIb sont très abondantes dans les muscles rapides (comme le muscle triceps). Chez le poisson les fibres rapides sont très abondantes et représentent le muscle squelettique blanc (90% de la masse musculaire squelettique).



### I.3.1.2.3. Les fibres intermédiaires (de type IIa):

Ce type de fibres est intermédiaire entre les fibres lentes et les fibres rapides. L'ATP est produite majoritairement via le processus anaérobie lactique et en moindre proportion via le métabolisme aérobie. Elles sont donc moyennement endurantes, moyennement fortes et moyennement fatigables. Chez le mammifère il s'agit des fibres de types IIa. Chez le poisson, il s'agit du muscle dit « rose » qui est anatomiquement situé entre le muscle rouge et le blanc au niveau de ligne latérale et est constitué d'une fine couche de fibres (moins de 1% de la masse musculaire squelettique).

### ***I.3.1.3. Les différentes catégories d'exercice physique :***

Il existe différents types d'exercice physique (Gomes et al., 2012). En fonction de l'intensité, on distingue l'exercice modéré, intense et très intense (tableau 1). Le recrutement des différents types de fibres musculaires dépend fortement de l'intensité de l'exercice (plus l'exercice est intense, plus le nombre de fibres recrutées est élevé). Les fibres de type I sont recrutées les premières puis les fibres IIa et enfin les fibres IIb. En fonction de la fréquence on distingue également l'exercice aigu et chronique.

#### *I.3.1.3.1. Selon l'intensité :*

##### *A- L'exercice physique peu intense ou modéré :*

Dans ce type d'exercice, la voie métabolique principalement sollicitée est aérobie en présence d'un apport en oxygène suffisant. Son intensité se situe entre 50 et 75% de la capacité aérobie maximale ( $VO_{2max}$ ). Il est supporté par les fibres lentes et il peut être maintenu sur une longue durée (1h ou plus). Chez l'homme, il s'agit d'un jogging ou d'une course de marathon par exemple. Chez le poisson, il s'agit de l'exercice modéré utilisé lors de la recherche de nourriture ou encore lors de migration sur une longue distance chez certaines espèces.

##### *B- L'exercice physique intense :*

Lorsque l'intensité de l'exercice croît et que la valeur du rapport ATP/ADP s'effondre (la production mitochondriale d'ATP n'arrive plus à suivre les besoins musculaires en énergie), la filière anaérobie est alors mise à contribution pour produire de l'ATP. Cet exercice fait donc intervenir à la fois le métabolisme anaérobie lactique et en moindre proportion le métabolisme





aérobie et il peut être maintenu sur une durée limitée (entre 2 et 3 minutes). C'est le cas d'une course de 400 m ou d'un 100 m nage chez l'Homme et il peut s'agir d'une interaction prédateur-proie ou d'un passage de barrage chez le poisson.

#### *C- L'exercice physique très intense :*

C'est un exercice physique très épuisant. Il est essentiellement supporté par les fibres rapides et la voie métabolique prédominante est l'anaérobie alactique. Ainsi, l'énergie vient essentiellement de l'ATP produit par la créatine phosphate. Si l'activité contractile musculaire vient à se prolonger plus que quelques secondes, le processus anaérobie lactique intervient.

Chez l'homme c'est le cas d'un saut en hauteur ou encore d'un lancer en athlétisme. Chez le poisson, il peut s'agir d'une réponse de fuite à un prédateur.

#### I.3.1.3.2. Selon la fréquence :

On distingue deux types d'exercice en fonction de la fréquence: l'exercice physique aigu et chronique. L'exercice aigu représente une séance unique d'exercice et induit des réponses métaboliques et cardiovasculaires temporaires (quelques minutes à quelques heures). L'exercice chronique (ou entraînement), quant à lui, représente un exercice physique effectué de manière répétée et induit des réponses métaboliques et cardiovasculaires plus durables (jusqu'à quelques mois).

### **I.3.2. Stress oxydant et activité physique :**

L'exercice physique peut potentiellement induire une augmentation de la production radicalaire. Cette dernière est d'autant plus élevée que la contraction musculaire est intense et prolongée.

Il a longtemps été considéré que l'augmentation de la production de ROS durant l'exercice est uniquement d'origine mitochondriale en raison de l'augmentation de la consommation d'oxygène. Cependant, des sources autres que la mitochondrie peuvent contribuer à la production radicalaire durant l'exercice (Cooper et al., 2002).



### ***1.3.2.1. La chaîne respiratoire mitochondriale :***

Lors de l'exercice, l'augmentation de la dépense énergétique implique une accélération du flux des réactions oxydatives du métabolisme énergétique. La consommation d'O<sub>2</sub> au niveau du muscle squelettique peut être jusqu'à 100 fois plus élevée qu'au repos.

L'augmentation du flux d'O<sub>2</sub> au niveau de la mitochondrie a longtemps été considérée comme le mécanisme unique de la formation de l'anion superoxyde (Alessio et al., 2000). Mais les données récentes suggèrent que c'est l'augmentation de la pression partielle d'O<sub>2</sub> au niveau mitochondrial plutôt qu'une augmentation du flux d'O<sub>2</sub> qui causerait la formation d'anion superoxyde pendant l'exercice (Vollaard et al., 2005). Les dommages oxydatifs que subit la mitochondrie durant un exercice exhaustif sont peu susceptibles d'être liés aux ROS générés via d'autres sources, suggérant ainsi que les mitochondries restent la source majeure de production de ROS durant l'exercice (Ji et Leichtweis, 1997).

### ***1.3.2.2. Ischémie-reperfusion et activité xanthine déshydrogénase/oxydase :***

Pendant l'exercice, l'apport en oxygène à de nombreux tissus (comme les tissus cardiaque et rénal) est inhibé car le débit sanguin dérivé de ces derniers est redirigé vers les muscles qui supportent l'effort physique. Cette condition ischémique déclenche alors la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. Ensuite, lorsque l'exercice physique cesse et que les tissus sont ré-oxygénés, l'activité xanthine oxydase élevée induit une augmentation de la production de l'anion superoxyde. (Viña et al., 2000) ont même suggéré que l'activité xanthine oxydase pourrait être une source de ROS plus importante que les mitochondries durant l'exercice.

### ***1.3.2.3. Autres sources :***

D'autres sources sont reconnues être potentiellement productrices de ROS au cours de l'exercice physique. Certaines oxydoréductases comme la NADPH oxydase (NOX) peuvent être activées et contribuer à la production d'anion superoxyde lors d'un exercice, mais le processus n'est pas encore bien établi.

L'exercice physique induit aussi une augmentation des concentrations en catécholamines. L'auto-oxydation de ces dernières peut entraîner une production radicalaire (Belviranlı et Gökbel, 2006).



Enfin, l'exercice peut également provoquer des lésions tissulaires qui entraînent non seulement l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires comme les neutrophiles, mais aussi leur activation, conduisant ainsi à la production de radicaux libres et à la sécrétion de peroxyde d'hydrogène et d'hypochlorite.

### **I.3.3. Réponse musculaire à l'exercice :**

Des adaptations métaboliques et radicalaires sont mises en place en réponse à l'exercice physique surtout au niveau du muscle squelettique et au niveau cardiaque. Ces deux tissus ont des capacités remarquables à modifier leur profil d'expression de gènes et leur phénotype en réponse aux changements de la demande fonctionnelle imposée par l'exercice. Nous allons voir dans cette partie que les réponses métaboliques et radicalaires peuvent être différentes selon le type d'exercice considéré.

#### ***I.3.3.1. Réponse à l'exercice aigu :***

L'exercice physique aigu induit des adaptations métaboliques et radicalaires qui sont d'autant plus importantes que l'exercice est intense. Généralement, les effets de l'exercice aigu sont de durée relativement courte (quelques minutes à quelques heures)

##### **I.3.3.1.1 Adaptations métaboliques :**

Durant l'exercice aigu, la consommation d'O<sub>2</sub> de l'organisme entier (VO<sub>2</sub>) augmente d'autant plus que l'exercice est intense. Chez le mammifère, il a été rapporté une augmentation de la consommation d'oxygène au stade 3 au niveau mitochondrial (Fernström et al., 2004) ainsi qu'une amélioration du transport du glucose depuis le sang vers le tissu musculaire (Rockl et al., 2008).

Au niveau cardiaque, (Bo et al., 2008) ont montré une consommation mitochondriale d'O<sub>2</sub> augmentée au stade 4 mais non modifiée au stade 3 ainsi qu'une augmentation de l'activité ATP synthase.

Chez le poisson, il a été montré également qu'un exercice aigu à la nage peut induire des modifications métaboliques notamment au niveau des capacités de stockage de glycogène et de renouvellement d'ATP (Kieffer, 2000).



#### I.3.3.1.2. Production radicalaire et système antioxydant :

Chez le mammifère, l'exercice physique aigu s'accompagne d'une augmentation de la production radicalaire (Fisher-Wellman et Bloomer, 2009). Cette production est d'autant plus élevée que l'exercice est exhaustif. Généralement, l'augmentation de la production radicalaire après l'exercice aigu est accompagnée d'une augmentation des activités des systèmes enzymatiques antioxydants. Il a été montré chez le rat, qu'une production plus élevée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après exercice est accompagnée d'une augmentation du contenu en GSH dans le muscle et de l'activité SOD au niveau cardiaque (Bejma et Ji, 1999; Somani et al., 1995).

Chez le poisson, les réponses radicalaires à l'exercice ne sont pas encore bien établies. Aniagu et al. (2006) ont montré qu'un exercice aigu intense induit une augmentation des dommages oxydatifs au niveau du foie et des branchies, mais ne modifie pas l'activité SOD chez le chevesne (*Leuciscus cephalus*).

#### **I.3.3.2. Réponses à l'exercice chronique modéré :**

##### I.3.3.2.1. Adaptations métaboliques :

D'une manière générale, l'exercice chronique induit une augmentation des capacités oxydatives musculaires. Chez le mammifère, l'entraînement induit une augmentation de la VO<sub>2max</sub> *in vivo* (Børsheim et Bahr, 2003). Chez le rat, la respiration mitochondriale est souvent augmentée (Silva et al., 2009; Ventura-Clapier et al., 2007) après un exercice physique chronique. L'augmentation de la consommation d'O<sub>2</sub> est souvent expliquée par une augmentation de la biogénèse mitochondriale. Bengtsson et al. (2001) ont montré dans le muscle squelettique humain une biogénèse mitochondriale plus élevée après entraînement. Cette adaptation à l'entraînement serait à l'origine de l'amélioration des capacités oxydatives et du rendement de la phosphorylation oxydative au niveau cardiaque et musculaire squelettique (Ascensão et al., 2005; el Midaoui et al., 1996).

Chez le poisson, des observations similaires à celles chez les mammifères ont été rapportées. Chez l'anguille européenne argentée (*Anguilla anguilla* L.), l'entraînement tend à augmenter la respiration mitochondriale maximale au niveau du muscle rouge (Mortelette et al., 2010a). Chez le zebrafish (*Danio rerio*), (McClelland et al., 2006) ont montré au niveau cardiaque une activité citrate synthase plus élevée (indicateur de biogénèse mitochondriale) après entraînement.

Généralement chez le poisson, une amélioration des capacités à produire de l'énergie via l'augmentation de la capacité de stockage du glycogène ainsi que des enzymes métaboliques





comme l'hexokinase et l'hydroxyacyl-CoA dehydrogenase plus actives sont observées après entraînement (Farrell et al., 1991; Johnston et Moon, 1980).

#### I.3.3.2.2. Production radicalaire et système antioxydant :

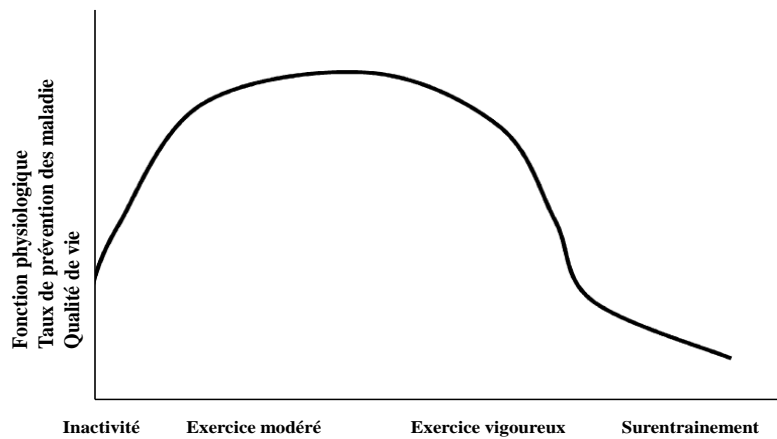
L'entraînement induit des réponses pro et antioxydantes au niveau musculaire et cardiaque. Chez le mammifère, il est souvent rapporté que l'entraînement induit une diminution de la production radicalaire. Dans le cœur et le muscle de rat (Powers et al., 1993, 1994), il a été montré une diminution de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après un entraînement.

La diminution de la production radicalaire n'est pas systématiquement accompagnée d'une modification au niveau des systèmes antioxydants. Dans certaines études, une augmentation des activités SOD, catalase ou GPx a été observée, dans d'autres, les activités enzymatiques antioxydantes n'étaient pas modifiées (Venditti et al., 1999) suggérant alors que cette production radicalaire moins élevée serait plutôt liée à une augmentation de l'expression des UCP2 et UCP3.

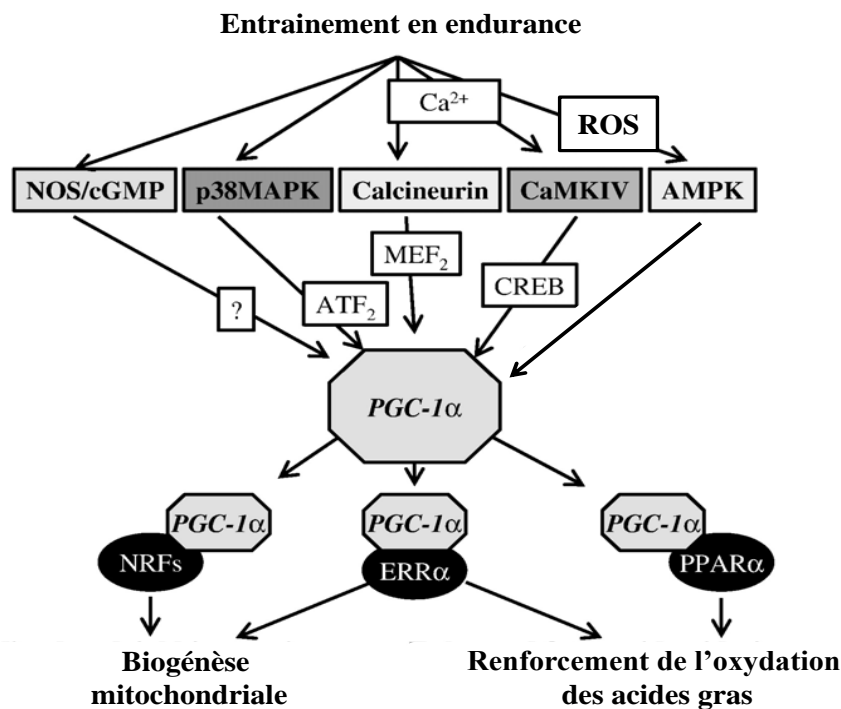
Comme vu dans le chapitre « Mitochondrie » (cf. I.2.2), les UCP participent à la régulation de la production radicalaire du métabolisme énergétique. En effet des études ont montré que l'exercice physique aigu induit une augmentation de l'expression des UCP3. Ces derniers peuvent jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la mitochondrie contre les ROS via le transport des anions superoxydes (Jones et al., 2003). Ce processus pourrait être similaire au cours d'un exercice chronique.

La découverte des UCP chez des espèces autres que les mammifères, comme les poissons qui sont ectothermes, suggère l'importance généralisée dans les fonctions métaboliques de ces derniers. Chez le poisson, l'expression des UCP dépend fortement de la température et peut aussi détenir une position importante dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial et celle de la production radicalaire (Mark et al., 2006). Chez le poisson, les données sur les réponses radicalaires et antioxydantes à l'entraînement restent rares. (Grim et al., 2010) ont montré qu'un entraînement à la nage de neuf jours ne modifie pas l'activité superoxyde dismutase dans le muscle squelettique du carpet arlequin (*Lepomis macrochirus*). Ils ont alors conclu que la durée d'entraînement n'était pas suffisante pour induire des modifications au niveau des systèmes antioxydants. Or dans une autre étude effectuée chez l'anguille européenne argentée (Mortelette et al., 2010) il a été montré, après trois jours d'entraînement à la nage, une diminution des activités des enzymes antioxydantes.

Surtout connus pour leurs effets délétères, les ROS peuvent aussi agir en tant que messagers cellulaires impliqués dans des voies de signalisation lors de l'exercice physique. Les processus seront détaillés dans la partie suivante.



**Figure 13 : Courbe type de la théorie de l'hormesis et les effets de l'exercice (Radak et al., 2008).** L'exercice modéré augmente la fonction physiologique de différents organes, augmente le taux de prévention contre les maladies et améliore la qualité de vie. L'inactivité physique, l'exercice intense et le surentraînement augmentent le risque de maladies et diminuent la fonction physiologique.



**Figure 14: Voies de signalisation impliquées dans la biogénèse mitochondriale et l'oxydation des acides gras, dans le cœur et dans le muscle squelettique, au cours de l'entraînement.** L'entraînement physique active un certain nombre de voies de signalisation dont l'oxyde nitrique synthase (NOS /cGMP), la protéine kinase mitogène activée p38 (p38MAPK), la calcineurine, calcium-calmoduline-kinase (CaMK IV), et l'adénosine monophosphate kinase activée (AMPK) médiée par les ROS. Ces voies de signalisation régulent l'expression du co-activateur du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes (PPAR $\alpha$ -PGC-1 $\alpha$ ) par des facteurs de transcription comme le facteur d'activation de la transcription 2 (ATF2), le facteur activateur du myocyte 2 (MEF2) et l'élément de réponse aux protéines de liaison cyclique (CREB) ou d'autres facteurs inconnus. PGC-1 $\alpha$  active le facteur nucléaire (NRF) et les récepteurs des œstrogènes (ERR $\alpha$ ) qui régulent la biogénèse mitochondriale, et active ERR $\alpha$  et PPAR $\alpha$  pour l'oxydation des acides gras. D'après Bengtsson et al. (2001) et Ventura-Clapier et al. (2007).

### ***I.3.3.3. Rôle des ROS dans l'adaptation musculaire :***

Radak et al. (2008) ont proposé que l'exercice module les ROS et que leurs effets pouvaient être décrits en s'appuyant sur la théorie de l'hormesis. Cette théorie montre que les systèmes biologiques répondent à une exposition aux substances chimiques, toxines ou radiations selon une courbe en cloche (figure 13). Ainsi, une surproduction de ROS dans le muscle squelettique non accoutumé est néfaste lors d'un exercice aigu intense par exemple, alors que la génération modérée de ROS par l'exercice régulier est bénéfique pour stimuler certains mécanismes d'adaptation comme l'angiogenèse, la biogénèse mitochondriale et l'hypertrophie musculaire.

#### **I.3.3.3.1. L'angiogenèse :**

Chez l'homme et le rat, l'entraînement en endurance augmente l'expression du facteur VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) qui lui-même active la croissance vasculaire. Les muscles sont ainsi plus vascularisés et mieux oxygénés. Les ROS produites lors de l'entraînement activeraient l'expression du facteur VEGF (Gomes et al., 2012).

#### **I.3.3.3.2. La biogénèse mitochondriale :**

Une biogénèse mitochondriale est souvent observée après un entraînement modéré (figure 14) et serait médiée par les ROS. Le mécanisme cellulaire n'est pas encore bien clair, mais Irrcher et al. (2009) ont suggéré que les ROS déclencheraient l'augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  (co-activateur transcriptionnel) via les voies AMP kinase, qui serait à l'origine de la régulation du nombre de mitochondries au niveau du muscle squelettique chez l'homme (Bengtsson et al., 2001).

#### **I.3.3.3.3. L'hypertrophie musculaire :**

L'augmentation du volume musculaire lors d'un exercice aigu et de courte durée est essentiellement lié à un infiltrat liquidien dans les espaces interstitiel et intracellulaire du muscle. En revanche, l'exercice chronique induit une hypertrophie musculaire plus durable qui met en jeu certaines voies de signalisation qui conduisent à une synthèse de protéines supérieure à leur dégradation.

Les ROS peuvent être impliquées dans le processus d'hypertrophie musculaire par l'activation de certaines MAP kinase (de l'anglais Mitogen-Activated Protein Kinase ; comme c-Jun et P38-MAPk), mais aussi d'IGF-1 (de l'anglais Insulin-like Growth Factor-1) (Gomes et al., 2012).

	Exercice aigu		Exercice chronique	
	Coeur	muscle	Coeur	Muscle
<b>Capacité oxydative</b>				
<b>Respiration mitochondriale maximale</b>	➡ (Bo, 2008)	↗ (Fernström, 2004)		↗ (Burelle, 2002) ➡ (Venditti, 1999)
<b>Production d'ATP</b>			↗ (Mokhtar, 1993)	↗ (Korzeniewski, 2003) ↗ (Hollozy, 1984)
<b>Dommages oxydants et production radicalaire</b>				
<b>Péroxidation lipidique</b>	➡ (Bejma, 2000) ↗ (Venditti, 2005)	↗ (Venditti, 2007) ↗ (Bejma, 2000)	↗ (Iiu, 2000) ➡ (Gul, 2006)	↗ (Iiu, 2000)
<b>Production mitochondriale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	➡ (Bejma, 2000)	↗ (Bejma, 1999) ↗ (Venditti, 2007)	↘ (Marcil, 2006) ↘ (Powers, 1993)	↘ (Powers, 1994) ↘ (Venditti, 1999)
<b>Protection antioxydante</b>				
<b>SOD</b>	↗ (Somani, 1995)	↗ (Ji, 1988)	➡ (Leichtweis, 1997)	➡ (Powers, 1994)
<b>CAT</b>	➡ (Gul, 2006)		➡ (Leichtweis, 1997)	➡ (Gul, 2006)
<b>GPx</b>		↗ (Ji, 1988)	➡ (Leichtweis, 1997) ↗ (Aydin, 2007)	➡ (Ascensão, 2005)
<b>Contenu en GSH</b>		↗ (Bejma, 1999)	↘ (Leichtweis, 1997)	↗ (Ascensão, 2005)

**Tableau 2 : Données de la littérature concernant l'effet de l'exercice physique chronique et aigu sur les statuts métaboliques, radicalaires et antioxydants au niveau du cœur et du muscle squelettique de rat.**

↗ = augmentation, ↘ = diminution, ➡ = pas de modification.

*On s'aperçoit donc que dans la littérature (tableau 2), les travaux étudiant l'effet de l'exercice physique sur le métabolisme énergétique et le métabolisme des ROS révèlent certains paradoxes et une difficulté à définir un mécanisme d'adaptation unique. En effet, on observe une disparité de résultats. L'adaptation à l'exercice dépend étroitement non seulement de la nature, de l'intensité ou de la durée de l'exercice mais dépend aussi d'autres facteurs tels que le type tissulaire étudié, l'âge, voire même le genre des individus.*

#### **I.4. Effets du genre sur le métabolisme énergétique et radicalaire :**

Lorsque l'on parle de dimorphisme sexuel, il est souvent fait référence aux différences de taille, de couleur (etc...) entre mâles et femelles. Or il existe dans la nature de nombreux exemples de dimorphisme sexuel biologique ou physiologique qui peuvent révéler d'une part des adaptations différentes selon le sexe à divers facteurs de stress (environnementaux, pathologiques, exercice...) et d'autre part des susceptibilités ou résistances différentes à développer certaines pathologies. Il existe par exemple des différences de genre au niveau de la fonction cardiovasculaire et des pathologies associées, qui ont conduit à de nombreuses études chez l'homme ces dernières années (Sangiorgi et al., 2013). Le dimorphisme sexuel a été aussi largement étudié dans le cadre de l'étude de la longévité en lien avec la théorie mitochondriale radicalaire du vieillissement. Cette théorie stipule que le vieillissement et la longévité seraient partiellement déterminés par les taux de ROS produites par la mitochondrie au cours du métabolisme normal.

Le genre fait partie des déterminants de l'âge et de la durée de vie. Il est clair que les radicaux libres sont des éléments clés dans les processus liés à l'âge et il a été aussi montré que chez les animaux, le genre qui a la plus longue durée de vie a des taux plus faibles de radicaux libres (Sohal et al., 1989). Chez beaucoup d'espèces mammaliennes, la durée de vie des femelles est plus élevée que celle des mâles. Enfin, il n'y a aucune évidence que la longévité des femelles soit universelle car des divergences existent au sein des mammifères et en dehors.

Les différences de réponses métaboliques et radicalaires entre mâles et femelles sont souvent attribuées aux hormones sexuelles et en particulier aux œstrogènes. Plusieurs modes d'actions et effets physiologiques des œstrogènes ont été rapportés.

L'œstrogène est un antioxydant et un stabilisant membranaire qui peut agir au niveau des dommages musculaires et de l'inflammation (Tiidus et Bombardier, 1999). Sa signification



physiologique, particulièrement ses effets potentiels sur la réparation musculaire et la récupération, n'est pas encore bien connue. Il a été suggéré que les hormones sexuelles jouent un rôle dans le stress oxydatif car l'œstradiol spécialement sous sa forme œstrone dans les tissus, a deux groupements hydroxyles qui sont potentiellement capables de stopper la lipoperoxydation comme notamment pendant l'exercice. Cependant, d'autres études ont montré que les effets de l'exercice sur le stress oxydatif étaient indépendants des variations du métabolisme des œstrogènes (Schmitz et al., 2008). Enfin les œstrogènes exercent des effets directs et indirects sur l'activité mitochondriale qui sont médiées par des activités génomiques et non génomiques (Klinge, 2008). Si l'implication des œstrogènes est souvent rapportée dans la littérature pour expliquer les différences de réponses physiologiques selon le genre, quelques auteurs suggèrent que les différences morphologiques, et surtout de taille entre mâle et femelle pourraient être aussi en partie responsables (Sanz et al., 2007).

*Nous allons voir dans la suite de ce chapitre que les réponses du métabolisme énergétique et des radicaux libres (la plupart du temps étudiés séparément) selon le sexe sont variables suivant les études. Enfin les adaptations à l'exercice notamment de type endurance révèlent parfois des différences inter-sexe qui ne sont pas forcément présentes chez les animaux sédentaires.*

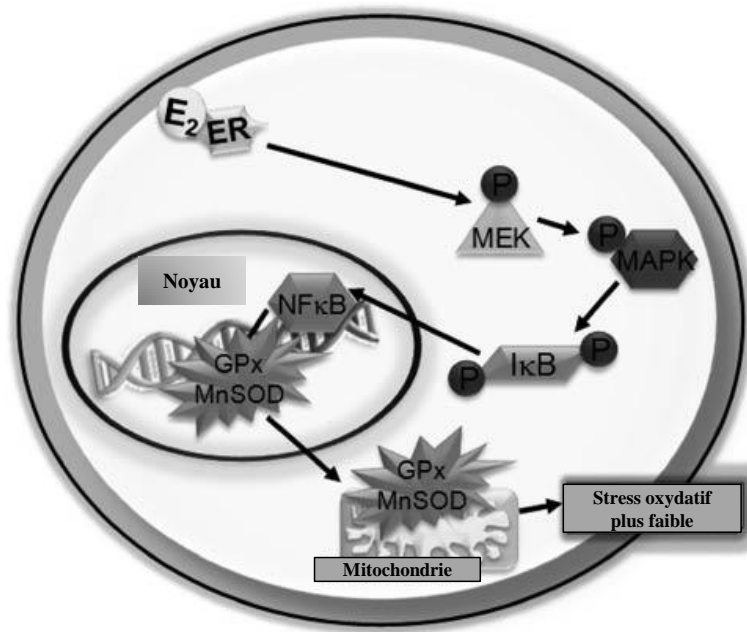
#### **I.4.1. Les réponses du métabolisme énergétique selon le genre :**

Par souci de synthèse, ne seront rapportés ici que des travaux chez l'animal.

Le bilan énergétique d'un organisme dépend des mécanismes qui coordonnent et régulent la prise de nourriture ainsi que la dépense énergétique ce qui inclut entre autres le métabolisme de base, l'activité physique et la thermorégulation.

Chez le rat, des différences selon le sexe existent pour tous ces aspects. Les rats Wistar femelles présentent une dépense énergétique plus grande que les mâles en raison d'un métabolisme de base plus élevé mais également une activation plus efficace de la thermogénèse (Valle et al., 2005). Parmi les mécanismes pouvant expliquer les différences de taux métabolique de base sont évoqués une proportion plus importante de tissus métaboliquement actifs chez la femelle et un métabolisme oxydatif hépatique plus important sous l'action des hormones thyroïdiennes. Au niveau musculaire, ont été mesurées chez la femelle, des quantités plus importantes d'ADN mitochondrial, de protéines mitochondriales et de complexes de la phosphorylation oxydative, ces derniers ayant également une activité maximale plus élevée (Colom et al., 2007). L'activation plus efficace de la thermogénèse chez la femelle est quant à elle liée à une proportion plus importante de tissu adipeux





**Figure 15 : Rôle des œstrogènes dans l'expression des enzymes antioxydantes (Viña et al., 2013).** Les œstrogènes (E<sub>2</sub>) se lieraient aux récepteurs membranaires (ER) et activeraient les MAP kinases. Les MAP kinase activeraient à leur tour le facteur nucléaire NF kappa B induisant ainsi une augmentation de l'expression des gènes qui codent pour les enzymes antioxydantes.

brun ainsi qu'à une quantité plus importante d'UCP1 dont la fonction est de dissiper sous forme de chaleur l'énergie du gradient de protons généré par la chaîne respiratoire (Nibbelink et al., 2002).

Au contraire chez la souris, Sanz et al. (2007) n'ont trouvé aucune différence de consommation d'oxygène mitochondriale dans le cœur, le muscle squelettique ni le foie. Chez des espèces non mammaliennes comme le poisson, il a aussi été rapporté un dimorphisme sexuel au niveau des caractéristiques métaboliques. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par exemple, les femelles utilisent préférentiellement la glycolyse pour la production d'ATP alors que les mâles ont une plus grande capacité aérobie ainsi qu'un métabolisme lipidique plus actif au niveau cardiaque (Battiprolu et al., 2007). Ces résultats ont été obtenus chez des truites immatures chez lesquelles les taux d'hormones sexuelles sont très faibles. Chez le saumon atlantique (*Salmo salar L.*), les mâles ont une consommation d'oxygène *in vivo* et par conséquent une capacité aérobie plus importante que les femelles de même âge (Kazakov et Khalyapina, 1981). Ces résultats obtenus chez le saumon restent difficiles à interpréter au vu de la différence de poids entre mâles et femelles chez les animaux utilisés. Chez l'anguille européenne argentée (*Anguilla anguilla L.*), les mâles présentent également une capacité aérobie plus élevée que les femelles (Amérand et al., 2010; Sébert, 2013), notons tout de même un dimorphisme sexuel important également chez cette espèce avec des mâles beaucoup plus petits que les femelles (Durif, 2003).

#### **I.4.2. Balance oxydants/antioxydants selon le genre:**

Des différences entre mâles et femelles ont été décrites au niveau de la production des ROS ainsi qu'au niveau de la protection antioxydante.

(Borrás et al., 2003) ont montré chez le rat Wistar que les femelles produisent moins de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondrial que les mâles dans le foie et dans le cerveau. Pour déterminer si les œstrogènes, sont impliqués dans cette différence de production mitochondriale de ROS, les effets de l'ovariectomie puis d'une substitution hormonale (œstrogène) ont été testés. Alors que l'ovariectomie induisait une augmentation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à un niveau similaire à celui des mâles, l'administration du 17β-œstradiol pendant 1 mois inhibait complètement cette augmentation de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plus tard (Borrás et al., 2007) ont montré que les œstrogènes se lient probablement à un récepteur membranaire, ce qui activerait les MAP kinases et induirait, via le facteur nucléaire NFκB, une augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes (figure 15). Chez la souris, Sanz et al. (2007) ont aussi montré que les femelles présentaient une production de ROS moins importante que les mâles dans le muscle squelettique. Ils ont alors suggéré que cette différence de production radicalaire serait liée à un contenu en GSH plus importante chez la femelle.



Plusieurs études ont montré chez l'homme et chez le rat un contenu en antioxydant plus important chez les individus de sexe féminin. Dans le cœur de rats Wistar par exemple, l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants, SOD et GPx est plus élevée chez la femelle. Il a alors été à nouveau suggéré que cette meilleure protection contre les ROS serait liée aux œstrogènes (Barp et al., 2002). De nombreux auteurs suggèrent que cette meilleure capacité antioxydante contre les ROS serait à l'origine de la longévité plus importante des femelles.

Chez le poisson également, des différences mâle/femelle au niveau des activités des enzymes antioxydantes et/ou des biomarqueurs du stress oxydatif ont été observées. Au niveau du cerveau, Santos et al. (2008) ont observé une expression plus élevée des gènes codant pour la Cu,Zn-SOD chez la femelle du poisson zèbre (*Danio rerio*). Au niveau du muscle squelettique, chez le requin pélagique (*Isurus oxyrinchus*), il a été rapportée une activité Cu,Zn-SOD dans le muscle squelettique des femelles leur assurant ainsi une protection plus élevée que les mâles contre le stress oxydatif (López-Cruz et al., 2010). Almroth et al. (2012) ont également montré chez la morue atlantique (*Gadus morhua*), une activité SOD tissulaire plus élevée chez la femelle que chez le mâle. Ils ont alors suggéré une similitude de mécanisme avec les mammifères à savoir une capacité antioxydante plus importante chez la femelle liée aux œstrogènes et qui leur procurerait une longévité plus élevée.

### **I.4.3. Les réponses d'adaptation à l'entraînement selon le genre:**

Chez le mammifère, face à divers facteurs tels que l'entraînement en endurance, des adaptations métaboliques et radicalaires peuvent être différentes selon le sexe.

Balcı et Pepe (2012) ont rapporté chez le rat Wistar qu'un entraînement en endurance à la nage induit une diminution de la lipopéroxydation ainsi qu'une augmentation du contenu en GSH dans le cœur des femelles mais pas chez les mâles. Ces derniers présentaient une diminution de l'activité SOD. Mais ces adaptations semblent être dépendantes du type de protocole d'entraînement et de l'espèce de rat utilisée. En effet, Liu et al. (2000) ont montré qu'un entraînement modéré à la course de 8 semaines induit plutôt une augmentation de la lipopéroxydation dans le cœur et dans le muscle squelettique des rats Sprague-Dawley femelles.

Au niveau du foie, Yamamoto et al. (2002) ont montré chez des rats Wistar sédentaires, une production radicalaire plus importante et une activité GPx moins importante chez les mâles que chez les femelles. Par contre après 6 semaines de course volontaire, les rats femelles présentaient une production radicalaire ainsi qu'une capacité antioxydante plus importante que les mâles. Ils ont alors suggéré que cette adaptation antioxydante à l'exercice serait lié à un niveau de GSH plus important chez les femelles après l'entraînement via une plus importante activité des enzymes de recyclage de



la GSH, (de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) et de la  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase (GCS)). Cependant, il faut noter que dans cette étude, les femelles étaient plus actives que les mâles, car en adoptant un protocole de course volontaire, elles ont couru une distance 12 fois supérieure à celle des mâles.

Dans un autre travail étudiant l'effet de l'entraînement sur la tolérance du myocarde de rat Sprague-Dawley à l'ischémie, il a été montré qu'en conditions de repos, les femelles sont mieux protégées au niveau cardiaque que les mâles. Par contre, un entraînement en endurance de 14 semaines s'est révélé être plus bénéfique pour les mâles. Les contenus en Hsp70 (Heat shock proteins) et en eNOS (enzyme intervenant dans la régulation du tonus vasculaire) ainsi que la force contractile du ventricule gauche étaient augmentés après entraînement (Thorp et al., 2007). Il a été suggéré que Hsp70 et eNOS pourraient interagir pour assurer une protection du myocarde contre des blessures engendrées par l'ischémie-reperfusion. Il a aussi été proposé que l'absence de modification chez la femelle serait liée à un effet inhibiteur des œstrogènes vis-à-vis de la production de Hsp70 au niveau du myocarde.

On a vu dans la partie consacrée à l'effet de l'entraînement selon le genre (I.4.3) que les poissons peuvent montrer des différences au niveau de la réponse physiologique (cortisol) et cellulaire au stress (HSP). On sait également que chez le mammifère, l'expression des HSP induite par l'exercice est dépendante du genre dans le muscle squelettique (Paroo et al., 2002a) et dans le cœur (Paroo et al., 2002b). Etant donné la significativité du genre sur la réponse au stress chez le poisson et le mammifère, il nous paraît intéressant d'examiner les réponses radicalaires et la fonction mitochondriale dans le cadre de l'adaptation à l'entraînement. A notre connaissance, ces études sont rares chez le poisson. La prise en compte du sexe est loin d'être systématique dans la littérature et notamment dans les études relatives à la réponse à l'exercice.

*Dans cette partie, nous venons de constater qu'il est difficile de dégager des profils métaboliques et radicalaires « types » chez le mâle et la femelle que ce soit chez les animaux sédentaires ou entraînés. Une fois de plus, il est difficile de comparer des études qui diffèrent en termes de nature et de durée de l'exercice physique, de type de tissu étudié et de paramètres métaboliques et radicalaires mesurés. Dans le cadre de notre travail, nous avons choisi de nous focaliser sur l'impact du genre sur la fonction mitochondriale et les réponses radicalaires après entraînement, dans le cœur et le muscle squelettique de deux espèces (mammifère et poisson)*



## II. Objectifs et hypothèses :

Il est donc connu qu'au niveau mitochondrial, des adaptations du métabolisme des ROS et du métabolisme énergétique sont mis en place en réponse à une activité physique régulière (Jones et al., 2003; Siu et al., 2004; Venditti et al., 1999). Cependant, l'interprétation des résultats dans la littérature peut être difficile à effectuer. En effet, les résultats sont étroitement dépendant de nombreux paramètres comme le protocole d'entraînement (durée, fréquence, intensité de l'exercice), mais aussi la souche, l'espèce, l'âge, le tissu ou le sexe des animaux. A notre connaissance, très peu d'études ont exploré le devenir après entraînement de la relation phosphorylation oxydative-production radicalaire au niveau mitochondrial dans les 2 tissus en parallèle (muscle squelettique et cœur) ainsi que l'impact du genre.

**Une question ressort: l'activité physique régulière modérée induit-elle un changement dans la relation étroite entre performance physiologique, rendement énergétique mitochondrial et statut oxydatif ? Si oui, est ce que ces adaptations métaboliques à l'entraînement sont différentes entre mâle et femelle ?**

**Le premier objectif** de ce travail porte sur l'étude de l'influence du sexe sur les liens entre performance physiologique et réponses radicalaires dans les deux tissus oxydatifs les plus sollicités au cours de l'entraînement physique modéré (cœur et muscle squelettique). Ainsi, des rats mâles et femelles ont été soumis à un entraînement physique (d'intensité entre 60 et 70% de leur vitesse maximale aérobie) et les réponses métaboliques ont été abordées selon deux approches *in vivo* et *in vitro*.

**Le deuxième objectif** consiste en la valorisation du modèle poisson dans l'étude de l'effet de l'entraînement physique. Sa qualité d'ectotherme fait qu'il est aisé de modifier son activité métabolique (Low et al., 1973). De plus chez les poissons téléostéens, les fibres lentes et rapides sont séparées (Fostier et Jalabert, 2011), ce qui permet de cibler l'étude du métabolisme aérobie sur le muscle le plus riche en mitochondries. Notre choix a porté sur l'anguille européenne argentée. Cette espèce est considérée comme étant athlète et endurante puisqu'elle effectue une migration de reproduction de 6000 Km des côtes européennes vers la mer des sargasses (Tesch et Thorpe, 2003). En lien avec les conditions extrêmes de température et de pression hydrostatique rencontrées pendant la migration (van Ginneken et al., 2005), des études ont montré que l'anguille possède des capacités d'acclimatation et d'adaptation de la performance cardiaque au stress environnemental et qu'elle représenterait un modèle utile pour l'étude des modulations cardiaques





(Imbrogno, 2013). D'autre part, cette espèce est caractérisée par un dimorphisme sexuel important basé sur la taille, ce qui pourrait être un atout dans l'exploration d'éventuelles adaptations métaboliques différentes entre les deux sexes.

Des anguilles mâles et femelles ont été soumises à un entraînement à la nage de même intensité que les rats et les mêmes mesures *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées dans le cœur et le muscle rouge. D'un autre côté, la modulation cardiaque a été étudiée chez les anguilles femelles. Ces dernières ont été soumises à des variations de température et de pression hydrostatique et la relation entre fréquence cardiaque et consommation d'oxygène *in vivo* a été déterminée.

Enfin, **le troisième objectif** était d'étudier le lien entre performance physique, production radicalaire et métabolisme énergétique. L'évolution de la performance physique a été évaluée *in vivo* et a été mise en lien avec des mesures *in vitro*, à partir de fibres perméabilisées, de la production radicalaire et du rendement énergétique au niveau mitochondrial.

Ainsi nous avons réalisé sur les fibres musculaires perméabilisées, des mesures *in vitro* de la consommation d'oxygène, de la production d'ATP et de la production de ROS ainsi qu'une évaluation la sensibilité aux ROS de la fonction mitochondriale. Avant la mise en place des protocoles d'entraînement, il a fallu valider la technique d'évaluation de la sensibilité aux ROS de la fonction mitochondriale et mettre au point la technique de mesure *in vitro* simultanée de la consommation d'O<sub>2</sub> et de la production d'ATP.



### III. Matériels et méthodes :

#### III.1. L'animalerie :

L'animalerie du site UFR Sciences et Techniques de Université de Bretagne Occidentale où sont hébergés les animaux utilisés dans le cadre de ce travail a obtenu l'agrément de l'Europe (Numéro d'agrément : A29-019-08). Toutes les installations sont conçues de manière à assurer un environnement approprié tenant compte des besoins physiologiques et éthologiques des espèces hébergées. La température et l'humidité relative d'hébergement sont adaptées aux espèces et contrôlées quotidiennement. Par ailleurs, le maintien d'un état de santé des animaux garantissant leur bien-être et respectant les exigences scientifiques est respecté. La règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) a été appliquée : le nombre maximal d'animaux par condition étudiée a été fixé à 10 et l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subits par les animaux ont été réduits, supprimés et/ou soulagés.

#### III.2. Les animaux :

##### III.2.1. Les rats :

36 rats Wistar (16 mâles et 20 femelles) sont utilisés (tableau 3). Ils proviennent du centre d'élevage Janvier localisé à St-Berthevin en France. A leur arrivée, les rats, âgés de sept semaines, ont été répartis deux par deux dans des cages au sein de l'animalerie du laboratoire où les conditions de cyclicité (alternance jour/nuit, 12/12h) et de température (21°C) optimales sont respectées et contrôlées. Les rats sont alimentés avec une nourriture standard (Scientific Animal Food and Engineering SAFE, France). Trois jours après leur arrivée au laboratoire, chaque animal est identifié à l'aide d'une puce électronique insérée sous la peau après anesthésie générale (Kétamine/xylazine: 80/12 mg.Kg<sup>-1</sup> en indice de poids).

	N	Poids des rats au début du protocole expérimental (g)
Mâle	16	270 ± 3
Femelle	20	214 ± 2

**Tableau 3 Poids des rats Wistar mâles et femelles au début du protocole expérimental.**



### III.2.2. Les anguilles :

26 anguilles européennes argentées (*Anguilla anguilla L.*) sont utilisées. Elles ont été pêchées en eau douce dans la Loire, au moment de leur dévalaison par un pêcheur professionnel (Yannick Perraud, St-Florent Leviel).

Les anguilles sont gardées à jeun dans un bac de 400 L alimenté par un circuit ouvert d'eau de ville aérée en continu. Les conditions de stabulation des anguilles sont les plus proches possibles des conditions naturelles de température ( $15\pm 1^\circ\text{C}$ ) et de photopériode.

Au minimum une semaine après leur arrivée, une étude morphométrique est réalisée afin de déterminer objectivement le sexe des animaux et de vérifier leur stade d'argenture. Ainsi, une fois l'animal anesthésié (10 mL d'une solution d'éthanol à 10% d'huile essentielle de clou de girofle (*Eugenia caryophyllus*) dilués dans 10 L d'eau), le poids (P), la longueur corporelle (Lc) ainsi que les diamètres oculaires (vertical ( $D_v$ ) et horizontal ( $D_h$ )) sont mesurés. Le poids et la longueur servent à vérifier le sexe et l'index oculaire permet de vérifier le stade d'argenture (Durif, 2003; Durif et al., 2005). Pour assurer le suivi des animaux, une puce électronique est insérée sous la peau avec un injecteur (le matériel est stérilisé à l'éthanol et la plaie est désinfectée à la bétadine).

	Mâle	Femelle
N	14	12
Poids (g)	$92 \pm 5$	$341 \pm 26$
Longueur (m)	$0,41 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,02$

**Tableau 4 : Données morphométriques pour la détermination du sexe des anguilles.**

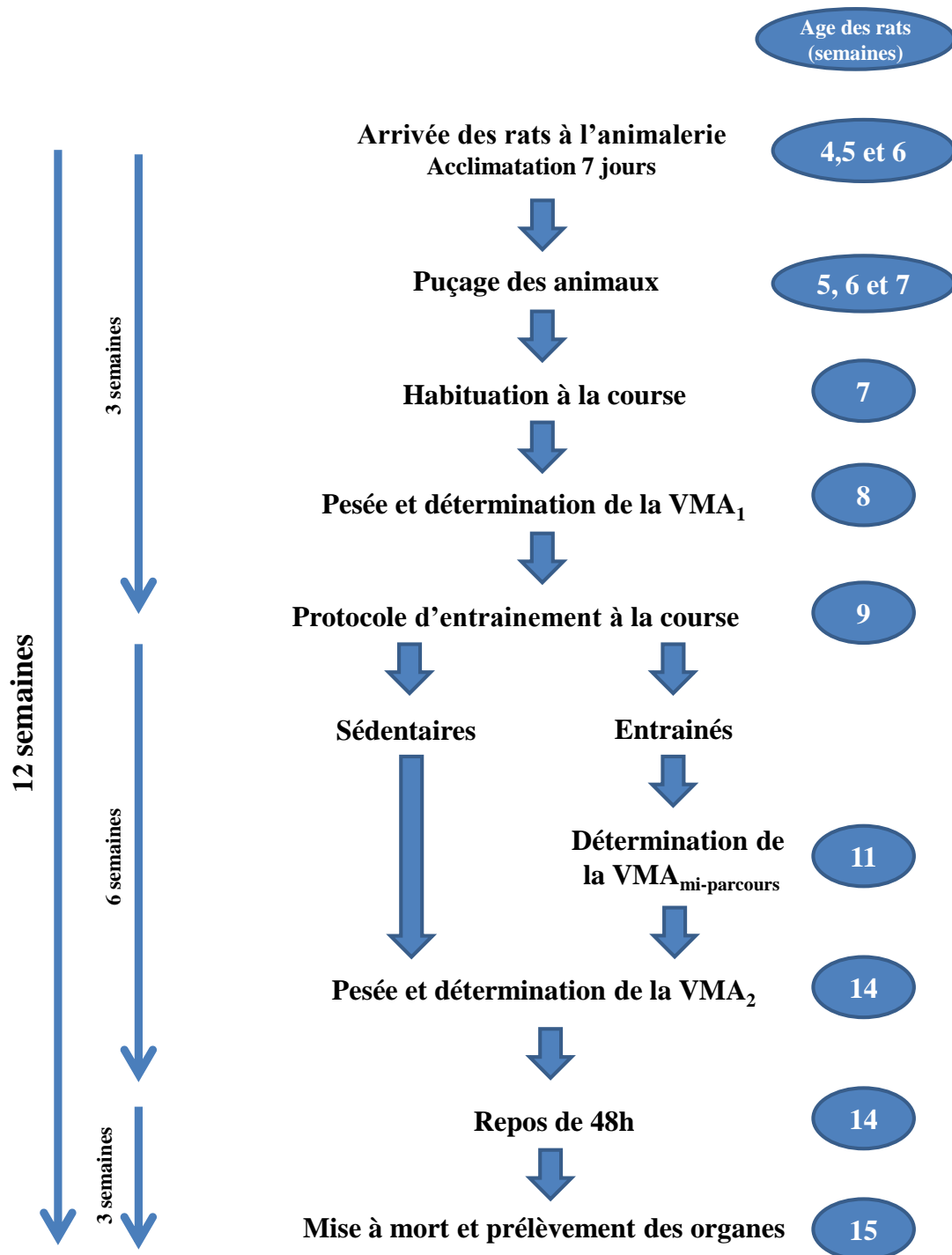


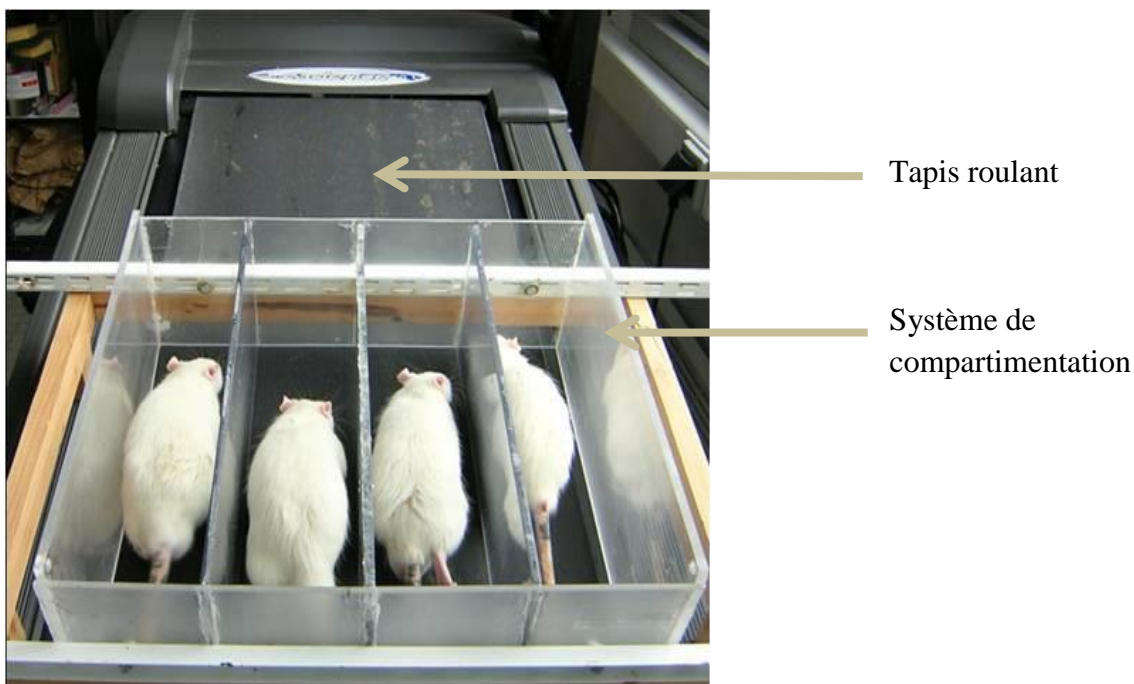
Figure 17 : Protocole d'entraînement à la course utilisé pour le rat.

### III.3. Protocoles d'entraînement:

#### III.3.1. Chez le rat Wistar:

Le système expérimental (figure 16) comporte un tapis roulant avec une pente nulle et un système de compartimentation qui permet de faire courir quatre rats simultanément.

Le protocole d'entraînement utilisé pour les rats (figure 17) se déroule en trois étapes : l'habituation au tapis de course, la mesure de la vitesse aérobie maximale (VMA) et la période d'entraînement.



**Figure 16 :** Système expérimental utilisé pour l'entraînement à la course des rats. Le système est composé d'un tapis roulant avec une pente de  $0^\circ$  et d'un système de compartimentation.

#### **\*Habituation au tapis de course :**

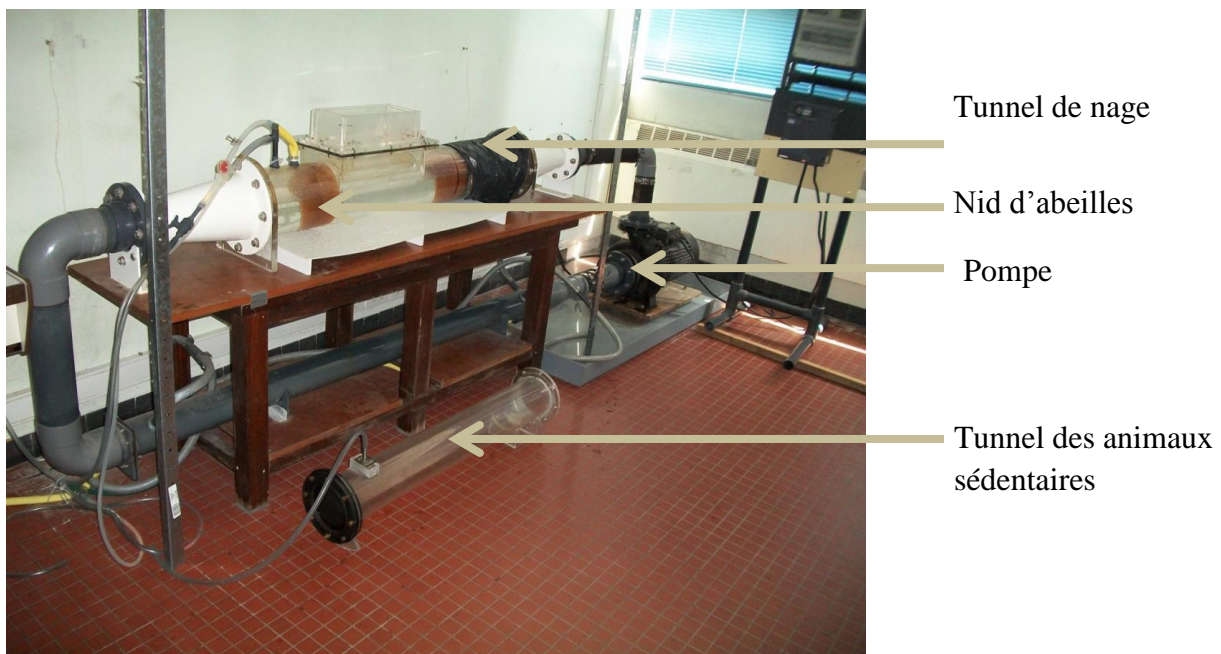
Les rats sont préalablement habitués au tapis de course pendant une semaine avant la période d'entraînement. Ils sont transférés quotidiennement de l'animalerie au laboratoire où ils courent pendant 30 min à des vitesses croissantes (de  $0,3$  à  $1 \text{ Km.h}^{-1}$ ).

A la fin de la semaine d'habituation au tapis de course, **la vitesse maximale aérobie (VMA)** est déterminée pour chaque rat.



Vitesse (km.h <sup>-1</sup> )	Durée du palier (s)
0,6	90
0,8	90
1	90
1,2	60
1,4	60
1,6	60
1,7	60
1,8	60
1,9	60
2,0	60
2,1	60
2,2	60
2,3	60
2,4	60
2,5	60
2,6	60
2,7	60
2,8	60
2,9	60
3,0	60

**Tableau 5 : Protocole d'évaluation de la vitesse aérobie maximale (VMA).**



**Figure 18 : Système expérimental utilisé pour l'entraînement à la nage des anguilles.**

### **\*Mesure de la VMA :**

Les animaux réalisent individuellement un test de VMA. La vitesse du tapis roulant est augmentée progressivement par palier de 90s puis de 60s, comme le montre le tableau 5, jusqu'à ce que l'animal ne puisse plus maintenir sa vitesse de course. Ainsi la VMA correspond à la dernière vitesse courue entièrement par l'animal. Les rats sont ensuite immédiatement mis au repos. Dans un premier temps, la mesure de la VMA est réalisée trois jours avant le début de l'entraînement (VMA<sub>1</sub>). Cette VMA<sub>1</sub> permet de déterminer d'une part la performance physique de l'animal, et d'autre part, d'ajuster la vitesse de course du protocole d'entraînement, à savoir 60-70% de la VMA<sub>1</sub> spécifique à chaque rat.

A l'issue de la détermination de VMA<sub>1</sub>, deux groupes sont définis de façon aléatoire : le groupe « entraîné » et le groupe « sédentaire » (non entraîné).

### **\*Période d'entraînement :**

La période d'entraînement à la course dure six semaines. Durant cette période, les rats sédentaires sont placés sur le tapis de course à l'arrêt 5j/semaine 1h/jour. Les rats du groupe entraîné sont d'abord soumis à l'entraînement à la course à 60-70% de VMA<sub>1</sub> pendant 3 semaines 5j/semaine et 1h/jour. A l'issue des trois semaines, leur VMA est réévaluée (VMA<sub>mi-parcours</sub>) afin de réajuster l'intensité de l'entraînement. Les rats du groupe entraîné sont alors soumis à nouveau à un entraînement pendant trois semaines à 60-70% de VMA<sub>mi-parcours</sub>.

A la fin de la période d'entraînement, la VMA est évaluée (VMA<sub>2</sub>) pour les deux groupes sédentaire et entraîné. Ceci permet de vérifier si la performance physique est améliorée chez les animaux entraînés par rapport aux sédentaires.

A la fin du protocole d'entraînement, les animaux sont placés au repos pendant 48h avant d'être sacrifiés. Le cœur et le muscle gastrocnémien sont prélevés pour les mesures sur tissu frais et congelés.

### **III.3.2. Chez l'anguille européenne:**

Le système expérimental est un tunnel de nage de type Brett (1964) de 85 litres et de 119cm de longueur muni d'une pompe qui délivre le courant d'eau (figure 18). La pompe est préalablement calibrée à l'aide d'un débitmètre. La droite de vitesse du courant (m.s<sup>-1</sup>) en fonction de la puissance délivrée par la pompe (Hz) est ensuite tracée et sert à exprimer la vitesse de nage en m.s<sup>-1</sup> (figure 19).

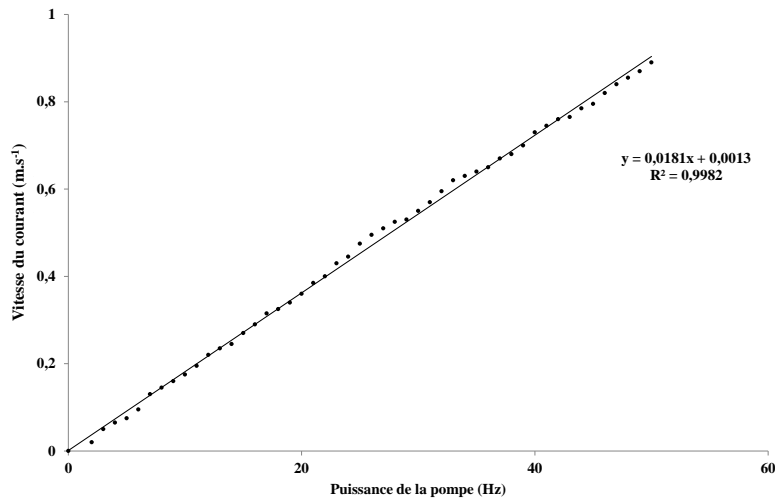


Figure 19 : Vitesse du courant d'eau (m.s<sup>-1</sup>) en fonction de la puissance délivrée par la pompe (Hz).

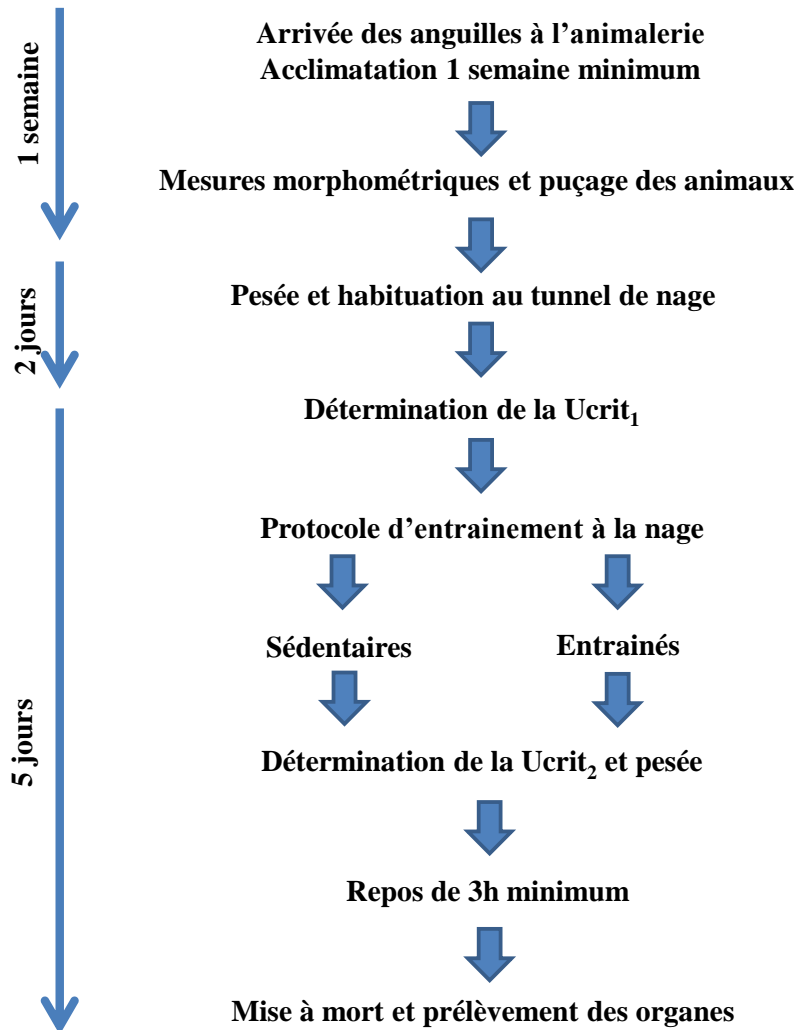


Figure 20 : Protocole d'entraînement à la nage utilisé pour les anguilles.

Comme pour les rats, le protocole d'entraînement peut se dérouler en trois étapes (figure 20): l'habitué au tunnel de nage, la mesure de la vitesse critique de nage ( $U_{crit}$ ) et la période d'entraînement.

#### \*Habituation au tunnel de nage :

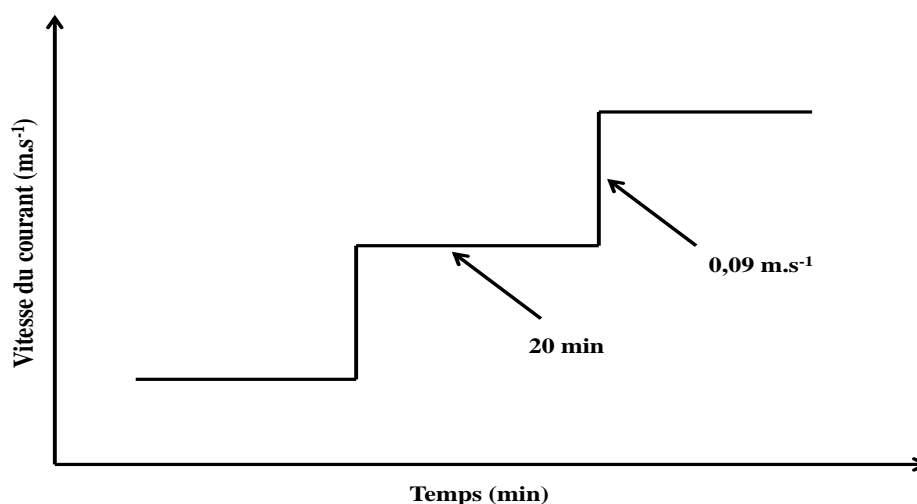
Les anguilles sont préalablement habituées au tunnel de nage. Elles y sont placées individuellement deux jours avant la détermination de la vitesse critique de nage ( $U_{crit}$ ).

#### \*Mesure de $U_{crit}$ :

Les animaux réalisent individuellement le test  $U_{crit}$ . Cette dernière est la vitesse maximale de nage que l'anguille peut maintenir dans le tunnel de nage. Elle est déterminée en augmentant le débit d'eau de  $0,09 \text{ m.s}^{-1}$  par palier de 20 minutes (figure 21) jusqu'à ce que l'anguille ne puisse plus maintenir sa position dans le tunnel (Mortelette et al., 2010).  $U_{crit}$  est déterminée grâce à la formule suivante (Brett, 1964) :

$$U_{crit} = V(n-1) + (t_n/T_i) \times V_i$$

où  $V(n-1)$  représente le débit d'eau au palier précédent,  $t_n$  la durée en minutes du dernier palier ( $n$ ) au cours duquel l'anguille ne pouvait plus nager,  $T_i$  la durée de chaque palier (20 min) et enfin  $V_i$  l'augmentation de la vitesse du courant d'eau à chaque palier.



**Figure 21 : Protocole de détermination de la vitesse critique de nage ( $U_{crit}$ ) des anguilles.** L'intensité du courant d'eau est augmentée de  $0,09 \text{ m.s}^{-1}$  toutes les 20 min jusqu'à ce que l'anguille ne maintienne plus sa position dans le tunnel de nage.



Ucrit est d'abord déterminée avant la période d'entraînement (Ucrit<sub>1</sub>) pour évaluer la performance de nage mais aussi pour ajuster l'intensité de l'exercice. Lors de la mesure de Ucrit<sub>1</sub>, la fréquence de battements de queue (batt.s<sup>-1</sup>), qui représente un autre indice de performance de nage, est mesurée par comptage des battements de queue sur un délai de 15s à raison de trois fois toutes les cinq minutes pour chaque palier de 20min.

A l'issue de la détermination de Ucrit<sub>1</sub>, deux groupes sont définis de façon aléatoire : le groupe "entraîné" et le groupe "sédentaire" (non entraîné).

#### **\*Période d'entraînement :**

Après la détermination de Ucrit<sub>1</sub>, les anguilles du groupe entraîné (N=6 pour les mâles et N=7 pour les femelles) sont soumises individuellement à un entraînement à la nage pendant trois jours et quatre nuits. Cet entraînement est d'intensité modérée de 70% de Ucrit<sub>1</sub> pendant 10 h (le jour) et à 50% de Ucrit<sub>1</sub> pendant 14 h (la nuit). Parallèlement, les anguilles du groupe sédentaire sont placées individuellement dans un aquarium de 15 L de la même forme que le tunnel de nage. Ce tunnel est branché sur le même circuit d'eau (c'est-à-dire soumis aux mêmes conditions de bruit, de photopériode et de température que le tunnel de nage).

A la fin du protocole de nage, les anguilles sont placées au repos pendant trois heures avant la détermination de Ucrit<sub>2</sub> et de la fréquence de battements de queue. Trois heures après, l'animal est sacrifié, le cœur et le muscle rouge sont ensuite prélevés.

### **III.4. Matériel biologique :**

#### **III.4.1. Prélèvements tissulaires :**

##### ***Le rat Wistar***

Les rats sont sacrifiés par exsanguination causée par le prélèvement tissulaire sous anesthésie (Kétamine/xylazine: 80/12 mg.Kg<sup>-1</sup> en indice de poids). Le muscle gastrocnémien et le cœur sont immédiatement récupérés et une partie du tissu est immédiatement transférée à 4°C dans une solution de tampon A (EGTA, 10 mM ; Taurine 20 mM ; MgCl<sub>2</sub> 3 mM ; MES potassium 0,1 mM ; Dithiothreitol 0,5 mM ; PCr 15 mM et ATP 5 mM, à pH 7,4) et utilisée pour les mesures et les dosages sur tissu frais. L'autre partie est immédiatement placée dans de l'azote liquide puis conservée à -80°C pour les mesures des activités enzymatiques et la quantification du MDA et des protéines.



### ***Les anguilles européennes***

Après la détermination de Ucrit<sub>2</sub>, les anguilles sont installées dans un environnement calme pendant trois heures minimum. Les poissons sont ensuite sacrifiés par décapitation. Des tronçons d'anguille (4 cm environ) sont prélevés (à partir de l'anus et vers l'avant du corps) ainsi que la moitié du ventricule et sont immédiatement plongés dans l'azote liquide. Ils sont stockés à -80°C pour les mesures des activités enzymatiques et la quantification du MDA et des protéines.

Du muscle rouge (situé le long de la ligne latérale sous la peau et en arrière de l'anus) et la moitié restante du ventricule sont transférés à 4°C dans un milieu tamponné B (Hepes 40 mM ; KCl 140 mM ; MgCl<sub>2</sub> 5 mM ; EDTA 10 mM ; Imidazole 20 mM ; DTT 0,5 mM ; ATP 1 mM et PCr 2 mM à pH 7,4). Les fibres de ces tissus seront perméabilisées pour les mesures de consommation d'oxygène, de production d'ATP et de radicaux libres hydroxyles ( $\bullet$ OH).

### **III.4.2. Préparations tissulaires :**

#### ***Les extraits musculaires***

**Pour le dosage des protéines et les mesures des activités des enzymes antioxydantes**, du tissu congelé est récupéré et broyé au polytron à 4°C dans une solution de tampon d'extraction TE (Tris 75 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4) à 3 mL pour 200 mg de tissu. L'homogénat est ensuite centrifugé (15 min à 12000 g à 4°C) et le surnageant est récupéré (Amérand et al., 2006).

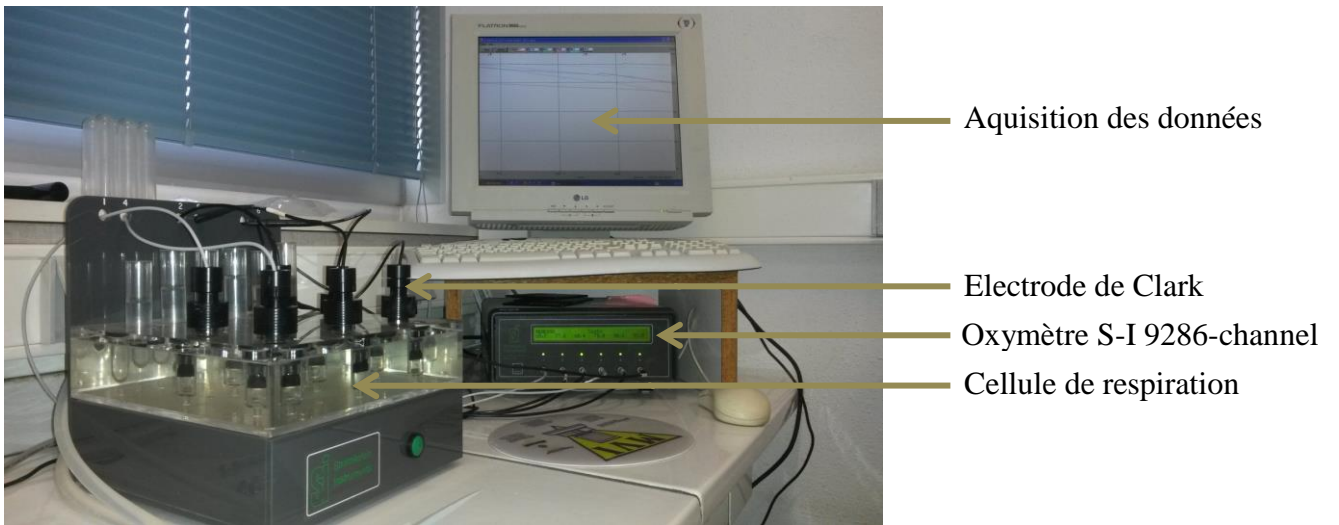
**Pour la mesure de l'activité citrate synthase**, du tissu congelé est récupéré et broyé au polytron à 4°C dans une solution de tampon d'extraction TE' (Tris HCl 0,1 M ; pH 8,1) à raison de 3ml pour 50mg de tissu (Leek et al., 2001).

#### ***Perméabilisation des fibres musculaires***

La perméabilisation consiste à incuber les fibres musculaires en présence de saponine. La saponine est un détergent qui crée des pores dans la membrane cellulaire, sans porter atteinte à celle des mitochondries, et permet ainsi de faciliter l'entrée des substrats jusqu'aux mitochondries. L'utilisation de fibres musculaires perméabilisées présente l'avantage d'évaluer, *in situ*, la fonction mitochondriale, alors que l'isolement des mitochondries a tendance à altérer leur intégrité (Saks et al., 1998). La technique de perméabilisation utilisée est basée sur les travaux de (Kunz et al., 1993) pour les rats et de (Theron et al., 2000) pour l'anguille.

Après dissection, les échantillons musculaires de rat ou d'anguille sont émincés grossièrement au scalpel. Ils sont ensuite placés dans le tampon adéquat A ou B (cf. III.4.1) à raison de 10 mL pour



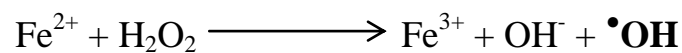


**Figure 22 : Système de mesure de la consommation d'oxygène.**

100 mg de tissu. Les tampons A et B sont respectivement additionnés de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et de 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de saponine. L'incubation s'effectue sous agitation constante pendant 20min à 4°C. Les fibres musculaires sont ensuite rincées deux fois 10min dans la solution tampon adéquate (A ou B) et immédiatement utilisée pour la mesure de la respiration mitochondriale musculaire et de la production d'ATP et d' $\bullet\text{OH}$ .

### ***Exposition des fibres perméabilisées à un système générateur de ROS***

La sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS est estimée par la mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale et de la production d'ATP de fibres perméabilisées exposées ou non à un système générateur de  $\bullet\text{OH}$ . Le système choisi,  $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ , est basé sur la réaction de Fenton :



Un travail de mise au point basé sur les travaux de Walsh et al. (2001) a consisté à trouver les meilleurs temps d'incubation et de concentrations en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $\text{FeCl}_2$  pour valider un même protocole pour toutes espèces et types tissulaires étudiés.

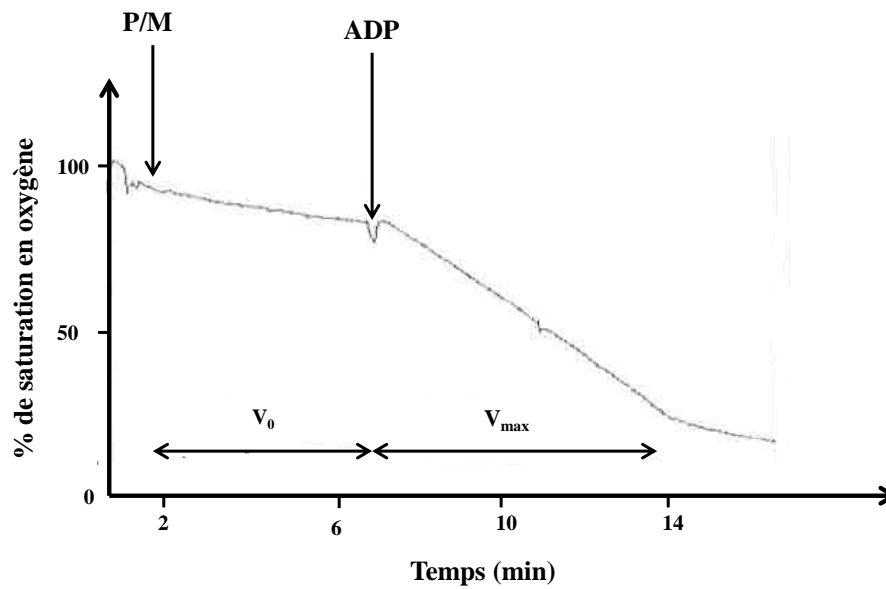
Ainsi, les fibres ont été incubées dans du tampon A ou A' en présence ou en absence du système  $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM/5mM) pendant 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière. L'incubation est suivie de deux lavages de 5 min dans du tampon A ou A' selon l'espèce.

### **III.4.3. Analyse des paramètres de la fonction mitochondriale et du stress oxydant:**

#### ***III.4.3.1. A partir des fibres perméabilisées :***

##### ***Mesure de la consommation d'oxygène par oxymétrie***

La consommation d'oxygène ( $\text{VO}_2$ ) des fibres perméabilisées (exposées ou non aux ROS) est mesurée *in vitro* par la méthode de confinement. Cette méthode est basée sur la mesure de la diminution de la quantité d'oxygène dans le milieu qui résulte de la respiration mitochondriale du tissu. La concentration d'oxygène du milieu est mesurée par une électrode polarographique de type Clark dans une cellule close remplie d'un milieu de respiration MR : Tris 20mM, KCl 150mM, EDTA 0,08mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM,  $\text{MgCl}_2$  7,5mM, à pH 7,2 et saturé en air à la température de mesure (figure 22).



**Figure 23 : Enregistrement type lors de la mesure de la consommation d'oxygène ( $VO_2$ ) dans les fibres perméabilisées.** Elle est mesurée en condition non phosphorylante ( $VO_{2(0)}$ ) où seul le pyruvate/malate (P/M) est ajouté. Dans un second temps, l'adénosine diphosphate (ADP) est ajouté pour la  $VO_2$  en condition phosphorylantes ( $VO_{2(max)}$ ).

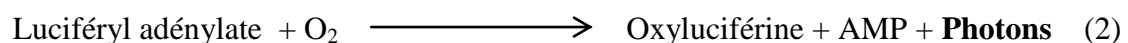
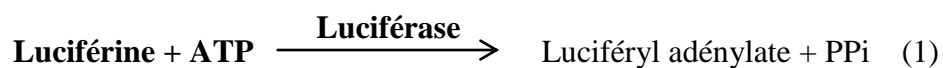
L'électrode est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent entre lesquelles est établie une différence de potentiel (0,7V) nécessaire à la réduction de l'oxygène en eau. L'intensité du courant mesurée entre les électrodes est donc proportionnelle à la quantité d'oxygène disponible dans le MR. L'électrode est connectée à un oxymètre SI926 relié à un ordinateur permettant de suivre la diminution de la saturation du MR en oxygène. Le type d'électrode utilisé est sensible aux variations de température, celle-ci est rigoureusement surveillée grâce à un système de thermorégulation des cellules de respiration qui permet ainsi des mesures à 15°C pour les anguilles et à 37°C pour les rats.

L'électrode est préalablement calibrée en deux points. Le premier, le 0% de saturation en oxygène est obtenu en utilisant une solution anoxique (saturée en sulfite de sodium). Le deuxième point, le 100% de saturation, est obtenu avec du MR saturé en air (255,5  $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  à 15°C et 186,7  $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  à 37°C).

La mesure débute dès la fermeture des cellules de respiration après le placement de 20 mg de fibres perméabilisées dans 2mL de MR sous agitation constante. Après 2min, sont introduits 50 $\mu\text{l}$  de Pyruvate/Malate (0,5/0,25mM) afin de mesurer la consommation d'oxygène (figure 23) en conditions de non phosphorylation  $V_0$  ( $\text{VO}_{2(0)}$ ). Après 5min, 10 $\mu\text{l}$  d'ADP (1M) sont ajoutés pour la mesure de consommation d'oxygène maximale en conditions de phosphorylation  $V_{\text{max}}$  ( $\text{VO}_{2(\text{max})}$ ). Les concentrations en Pyruvate/Malate et en ADP sont saturantes de manière à mesurer les consommations d'oxygène en état de fonctionnement maximal des mitochondries (Zoll et al., 2002). Les consommations d'oxygène sont exprimées en  $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissu frais.

### ***Mesure de la production d'ATP***

Le principe de dosage de l'ATP par bioluminescence repose sur la réaction métabolisée par la luciférase :



La lumière émise, mesurée par un luminomètre, est directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans le milieu.

Afin de mesurer la production d'ATP ( $V_{\text{ATP}}$ ) au cours du fonctionnement mitochondrial, des mises au point ont été nécessaires et se sont appuyées sur les travaux de Ouhabi et al. (1998). Il a été vérifié entre autres l'absence d'une production d'ATP pendant la mesure de  $\text{VO}_{2(0)}$ , et testé l'effet



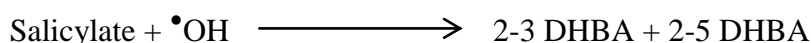
de multiples prélèvements du milieu de respiration sur la  $VO_{2(max)}$  et la production d'ATP. La quantification de la concentration d'ATP cumulée a été réalisée dans le MR pendant la mesure de  $VO_{2(max)}$ .

Ainsi, 20  $\mu$ l de MR ont été prélevés toutes les 30 secondes pendant deux minutes et additionnés à 100  $\mu$ l de DMSO (diméthylsulfoxyde, qui permet de stabiliser l'ATP produit et inhibe sa dégradation rapide) pour former la solution échantillon. La solution réactionnelle (luciférine 15  $\mu$ M ; Glycine 50 mM ; Tris 0,1 mM ;  $MgSO_4$  10 mM et de BSA 1 mg.mL<sup>-1</sup>) est ajoutée à volume équivalent avec la solution échantillon. Une gamme étalon (0-500 nmol), réalisée à chaque série de dosages, permet d'obtenir la quantité d'ATP produite par les fibres perméabilisées pendant un temps donné. Les valeurs sont exprimées en  $\mu$ mol d'ATP.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.

### ***Mesure de la production des $\bullet OH$***

La technique de quantification des  $\bullet OH$  est une adaptation par Amérand et al. (2005) des travaux de Floyd et al. (1984, 1986) et de Duine et al. (1998).

En raison de sa forte réactivité, le radical  $\bullet OH$  a une demi-vie très courte (10<sup>-9</sup>s) et est présent en très faibles concentrations. Une technique indirecte utilisant le salicylate comme piègeur des  $\bullet OH$  a donc été utilisée. L'hydroxylation du salicylate par les  $\bullet OH$  forme deux dérivés stables, le 2-3 et le 2-5 acide dihydroxybenzoïque (DHBA) :



Le 2-3 et le 2-5 DHBA sont ensuite séparés et quantifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur électrochimique.

Le principe est basé sur l'entraînement de l'échantillon à analyser par une phase mobile polaire à travers une colonne dans laquelle des chaînes alkyles à 18 carbones greffées sur des particules de silice constituent la phase stationnaire apolaire. Les molécules seront ainsi séparées principalement selon leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire. Le détecteur comporte une cellule connectée à une électrode en carbone vitreux et une électrode de référence Ag/AgCl entre lesquelles est appliqué un potentiel pour oxyder les molécules. La quantité des molécules oxydées de l'échantillon sera ainsi proportionnelle à la variation d'intensité du courant mesurée. L'identification et la quantification des 2-5 et 2-3 DHBA se fait en fonction d'un mélange standard à concentration et temps de rétention connus et spécifiques à chaque molécule.

Une partie des fibres perméabilisées (100 mg) est incubée pendant 30 min sous agitation constante à l'obscurité, dans 4,5 mL de milieu de respiration filtré (à 0,45  $\mu$ m) et saturé en air à 15°C pour l'anguille et à 37°C en condition  $V_{max}$ . La réaction débute dès l'addition de 60  $\mu$ l de salicylate



(50mM). Un contrôle (sans fibres perméabilisées) est préparé, il servira à contrôler une éventuelle production parasite des  $\bullet\text{OH}$ .

Après 30 min d'incubation, la réaction est stoppée en ajoutant 225 $\mu\text{l}$  d'acide perchlorique 70%. Les fibres sont ensuite récupérées et broyées à froid dans l'azote liquide. Le milieu d'incubation est récupéré et transféré avec le broyat dans un tube. Après centrifugation (10 min à 12000 g et à 4°C) le pH de la solution est neutralisé (entre 6 et 8) avec de la soude (NaOH). La solution est enfin filtrée (à 0,45  $\mu\text{m}$ ) et conservée à -80°C.

Au même moment, un mélange standard de 2-3 et de 2-5 DHBA, respectivement de 2 et 2.5 ng.mL<sup>-1</sup> de MR est réalisé et conservé à -80°C.

Dans un délai de trois jours maximum, les échantillons, les contrôles et le standard sont dosés par HPLC couplée à un détecteur électrochimique. Les conditions chromatographiques sont décrites dans l'annexe 1.

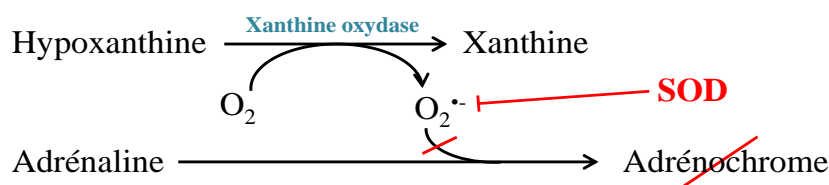
#### IV.4.3.2. Mesures à partir d'extraits tissulaires :

##### *Systèmes enzymatiques antioxydants :*

Les mesures ont été effectuées à 37°C pour les rats et à 15°C pour l'anguille à partir des extraits protéiques de tissus cardiaque et musculaire squelettique.

##### \* La superoxyde dismutase (SOD) :

L'activité maximale de la SOD est mesurée indirectement en utilisant le système Hypoxanthine/Xanthine comme producteur d' $\text{O}_2^{\bullet-}$  en présence d'oxygène. La xanthine oxydase permet de catalyser cette réaction. L'adrénaline est réduite par  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en adrénochrome. La formation de ce dernier est mesurée par spectrophotométrie à 480nm. La SOD issue des extraits tissulaires neutralise l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  et limite la réduction de l'adrénaline :



L'activité de la SOD est calculée selon le pourcentage d'inhibition de la réduction de l'adrénaline en adrénochrome par rapport à un contrôle, c'est-à-dire sans tissu (Amérand et al., 2006). Les détails sont présentés dans l'annexe 2. Les résultats sont exprimés en  $U_{\text{SOD}}.\text{mg}^{-1}$  de protéines.





\* La catalase (CAT) :

L'activité maximale de la catalase repose sur la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en dioxygène par la catalase:



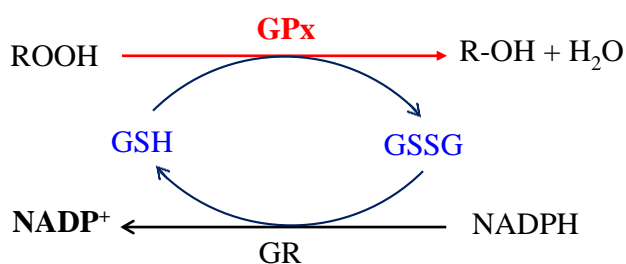
La disparition du peroxyde d'hydrogène est mesurée en fonction du temps par spectrophotométrie à 240 nm. L'activité CAT, exprimée en  $\mu\text{mol}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformé.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines, est calculée grâce à la formule de Beer-Lambert :

$$\Delta C \text{ (nmol H}_2\text{O}_2\text{/min/mg)} = \frac{\Delta A_{240} \text{ (DO/min)} \times V_{\text{cuve}} \text{ (ml)} \times V_{\text{tampon extraction}} \text{ (ml)}}{\epsilon \text{ (m L/mol/cm)} \times l \text{ (cm)} \times V_{\text{extrait}} \text{ (ml)} \times \text{contenu protéique (mg)}}$$

Coefficient d'extinction molaire :  $\epsilon=15000 \text{ L/mol/cm}$

\* La glutathion peroxydase (GPx) :

L'activité maximale de la GPx est mesurée indirectement via sa capacité à réduire un peroxyde (ROOH) en présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est oxydé en glutathion disulfide (GSSG) qui lui est réduit en GSH par la glutathion réductase (GR) en présence de NADPH qui est oxydé en NADP<sup>+</sup> :

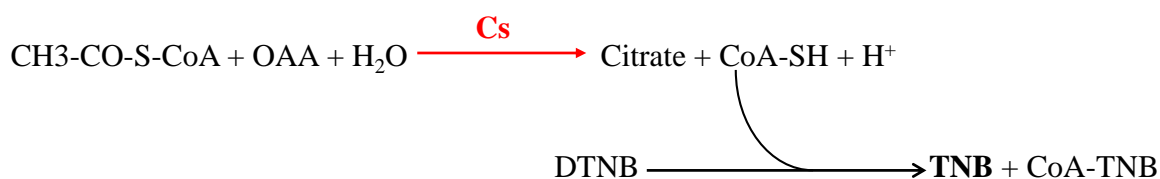


L'oxydation du NADPH en NADP<sup>+</sup> est mesurée par spectrophotométrie en fonction du temps à 340nm (Mortelette et al., 2010). L'activité GPx, exprimée en  $\mu\text{mol}$  de NADPH oxydé.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines, est proportionnelle à la disparition de NADPH et est calculée grâce à la formule de Beer-Lambert. Les détails sont présentés dans l'annexe 3.



### *L'activité citrate synthase (Cs)*

La citrate synthase est une enzyme spécifiquement mitochondriale et classiquement utilisée comme témoin de la densité mitochondriale dans un tissu (Siu et al., 2003). Elle est située dans l'espace inter-membranaire mitochondriale et catalyse la première réaction du cycle de Krebs, c'est-à-dire la formation de citrate à partir d'oxaloacétate (OAA) et d'acétyl CoA (CH<sub>3</sub>-COS-CoA). Le CoA réduit (CoA-SH) formé lors de la réaction réagit avec le 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoic acid (DTNB) pour donner du TNB qui absorbe spécifiquement à 412 nm :



La vitesse de formation du TNB est donc proportionnelle à l'activité Cs (Srere, 1969). Les détails sont présentés dans l'annexe 4. L'activité Cs est exprimée en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines.

### *Contenu tissulaire en protéines*

La teneur tissulaire en protéines a été mesurée par colorimétrie en utilisant un kit de dosage des protéines (Uptima-Interchim, France, # FT-40840A) qui est basé sur la méthode BCA (BC Assay) à partir de l'acide bicinchoninique (BC). L'ion cuivre Cu<sup>2+</sup> est réduit en Cu<sup>+</sup> par les protéines en milieu alcalin. Le BC chélate les ions Cu<sup>+</sup> avec une spécificité très élevée pour former un complexe de couleur pourpre soluble dans l'eau. L'absorbance de ce dernier complexe est mesurée par spectrophotométrie en lecteur de plaque à 562 nm. La concentration en protéines est directement proportionnelle à l'absorbance mesurée.

La teneur tissulaire en protéines est calculée avec une courbe de référence (gamme étalon 0-2 mg/ml) obtenue pour une protéine standard, la BSA (Bovine Serum Albumin) puis exprimée en mg de protéines.g<sup>-1</sup> de tissu.

### *Quantification du MDA*

Le malondialdéhyde (MDA) est un des produits de la lipopéroxydation (classiquement utilisé comme un indice de stress oxydatif et des dommages causés par les radicaux libres).



Le principe du dosage repose sur la formation d'un complexe en milieu acide et chaud entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA). Après extraction, le complexe formé est spécifiquement identifié et quantifié par HPLC couplée à un détecteur UV (532 nm).

Du tissu congelé est récupéré et broyé au polytron à 4°C à raison de 60 mg pour 2 ml d'une solution contenant 2% d'une solution de méthanol à 1% de butylhydroxytoluène. L'homogénat est ensuite incubé à 100°C pendant 30 min avec 3 mL d'acide phosphorique 1% et 1 mL de TBA à 7,4 mM. Les complexes TBA/MDA formés sont extraits avec 4 mL de butanol. Après centrifugation (4000 g), 2mL de l'extrait butylique sont récupérés et évaporés sous bullage d'azote à 37°C. Le résidu obtenu est suspendu dans 1mL de phase mobile avant d'être filtré à 0,45 µm. Le complexe TBA/MDA est séparé par HPLC et détecté au spectrophotomètre UV à 532 nm (Amérand et al., 2006). Les valeurs acquises sont rapportées à la masse du tissu et exprimées en nmol MDA.g<sup>-1</sup> de tissu. Les conditions chromatographiques sont décrites dans l'annexe 5.



## IV. Résultats :

### IV.1. Effet d'un entraînement en endurance sur la performance physique :

La vitesse maximale aérobie (VMA pour le rat et  $U_{crit}$  pour le poisson) a été utilisée dans le cadre de ce travail comme indice de l'intensité métabolique. **Cette mesure de VMA** a été choisie car nous n'avions pas la possibilité technique de mesurer la consommation d'oxygène maximale de l'animal entier ( $VO_{2entier}$ ).

Concernant le poisson en particulier, nous avons cherché dans un premier temps à disposer d'un autre indice de l'intensité métabolique, soit la mesure de la fréquence cardiaque (Fc). L'idée était d'étudier la relation  $VO_{2entier}/Fc$  dans diverses situations expérimentales (température, pression hydrostatique et exercice) afin de déterminer si la seule mesure de la Fc pouvait permettre de prédire la  $VO_{2entier}$ .

Dans un premier temps, nous avons testé différentes gammes de température ( $5^{\circ}C-25^{\circ}C$ ) et de pression hydrostatique (0,1MPa-10,1MPa). La figure A de l'annexe 6 montre une corrélation linéaire ( $R^2 = 0,98$ ) de la relation  $Fc/VO_{2entier}$  dans la gamme de températures testées. En revanche, sous l'effet de la pression hydrostatique (0,1 MPa-10,1 MPa), cette relation n'est pas linéaire (figure 36 dans l'annexe 6). La Fc stagne aux alentours de 8,1MPa alors que  $VO_{2entier}$  continue d'augmenter. Cela signifie que, chez l'anguille, la Fc pourrait être utilisée pour prédire la  $VO_{2entier}$  (et vis-versa) dans la gamme de température utilisée ( $5^{\circ}C-25^{\circ}C$ ) et à pression atmosphérique.

Dans un second temps, nous avons étudié la relation entre la Fc et la vitesse de nage et nous avons vérifié si la relation linéaire  $Fc/VO_{2entier}$  obtenue précédemment pouvait être utilisée pour estimer l'intensité métabolique (par extrapolation) en situation de nage. Ainsi,  $VO_{2entier}$  a été estimée en rapportant les valeurs de  $F_C$  obtenues au cours de la nage sur la courbe  $Fc/VO_{2entier}$  obtenue précédemment dans la gamme de température ( $5^{\circ}C-25^{\circ}C$ ). Malheureusement, cela n'a pas été possible (figure B<sub>1</sub> dans l'annexe 6). En effet, les valeurs de  $VO_{2entier}$  estimées n'étaient pas cohérentes, pour des raisons techniques, avec d'autres études mesurant directement la  $VO_{2entier}$  au cours de la nage (figure B<sub>2</sub> dans l'annexe 6).

Ainsi, l'estimation de l'intensité métabolique a été effectuée par mesure de **la vitesse critique de nage  $U_{crit}$**  (qui équivaut à la VMA chez le mammifère).





#### IV.1.1. Chez le rat Wistar :

Le tableau 6 montre, quel que soit le sexe, une augmentation significative ( $\approx 10\%$  chez les mâles et  $\approx 20\%$  chez les femelles) de la vitesse maximale aérobie (VMA) dès la 3<sup>ème</sup> semaine d'entraînement. Ce gain est maintenu chez la femelle après 6 semaines d'entraînement (VMA<sub>2</sub>). Pour des raisons techniques, la VMA<sub>2</sub> n'a pas été mesurée chez les mâles (ces derniers ont été utilisés dans le cadre d'un autre projet de recherche où la VMA n'a pas été déterminée après entraînement).

		Mâle		Femelle	
		Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraînée
N		8	8	10	10
Poids (g)	P <sub>1</sub>	270 ± 3 <sup>§§§§</sup>	269 ± 3	214 ± 2	216 ± 2
	P <sub>2</sub>	422 ± 10 <sup>##§§§§</sup>	380 ± 10 <sup>##**</sup>	272 ± 5 <sup>###</sup>	257 ± 3 <sup>##**</sup>
VMA (Km/h)	VMA <sub>1</sub>	1,45 ± 0,10 <sup>§</sup>	2,04 ± 0,12 <sup>**</sup>	1,80 ± 0,08	1,93 ± 0,08
	VMA <sub>mi-parcours</sub>	Nm	2,24 ± 0,14 <sup>‡</sup>	Nm	2,34 ± 0,11 <sup>‡</sup>
	VMA <sub>2</sub>	Nm	Nm	1,63 ± 0,06	2,22 ± 0,12 <sup>‡***</sup>

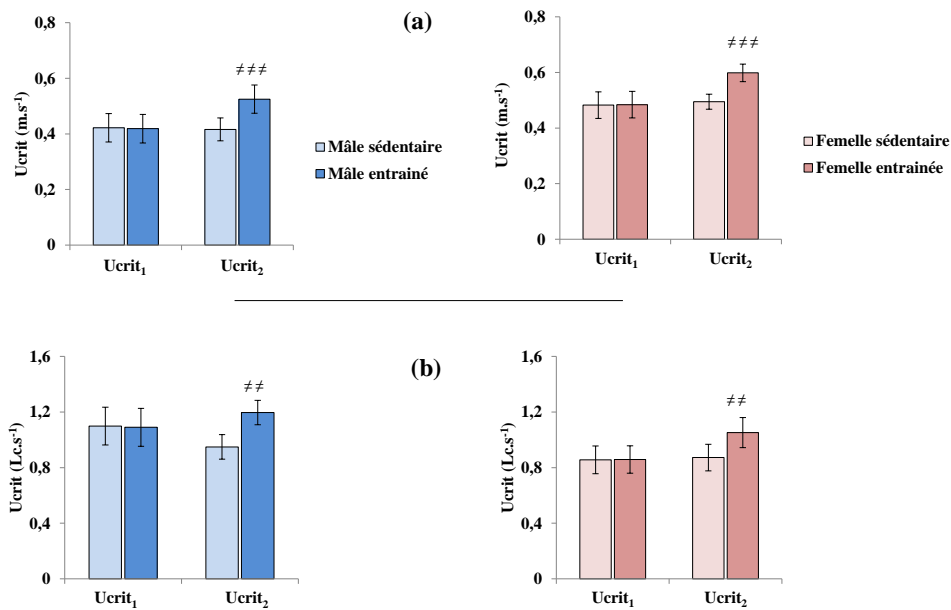
**Tableau 6 : Effets de six semaines d'entraînement à la course sur le poids et la vitesse maximale aérobie (VMA) du rat Wistar mâle et femelle.** Le poids et la VMA ont été mesurés avant (1) et après (2) protocole d'entraînement à la course (sauf chez le mâle pour lequel VMA<sub>2</sub> n'a pas été déterminée). Chez les animaux entraînés, la VMA a été évaluée à mi-parcours (VMA<sub>mi-parcours</sub>) afin de réajuster l'intensité de l'entraînement. Les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM. \* $P < 0,05$  et \*\* $P < 0,01$  entraîné vs sédentaire ; <sup>§</sup> $P < 0,05$  et <sup>§§§§</sup> $P < 0,001$  sédentaire mâle vs sédentaire femelle; <sup>‡</sup> $P < 0,05$  et <sup>‡‡</sup> $P < 0,001$  avant vs après protocole d'entraînement. Nm = non mesuré.

Que ce soit chez les animaux du groupe sédentaire ou entraîné, les femelles présentent une prise de poids moins importante que les mâles sur toute la durée du protocole. Toutefois, chez les rats entraînés, le gain de poids à la fin du protocole d'entraînement est moins important que chez les sédentaires (de -13% chez les mâles et -8% chez les femelles entraînés vs sédentaires mâles et femelles).

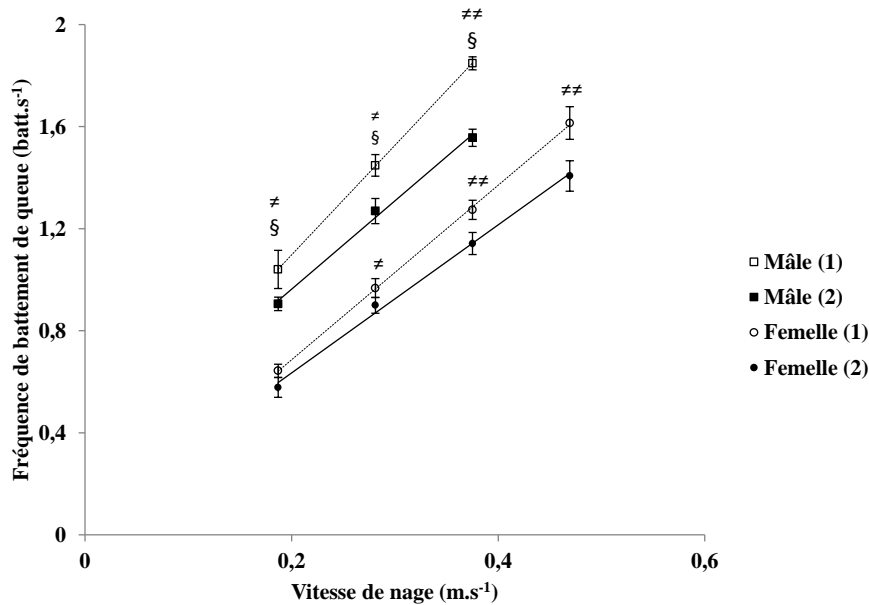
**Chez le rat Wistar, l'entraînement à la course a induit une amélioration de la performance physique.**

#### IV.1.2. Chez l'anguille européenne :

La performance de nage a été évaluée par la mesure de la vitesse critique de nage (Ucrit) et de la fréquence de battements de queue avant (1) et après (2) le protocole d'entraînement.



**Figure 24 : Vitesse critique de nage (Ucrit) d'anguilles européennes mâles et femelles.** Ucrit a été évaluée avant (Ucrit<sub>1</sub>) et après (Ucrit<sub>2</sub>) le protocole d'entraînement à la nage. Les valeurs sont exprimées en m.s<sup>-1</sup> (a) et en longueur corporelle par seconde (Lc.s<sup>-1</sup>) (b). Moyenne ± SEM. ; <sup>##</sup>  $P < 0,01$ , <sup>###</sup>  $P < 0,001$  avant vs après protocole d'entraînement.



**Figure 25 : Fréquence de battements de queue en fonction de la vitesse de nage chez l'anguille mâle et femelle avant (1) et après (2) entraînement à la nage.** La figure ne présente que les individus entraînés. Il a été vérifié que la fréquence de battements de queue n'est pas modifiée chez les individus sédentaires après le protocole de nage. <sup>\$</sup> $P < 0,05$  sédentaire mâle vs sédentaire femelle ; <sup>#</sup> $P < 0,05$ , <sup>##</sup>  $P < 0,01$  avant vs après entraînement à la nage.

La figure 24 présente les Ucrit moyennes exprimées soit en mètre par seconde ( $m.s^{-1}$ ) soit en longueur corporelle par seconde ( $Lc.s^{-1}$ ). L'expression en  $Lc.s^{-1}$  permet de prendre en compte l'impact des différences de taille entre mâles et femelles.

Chez les anguilles sédentaires, quel que soit le genre, les valeurs d'Ucrit ne sont pas modifiées par la durée du protocole ( $Ucrit_1$  vs  $Ucrit_2$ ).

Chez les anguilles entraînées, on note un gain significatif de performance de nage ( $Ucrit_2$  vs  $Ucrit_1$ ) d'environ 26% chez les mâles et de 21% chez les femelles (exprimée en  $m.s^{-1}$ ). Lorsque la taille des animaux est prise en compte (c'est-à-dire lorsque la vitesse est exprimée en  $Lc.s^{-1}$ ), les mêmes gains significatifs de performance de nage sont observés.

Parallèlement à ces mesures d'Ucrit, nous avons mesuré la fréquence de battements de queue avec pour objectif de voir si l'entraînement modifie ce paramètre et s'il existe des différences selon le genre (figure 25). La fréquence de battements de queue ( $battements.s^{-1}$ ) n'était pas modifiée chez les sédentaires entre le début et la fin du protocole d'entraînement (non représentée graphiquement dans ce travail).

Quelle que soit la vitesse de nage, les mâles présentent une fréquence de battements de queue significativement plus élevée que celle des femelles.

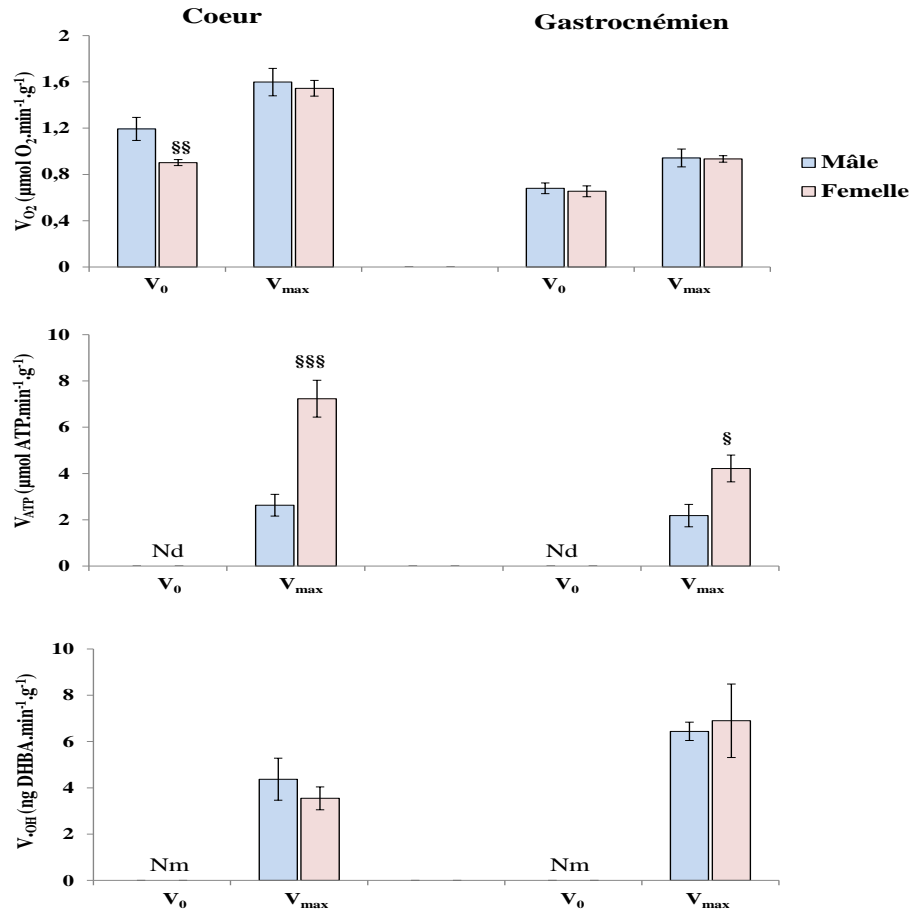
Enfin, l'entraînement induit pour une vitesse de nage donnée (sauf à  $0,19 m.s^{-1}$  pour les femelles) une diminution significative de la fréquence de battements de queue.

Concernant l'évolution du poids au cours du protocole, chez les entraînées comme chez les sédentaires, le poids des anguilles a diminué significativement après le protocole d'entraînement car elles sont à jeun (tableau 7). L'entraînement n'a pas eu d'effet sur le poids des anguilles.

		Mâle		Femelle	
		Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraînée
N		6	6	7	7
		$0,385 \pm 0,007$ <sup>§§§</sup>	$0,444 \pm 0,043$	$0,579 \pm 0,038$	$0,587 \pm 0,035$
Poids (g)	P <sub>1</sub>	$89,5 \pm 7,2$ <sup>§§§</sup>	$95,0 \pm 8,7$	$344 \pm 41$	$338 \pm 36$
	P <sub>2</sub>	$86,8 \pm 6,8$ <sup>§§§</sup> <sup>‡</sup>	$92,0 \pm 8,6$ <sup>‡</sup>	$336 \pm 39$ <sup>‡</sup>	$331 \pm 38$ <sup>‡</sup>

**Tableau 7: Effets de l'entraînement sur le poids chez l'anguille mâle et femelle.** Le poids (P<sub>1</sub>) et après (P<sub>2</sub>) protocole d'entraînement à la nage. Les valeurs sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. <sup>§§§</sup> $P < 0,001$  sédentaire mâle vs sédentaire femelle; <sup>‡</sup> $P < 0,05$  avant vs après protocole d'entraînement.

**Chez l'anguille européenne, quel que soit le sexe, l'entraînement à la nage a induit une amélioration de la performance physique de nage.**



**Figure 26 : Effet du genre sur la fonction mitochondriale chez le rat Wistar.** la respiration mitochondriale (basale ' $V_0$ ' et maximale ' $V_{max}$ '), la production d'ATP ( $V_{ATP}$ ) et la production d'OH ( $V_{OH}$ ) ont été mesurées à partir de fibres perméabilisées cardiaques et musculaires. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.  $^{\$}P < 0,05$ ,  $^{\$§§}P < 0,001$  mâle vs femelle. Nd = non détecté, Nm = non mesuré.

## **IV.2. Effet du genre et de l'entraînement sur la fonction mitochondriale et les réponses radicalaires dans le muscle cardiaque et squelettique :**

L'étude de l'effet du genre et de l'entraînement sur la fonction mitochondriale et les réponses radicalaires a nécessité entre autres de réaliser plusieurs mesures simultanées '*in vitro*' sur du tissu frais. Cette étude a donc demandé quelques mises au point dans le but de réaliser en parallèle, à partir de fibres perméabilisées de cœur et de muscle, les mesures de la consommation d'oxygène ( $VO_2$ ), de production d'ATP ( $V_{ATP}$ ) et de production du radical hydroxyle ( $V_{\cdot OH}$ ).

Il a été vérifié qu'il n'y avait pas de production d'ATP en conditions non phosphorylantes ( $V_0$ ). En effet, la figure A<sub>1</sub> de l'annexe 7 montre que la production d'ATP mesurée était dépendante de la quantité d'ADP ajoutée dans le milieu de respiration. Il a également été déterminé le nombre minimum de prélèvements de milieu de respiration qui permet d'établir la cinétique de production d'ATP sans interférer sur la  $VO_2$ . La figure B de l'annexe 7 montre qu'en deux minutes, trois prélèvements (un prélèvement par minute) donnent une cinétique similaire à celle obtenue avec six prélèvements (un prélèvement chaque 30 secondes).

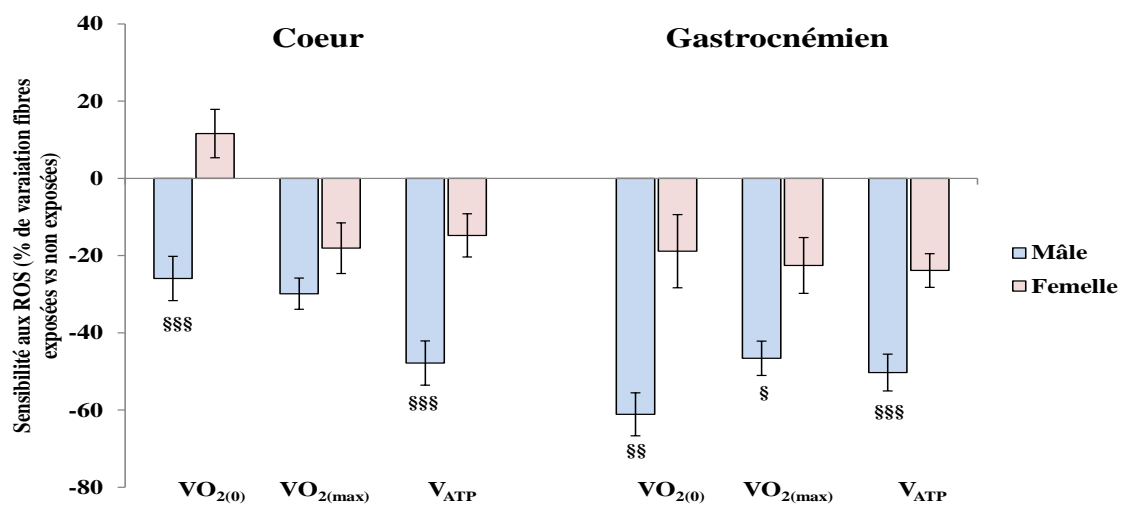
Concernant l'exploration de la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS, la mise au point a consisté essentiellement à déterminer les temps d'incubation et les concentrations de  $H_2O_2$  et de  $FeCl_2$  (figure de l'annexe 8) qui induiraient une inhibition maximale et reproductible de la consommation d'oxygène mitochondriale dans les deux tissus étudiés. Nous avons ainsi testé plusieurs combinaisons de concentrations de  $FeCl_2$  et de  $H_2O_2$  et plusieurs temps d'incubation. Au final, comme mentionné dans la partie "matériels et méthodes", une incubation des fibres perméabilisées pendant 30 min en présence du système  $FeCl_2/H_2O_2$  à 1mM/5mM a été utilisée.

### **IV.2.1. Chez le rat Wistar :**

#### ***IV.2.1.1. Fonction mitochondriale et réponses radicalaires chez les animaux sédentaires :***

La figure 26 montre que la capacité aérobie ainsi que la production d'ATP sont globalement plus élevées dans le cœur que dans le muscle squelettique.

Les consommations d'oxygène maximales ( $VO_{2(max)}$ ) des mâles et des femelles sont similaires quel que soit le tissu, tandis que la consommation d'oxygène en conditions non phosphorylantes ( $VO_{2(0)}$ ) est significativement plus élevée chez le mâle que chez la femelle au niveau cardiaque.



**Figure 27 : Sensibilité de VO<sub>2</sub> (VO<sub>2(0)</sub> et VO<sub>2(max)</sub>) et V<sub>ATP</sub> aux ROS selon le genre chez le rat Wistar. La sensibilité aux ROS est représentée par le pourcentage de variation des différents paramètres mesurés dans les fibres exposées par rapport aux fibres non exposées au système générateur de ROS. Les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM. §P < 0,05, §§P < 0,01 §§§P < 0,001 mâle vs femelle.**

Néanmoins, quel que soit le tissu, la production d'ATP ( $V_{ATP}$ , mesurée en condition phosphorylante) est significativement plus importante chez la femelle. Ceci se traduit par un ratio  $V_{ATP}/VO_{2(max)}$  significativement plus élevée chez la femelle, corrélée à une activité citrate synthase Cs (tableau 8) plus importante seulement dans le cœur (significativement). Au niveau du gastrocnémien, l'activité Cs tend à être moins élevée (-22%) que chez le mâle.

Mesurée en parallèle, la production radicalaire ( $V_{OH}$ ), n'est pas significativement différente entre les deux sexes, mais tend tout de même à être moins importante chez la femelle (-19%) dans le cœur.

		CS (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	GPx (μmol NADPH oxydé. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)
Coeur	Mâle (N=8)	542 ± 43 <sup>§</sup>	3,75 ± 0,20 <sup>§§§</sup>	3,01 ± 0,29	5,86 ± 0,34 <sup>§§</sup>	20,4 ± 3,1
	Femelle (N=10)	682 ± 39	4,57 ± 0,17	2,58 ± 0,70	12,3 ± 0,6	20,3 ± 3,4
Gastrocnémien	Mâle (N=8)	188 ± 18	5,03 ± 0,2 <sup>§§§</sup>	6,97 ± 0,84 <sup>§§§</sup>	1,90 ± 0,11	20,0 ± 2,1 <sup>§</sup>
	Femelle (N=10)	146 ± 19	2,81 ± 0,13	1,17 ± 0,46	1,74 ± 0,18	11,7 ± 1,1

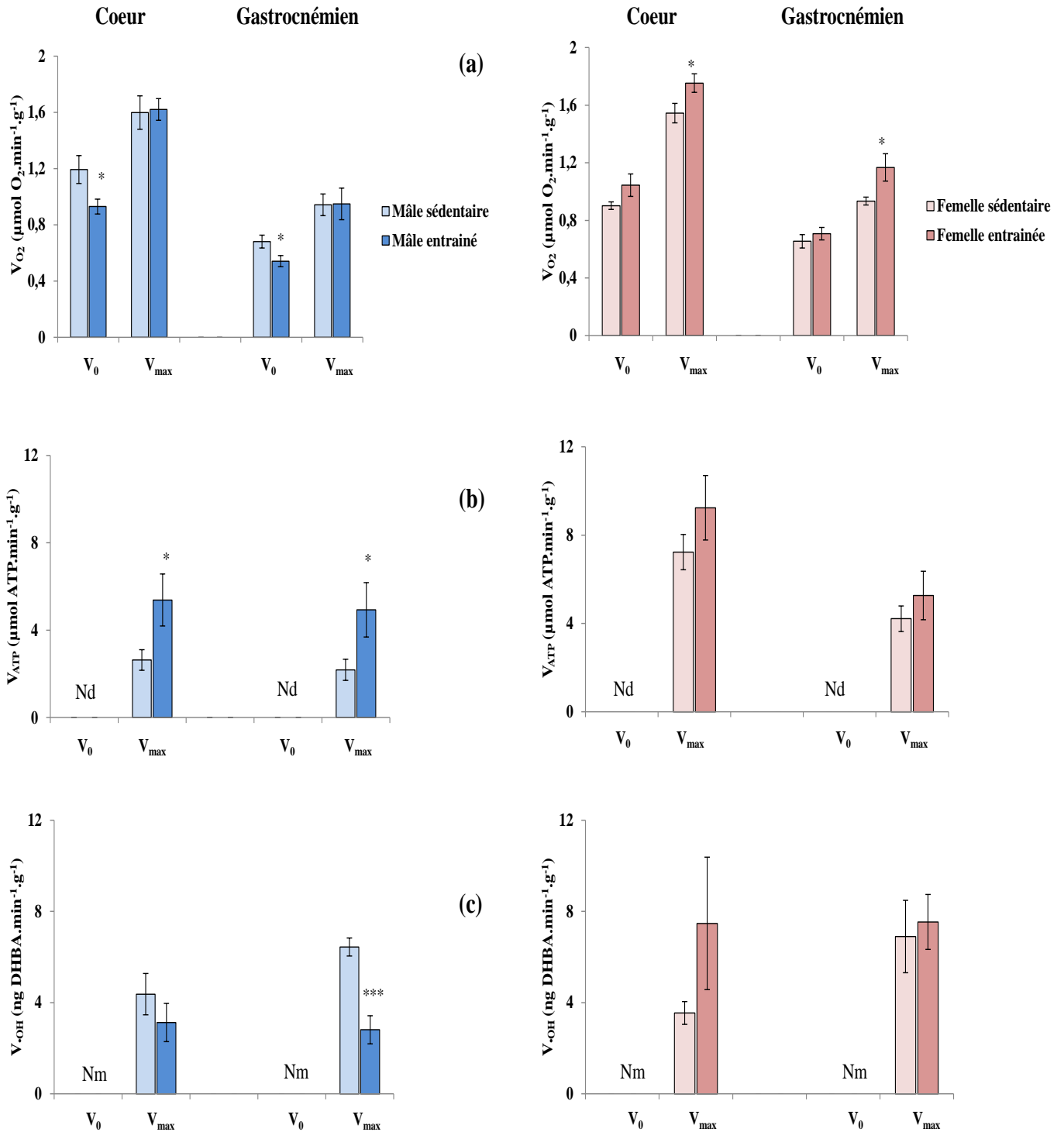
**Tableau 8 : Effet du genre sur les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT et GPx), de la citrate synthase (Cs) et sur le contenu en malondialdéhyde (MDA) chez le rat Wistar mâle et femelle.** Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. <sup>§</sup> $P < 0,05$ , <sup>§§</sup> $P < 0,01$ , <sup>§§§</sup> $P < 0,001$  mâle vs femelle.

Comme illustré par la figure 27, la fonction mitochondriale est, comme attendu, affectée après exposition des fibres perméabilisées aux ROS. Quel que soit le tissu, la sensibilité de  $VO_{2(0)}$ ,  $VO_{2(max)}$ , et de  $V_{ATP}$  est significativement moins importante chez la femelle que chez le mâle.

La mesure des activités enzymatiques (tableau 8) montre des différences inter-tissulaires : les activités de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPx) sont plus élevées chez la femelle par rapport au mâle au niveau cardiaque. Au contraire, au niveau du muscle gastrocnémien, la femelle présente des activités SOD et de la catalase (CAT) ainsi qu'un contenu en malondialdéhyde (MDA, index de lipoperoxydation) moins élevés que le mâle.

- Chez le rat Wistar, la femelle présente un rendement de la phosphorylation oxydative plus élevé que chez le mâle.
- La fonction mitochondriale semble plus résistante au stress oxydant chez la femelle.





**Figure 28: Effet de l'entraînement à la course sur la fonction mitochondriale chez le rat Wistar.**  $V_{O_2}$  ( $V_0$  et  $V_{\max}$ ) (a),  $V_{ATP}$  (b) et  $V_{\cdot OH}$  (c) ont été mesurées chez le mâle sédentaire (bleu clair) et entraîné (bleu foncé) et chez la femelle sédentaire (rose clair) et entraînée (rose foncé). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  et \*\*\* $P < 0,001$  entraîné vs sédentaire. Nd = non détecté, Nm = non mesuré.

#### IV.2.1.2. Effet de l'entraînement sur la fonction mitochondriale et les réponses radicalaires : effet de l'entraînement

Comme le montre la figure 28-a, l'entraînement induit chez le mâle une diminution significative de  $VO_{2(0)}$  dans le cœur et dans le muscle sans modification de  $VO_{2(max)}$ . Parallèlement,  $V_{ATP}$  est significativement plus élevée quel que soit le tissu par rapport aux sédentaires (figure 28-b). L'entraînement induit donc une augmentation du rapport  $V_{ATP}/VO_{2(max)}$  (tableau A de l'annexe 9), autrement dit une amélioration du rendement de la phosphorylation oxydative.

En ce qui concerne la production radicalaire, l'entraînement a diminué  $V_{OH}$  dans le muscle gastrocnémien ( $P < 0,001$ ) et dans le cœur (tendance de -28%).

Chez la femelle, on note une augmentation significative de  $VO_{2(max)}$  au niveau du cœur et du muscle gastrocnémien, mais qui ne s'accompagne pas de variation de l'activité citrate synthase (tableau 9).  $V_{ATP}$  après entraînement a tendance à augmenter (+12%) au niveau cardiaque, mais sans modifier le rapport  $V_{ATP}/VO_{2(max)}$ .

a)

		CS (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	GPx (μmol NADPH oxydé. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)
Coeur	Sédentaire (N=8)	542 ± 43 <sup>§</sup>	3,75 ± 0,20 <sup>§§§</sup>	3,01 ± 0,29	5,86 ± 0,34 <sup>§§</sup>	20,4 ± 3,1
	Entraîné (N=8)	559 ± 35	2,32 ± 0,16 <sup>***</sup>	2,91 ± 0,28	3,85 ± 0,29 <sup>***</sup>	20,1 ± 2,7
Gastrocnémien	Sédentaire (N=8)	188 ± 18	5,03 ± 0,2 <sup>§§§</sup>	6,97 ± 0,84 <sup>§§§</sup>	1,90 ± 0,11	20,0 ± 2,1 <sup>§</sup>
	Entraîné (N=8)	162 ± 12	4,17 ± 0,18 <sup>**</sup>	3,95 ± 0,35 <sup>**</sup>	1,01 ± 0,08 <sup>***</sup>	21,2 ± 2,0

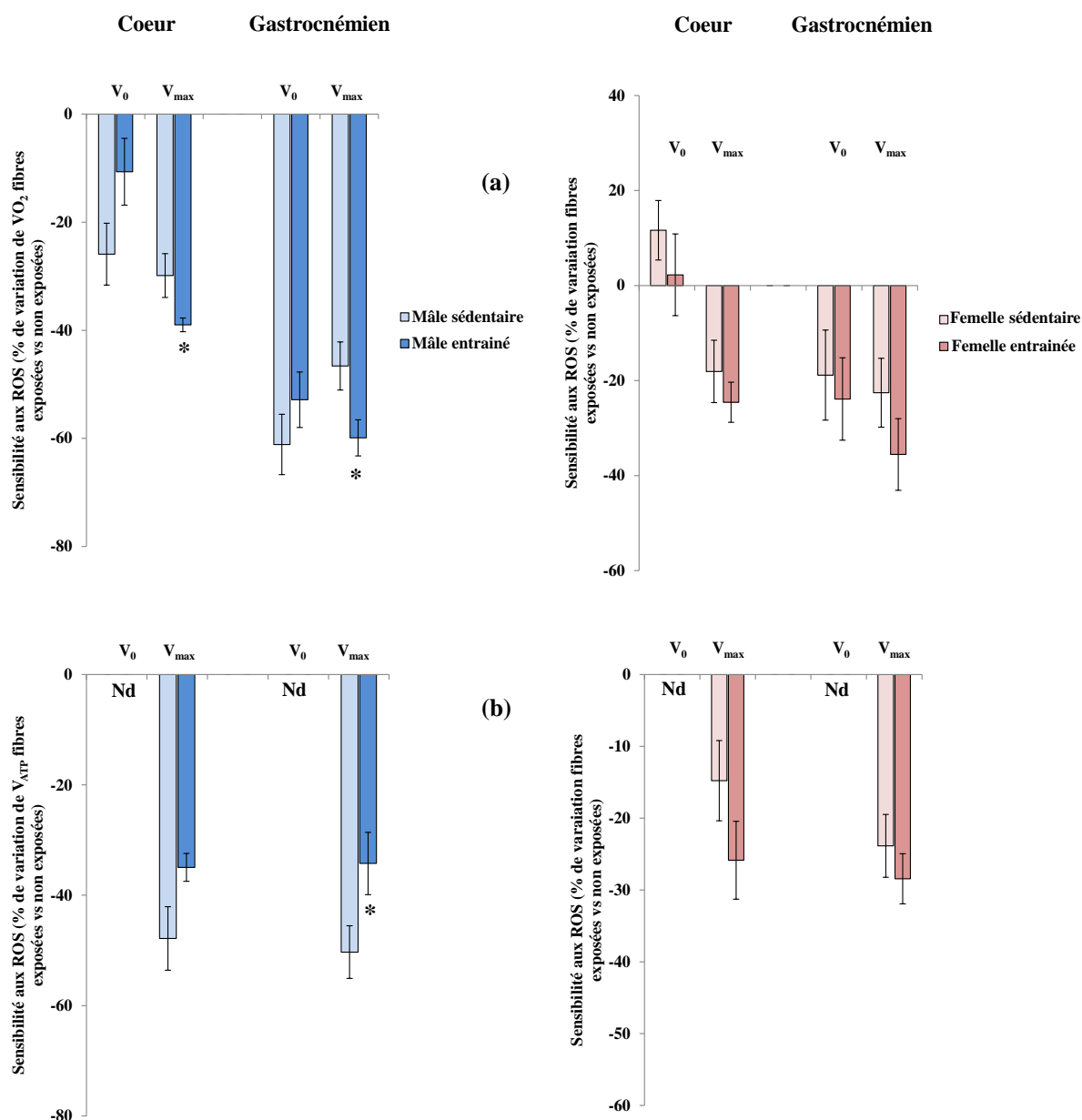
b)

		CS (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	GPx (μmol NADPH oxydé. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)
Coeur	Sédentaire (N=10)	682 ± 39	4,57 ± 0,17	2,58 ± 0,70	12,3 ± 0,6	20,3 ± 3,4
	Entraîné (N=10)	670 ± 36	4,32 ± 0,19	2,28 ± 0,68	11,5 ± 0,8	17,9 ± 4,0
Gastrocnémien	Sédentaire (N=10)	146 ± 19	2,81 ± 0,13	1,17 ± 0,46	1,74 ± 0,18	11,7 ± 1,1
	Entraîné (N=10)	144 ± 17	2,85 ± 0,17	0,82 ± 0,31	1,46 ± 0,20	14,1 ± 1,7

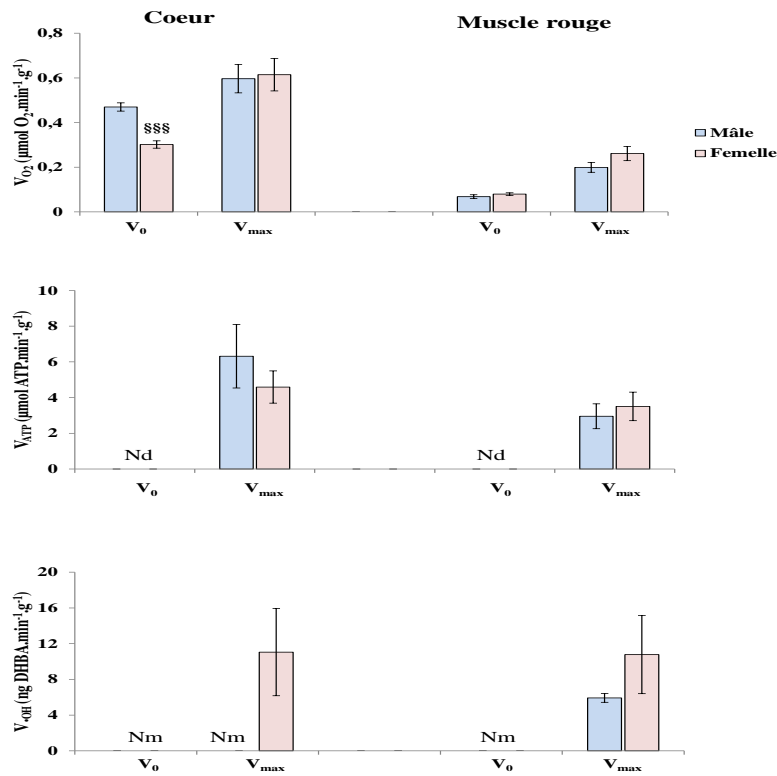
**Tableau 9 : Effet du protocole d'entraînement à la course sur les activités enzymatiques antioxydantes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx), sur la citrate synthase (Cs) et sur le contenu en MDA chez le rat Wistar mâle (a) et femelle (b). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$  entraîné vs sédentaire. <sup>§</sup> $P < 0,05$ , <sup>§§</sup> $P < 0,01$ , <sup>§§§</sup> $P < 0,001$  mâle vs femelle.**



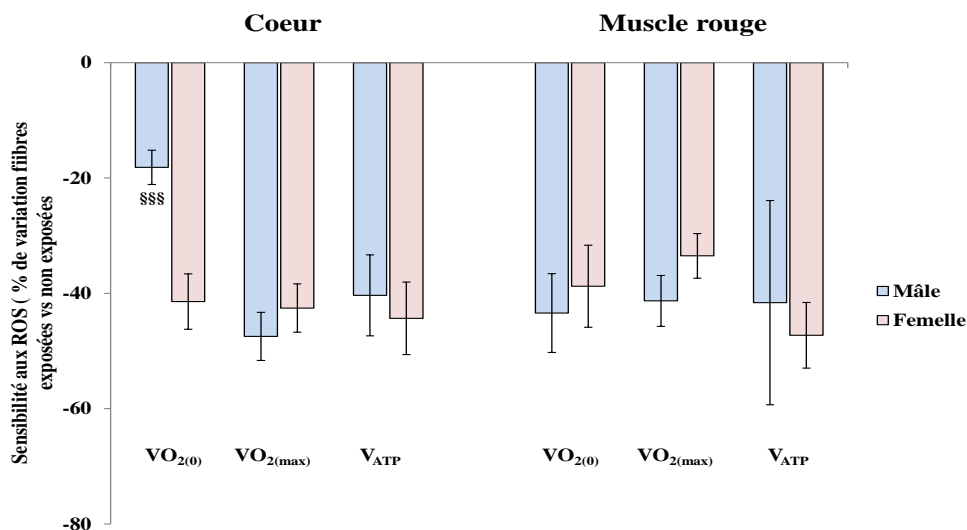
Selon le genre, l'entraînement n'a pas les mêmes effets sur la sensibilité aux ROS de la fonction mitochondriale (figure 29). Aucune modification de la sensibilité aux ROS de  $VO_2$  et de  $V_{ATP}$  n'est observée chez les femelles. Pourtant, chez les mâles, l'entraînement a induit dans les deux tissus une augmentation de la sensibilité de la respiration mitochondriale maximale ( $VO_{2(max)}$ ) et une diminution de la sensibilité de la production d'ATP mitochondriale ( $V_{ATP}$ ).



**Figure 29 : Effet de l'entraînement sur la sensibilité de  $VO_2$  (a) et  $V_{ATP}$  (b) aux ROS chez le rat Wistar mâle et femelle.** Les mesures ont été réalisées en conditions non phosphorylantes ( $V_0$ ) et phosphorylantes ( $V_{max}$ ). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  entraîné vs sédentaire. Nd = non détecté.



**Figure 30 : Effet du genre sur la fonction mitochondriale chez l'anguille.** La respiration mitochondriale (basale  $V_0$  et maximale  $V_{max}$ ), la production d'ATP ( $V_{ATP}$ ) et la production d'OH ( $V_{OH}$ ) ont été mesurées à partir de fibres cardiaques et musculaires rouges perméabilisées chez l'anguille mâle (bleu) et femelle (rose). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. <sup>\$\$\$</sup> $P < 0.001$  mâle vs femelle. Nd = non détecté, Nm = non mesuré.



**Figure 31 : Sensibilité de  $VO_2$  ( $VO_{2(0)}$  et  $VO_{2(max)}$ ) et  $V_{ATP}$  aux ROS selon le genre chez l'anguille européenne.** La sensibilité aux ROS représente le pourcentage de variation des différentes grandeurs mesurées des fibres exposées par rapport aux fibres non exposées aux ROS. Les valeurs sont présentées en moyennes  $\pm$  SEM. <sup>\$\$\$</sup> $P < 0,001$  mâle vs femelle.

Le tableau 9 montre des activités enzymatiques antioxydantes qui diminuent significativement après six semaines d'entraînement chez le mâle et quel que soit le tissu (à l'exception de l'activité catalase dans le cœur), alors qu'aucune modification n'est observée chez les femelles. Chez les deux sexes et quel que soit le tissu, les contenus tissulaires en MDA et en protéines ne sont pas modifiés après entraînement.

- **L'entraînement induirait chez le rat Wistar mâle une amélioration du rendement de la phosphorylation oxydative accompagnée d'une diminution de la production radicalaire en conditions de fonctionnement mitochondrial maximal.**
- **L'entraînement induirait des sensibilités aux ROS variables au niveau des différentes structures de la mitochondrie.**

#### **IV.2.2. Chez l'anguille européenne :**

##### ***IV.2.2.1. Fonction mitochondriale et réponses radicalaires chez les animaux sédentaires :***

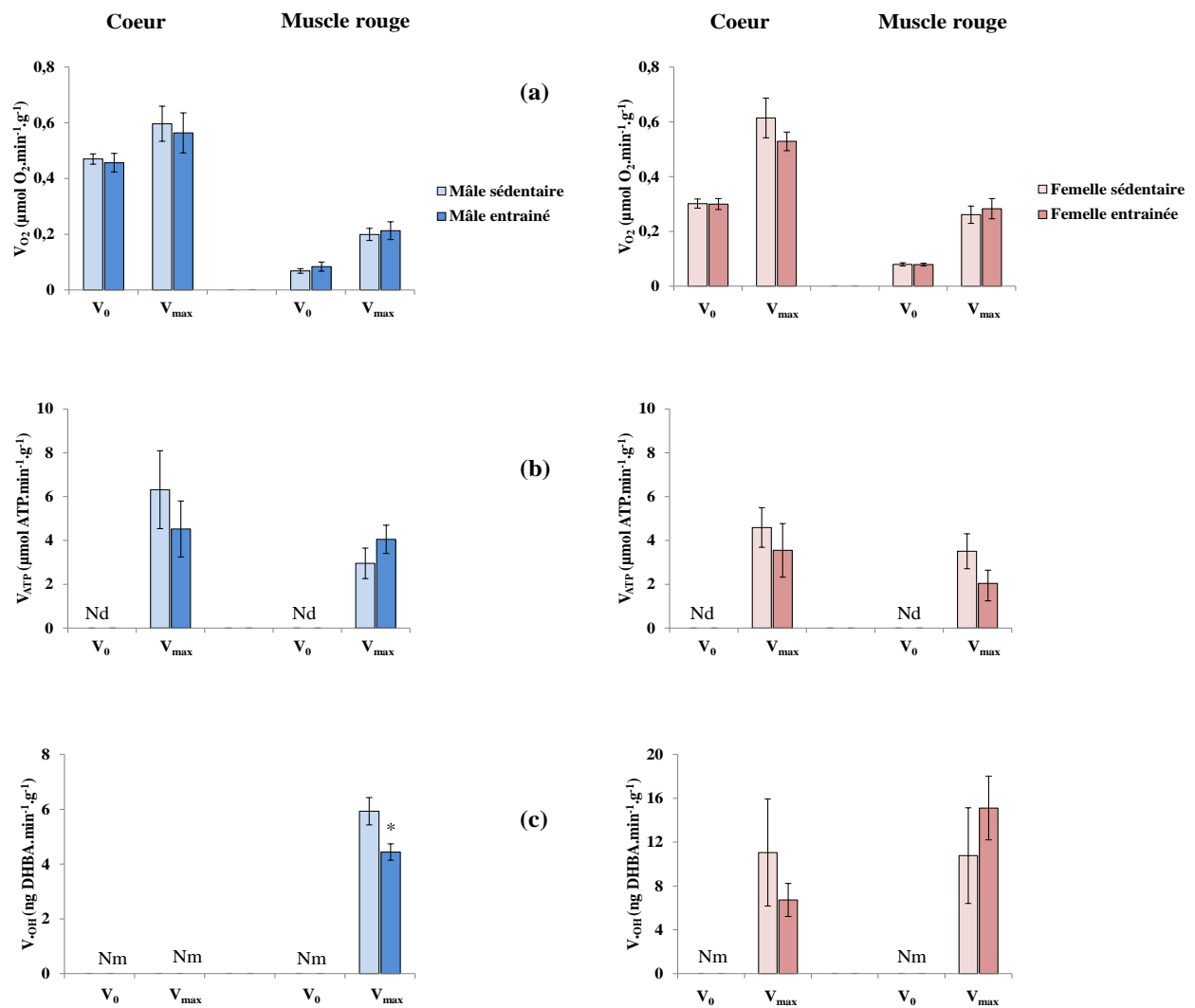
Chez l'anguille, comme chez le rat, la capacité aérobie ainsi que la production d'ATP sont globalement plus élevées dans le cœur que dans le muscle squelettique (figure 30).

Au vue de la figure 30, les anguilles ne présentent pas de différence selon le sexe du rendement de la phosphorylation oxydative quel que soit le tissu.

Par contre, au niveau cardiaque,  $VO_{2(0)}$  est significativement moins élevée chez la femelle par rapport au mâle. La production d'ATP cardiaque tend à être plus élevée chez le mâle alors que la capacité aérobie ( $VO_{2(max)}$ ) est similaire entre les deux sexes.

Le cœur relativement de petite taille chez l'anguille mâle ne nous a pas permis de mesurer la production radicalaire dans ce tissu cependant au niveau du muscle rouge,  $V_{\cdot OH}$  tend à être moins élevée (-46%) chez le mâle que chez la femelle (figure 30).

D'une façon générale, la sensibilité de  $VO_{2(max)}$  et de  $V_{ATP}$  aux ROS n'est pas différente entre les deux sexes et quel que soit le tissu. Cependant au niveau cardiaque, l'anguille mâle présente une  $VO_{2(0)}$  plus résistante à l'exposition aux ROS que les femelles (figure 31).



**Figure 32 : Effet de l'entraînement à la nage sur la fonction mitochondriale chez l'anguille.**  $VO_2$  ( $VO_{2(0)}$  et  $VO_{2(max)}$ ) (a),  $V_{ATP}$  (b) et  $V_{-OH}$  (c) ont été mesurées chez le mâle sédentaire (bleu clair) et entraîné (bleu foncé) et chez la femelle sédentaire (rose clair) et entraînée (rose foncé). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  entraîné vs sédentaire. Nd = non détecté, Nm = non mesuré.

Le tableau 10 montre une activité SOD et GPx au niveau du cœur et du muscle ainsi qu'un contenu en MDA dans le muscle similaires entre les deux sexes.

- L'anguille mâle tend à avoir un rendement énergétique ( $V_{ATP}/VO_{2(max)}$ ) ainsi qu'une résistance de la fonction mitochondriale aux ROS plus élevées au niveau cardiaque que chez la femelle.
- La production radicalaire au niveau du muscle rouge et la sensibilité de  $VO_{2(0)}$  aux ROS au niveau cardiaque moins élevées observées chez le mâle ne semblent pas être liées à une activité plus élevée des systèmes antioxydants.

		CS (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	GPx (nmol NADPH oxydé. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)
Coeur	Mâle (N=6)	ND	2,52 ± 0,28	ND	19,4 ± 2,7	ND
	Femelle (N=7)	ND	2,56 ± 0,33	ND	24,3 ± 3,2	ND
Muscle rouge	Mâle (N=6)	79,9 ± 10,0	2,99 ± 0,36	95,5 ± 6,8	21,8 ± 4,4	66,5 ± 8,5
	Femelle (N=7)	81,7 ± 9,9	3,22 ± 0,28	118 ± 22	22,2 ± 3,0	61,6 ± 9,6

**Tableau 10 : Effet du genre sur les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT et GPx), de la citrate synthase (Cs) et sur la lipopéroxidation chez l'anguille mâle et femelle.** Les différents paramètres ont été mesurés à partir de tissus congelés. Les valeurs sont exprimées par les moyennes ± SEM. Il n'y a pas de différences significatives entre mâle et femelle.

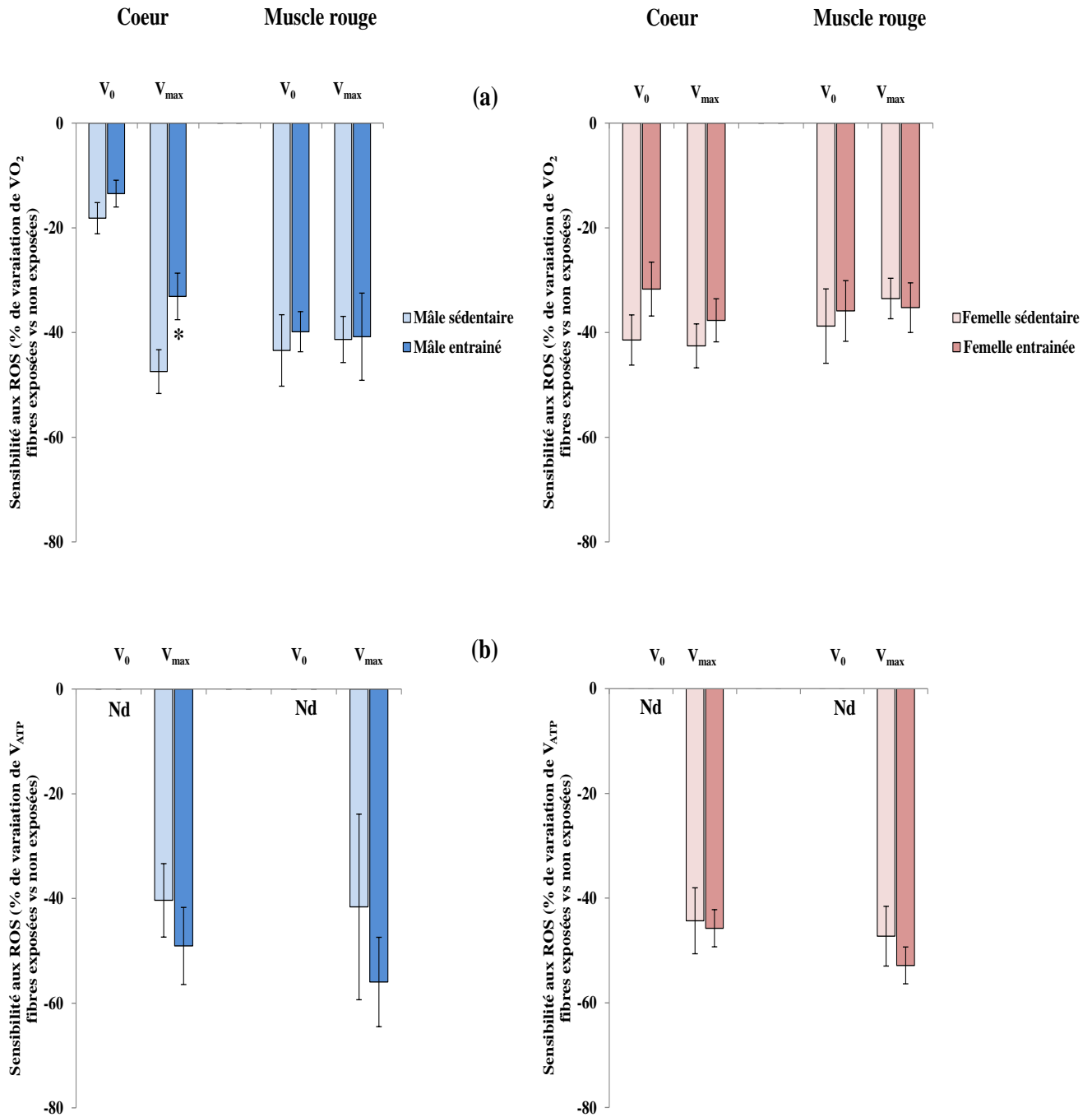
#### *IV.2.2.2. Effet de l'entraînement sur la fonction mitochondriale et sur les réponses radicalaires :*

Que ce soit chez le mâle ou chez la femelle et quel que soit le tissu, l'entraînement n'a pas induit de modifications significatives de la  $VO_2$  ( $VO_{2(max)}$  et  $VO_{2(0)}$ ) ni de  $V_{ATP}$  (figure 32).

Néanmoins,  $V_{ATP}$  tend à diminuer chez les deux sexes. Ainsi, l'entraînement tend à diminuer le rapport  $V_{ATP}/VO_{2(max)}$  (tableau B de l'annexe 9) dans le cœur et dans le muscle chez la femelle (respectivement -35% et -58%). L'activité de la citrate synthase n'est pas modifiée avec l'entraînement.

Parallèlement, la production des  $\cdot OH$  diminue significativement dans le muscle rouge chez le mâle alors qu'elle tend à augmenter chez la femelle (+40%) après entraînement. Chez cette dernière, l'entraînement ne modifie pas la sensibilité aux ROS de  $VO_{2(0)}$ , de  $VO_{2(max)}$  ni de  $V_{ATP}$ .





**Figure 33 : Effet de l'entraînement sur la sensibilité de  $VO_2$  (a) et  $V_{ATP}$  (b) aux ROS chez l'anguille mâle et femelle.** Les mesures ont été réalisées en conditions non phosphorylantes ( $V_0$ ) et phosphorylantes ( $V_{max}$ ). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  entraîné vs sédentaire. Nd = non détecté.

En revanche, chez le mâle le cœur présente une plus grande résistance face aux ROS avec une sensibilité de  $VO_{2(max)}$  significativement moins importante après entraînement (figure 33).

Comme le montre le tableau 11, l'entraînement induit globalement une augmentation de la défense antioxydante quel que soit le tissu chez la femelle ( $P < 0,05$  pour la GPx). Dans ce même tissu, le contenu en MDA tend également à augmenter (+40%) chez les femelles entraînées. Ces deux observations sont à mettre en parallèle à la  $V_{OH}$  qui tend à augmenter dans ce même tissu.

**Dans l'ensemble, l'entraînement induirait des effets bénéfiques chez le mâle, avec une moindre production radicalaire et une résistance plus importante aux ROS.**

a)

		CS (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	CAT (nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	GPx (nmol NADPH oxydé. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)
Coeur	Sédentaire (N=6)	ND	2,52 ± 0,28	Nm	19,4 ± 2,7	ND
	Entraîné (N=6)	ND	2,83 ± 0,44	Nm	19,9 ± 3,3	ND
Muscle rouge	Sédentaire (N=6)	79,9 ± 10,0	2,99 ± 0,36	95,4 ± 6,8	21,8 ± 4,4	66,5 ± 8,5
	Entraîné (N=6)	83,1 ± 5,5	3,43 ± 0,30	90,1 ± 12,7	24,4 ± 4,7	64,4 ± 4,5

b)

		CS (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	CAT (nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	GPx (μmol NADPH oxydé. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)
Coeur	Sédentaire (N=7)	ND	2,56 ± 0,33	Nm	24,3 ± 3,2	ND
	Entraîné (N=7)	ND	3,32 ± 0,45	Nm	37,0 ± 4,5*	ND
Muscle rouge	Sédentaire (N=7)	81,7 ± 9,9	3,22 ± 0,28	118 ± 22	22,2 ± 3,0	61,6 ± 9,6
	Entraîné (N=7)	79,1 ± 6,5	2,97 ± 0,42	122 ± 18	34,8 ± 4,9*	86,5 ± 15,7

**Tableau 11 : Effet du protocole d'entraînement à la nage sur les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT et GPx) sur la citrate synthase (Cs) et sur la lipopéroxidation chez l'anguille mâle (a) et femelle (b). Les différents paramètres ont été mesurés à partir de tissus congelés. Les valeurs sont exprimées par les moyennes ± SEM. \* $P < 0,05$  entraîné vs sédentaire. Nm = non mesuré**



## V. Discussion :

Ce travail de thèse s'inscrit dans une des thématiques de l'EA 4324 ORPHY qui étudie entre autres les interactions entre ROS et métabolisme énergétique dans diverses situations physiologiques ou physiopathologiques.

Toute espèce animale confrontée à des variations de facteurs environnementaux (température, teneur en O<sub>2</sub>, apport nutritionnels ...etc.) et/ou de son activité physique doit mettre en place des mécanismes pour maintenir un fonctionnement cellulaire optimal y compris au niveau de son statut redox (balance pro-antioxydants). Ces mécanismes sont déterminants dans l'optimisation de son métabolisme énergétique et par conséquent déterminants pour ses performances.

Dans ce contexte, nous avons ainsi étudié **les effets de l'entraînement modéré** chez deux espèces animales:

**1-** selon une approche de physiologie intégrative **en évaluant la performance physiologique** à plusieurs échelles d'organisation biologique :

- à l'échelle de l'individu, la performance physique a été évaluée *in vivo* par des mesures de vitesse maximale de course ou de nage.

- à l'échelle cellulaire, ont été estimés, *in vitro*, les rendements énergétiques (rapport  $V_{ATP}/VO_{2(max)}$ ) du muscle cardiaque et du muscle squelettique ainsi que la résistance de la fonction mitochondriale à l'exposition exogène aux ROS.

La mise en perspective de ces paramètres ou indices de performance à différents niveaux d'organisation biologique pourrait permettre de dégager une certaine cohérence physiologique.

**2-** selon le genre : la performance physiologique est souvent rapportée comme dépendante du genre. Elle peut se traduire par des capacités aérobies différentes ou encore par des résistances différentes à certaines pathologies. A ce jour, peu d'études se sont intéressées aux différences sexuelles de l'homéostasie des ROS. Ainsi, l'étude de **l'influence du genre sur les liens entre performance physiologique et réponses radicalaires à l'entraînement** sera un de nos objectifs. La plupart du temps, l'origine de ces différences sexuelles est rapportée comme dépendante des hormones sexuelles. Nous discuterons également du facteur taille ou poids susceptible d'influencer les réponses métaboliques et radicalaires à l'entraînement.

**3-** selon une approche de physiologie comparée par l'utilisation de deux modèles (poisson et rat) : nous voulons montrer que **l'utilisation du modèle poisson dans le champ de la physiologie de l'exercice** a toute sa place dans l'étude des mécanismes impliqués dans les interactions entre le métabolisme énergétique et les ROS. (Abele et Puntarulo, 2004) ont émis l'hypothèse que les ROS



constituaient des éléments clés du métabolisme chez le poisson ainsi que de son adaptation aux contraintes environnementales. En tant qu'ectotherme, son activité métabolique est dépendante de la température mais aussi des variations d'autres facteurs (saison, cycle de vie, migration, etc.) qui peuvent engendrer des ajustements ou adaptations au niveau du métabolisme énergétique et radicalaire.

Ainsi chez le poisson, les muscles cardiaque et squelettique peuvent aussi présenter une remarquable plasticité. Nous avons vu dans le chapitre I.3.1 l'organisation structurale et fonctionnelle des muscles squelettiques chez le poisson et le mammifère. Sur le plan de son organisation cardiaque, le poisson se distingue des autres vertébrés. Son cœur est rudimentaire, c'est-à-dire doté de deux chambres séparées par une valve. Les systèmes respiratoires et circulatoires sont en « série » et seul du sang veineux traverse le cœur. Le sang arrive par le sinus veineux, passe par l'atrium (équivalent de l'oreillette) puis pénètre dans le ventricule. Lorsque ce dernier se contracte, il envoie le sang aux branchies. Le sang ainsi réoxygéné est distribué aux différents organes. Le muscle cardiaque comme chez les autres vertébrés est constitué de fibres musculaires. Ce sont des cardiomyocytes qui se contractent grâce à la dépolarisation spontanée de leurs membranes. La plasticité fonctionnelle cardiaque en réponse à l'influence de divers facteurs (température, hypoxie...etc.) a particulièrement été mise en évidence chez l'anguille européenne.

#### ***L'anguille européenne argentée : une espèce « performante »***

La plupart des travaux relatifs à l'influence de l'exercice chronique chez le poisson ont été réalisés chez le saumon ou la truite (Morash et al., 2014). Toutefois, l'anguille européenne a retenu notre attention pour ses capacités exceptionnelles. Dans son milieu naturel, elle est capable de faire face à des challenges environnementaux (température, pression hydrostatique, distance parcourue, etc.) imposés par son cycle de vie. Ses capacités métaboliques et cardiorespiratoires ont été étudiées dans diverses conditions expérimentales (Ellerby et al., 2001; van Ginneken et van den Thillart, 2000). Elle présente ainsi une tolérance à l'hypercapnie sévère (McKenzie et al., 2003). Sa capacité d'endurance pourrait être en partie liée à la très grande tolérance du myocarde à l'acidose hypercapnique et à l'hypoxie.

Par ailleurs, pendant l'hypoxie, elle présente une capacité à réguler son métabolisme aérobie malgré une hypoxémie. Enfin, il a été montré dans notre laboratoire, son exceptionnelle résistance aux hautes pressions hydrostatiques (101 ATA soit environ 1000m de profondeur). Par exemple, chez l'anguille exposée à 101 ATA, contrairement à la truite, il n'y a pas d'altération du métabolisme aérobie (Theron et al., 2000).

L'étude des mécanismes physiologiques à l'origine de sa performance d'endurance nous intéresse particulièrement. Cette capacité à pouvoir nager sur plusieurs milliers de kilomètres à

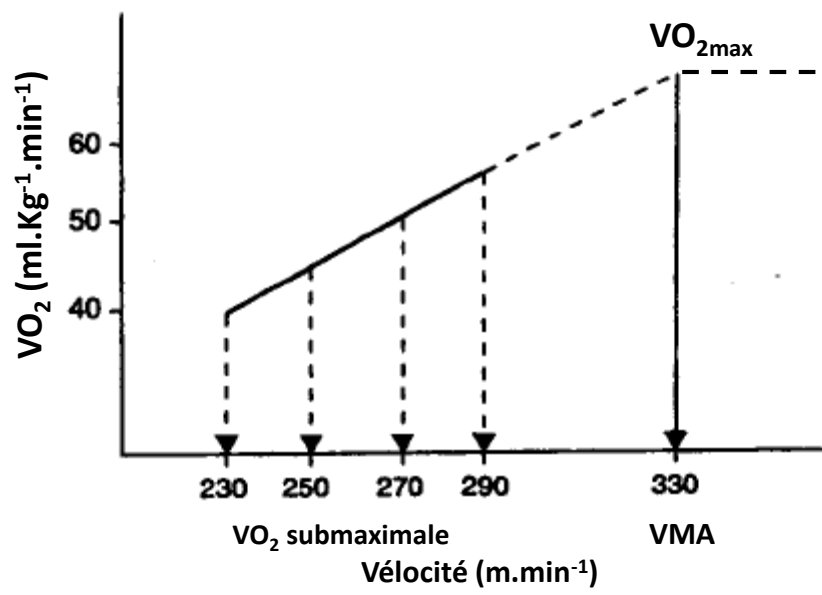


Figure 34 : Relation entre consommation d'oxygène in vivo et vitesse maximale aérobie (Billat et Koralsztein, 1996).

jeûn constitue un véritable challenge et reste encore non élucidée. Enfin, il a été montré qu'un dimorphisme sexuel existerait au niveau de ses performances physiologiques. Comment les mâles, largement plus petits que les femelles, assurent la performance d'atteindre en même temps que les femelles leur lieu de reproduction, la mer des Sargasses, situé à 6000 Km de nos côtes européennes ? Les mâles pourraient présenter des capacités physiologiques et métaboliques élevées pour nager plus vite relativement à leur taille (même s'ils entament la migration plus tôt que les femelles). Il sera intéressant de voir si les mâles, après entraînement à la nage, présentent un profil métabolique et radicalaire qui va dans le sens d'une performance métabolique supérieure à celle des femelles.

### **V.1. Etude des effets de l'entraînement en endurance sur la performance physique *in vivo* :**

La performance physique aérobie en physiologie de l'exercice (chez l'homme ainsi que l'animal) est classiquement déterminée par l'évaluation de la consommation d'oxygène maximale de l'organisme entier ( $VO_{2max}$ ) qui reflète la quantité d'oxygène maximale qui peut être consommée malgré une majoration de la charge de travail. La  $VO_{2max}$  est un critère discriminant de l'aptitude aérobie et sa validité est basée sur la forte corrélation la liant à la performance physique. Chez le rat, la  $VO_{2max}$  peut être mesurée en utilisant une cage métabolique qui permet la collecte d'informations sur les échanges gazeux respiratoires. Au cours de l'exercice physique chez le poisson, elle peut être mesurée en utilisant une électrode à oxygène qui mesure le pourcentage de saturation de l'eau en  $O_2$  dans un aquarium clos et étanche.

Il est également possible, pour évaluer la performance aérobie, d'utiliser un indicateur autre que  $VO_{2max}$  soit la vitesse maximale aérobie (VMA).

La mesure de la VMA chez le mammifère est le meilleur moyen pour estimer indirectement la  $VO_{2max}$  et donc la performance aérobie lorsque l'on ne dispose pas de cage métabolique (Reboul et al., 2005a; Sun et al., 2008). En effet, au cours d'un exercice de course, Billat et Koralsztein (1996) ont montré qu'il existe une corrélation linéaire et positive entre la vitesse de course et la  $VO_2$  (figure 34). Ainsi, la VMA représente la première vitesse à partir de laquelle la  $VO_2$  n'augmente plus significativement, c'est-à-dire lorsqu'on atteint la  $VO_{2max}$ .

Chez le poisson, la vitesse critique de nage ( $U_{crit}$ ), équivalent de la VMA chez le mammifère, est souvent utilisée comme indicateur des effets de stress environnementaux sur la condition physique des poissons. Elle reflète la vitesse maximale de nage soutenue et la performance aérobie chez le poisson.





Un premier objectif méthodologique a été de choisir **un protocole d'entraînement le plus proche possible (comparable en terme d'intensité) pour les deux modèles animaux étudiés.**

Au laboratoire, nous disposons d'un tapis roulant sans cage métabolique et d'un tunnel de nage dont la grande contenance (85 L) rend difficile la mesure de la  $VO_2$  de l'anguille compte tenu de sa taille et de sa faible consommation d'oxygène. Ainsi, la VMA (pour le rat) et la Ucrit (pour l'anguille) ont été utilisées afin d'évaluer la performance aérobie et d'établir l'intensité de l'entraînement.

**L'intensité de l'entraînement** a été exprimée classiquement en pourcentage de la VMA et de la Ucrit. L'intensité d'un entraînement modérée se situe aux alentours de 50-75% de la  $VO_{2max}$  chez le mammifère (Gomes et al., 2012) et chez le poisson (Holk et Lykkeboe, 1998). A cette intensité, les différents substrats (glucose, glycogène et acides gras) sont utilisés pour la production aérobie d'énergie et il n'y a pas (ou très peu) de production de lactate évitant ainsi de provoquer la fatigue et l'altération de la capacité de production d'énergie. Donc pour les deux espèces, **l'intensité de l'entraînement choisie se situait entre 60 et 70% de la VMA pour le rat et 70% de la Ucrit pour l'anguille.**

Concernant la **durée de l'entraînement**, le protocole est différent selon l'espèce. Pour le rat, nous avons choisi une durée classique de 6 semaines. En effet, des études ont montré qu'un exercice en endurance d'une durée de 6 à 8 semaines induit un ensemble de modifications structurales, métaboliques et radicalaires au niveau cardiaque et musculaire squelettique (Díaz-Herrera et al., 2001; Fenning et al., 2003). Ainsi, Daussin (2007) a montré qu'un exercice modéré de 8 semaines induisait chez l'homme une amélioration de la capacité aérobie en relation avec une amélioration de la respiration mitochondriale ainsi que du rendement de la phosphorylation oxydative. Chez l'anguille, la durée de l'entraînement à la nage a été de 3 jours et 4 nuits. En effet un travail de thèse effectué au laboratoire (Mortelette, 2010) a montré qu'un exercice à la nage à 70% de Ucrit de seulement quelques jours chez l'anguille argentée induisait une augmentation de sa performance de nage accompagnée de modifications du métabolisme radicalaire et des puissances aérobies similaires à celles observées chez le rat après 6 semaines d'entraînement à la course.

### **V.1.1. Performance de course chez le rat Wistar :**

#### ***Avant entraînement :***

Dans cette étude, les rats Wistar mâle et femelle présentent une VMA avant protocole d'entraînement ( $VMA_1$ ) respectivement de  $1,75 \pm 0,10$  et  $1,86 \pm 0,06$  Km.h<sup>-1</sup> (moyennes des



VMA<sub>1</sub> de tous les individus des groupes sédentaires et entraînés). **La performance aérobie n'est pas significativement différente selon le sexe.** Toutefois, la VMA<sub>1</sub> est légèrement plus élevée chez la femelle que chez le mâle. A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de valeurs de VMA pour le rat Wistar. Des études effectuées chez le rat mâle Sprague-Dawley (Sun et al., 2008) et Agouti (Reboul et al., 2005b) ont mesuré des VMA respectivement de  $\approx 2,16 \text{ Km. h}^{-1}$  et  $\approx 2,3 \text{ Km.h}^{-1}$ . Si on s'intéresse dans la littérature aux valeurs de VO<sub>2max</sub>, on retrouve également des valeurs qui ne sont pas significativement différentes selon le genre. Chez le rat Wistar, ont été rapportées des valeurs aux alentours de  $2,7 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  chez le mâle (Georgieva et Boyadjiev, 2004) et de  $2,9 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  chez la femelle (Patch et Brooks, 1980). On peut donc dire que nos résultats concordent avec ceux de la littérature.

### ***Après entraînement :***

Chez les mâles, VMA<sub>1</sub> (avant entraînement) du groupe sédentaire est significativement plus faible que celle du groupe entraîné. Cette différence est uniquement liée au hasard puisque les groupes ont été répartis aléatoirement.

A notre connaissance, rares sont les études qui ont mesuré la VMA avant et après entraînement chez le rat. Reboul et al. (2005b) ont montré qu'un entraînement à la course de cinq semaines à 80% de la VMA induisait une augmentation de la VMA de 18% chez le rat Agouti mâle. Nos résultats montrent qu'**après seulement 3 semaines d'entraînement (VMA<sub>mi-parcours</sub>)**, la VMA augmente déjà significativement quel que soit le sexe (de 9,8% chez le mâle et de 21,24% chez la femelle). Cette augmentation est maintenue chez la femelle puisqu'à la fin du protocole d'entraînement (six semaines), une augmentation d'environ 15% est observée (VMA<sub>2</sub> vs VMA<sub>1</sub>). Toutefois, des études ont montré qu'un entraînement en endurance de cinq semaines chez le rat Wistar mâle augmente la VO<sub>2max</sub> de 12% (Patch et Brooks, 1980), un pourcentage proche de celui que nous avons obtenu avec la mesure des VMA. Nous n'avons pas pu établir une comparaison de l'effet de l'entraînement entre mâles et femelles au bout des six semaines de protocole puisque, chez le mâle, VMA<sub>2</sub> n'a pas été mesurée pour des raisons évoquées dans la partie résultats (cf. IV.1.1). Cependant, l'augmentation plus importante chez la femelle au bout de 3 semaines suggère que chez ces dernières, **l'entraînement induirait une amélioration de performance aérobie plus élevée ou plus précoce que chez le mâle.**

Pendant cette période de protocole (six semaines), tous les animaux (sédentaires et entraînés) ont pris du poids (lié à leur croissance). Toutefois, cette prise de poids est moins importante chez les



entraînés par rapport aux sédentaires. En effet, il est connu que l'entraînement agit en diminuant la masse grasse et en favorisant la masse musculaire (Levin et Dunn-Meynell, 2004).

Dans notre étude, la moindre prise de poids chez les entraînés par rapport aux sédentaires est plus marquée chez le mâle (-15%) que chez la femelle (-8%). **Ceci suggère que l'entraînement aurait induit une perte de masse grasse plus importante chez le mâle que chez la femelle.**

### V.1.2. Performance de nage chez l'anguille européenne :

#### *Avant entraînement :*

Les valeurs de vitesse critique de nage avant protocole d'entraînement ( $U_{crit1}$ ) sont de l'ordre  $0,5 \pm 0,03 \text{ m.s}^{-1}$  chez la femelle. Ce résultat est proche de celui obtenu par Mortelette et al. (2010) qui ont montré une  $U_{crit}$  de  $0,6 \pm 0,03 \text{ m.s}^{-1}$  chez l'anguille femelle. Cependant, nos valeurs sont moins élevées que celles rapportées par Palstra et van den Thillart (2010) et Quintella et al. (2010) (entre  $0,6$  et  $0,8 \text{ m.s}^{-1}$ ) alors que la taille des animaux est comparable ( $58,3 \pm 2,5 \text{ cm}$  dans notre étude vs  $62,1 \pm 5 \text{ cm}$  dans l'étude de Quintella et al., 2010). Cette différence pourrait être liée à la différence de site géographique d'échantillonnage.

Les mâles présentent une  $U_{crit}$  de  $0,4 \text{ m.s}^{-1}$  qui tend à être moins importante que celle des femelles. Cependant, il faut tenir compte de la différence de taille entre les deux sexes. En effet, lorsque nous considérons la  $U_{crit}$  relative (exprimée en  $Lc.s^{-1}$ ), on observe des valeurs qui sont plus élevées de 29% chez le mâle par rapport à la femelle mais de manière non significative ( $1,1 \pm 0,09$  et  $0,87 \pm 0,10$  respectivement pour les individus mâles et femelles). Quintella et al. (2010) ont aussi rapporté une  $U_{crit}$  relative plus élevée de 29% chez l'anguille mâle et ont ainsi suggéré que ces derniers seraient meilleurs nageurs que les femelles.

Pour disposer d'un autre indice de performance physique chez l'anguille, la fréquence de battements de queue a été mesurée. Steinhausen et al. (2005) ont montré chez le lieu noir (*Pollachius virens*) et le merlan (*Merlangius merlangus*) que la fréquence de battements de queue est positivement corrélée à la vitesse de nage mais aussi à la  $VO_2$  durant l'exercice, suggérant ainsi son utilisation pour prédire la  $VO_2$  chez le poisson.

Nos résultats montrent une fréquence de battements de queue significativement plus importante chez les mâles que chez les femelles et ceci quelle que soit la vitesse de nage. Ceci confirme les travaux d'Amérand et al. (2010) et de Vettier et Sébert (2004) qui ont montré que les mâles ont une capacité aérobie supérieure à celle des femelles.



*La performance aérobie plus importante chez les mâles leur permettrait de nager plus rapidement pour peut-être synchroniser ainsi leur arrivée avec les femelles sur le site de reproduction.*

#### **Après entraînement :**

Quel que soit le sexe, l'entraînement à la nage a induit une amélioration de la Ucrit (de 26% chez le mâle et de 20% chez la femelle). En parallèle, la fréquence de battements de queue était significativement diminuée après entraînement quelle que soit la vitesse de nage. L'ensemble de ces résultats montre que globalement, **l'entraînement a induit une amélioration de la performance de nage**. Cette dernière peut être liée à des modifications métaboliques et/ou mécaniques.

La diminution de la fréquence de battements de queue pour une même vitesse de nage suggère une modification du comportement locomoteur qui améliorerait le rendement de nage. Il a été démontré chez les poissons téléostéens (poissons dont le squelette est entièrement ossifié), que les contractions répétées associées à un exercice physique peuvent provoquer une hypertrophie du muscle squelettique blanc et renforcer le phénotype aérobie du muscle rouge par notamment une augmentation du pourcentage des fibres (Davison, 1997; Johnston et Moon, 1980). La performance aérobie des muscles peut aussi être améliorée indirectement par l'augmentation de la force contractile cardiaque permettant ainsi une plus fine distribution et extraction tissulaire de l'oxygène (Gallaughier et al., 2001).

*Chez le rat Wistar et chez l'anguille, l'entraînement en endurance a induit une amélioration de la performance aérobie. Est-ce que ces modifications observées au niveau de l'organisme, suite à l'entraînement, peuvent être corrélées à des modifications fonctionnelles au niveau cellulaire ?*

## **V.2. Validation des techniques de mesures *in vitro* sur les fibres musculaires perméabilisées :**

L'activité mitochondriale implique des liens étroits entre la consommation d'oxygène, la production d'ATP et la production de ROS liée à la fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Pourtant, les différents paramètres de la fonction mitochondriale sont rarement étudiés simultanément. Les mesures de consommation d'oxygène ( $VO_2$ ) et de production d'ATP ( $V_{ATP}$ )





nous permettront d'appréhender la notion de rendement de la phosphorylation oxydative, indice de performance métabolique au niveau cellulaire. Ainsi, dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons mis au point une méthode de mesure de la production d'ATP à partir de fibres perméabilisées musculaires. L'objectif était de mesurer **en parallèle**  $VO_2$ ,  $V_{ATP}$  et  $V_{\cdot OH}$  sur une préparation tissulaire *in vitro*.

L'exploration de la fonction mitochondriale peut être effectuée soit sur des mitochondries isolées soit sur des fibres perméabilisées. Les techniques d'isolement mitochondrial sont toutefois assez traumatiques pour ces organites et ont tendance à diminuer leur affinité à l'ADP (Saks et al., 1998). Ainsi, leur survie n'est que de 10 à 40%. Ceci impose des prélèvements importants de matériel biologique (entre 500 et 1000 mg de tissu musculaire). Il était donc plus intéressant de travailler sur des fibres musculaires perméabilisées selon la technique décrite pour les fibres cardiaques par Veksler et al (1987) qui permet d'accéder à 90% des mitochondries musculaires. Il a été démontré que les caractéristiques respiratoires des mitochondries sur fibres perméabilisées étaient similaires à celles obtenues sur mitochondries isolées (Letellier et al., 1992). De plus, la préparation musculaire est moins lourde à mettre en œuvre que celle des mitochondries isolées et les quantités tissulaires nécessaires sont nettement plus réduites puisque 50 mg de fibres musculaires suffisent pour plusieurs mesures oxymétriques. La technique d'étude de la respiration mitochondriale est bien maîtrisée au laboratoire ORPHY, au sein duquel, avait été précédemment mis au point un modèle de mesure *in vitro* de la production des ions hydroxyles ( $V_{\cdot OH}$ ) en parallèle de la  $VO_2$  à partir de fibres perméabilisées de poisson et de rat.

La mise au point de la mesure de  $V_{ATP}$  n'a pas été effectuée à partir de muscle d'anguille. Il s'agit d'une espèce sauvage faisant partie des espèces protégées. Ainsi, les mises au point ont été réalisées sur la truite arc-en-ciel d'élevage (*Salmo gairdneri*).

Dans le but de quantifier **la quantité d'ATP d'origine mitochondriale (produite par unité de temps) par des fibres perméabilisées**, à partir de la méthode d'Ouhabi et al. (1998), deux points principaux ont dû être vérifiés :

\* L'ATP produit par les fibres s'accumule dans le milieu de respiration (MR) pendant la mesure de  $VO_2$ . Les essais consistaient principalement à déterminer le nombre et le volume minimums des prélèvements de MR en fonction du temps sans affecter la mesure de la consommation d'oxygène.

Ainsi, il s'est avéré d'une part, que trois prélèvements en deux minutes donnent une cinétique similaire à celle établie à partir de cinq prélèvements en deux minutes (un prélèvement toutes les 30 secondes) et d'autre part que ce nombre de prélèvements n'affectait pas la mesure de la  $VO_2$  effectuée en parallèle (figure A de l'annexe 7).



\* Ensuite, il était important de vérifier que cette production était spécifiquement d'origine mitochondriale (figure B de l'annexe 7). Pour cela, nous avons d'abord testé différentes concentrations d'ADP. En absence d'ADP ( $V_0$ ), la production d'ATP est indétectable, alors qu'elle augmente avec des concentrations croissantes d'ADP.

Dans un second temps, nous avons utilisé un inhibiteur réversible de la COX, le KCN. Ce dernier agit sur la chaîne respiratoire en empêchant le transfert des électrons vers l' $O_2$  (Delhumeau et al., 1994), le découplage de la chaîne respiratoire inhibe ainsi la production d'ATP. La production d'ATP mesurée était aussi négativement corrélée à la concentration de KCN utilisée. Ces résultats montrent donc que la synthèse de l'ATP observée serait à priori d'origine mitochondriale. Toutefois, les résultats de  $V_{ATP}$  obtenus chez la truite (tableau de l'annexe 7) montrent une limite du système de fibres perméabilisées. En effet, le ratio  $V_{ATP}/VO_{2(max)}$  (indice du rendement de la phosphorylation oxydative) dans le cœur était 2 fois supérieur à la valeur théorique (le ratio ATP/ $O_2$  théorique est de 6 au niveau des mitochondries isolées) (Lemasters, 1984). Cette valeur élevée peut être expliquée par le fait qu'il existe plusieurs sources de production d'ATP dans la cellule. En effet, la phosphocréatine, ou encore l'adénylate kinase (Zeleznikar et al., 1995) sont impliquées dans la production cellulaire totale d'ATP. Dans notre système, le contenu enzymatique du cytosol est supposé être éliminé avec les séries d'incubation et de lavages (cf. matériel et méthodes). Cependant, des traces d'enzyme qui peuvent intervenir dans la synthèse d'ATP, en particulier les enzymes membranaires comme l'adénylate kinase, peuvent persister au niveau des fibres perméabilisées. **On peut donc dire que la synthèse d'ATP observée est non pas uniquement, mais plutôt majoritairement issue du fonctionnement mitochondrial.**

La  $V_{ATP}$  plus importante au niveau des fibres cardiaques par rapport aux fibres musculaires rouges (tableau de l'annexe 7) peut être expliquée par le fait que le cœur, contrairement au muscle rouge, est sollicité en permanence, il doit donc pouvoir maintenir et renouveler son contenu énergétique en permanence (Sieck et Regnier, 2001).

Un travail de mise au point a également été nécessaire pour étudier le devenir de la fonction mitochondriale ( $VO_2$  et  $V_{ATP}$ ) face à un stress oxydatif qui pourrait être engendré suite à un exercice physique intense par exemple. Nous voulions donc explorer la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS et plus spécifiquement aux ions hydroxyles ( $\cdot OH$ ). Ces derniers sont les radicaux les plus délétères. Ils présentent une extrême réactivité, une demi-vie limitée ( $10^{-10}$  s dans les systèmes biologiques), diffusent donc peu à travers la membrane mitochondriale et sont les plus toxiques lors d'un stress oxydant vis-à-vis des molécules organiques et inorganiques des cellules, en particulier, l'ADN, les protéines, les lipides. Ils sont ainsi susceptibles d'affecter le fonctionnement mitochondrial.



La mise au point a été effectuée selon les travaux de Walsh et al. (2001) dans lesquels le système générateur des  $\cdot\text{OH}$  consiste en un mélange de  $\text{FeCl}_2$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (réaction de Fenton) (cf. matériel et méthodes III.).

La mise au point a principalement consisté en la détermination de la combinaison idéale des concentrations de  $\text{FeCl}_2$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui provoquerait une inhibition maximale et reproductible de la respiration mitochondriale du tissu cardiaque et musculaire rouge simultanément. Le tableau de l'annexe 8 montre que la sensibilité de  $V_{\text{O}_2(\text{max})}$  dans le cœur et dans le muscle a été obtenue avec un mélange  $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  à 1mM/5mM.

La sensibilité aux ROS est moins importante dans les fibres cardiaques que dans les fibres musculaires rouges. Ces dernières seraient plus résistantes au stress oxydatif. Ceci pourrait être lié à une protection enzymatique antioxydante plus élevée dans le cœur que dans le muscle rouge.

Cette méthode de test de sensibilité aux ROS a été validée et s'est révélée suffisamment discriminante pour mettre en évidence **des différences inter-tissulaires de vulnérabilité aux ROS.**

### **V.3 Effet du genre sur la fonction mitochondriale et les radicaux libres :**

Avant d'étudier les effets de l'entraînement, nous avons exploré la fonction mitochondriale et le métabolisme des ROS selon le genre chez les animaux des groupes sédentaires.

#### **V.3.1. Chez le rat Wistar:**

##### *Une phosphorylation oxydative plus performante chez la femelle ?*

Nous avons obtenu des valeurs de  $\text{VO}_{2(\text{max})}$  similaires entre mâle et femelle (dans le muscle et dans le cœur) respectivement de l'ordre de 0,94 et 1,6  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ . Ces valeurs sont dans la gamme rapportée dans la littérature dans les deux tissus (Mortelette et al., 2010; Wüst et al., 2012) et confirment que les fibres cardiaques présentent des capacités aérobies plus élevées que dans le muscle squelettique quel que soit le sexe .

En revanche, même si les  $\text{VO}_{2(\text{max})}$  sont similaires entre les deux sexes, la production d'ATP ( $V_{\text{ATP}}$ ) est plus élevée dans le cœur et le muscle chez la femelle. Ces résultats vont donc dans le sens d'un **meilleur rendement énergétique (rapport  $V_{\text{ATP}}/ \text{VO}_{2(\text{max})}$ ) chez la femelle.**

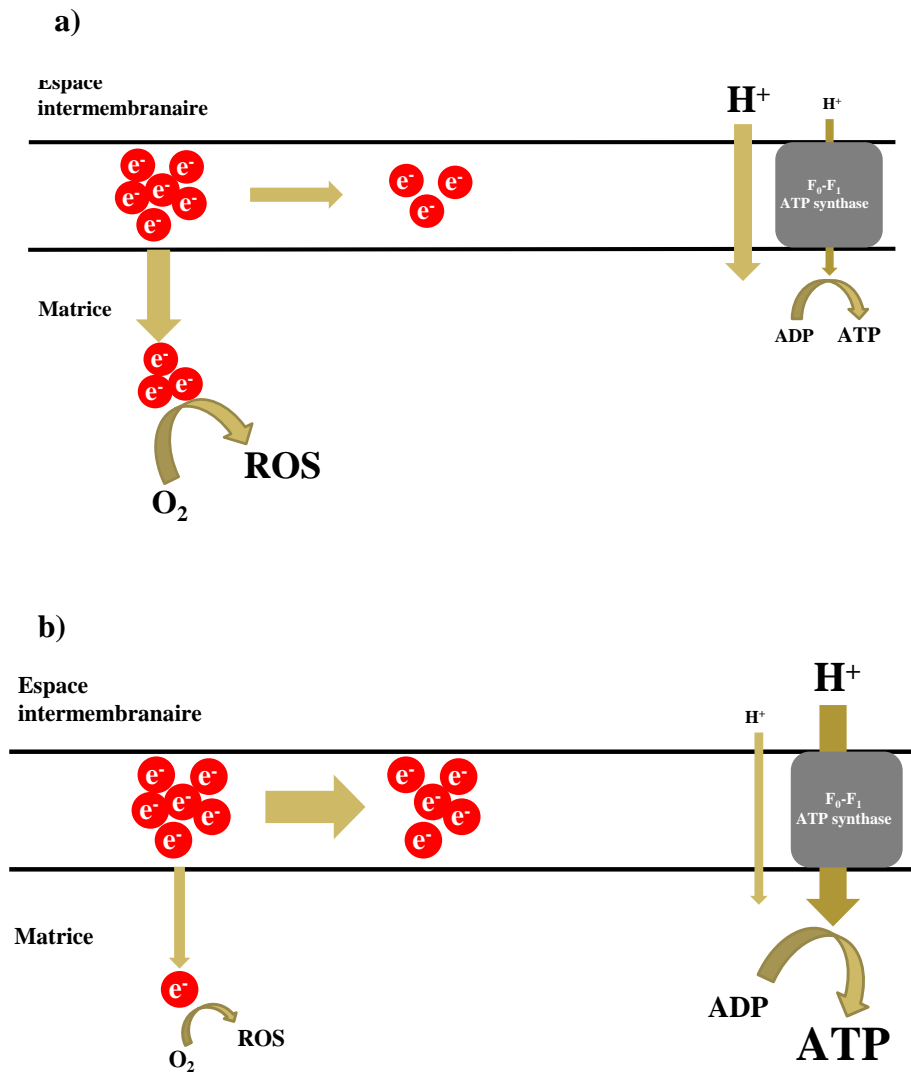


Figure 35 : Hypothèse sur la fuite d'électrons et la conductance aux protons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale chez le rat Wistar a) mâle et b) femelle.

### *Comment expliquer ce meilleur rendement de la phosphorylation oxydative chez la femelle?*

Il est difficile d'émettre une unique hypothèse car une meilleure efficacité de la phosphorylation oxydative peut dépendre de plusieurs facteurs.

En effet, elle peut en partie résulter de la variation de l'efficacité du transfert des protons (découplage intrinsèque). Une meilleure efficacité du transfert des protons peut être liée à une meilleure stœchiométrie  $H^+/e^-$  ou un plus faible rapport  $H^+/ATP$  (Weber et Senior, 2003). La stœchiométrie  $H^+/e^-$  représente le nombre de protons pompés par un complexe de la chaîne respiratoire pour un nombre d'électrons donné transféré au travers de la chaîne respiratoire. Il a été suggéré que, *in vivo*, la variation de l'activité de la Cytochrome c oxydase (COX) soit principalement sujet à la variation de sa stœchiométrie (Papa et al., 1994). En ce qui concerne la stœchiométrie  $H^+/ATP$ , il a été montré que le nombre de molécules d'ADP phosphorylées par proton passant dans le complexe  $F_0-F_1$  ATP synthase n'est pas constant (Kadenbach, 2003). Ce qui veut dire que, bien qu'il n'y ait pas de modification de la respiration mitochondriale, l'efficacité de la phosphorylation peut être modifiée. On peut alors suggérer que les complexes I, III et IV et/ou le complexe  $F_0-F_1$  ATP synthase seraient plus efficaces chez la femelle.

L'efficacité de la phosphorylation oxydative peut dépendre de **la force protomotrice** (découplage extrinsèque). Elle peut également être liée à la moindre perméabilité aux protons chez la femelle (figure 35). En effet,  $VO_{2(0)}$  dans le cœur des femelles est significativement plus faible que chez le mâle, ce qui se traduit par un RCR (respiratory control ratio) plus important chez la femelle. Un meilleur couplage de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative peut être lié à une meilleure utilisation des électrons par les complexes de la chaîne respiratoire. Colom et al. (2007) ont montré chez le rat Wistar femelle une plus grande activité des différents complexes de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative. Cette hypothèse de **meilleure utilisation des électrons** est confortée par la diminution de la production des  $\cdot OH$  dans le cœur même si celle-ci n'est pas significative.

L'origine d'une plus faible fuite de protons au niveau mitochondrial chez le rat Wistar femelle peut être liée à **des éléments structuraux de la mitochondrie**, comme le contenu mitochondrial en acides gras polyinsaturés (AGPI) par exemple. Thompson et Reitz (1978) ont rapporté chez le rat une composition mitochondrial en AGPI moins élevée chez la femelle en comparaison avec le mâle. De plus, à partir d'une étude comparative inter-espèces, Brand et al. (2003), ont montré au niveau des mitochondries isolées de foie, une corrélation positive de la fuite de protons avec la concentration en AGPI mitochondriale.





Par ailleurs, une plus faible fuite de protons au niveau mitochondrial peut aussi être liée à **des éléments fonctionnels**. Elle peut aussi être due à une expression et/ou activité moins importante des ANT et/ou des UCP. Ces dernières sont les principaux acteurs au niveau de la fuite de protons inductible. Il a été montré au niveau musculaire chez le rat Wistar que les femelles présentent, comparativement aux mâles, une expression moins importante des UCP<sub>3</sub> corrélée au poids (Rodríguez et al., 2003), sachant que les femelles ont un poids plus faible que celui des mâles.

La fuite de protons ne serait pas seulement impliquée dans la thermogénèse ou l'efficacité de la phosphorylation oxydative, mais elle pourrait aussi jouer un rôle « antioxydant » en diminuant le potentiel membranaire mitochondrial (Goglia et Skulachev, 2003). En effet, des souris transgéniques déficientes en UCP<sub>2</sub> et UCP<sub>3</sub> présentent une augmentation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale (Brand et al., 2002). Ceci suggère que la moindre expression des UCP musculaires impliquerait une plus grande production de ROS chez la femelle, or ce n'est pas le cas. En effet, d'après nos résultats, la production des <sup>•</sup>OH au niveau cardiaque tend à être moins importante chez la femelle par rapport aux mâles. Cette observation est conforme à d'autres études qui travaillent sur la théorie de l'âge. Cette théorie stipule que le vieillissement et la longévité seraient partiellement déterminés par les taux de ROS produits par la mitochondrie au cours du métabolisme normal (Sohal et al., 1989). En effet, la production de ROS par les mitochondries altère les lipides, protéines et acides nucléiques. L'altération de l'ADNm provoque des mutations qui peuvent entraîner le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et qui en retour accroît la production de ROS. Ainsi s'installe un cercle vicieux où l'augmentation exponentielle des mutations de l'ADNm conduit aux dégénérescences liées au vieillissement (Sanz et Stefanatos, 2008). Il est intéressant de noter que la femelle Wistar a effectivement une production radicalaire moindre et une longévité supérieure à celle du mâle (respectivement 25 et 21 mois en moyenne). Ainsi, une production moins importante de ROS chez la femelle est associée à un vieillissement plus lent et donc une vie plus longue.

### *Quelles pourraient être les autres origines de la moindre production radicalaire chez la femelle ?*

L'implication des systèmes antioxydants constitue une piste. Au niveau cardiaque, la femelle présente des activités SOD et GPx plus élevées que chez le mâle et sont en accord avec la littérature (Barp et al., 2002). Cette meilleure protection antioxydante est souvent attribuée aux hormones sexuelles et en particulier aux œstrogènes. En effet, ces dernières agiraient en activant les MAP kinases qui activeraient à leur tour le facteur nucléaire NF-κB induisant ainsi une augmentation de l'expression des gènes qui codent pour les enzymes antioxydantes.



De plus Borrás et al. (2010) ont montré que les œstrogènes diminuent la production de peroxyde d'hydrogène et augmentent le potentiel membranaire dans des mitochondries isolées. Ces hormones auraient ainsi des effets protecteurs directs (qui ne dépendent pas de l'activation des systèmes enzymatiques antioxydants) vis-à-vis de la fonction mitochondriale contre le stress oxydant.

Au niveau du muscle gastrocnémien, la femelle présente une activité CAT et SOD moins importante que le mâle. Cette moindre activité n'expose toutefois pas plus la femelle au stress oxydant puisque le contenu musculaire en MDA est significativement moins élevé que chez le mâle.

### **Une résistance de la fonction mitochondriale aux ROS plus importante chez la femelle ?**

En exposant les fibres perméabilisées à un système générateur de ROS, nous avons voulu tester la résistance de cette fonction mitochondriale face à un stress oxydatif. Comme attendu, la fonction mitochondriale est affectée, ce qui engendre une diminution de  $VO_{2(0)}$ ,  $VO_{2(max)}$  et  $V_{ATP}$ , après exposition aux ROS. En revanche, il est très intéressant de relever des différences de sensibilité aux ROS de la fonction mitochondriale selon le sexe. **Tous les paramètres cités ci-dessus sont moins affectés chez la femelle quel que soit le tissu.** Cette meilleure résistance au stress oxydatif est certainement liée à la présence d'antioxydants persistants dans les fibres perméabilisées. Lors de la perméabilisation, les fibres sont vidées de leur contenu en enzymes antioxydantes cytoplasmiques, mais peuvent être présentes des substances antioxydantes comme la vitamine E au niveau membranaire ou encore comme les systèmes enzymatiques GPx et Mn-SOD au niveau mitochondrial.

**En résumé, il existe des différences au niveau de la fonction mitochondriale et des réponses radicalaires selon le genre chez le rat Wistar. Les femelles présentent principalement un meilleur rendement de la phosphorylation oxydative et une résistance de la fonction mitochondriale aux ROS plus élevée.**

**Le meilleur rendement de la phosphorylation oxydative chez la femelle peut être lié à une fuite de protons et/ou d'électrons moins importante puisque parallèlement, au niveau du cœur, une moindre production radicalaire est observée. Cette dernière peut être liée également à des systèmes enzymatiques antioxydants plus actifs dans le cœur chez la femelle qui présente aussi une fonction mitochondriale plus résistante aux ROS.**

**Ces différences métaboliques et radicalaires entre mâle et femelle peuvent également être attribuées aux œstrogènes qui sont connus pour leur effet antioxydant.**

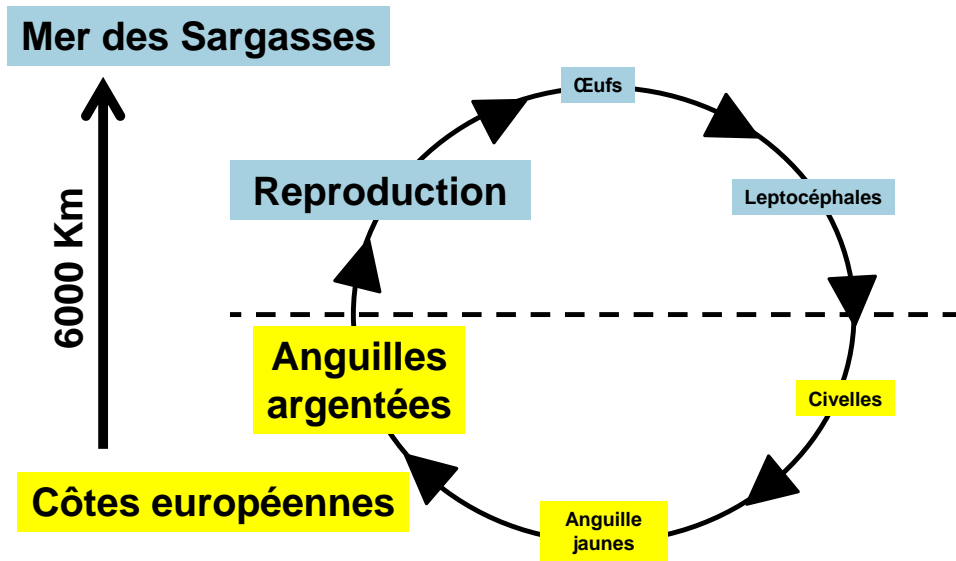


Figure 36 : Cycle de vie de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L. D'après van Ginneken and Maes (2005).

### **V.3.2. Fonction mitochondriale et métabolisme radicalaire selon le sexe chez l'anguille européenne argentée (*Anguilla anguilla L.*):**

Chez l'anguille argentée européenne, la plupart des travaux qui se sont intéressés à l'exploration de son métabolisme énergétique musculaire ont été effectués essentiellement chez la femelle pour des raisons méthodologiques (grande taille et par conséquent du matériel biologique disponible en grande quantité). Or le dimorphisme sexuel important entre mâle et femelle (mâle beaucoup plus petit que la femelle) pose la question de leurs capacités physiologiques et métaboliques respectives qui sont déterminantes pour atteindre leur lieu de reproduction de manière synchrone.

Avant d'analyser les réponses métaboliques et radicalaires suite à l'entraînement en endurance modéré, nous allons apporter quelques éléments sur le cycle de vie de l'anguille et en particulier le processus d'argenture qui constitue une phase de préparation à la nage soutenue entreprise pendant sa migration transocéanique.

#### ***Le processus d'argenture : une préparation physiologique à l'endurance***

L'anguille européenne (*Anguilla anguilla L.*) présente un cycle de vie complexe qui se décompose en plusieurs étapes (figure 36). Dans la mer des Sargasses (aire supposée de ponte), les œufs fécondés donnent naissance à des larves (leptocéphales) qui, inaptes à la nage, se laissent porter par le courant nord-atlantique vers l'Est jusqu'aux côtes européennes où elles subissent une première métamorphose en civelles. Ces civelles, aptes à nager, se sédentarisent en eau douce puis se transforment et se pigmentent progressivement en anguillettes puis en anguilles jaunes. Les anguilles jaunes commencent alors une phase de croissance à la fin de laquelle, elles subissent une seconde métamorphose, appelée silvering process (processus d'argenture) et deviennent des anguilles argentées.

Cette dernière métamorphose consiste en une série de transformations morphologiques, anatomiques, et physiologiques visant la préparation de l'anguille à un changement de milieu lors de la migration transocéanique de reproduction. Parmi ces transformations, on note globalement l'acquisition d'une livrée argentée, le développement de la ligne latérale, l'élargissement du diamètre de l'œil et l'accroissement du volume musculaire jusqu'à +13% et le développement du muscle rouge à fort pouvoir oxydatif. Comparée au stade de vie anguille jaune, l'anguille argentée présente à la fois un volume de muscle rouge et un contenu mitochondrial plus élevés (Pankhurst, 1982).



Les branchies, les reins et l'intestin (organes impliqués dans l'osmorégulation) subissent des modifications physiologiques, permettant l'équilibre osmotique dans les grandes profondeurs océaniques. On note aussi une augmentation du rapport gonado-somatique et de la sécrétion hormonale par les gonades (Durif, 2003). Pendant ce processus d'argenture, les anguilles cessent de se nourrir et utilisent leur stock de graisse à la fois pour la nage et pour la maturation des gonades.

Les anguilles femelles restent entre 7 et 30 ans en eau douce avant la migration contrairement aux mâles qui restent entre 4 et 9 ans. Par conséquent, les femelles présentent un poids cinq à six fois et une taille deux à trois fois plus importants que celle des mâles avant le début de la migration. Les mâles atteignent donc la maturation une fois qu'ils ont atteint une taille critique nécessaire pour migrer et développer les produits sexuels, alors que les femelles doivent être plus grandes pour stocker suffisamment de ressource énergétique pour la maturation des gonades et atteindre l'aire de reproduction.

Les anguilles quittent donc le continent à un stade pré-pubère. Leur maturité sexuelle ne survient qu'au cours de la migration par déblocage de la fonction gonadotrope sous l'effet de certains facteurs comme la nage ou encore la pression hydrostatique (Palstra et van den Thillart, 2010; Sébert et al., 2007).

Dans notre travail de thèse, nous avons exploré **l'impact de deux facteurs environnementaux (température et pression hydrostatique) sur la relation entre fréquence cardiaque (Fc) et consommation d'oxygène de l'animal entier ( $VO_{2entier}$ )**. En effet, lors de la mise au point du protocole de nage, notre but était de vérifier si la mesure de la Fc pouvait être utilisée comme indice de l'intensité métabolique au cours de la nage chez l'anguille.

Ainsi nous avons étudié cette **relation  $Fc/VO_{2entier}$**  dans diverses situations expérimentales proches de celles rencontrées naturellement par l'anguille. Dans la gamme de température (5-25°C), la relation  $Fc/VO_{2entier}$  était linéaire alors que dans la gamme de pression (0,1-10,1 MPa), la Fc ne dépassait pas le seuil des 50 battements par minute au-delà de 8,1 MPa. Ainsi ces résultats ont fait l'objet d'une publication (soumise dans Journal of Thermal Biology, cf. annexe 10). Ils confirment la performance cardiaque exceptionnelle de l'anguille. En effet, que ce soit en conditions de basse température ou de haute pression hydrostatique, le débit cardiaque est maintenu par une augmentation de la force contractile du myocarde.

Ces résultats montrent que l'anguille se caractérise par une plasticité cardiaque qui lui permet probablement d'optimiser sa fonction cardiaque au cours de la migration. Imbrogno (2013) a émis l'hypothèse que grâce à sa plasticité cardiaque, l'anguille serait capable de faire face à des changements environnementaux extrêmes (salinité, température et hypoxie), ou encore à une activité physique. Ils suggèrent ainsi que le modèle anguille serait intéressant dans l'étude des mécanismes impliqués dans la modulation de la fonction cardiaque.





Dans la suite, nous verrons si cette plasticité se retrouve à d'autres niveaux d'organisation tissulaire et cellulaire et si des différences de la fonction mitochondriale et radicalaires existent entre mâles et femelles. La taille des mâles et leur stock d'énergie inférieurs à ceux des femelles laissent penser que ces profils métaboliques et radicalaires au niveau du cœur et du muscle squelettique puissent être différents selon le sexe.

### *Un rendement énergétique plus performant au niveau cardiaque chez le mâle ?*

Les anguilles, quel que soit leur sexe, présentent au niveau cardiaque des capacités aérobies maximales ( $VO_2$  et  $V_{ATP}$ ) largement supérieures à celles du muscle rouge. Les différences ont été également mises en évidence chez le rat mais dans une moindre mesure. Chez tous les vertébrés, cet organe a les caractéristiques de fonctionner en permanence et donc de nécessiter un apport en énergie constant. D'un point de vue métabolique, il utilise majoritairement les acides gras et a également la capacité d'utiliser le lactate pour sa production énergétique (Moyes, 1996; Somero, 1973).

Chez l'anguille, une capacité métabolique exceptionnelle est certainement nécessaire pour faire face aux multiples challenges environnementaux vus précédemment.

Lorsqu'on compare mâle et femelle, peu de différences significatives se dégagent au niveau de la fonction mitochondriale et des réponses radicalaires. Toutefois, plusieurs tendances mises en parallèle laissent penser que le mâle présente une performance métabolique plus importante que la femelle. La production d'ATP mesurée en condition de fonctionnement mitochondrial maximal tend à être plus élevée (+37%) chez le mâle que chez la femelle. Ainsi le rendement de la phosphorylation oxydative tend à être plus élevé (+59%) chez le mâle. Il n'a pas été possible de quantifier la production radicalaire au niveau cardiaque. Par contre au niveau du muscle rouge, elle tend à être plus faible chez le mâle que chez la femelle. Étant donné que les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT et GPx) ne présentent pas de différence significative entre les deux sexes, on peut émettre l'hypothèse que **le rendement énergétique de la phosphorylation oxydative serait lié à une meilleure utilisation des électrons au niveau de la chaîne respiratoire**. (Vettier et Sébert, 2004) ont montré à partir d'extraits mitochondriaux, que la métamorphose en anguille argentée s'accompagne également d'une modulation de la composition membranaire en acides gras, induisant ainsi une augmentation de la fluidité de la membrane mitochondriale. Il n'est donc pas impossible que des différences de composition membranaire en acides gras puissent exister entre mâle et femelle pouvant ainsi modifier la perméabilité membranaire aux protons chez le mâle. La moindre fuite de protons chez le mâle pourrait participer au meilleur rendement énergétique mitochondrial.



Enfin l'étude de la vulnérabilité aux ROS de la fonction mitochondriale suggère **une plus grande résistance aux effets des ROS chez le mâle au niveau cardiaque** (mis en évidence au niveau de  $VO_{2(0)}$ ).

La synthèse de ces résultats confirme les rares travaux antérieurs sur le métabolisme énergétique chez l'anguille mâle et femelle, qui avaient montré à partir de la mesure de la  $VO_{2(max)}$  au niveau du muscle rouge, une plus grande capacité oxydative chez le mâle (Amérand et al., 2010; Vettier et Sébert, 2004). Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de différence de  $VO_{2(max)}$  au niveau du muscle rouge, mais nous arrivons à la même conclusion d'une performance métabolique du mâle supérieure à celle des femelles par l'exploration de la fonction mitochondriale et de la production radicalaire.

Ces caractéristiques métaboliques permettraient aux mâles de nager plus vite que les femelles et ainsi de compenser le handicap de la petite taille. En effet, on a vu que les mâles et femelles avaient des  $U_{crit}$  similaires (exprimée en  $m \cdot s^{-1}$ ) malgré la différence de taille. Les mâles sont donc relativement de meilleurs nageurs car malgré leur petite taille (-34% par rapport aux femelles), ils fournissent un effort plus important pour atteindre une vitesse similaire à celle des femelles (Quintella et al., 2010).

**Chez l'anguille européenne, le mâle montre globalement une meilleure efficacité énergétique mitochondriale que la femelle. Il présente au niveau cardiaque un rendement de la phosphorylation oxydative ainsi qu'une résistance de la fonction mitochondriale à l'exposition aux ROS plus élevés et au niveau du muscle rouge une production radicalaire moins importante que chez la femelle.**

**Cette performance de la fonction mitochondriale chez le mâle participerait à la nage plus rapide tout en évitant les effets délétères du stress oxydatif.**

Nous verrons dans le chapitre suivant si un entraînement à la nage (qui mime cet exercice d'endurance entrepris au cours de la migration) confirme ou pas ces différences mâle/femelle.



#### **V.4. Effets de l'entraînement en endurance sur la fonction mitochondriale et le métabolisme radicalaire :**

Nous avons vu chez les deux espèces étudiées (poisson et rat) et quel que soit le sexe, que l'entraînement a amélioré la performance physique. Cette dernière est en partie déterminée par la capacité d'adaptation mitochondriale au niveau du cœur ou du muscle squelettique, les deux tissus les plus sollicités au cours de l'exercice physique.

Quelle que soit l'espèce, la biogénèse mitochondriale fait partie des adaptations quantitatives classiquement rapportées dans la littérature (Castro et al., 2013; Wright et al., 2007). Elle se traduit par une augmentation de densité et/ou de volume mitochondrial sous l'influence de l'activation de PGC1- $\alpha$ . Elle peut être mise en évidence par une augmentation de l'activité et/ou de l'expression des enzymes du cycle de Krebs et des complexes de la chaîne respiratoire. Parmi les facteurs qui stimulent cette biogénèse mitochondriale, du moins chez le mammifère, figurent les ROS (Gomes et al., 2012) qui participeraient ainsi à l'optimisation du métabolisme énergétique.

Les adaptations à l'entraînement peuvent être aussi qualitatives. L'entraînement peut induire une diminution de la sensibilité à l'ADP et améliorer le contrôle des mécanismes respiratoires via par exemple l'augmentation de l'efficacité des créatines kinases mitochondriales. L'ensemble de ces adaptations vont alors dans le sens d'un métabolisme énergétique plus oxydatif (Hood, 2001; Zoll et al., 2002).

Toutefois, les mécanismes d'adaptation de la fonction mitochondriale et des ROS à l'entraînement sont loin d'être totalement élucidés. Sachant que ces fonctionnements cellulaires de base sont présents chez toutes les espèces, est-il possible de mettre en évidence des mécanismes d'adaptation à l'entraînement similaires chez le rat et le poisson ? Cette analyse nous permettra de discuter de la pertinence du modèle poisson dans le champ de la physiologie de l'exercice. Enfin, parallèlement à cette analyse relevant de la physiologie comparée, l'ensemble de ces réponses métaboliques sera étudiée en fonction du genre.

##### **V.4.1. Effets de l'entraînement à la course sur la fonction mitochondriale et le métabolisme radicalaire chez le rat Wistar mâle et femelle:**

Chez le rat ou d'autres modèles animaux (souris, chien), les effets bénéfiques de l'entraînement de type endurance ont été décrits (Ventura-Clapier et al., 2007).

Globalement, au niveau du métabolisme cardiaque, les études montrent que l'exercice régulier



en endurance protège contre le stress oxydant induit par le vieillissement (Rosa et al., 2005) et stimule la glycolyse et le métabolisme oxydatif (Stuewe et al., 2000). Il a été suggéré que cette amélioration de la production d'énergie au niveau cardiaque serait liée à l'activation de PGC-1- $\alpha$  au cours de l'entraînement, toutefois, les mécanismes précis restent peu connus (Bo et al., 2008).

Au niveau du muscle squelettique, l'augmentation de la capacité oxydative et plus précisément la capacité à oxyder les acides gras est rapportée fréquemment. Ainsi, l'amélioration de l'efficacité du métabolisme mitochondrial peut être attribuée à la stimulation des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Silva et al., 2009) mais aussi à l'augmentation des activités des enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation (Zonderland et al., 1999).

Des disparités d'effets semblent exister selon le genre, mais restent difficile à généraliser compte tenu de la diversité des protocoles d'entraînement mais aussi du type de rat ou de tissu exploré. A titre d'exemple, s'agissant des réponses radicalaires chez le rat Sprague Dawley, un entraînement modéré à la course de huit semaines induit une augmentation de la lipoperoxydation dans le cœur et le muscle squelettique plus importante chez la femelle que chez le mâle (Liu et al., 2000). Dans le foie, Yamamoto et al. (2002) ont montré que la production radicalaire est moins importante chez le mâle mais plus élevée chez la femelle après un exercice physique volontaire de six semaines. Par ailleurs, chez le rat Wistar, un entraînement à la nage de huit semaines induit une diminution de la lipoperoxydation dans le cœur des femelles mais pas chez les mâles (Balci et Pepe, 2012).

Ainsi, dans cette partie de la discussion, l'étude de l'effet de l'entraînement sur la fonction mitochondriale et le métabolisme radicalaire, en utilisant un même protocole d'entraînement chez les deux sexes, va nous permettre vérifier s'il existe des adaptations à l'entraînement différentes selon le genre.

### ***L'entraînement serait-il plus bénéfique chez le mâle que chez la femelle ?***

Comme souvent rapporté chez le rat (Ascensão et al., 2005), nos résultats montrent que l'entraînement en endurance induit une amélioration de la fonction mitochondriale.

L'activité citrate synthase non modifiée suite à l'entraînement suggère que cette amélioration ne semble pas être liée à une biogénèse mitochondriale et ceci quel que soit le genre. Toutefois, nous avons constaté que **l'amélioration de la fonction mitochondriale se traduit différemment selon le sexe** : alors que chez la femelle,  $VO_{2(max)}$  augmente significativement, elle n'est pas modifiée chez le mâle. Par contre chez ce dernier, l'entraînement induit une augmentation significative de la



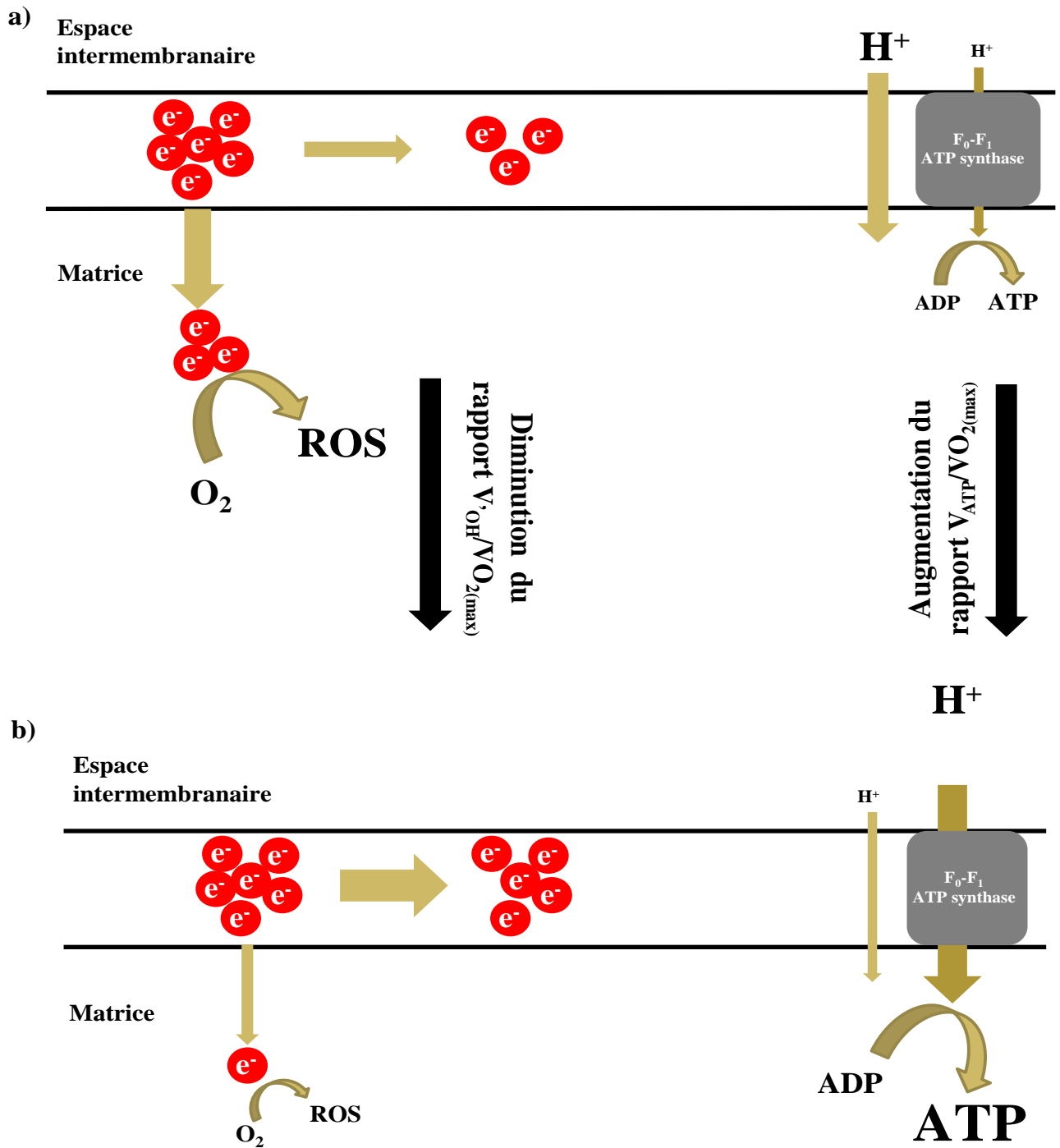


Figure 37 : Hypothèse sur la fuite d'électrons et la conductance aux protons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale chez le rat Wistar mâle a) sédentaire et b) entraîné.

production d'ATP. **Ces résultats traduisent ainsi une amélioration du rendement de la phosphorylation oxydative chez le mâle et sont intéressants à mettre en lien avec le devenir de la production radicalaire (figure 37).**

**Chez le mâle**, nous observons une diminution de la production radicalaire (significative dans le muscle et non significative dans le cœur). Des travaux de la littérature ont aussi rapporté une diminution de la production mitochondriale des ROS ( $H_2O_2$ ) dans le muscle gastrocnémien du rat Wistar mâle après un entraînement à la nage de 10 semaines (Venditti et al., 1999) et au niveau cardiaque chez le rat Fisher mâle après un exercice physique volontaire de 20 mois (Judge et al., 2005). Ces travaux, contrairement à notre étude, n'ont pas exploré en parallèle la phosphorylation oxydative. Ils ont alors suggéré que la diminution de la production de ROS serait liée à une moindre production d' $O_2^{\cdot-}$  et donc une moindre fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils ont alors relié ces résultats à la plus grande durée de vie observée chez les individus entraînés.

Dans notre étude, le rapport  $V_{\cdot OH}/VO_{2(max)}$  diminué chez le mâle après entraînement signifierait que pour une même capacité aérobie après entraînement, la production radicalaire a diminué. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'entraînement a réduit la fuite d'électrons au niveau mitochondrial et a induit **une plus grande efficacité d'utilisation des électrons pour la production d'ATP**.

Par ailleurs, l'optimisation de la fonction mitochondriale chez le mâle se traduit également par un RCR ( $VO_{2(max)}/VO_{2(0)}$ ) augmenté. **Ce meilleur couplage entre oxydation et phosphorylation** dans le cœur et le muscle gastrocnémien après entraînement suggère une moindre fuite de protons au niveau mitochondrial.

Dans la littérature, une augmentation de la production d'ATP est souvent attribuée à une augmentation de la respiration mitochondriale maximale  $VO_{2(max)}$  (Wagner, 2010). Cependant, la régulation de la fuite de protons est aussi importante et fait partie des mécanismes d'adaptation du métabolisme mitochondrial à l'entraînement. Lumini-Oliveira et al. (2009) ont rapporté, à partir de mitochondries de rat Wistar mâle, un RCR plus élevé ( $VO_{2(max)}$  qui augmente et  $VO_{2(0)}$  qui tend à diminuer) après un entraînement à la course de 14 semaines. Ils ont ainsi suggéré que l'entraînement induirait une diminution de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons.

Cette moindre perméabilité aux protons peut être mise en lien avec des changements structuraux au niveau de la mitochondrie notamment la composition lipidique mitochondriale. Il a été rapporté qu'un entraînement en endurance de 20 jours chez le rat (Kalofoutis et al., 1981) peut



effectivement moduler la composition lipidique au niveau de mitochondries isolées de cœur en diminuant le contenu en acides gras polyinsaturés. Les mêmes observations ont été rapportées à partir de biopsie de muscle *vastus lateralis* chez l'homme après quatre semaines d'entraînement (Helge et al., 2001).

Par ailleurs, une moindre perméabilité aux protons peut aussi être liée aux UCP. L'entraînement peut diminuer l'expression des UCP<sub>3</sub> dans le muscle squelettique chez l'Homme (Fernström et al., 2004) ou encore des UCP<sub>2</sub> et UCP<sub>3</sub> dans le muscle et le cœur de rats OFA mâles (Boss et al., 1998).

**Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes, mettant en jeu la composition membranaire en lipides et les UCP, pourraient contribuer à diminuer la fuite de protons au niveau de la chaîne respiratoire et participer à l'amélioration de la phosphorylation oxydative observée chez le mâle entraîné.**

**Chez le rat Wistar femelle**, il a été montré qu'un entraînement modéré à la course de deux semaines induisait une augmentation de la consommation d'oxygène maximale de l'animal (Patch et Brooks, 1980). A partir de fibres perméabilisées de rat Sprague Dawley femelle, il a été rapporté qu'un entraînement en endurance de quatre semaines induisait une augmentation de la respiration mitochondriale dans le muscle soléaire et non dans le muscle gastrocnémien (Burelle et Hochachka, 2002). Nos résultats montrent que quel que soit le tissu (cœur et muscle gastrocnémien),  $VO_{2(max)}$  augmente significativement après six semaines d'entraînement. Cette amélioration de la capacité aérobie des fibres cardiaques et musculaires squelettiques est accompagnée d'une  $V_{ATP}$  qui tend à augmenter. **L'entraînement n'a donc pas modifié le rendement de la phosphorylation oxydative contrairement à ce que nous avons observé chez le mâle.**

Parallèlement à l'augmentation de  $VO_{2(max)}$ , une augmentation, mais non significative de la production radicalaire (+107%) est observée dans le cœur. Le rapport  $V_{\cdot OH}/VO_{2(max)}$  qui augmente (+86%, non significatif) signifierait que pour une même consommation d'oxygène, la production radicalaire augmenterait. **Ceci suggère que l'entraînement aurait induit chez la femelle une augmentation de la fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire.**

Parallèlement, le rapport  $VO_{2(max)}/VO_{2(0)}$  non modifié montre que l'entraînement n'a pas influé sur le couplage entre oxydation et phosphorylation.

**Ces résultats confirment que la tendance à l'augmentation de  $V_{ATP}$  chez la femelle serait liée à l'augmentation de la consommation d'O<sub>2</sub> mitochondriale et non pas à un meilleur couplage ou un meilleur rendement de la phosphorylation oxydative contrairement au mâle.**



*Est-ce que les modifications de la production radicalaire sont accompagnées de modification du statut antioxydant ?*

**Chez le mâle**, l'un des résultats les plus originaux de notre étude est la **diminution significative des activités des systèmes antioxydants quel que soit le tissu** (sauf pour la CAT dans le cœur). Ces résultats peuvent être, à priori, surprenants lorsqu'on examine la littérature. En effet, chez le rat, il est rapporté classiquement que suite à l'entraînement, l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants augmente (Ascensão et al., 2007) ou reste inchangée (Powers et al., 1994). Toutefois, quelques travaux ont rapporté une diminution de l'activité SOD après un exercice physique volontaire de sept jours chez le campagnol (*Microtus agrestis*) (Selman et al., 2002) et de l'activité GPx après un entraînement de huit semaines chez le rat Sprague-Dawley mâle (Gul et al., 2006). Dans ces travaux, les auteurs n'ont pas discuté les raisons de ces diminutions, mais il est possible que la différence du type et/ou la durée d'entraînement ainsi que l'espèce étudiée entre les travaux cités ci-dessus puissent expliquer ces différentes réponses antioxydantes à l'entraînement.

Dans notre étude, la diminution des activités antioxydantes est tout à fait cohérente lorsqu'elle est mise en lien avec les résultats obtenus *in vitro* (décrits ci-dessus) en particulier la diminution de la production radicalaire. **Il s'agit probablement d'une adaptation à la production de ROS diminuée au cours de la période d'entraînement.**

Cette diminution des activités des enzymes antioxydantes mesurées au niveau tissulaire n'est pas uniquement liée à la production radicalaire mitochondriale. D'autres sources de ROS sont potentiellement activées lors de l'exercice physique telles que la xanthine oxydase, la NADPH oxydase, les catécholamines (Powers et Jackson, 2008). Dans ce travail de thèse, nous n'avons pas exploré ces autres sources de ROS, mais il serait intéressant de les prendre en considération dans des travaux futurs.

**Chez la femelle**, l'entraînement n'a pas induit de modification des activités des systèmes enzymatiques antioxydants. L'absence de modification du contenu en MDA reflète une balance pro/antioxydants bien régulée chez la femelle. Les taux élevés d'œstrogène pourraient exercer une activité antioxydante et ainsi se substituer aux effets des activités enzymatiques. En effet, il a été rapporté qu'un entraînement en endurance induit chez le rat Sprague Dawley femelle, une perturbation du cycle œstral (Carlberg et Fregly, 1985) qui peut provoquer une diminution de la production plasmatique d'œstrogène (Mosavat et al., 2013). Mais que ce processus est compensé par une augmentation de l'expression des récepteurs à l'œstrogène Er $\alpha$  (Estrogen receptor alpha) dans le muscle squelettique, ce qui a pour effet de maintenir un effet œstrogénique



constant (Lemoine et al., 2002). Sachant que les œstrogènes sont des stimulateurs de l'expression des gènes de la SOD et la GPx, ceci, pourrait expliquer l'absence de modification de l'activité des enzymes antioxydantes suite à l'entraînement.

### ***Quel est l'effet de l'entraînement sur la résistance de la fonction mitochondriale aux ROS ?***

Nous avons voulu vérifier si l'entraînement pouvait modifier la résistance de la fonction mitochondriale aux ROS mais aussi si des différences inter-sexe pouvaient être mises en évidence. Nous avons ainsi pu montrer que **l'entraînement en endurance de six semaines a induit des vulnérabilités de la fonction mitochondriale différentes selon le sexe.**

**Chez le mâle**, l'entraînement a modifié la sensibilité de la fonction mitochondriale au niveau du cœur et du muscle. Ce résultat est différent de celui de Walsh et al. (2001) qui n'ont observé aucune modification de la sensibilité aux ROS de la consommation d'oxygène des fibres musculaires perméabilisées dans le gastrocnémien chez l'homme après deux semaines d'entraînement. Toutefois, Leichtweis et al. (1997) montrent que l'exposition aux ROS de mitochondries isolées de rat Sprague-Dawley mâle induit une diminution plus importante de la respiration mitochondriale chez les individus entraînés (deux semaines) en comparaison aux sédentaires.

Dans notre étude, la vulnérabilité de  $VO_{2(max)}$  aux ROS est significativement augmentée alors que celle de  $V_{ATP}$  est significativement diminuée (figure 30). Ces résultats suggèrent que chez le mâle, l'entraînement aurait induit une sensibilité aux ROS différente des complexes et/ou des structures de la mitochondrie. Il est intéressant de noter **une meilleure résistance aux ROS de la phosphorylation oxydative après entraînement**. Il est connu que certains composés impliqués dans la fonction mitochondriale sont particulièrement sensibles aux ROS, les plus fréquemment cités étant l'ATP/ADP translocase, la  $F_0-F_1$  ATP synthase, les  $UCP_2$  et  $UCP_3$ , mais aussi le pore de transition de perméabilité mitochondriale, dont l'induction augmente la perméabilité membranaire provoquant le gonflement des mitochondries et la mort cellulaire par apoptose (Cambier et al., 2009). Leichtweis et al. (1997) avaient suggéré que certains composés spécifiques de la mitochondrie dans le cœur exposé chroniquement aux ROS, comme dans la cadre de l'exercice, pouvaient être plus ou moins affectés par l'exposition aux ROS. Ainsi, après entraînement, certains de ces composés, impliqués en particulier dans la phosphorylation comme la  $F_0-F_1$  ATP synthase ou l'ANT, pourraient être mieux protégés que d'autres complexes de la chaîne respiratoire. Des systèmes antioxydants autres qu'enzymatiques pourraient être impliqués dans cette protection comme la vitamine E, le glutathion ou encore l'ubiquinone dont les taux peuvent être modifiés par l'entraînement (Powers et al., 1994).





**Chez la femelle**, il n'y a pas de modification de la vulnérabilité de la fonction mitochondriale aux ROS ni de l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants après entraînement. On peut ainsi suggérer que **l'absence de modification de sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS après entraînement pourrait être liée au maintien d'un effet protecteur des œstrogènes constant.**

### *Comment expliquer ces différences de réponses à l'entraînement selon le sexe ?*

Les différences de profils métaboliques et radicalaires entre mâles et femelles sont souvent attribuées aux hormones sexuelles. Les œstrogènes en particulier sont souvent rapportés comme des éléments protecteurs contre le stress oxydatif de manière directe ou indirecte via la stimulation des systèmes enzymatiques antioxydants. A titre d'exemple, il a été rapporté chez le rat Wistar qu'une ovariectomie induisait une augmentation de la production mitochondriale de ROS puis que l'administration du  $17\beta$ -œstradiol rétablissait cette production au niveau normal (Borrás et al., 2003).

Toutefois, d'autres études n'ont relevé aucune différence métabolique et/ou radicalaire entre les deux sexes. Chez la souris par exemple, la fonction mitochondriale ainsi que la production radicalaire n'étaient pas différentes entre mâle et femelle malgré les différences de taux d'œstrogènes (Sanz et al., 2007). Il a ainsi été suggéré que d'autres facteurs, comme par exemple la taille corporelle, pourraient être impliqués dans ces différences de réponses. Ce dernier facteur nous intéresse particulièrement puisque des différences de poids (qui reflète généralement des différences de taille corporelle) existent entre les rats wistar mâle et femelle.

Chez le mammifère, il existe une corrélation interspécifique entre intensité métabolique et poids corporel. Au niveau du foie, la diminution de la consommation d'oxygène avec l'augmentation du poids corporel est expliquée par une diminution du renouvellement d'ATP et de l'augmentation de l'efficacité énergétique. Cette meilleure efficacité énergétique serait liée à une moindre fuite de protons chez les grands animaux par rapport aux plus petits. La différence de fuite de protons selon le poids a été attribuée à la différence de surface de la membrane mitochondriale interne. Plus cette dernière est petite et moins la fuite de protons est importante (Porter, 2001).

Dans une autre étude comparative inter-espèce, chez l'oiseau, Brand et al. (2003) ont également rapporté que la conductance de protons est aussi moins élevée lorsque la taille de l'animal augmente, mais contrairement au mammifère, elle serait plutôt liée aux différences de la composition mitochondriale en phospholipides (Brookes, 2005).



Bien qu'il s'agisse d'études comparatives inter-espèces, nous pouvons suggérer que le facteur poids pourrait être impliqué dans les différences du métabolisme mitochondrial entre mâle et femelle d'une même espèce. En effet, dans notre étude, la différence de poids entre mâle et femelle (poids plus élevé chez le mâle de +26%) se réduit après entraînement. Cet effet de l'entraînement sur le poids est plus marqué chez le mâle et est accompagné de réponses métaboliques et radicalaires plus nettes que chez la femelle. Quelques pistes sur la place du facteur poids et/ou sexe seront avancées dans la partie V.5 de cette discussion.

**Nous venons de voir que si l'entraînement a amélioré la fonction mitochondriale chez les deux sexes, les effets semblent globalement plus bénéfiques chez le mâle en termes de meilleur rendement énergétique mitochondrial, de plus grande résistance de la fonction mitochondriale aux ROS et de moindre production radicalaire. Le meilleur rendement énergétique chez le mâle serait attribué à un meilleur couplage oxydation/phosphorylation et une meilleure utilisation des électrons pour la production d'énergie au niveau mitochondrial.**

**Il est difficile d'émettre des hypothèses quant à l'origine de ces différences. Elle peut être hormonale mais aussi liée à la différence de poids.**

#### **V.4.2. Effet de l'entraînement en endurance sur la fonction mitochondriale et le métabolisme radicalaire chez l'anguille européenne argentée mâle et femelle :**

L'une des premières équipes à avoir testé la capacité d'endurance des anguilles européennes est celle de Van Den Thillart et al. (2004). En soumettant des anguilles argentées femelles à un exercice de nage à une vitesse de  $0,5 \text{ Lc.s}^{-1}$  durant trois mois, c'est-à-dire une distance parcourue de 2850 Km sans interruption, ils avaient pour objectif d'estimer le coût énergétique de la migration de reproduction supposée effectuée sur 6000 Km. Ils ont ainsi montré que l'anguille européenne argentée nage quatre à six fois plus efficacement que d'autres poissons. En effet, son coût de transport a été estimé à  $30 \text{ mg O}_2.\text{kg}^{-1}.\text{km}^{-1}$  à une vitesse de nage de  $0,5 \text{ Lc.s}^{-1}$ . Pour cette même vitesse, il a été rapporté chez le saumon rouge (*Oncorhynchus nerka*) et le saumon argenté (*Oncorhynchus kisutch*) un coût de transport six fois plus élevé que chez l'anguille (entre  $150$  et  $200 \text{ mg O}_2.\text{kg}^{-1}.\text{km}^{-1}$ ) (Lee et al., 2003). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), un poisson plus actif que l'anguille, le coût de transport à une vitesse de nage de  $0,7 \text{ Lc.s}^{-1}$  est aux alentours de  $160 \text{ mg O}_2.\text{kg}^{-1}.\text{km}^{-1}$  (Teulier et al., 2013).



Ainsi, compte tenu de ces capacités de nage exceptionnelles, l'anguille européenne argentée peut être considérée comme un athlète en endurance puisqu'elle est capable d'effectuer un exercice de nage sur plus de 6000 km.

Dans notre travail, la durée de nage (quelques jours) n'est pas comparable à celle des travaux de Van Den Thillart et al. (2004) (trois mois) ou de van Ginneken et al. (2005) (six mois). Nous avons défini notre protocole d'entraînement à partir du travail de Mortelette et al. (2010) qui avait montré qu'un entraînement à la nage de quelques jours induisait chez l'anguille femelle des modifications métaboliques et radicalaires. Plus précisément, l'amélioration de la performance physique après entraînement s'accompagnait d'une tendance à l'augmentation des capacités aérobies maximales et de la production radicalaire au niveau du muscle rouge. Parallèlement, avait été mise en évidence une moindre lipoperoxydation malgré des activités enzymatiques antioxydantes diminuées. Ils ont alors suggéré que l'ensemble de ces adaptations pourrait jouer un rôle dans l'amélioration de la performance de nage chez l'anguille, en maintenant, voire même en augmentant la capacité aérobie du muscle rouge tout en se préservant des effets délétères des ROS.

Nous allons voir dans notre étude, que l'entraînement de courte durée (quelques jours) induit des réponses métaboliques et radicalaires chez la femelle mais aussi chez le mâle. Nos résultats présentent certaines différences par rapport à ceux des travaux de Mortelette et al. (2010). Toutefois, il faut rappeler qu'il s'agit d'animaux sauvages et que leur état métabolique peut différer selon le site géographique. Concernant les lots de mâles et de femelles utilisés dans notre étude, ils proviennent d'un même site et ont été pêchés à la même époque.

Globalement, comme chez le mammifère, nous avons mis en évidence chez l'anguille des effets de l'entraînement au niveau de sa performance physique, mais aussi au niveau métabolique et radicalaire. Toutefois, même si on note peu de différences significatives entre mâles et femelle, plusieurs tendances mises en perspectives seront intéressantes à analyser notamment au niveau de la fonction mitochondriale.

Dans la littérature, les études s'intéressant aux effets de l'entraînement en endurance chez le poisson ne sont pas aussi nombreuses que celles chez le mammifère, voire même rares. Toutefois, il en ressort globalement qu'un exercice de type endurance améliore également, chez le poisson, les capacités aérobies.

Comme chez le mammifère, l'amélioration des capacités aérobies chez le poisson est souvent attribuée à une biogénèse mitochondriale plus importante suite à un entraînement. Davison et Goldspink (1977) ont montré chez la truite (*Salmo trutta*) qu'un exercice de nage à  $1,5 \text{ Lc}\cdot\text{s}^{-1}$  de 28 jours induisait une augmentation du pourcentage des fibres rouges et du volume des mitochondries



dans ce même types de fibre. Ces modifications permettent ainsi un renforcement du phénotype aérobie du muscle rouge. D'autres études ont rapporté que l'entraînement à la nage induisait une augmentation des activités des enzymes du métabolisme aérobie. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), Morash et al. (2014) ont montré qu'un entraînement à la nage de quatre semaines à une vitesse de  $1,5 \text{ Lc.s}^{-1}$  (qui correspondait approximativement à 50% de  $U_{\text{crit}}$ ) induisait au niveau du muscle rouge une augmentation de l'activité de la  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (oxydoréductase impliquée dans la  $\beta$ -oxydation), la citrate synthase (enzyme du cycle de Krebs) et l'hexokinase (enzyme impliquée dans la glycolyse). Chez le saumon (*Salmo salar L.*), un entraînement à la nage de six semaines, engendre dans le muscle squelettique une augmentation de l'activité des enzymes métaboliques comme la succinate déshydrogénase (Anttila et al., 2006). Ces activités enzymatiques augmentées permettent une amélioration de la capacité aérobie musculaire.

**Quel que soit le sexe**, nous avons vu dans notre étude que la performance de nage ( $U_{\text{crit}}$ ) augmente de 20% environ. Dans le contexte de la migration, même si les anguilles mâles sont supposées débiter leur migration un mois avant celle des femelles, leur arrivée sur le lieu de reproduction ne serait pas synchronisée avec celle des femelles si les deux sexes nageaient à la même vitesse. Dans le cadre de notre protocole d'entraînement, les mâles et les femelles ont parcouru, sur une même période, des distances comparables, respectivement 74 Km et 86 Km (moyenne de vitesse de nage en  $\text{m.s}^{-1}$  multipliée par la durée totale de l'entraînement (trois jours et quatre nuits)). Étant donné que les mâles avaient une  $U_{\text{crit}}$  (exprimée en  $\text{Lc.s}^{-1}$ ) et une fréquence de battements de queue plus élevées que les femelles, ils ont donc nagé plus vite et ont été plus efficaces d'un point de vue énergétique.

Alors que la performance de nage est améliorée, nous n'avons pas observé d'augmentation de  $\text{VO}_{2(\text{max})}$ . Ces résultats confirment ceux obtenus par Mortelette et al. (2010) chez l'anguille femelle, même si dans cette étude une tendance à augmenter de  $\text{VO}_{2(\text{max})}$  avait été mise en évidence parallèlement à une augmentation de  $U_{\text{crit}}$  de 7,3%.

Nous n'avons pas non plus mis en évidence de biogénèse mitochondriale. La stabilité de l'activité citrate synthase et du contenu protéique avec l'entraînement ne sont à priori pas surprenants. En effet, les anguilles, étant maintenues à jeun, ne sont pas dans les meilleures conditions de synthèse protéique et de biogénèse mitochondriale et puisent certainement dans les réserves lipidiques pour la production d'énergie. Il est possible aussi que la durée de l'entraînement n'était pas suffisante puisque dans une étude comparant différentes durées d'entraînement à la nage (une, deux et quatre semaines) chez la truite, Morash et al. (2014) ont montré une augmentation de l'activité citrate synthase qu'après quatre semaines d'entraînement.





**L'ensemble de ces résultats suggère que les anguilles argentées seraient pré-adaptées à un exercice physique soutenu mais que la durée de l'entraînement n'était peut-être pas suffisante pour modifier la capacité aérobie cardiaque et musculaire.**

*Est-ce que l'amélioration de la performance de nage après entraînement se traduit par une meilleure efficacité énergétique mitochondriale chez les anguilles mâles et les femelles ?*

Chez le mâle, après entraînement, la production d'ATP tend effectivement à augmenter (+37%) dans le muscle rouge. Ainsi, le rendement de la phosphorylation oxydative ( $V_{ATP}/VO_{2(max)}$ ) tend à augmenter (+59%). Par ailleurs, toujours dans le muscle rouge, lorsqu'on examine la production radicalaire ramenée à la consommation d'oxygène maximale *in vitro*, nous observons un rapport  $V_{\bullet OH}/VO_{2(max)}$  diminué suite à l'entraînement à la nage. Cette moindre capacité de production radicalaire dans le muscle rouge chez le mâle signifie que les électrons seraient mieux utilisés pour la production d'énergie. Ceci expliquerait alors l'amélioration (tendance) du rendement de la phosphorylation oxydative.

Chez la femelle, contrairement au mâle, la production d'ATP diminue (-42% NS) dans le muscle rouge, ce qui est à mettre en parallèle à la diminution du rendement de la phosphorylation oxydative ( $V_{ATP}/VO_{2(max)}$  de -56% NS). Dans ce même tissu, la production radicalaire ramenée à la consommation d'oxygène maximale *in vitro* tend à augmenter, reflétant ainsi une augmentation de la fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire.

**L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'entraînement de quelques jours améliore le rendement énergétique mitochondriale au niveau du muscle rouge chez l'anguille mâle mais pas chez la femelle.**

Contrairement aux mammifères, l'entraînement n'a pas induit de modification de la fuite de protons (traduit par une  $VO_{2(0)}$  non modifiée). On ne peut donc pas suggérer que cette meilleure efficacité énergétique, observée chez le mâle, puisse être liée à un meilleur couplage de l'oxydation et de la phosphorylation de l'ADP en ATP.

A notre connaissance, peu de recherches sur la régulation de la fonction mitochondriale, dont la participation de la fuite des protons, existent chez le poisson. Nous n'avons pas à disposition de données, comme par exemple l'effet de l'entraînement sur la composition de la membrane mitochondriale en acide gras et/ou sur le couplage entre phosphorylation et chaîne respiratoire mitochondriale qui peuvent influencer sur la fuite de protons au niveau mitochondrial. Toutefois, l'implication des UCP serait intéressante à analyser. En effet, Bermejo-Nogales et al. (2011) ont



montré chez la dorade (*Sparus aurata*) que la restriction alimentaire induisait une augmentation de l'expression d'UCP<sub>3</sub>. Il est vrai que cette dernière étude ne concerne pas l'effet de l'entraînement à la nage, mais puisque les anguilles sont à jeûn, il serait intéressant de vérifier l'impact de l'entraînement sur l'expression et/ou l'activité des UCP<sub>3</sub> chez les anguilles mâles. Ces UCP pourraient alors jouer non seulement un rôle dans l'amélioration de l'efficacité énergétique, mais aussi un rôle antioxydant et participer ainsi à limiter la production radicalaire au niveau du muscle rouge.

*Est-ce que la production radicalaire différente selon le sexe s'accompagne de modification du statut antioxydant et de la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS ?*

Chez le mâle, la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS au niveau du muscle rouge ne montre aucune différence de réponse à l'entraînement. Ceci peut être lié à l'activité également non modifiée des systèmes enzymatiques antioxydants. Toutefois, **la fonction mitochondriale semble être mieux protégée au niveau cardiaque** puisqu'une plus grande résistance aux ROS de VO<sub>2(max)</sub>, est observée parallèlement à des activités SOD et GPx non modifiées suite à l'entraînement. **L'entraînement aurait induit une sensibilité aux ROS différente selon les complexes et/ou autres structures de la membrane mitochondriale au niveau cardiaque.** Il est possible que l'entraînement ait induit une augmentation de l'expression de certains complexes de la chaîne respiratoire au niveau cardiaque, limitant ainsi l'impact des ROS. Cette hypothèse reste à vérifier car dans la littérature, à notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été effectuée chez le poisson. Tout comme il serait intéressant d'explorer les systèmes antioxydants non enzymatiques qui pourraient être potentiellement impliqués dans cette résistance aux ROS au niveau cardiaque.

Chez la femelle, quel que soit le tissu, l'entraînement ne modifie pas la sensibilité à l'exposition aux ROS de la fonction mitochondriale. De plus, l'entraînement a tendance à déséquilibrer la balance pro/antioxydant puisqu'on observe un contenu en MDA plus important (+40% NS) alors que globalement, l'activité enzymatique antioxydante est plus élevée (Gpx significativement plus élevée) dans le muscle rouge mais aussi au niveau du cœur.

Il a été montré que l'exercice de nage prolongé participerait à la maturation sexuelle chez l'anguille européenne en stimulant la sécrétion de la 11 kétotestostérone et la 17-β œstradiol (Palstra et van den Thillart, 2010). Comme chez le mammifère, ces hormones pourraient, via les MAP kinases, stimuler l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes. Ceci pourrait ainsi expliquer l'activité GPx plus élevée observée suite à l'entraînement à la nage.



**Ainsi, chez l'anguille après entraînement, la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS et le profil pro/antioxydant sont modifiés. Par ailleurs, des réponses selon le genre sont observées puisque, face à un stress oxydatif, le mâle semble être plus résistant que la femelle.**

Des différences de **profil radicalaire selon le sexe** avaient déjà été mises en évidence au laboratoire mais dans tout un autre contexte, celui des effets de la pression hydrostatique. L'anguille est supposée migrer en profondeur et adopterait des stratégies migratoires différentes selon le genre (Scaion et al., 2008). Pour vérifier cette hypothèse, la consommation d'oxygène et la production radicalaire avaient été évaluées chez des anguilles mâles et femelles acclimatées à une pression hydrostatique de 10,1 MPa, durant trois semaines (Amérand et al., 2010). A pression atmosphérique, le rapport  $V_{\bullet\text{OH}}/VO_{2(\text{max})}$  tendait à être plus élevé chez le mâle que chez les femelles. Après exposition à la pression, alors que la production de ROS était plus élevée chez les femelles, elle était inversement corrélée au taux métabolique chez les mâles. Ceci reflétait chez le mâle une production radicalaire moins importante qu'avant exposition à la pression. Il a alors été suggéré que le mâle migrerait plus en profondeur que les femelles, ce qui lui permettrait une optimisation de son métabolisme énergétique tout en se protégeant contre les effets délétères des ROS.




**Cet ensemble de résultats (les nôtres et ceux de la littérature), confirme d'une part une grande plasticité de la fonction mitochondriale chez le mâle. D'autre part, il nous conforte dans l'idée que les ROS jouent un rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique y compris chez le poisson.**

**Chez l'anguille, l'effet de l'entraînement à la nage est plus marqué au niveau du muscle rouge qu'au niveau du cœur. Après quelques jours de nage, les mâles ont amélioré d'une part leur rendement énergétique au niveau du muscle rouge, et d'autre part, la résistance de leur fonction mitochondriale à un stress oxydatif au niveau du cœur. Ces adaptations au niveau cellulaire pourraient contribuer à la capacité de nage supérieure des mâles par rapport aux femelles.**

A ce stade, il reste difficile d'affirmer que ces différences de réponses sont liées au sexe et/ou à la différence de taille. Comme annoncé dans la partie consacrée au rat Wistar, une réflexion préliminaire sera effectuée dans la partie V.5 de cette discussion.

Paramètres	Rat		Anguille	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
Gain de poids de l'animal	↘ S	↘ S	→	→
Gain de vitesse maximale	↗ S	↗ S	↗ S	↗ S
<b>Coeur</b>				
VO <sub>2(0)</sub>	↘ S	→	→	→
VO <sub>2(max)</sub>	→	↗ S	→	↘ NS
VATP	↗ S	↗ NS	↗ NS	↘ NS
V <sub>ATP</sub> /VO <sub>2(max)</sub>	↗ S	→	↗ NS	↘ NS
V <sub>·OH</sub>	↘ S	↗ NS	Nm	↘ NS
V <sub>·OH</sub> /VO <sub>2(max)</sub>	↘ NS	↗ NS	Nm	↘ NS
MDA	→	↘ NS	Nm	Nm
SOD	↘ S	→	↗ NS	↗ NS
CAT	→	→	Nm	Nm
GPx	↘ S	→	→	↗ S
Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(0)</sub>	↘ NS	↗ NS	↘ NS	↘ NS
Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(max)</sub>	↗ S	↗ NS	↘ S	→
Sensibilité aux ROS de V <sub>ATP</sub>	↘ S	↗ NS	↗ NS	→
<b>Muscle squelettique</b>				
VO <sub>2(0)</sub>	↘ S	→	→	→
VO <sub>2(max)</sub>	→	↗ S	→	→
VATP	↗ S	↗ NS	↗ NS	↘ NS
V <sub>ATP</sub> /VO <sub>2(max)</sub>	↗ S	→	↗ NS	↘ NS
V <sub>·OH</sub>	↘ S	→	↘ S	↘ NS
V <sub>·OH</sub> /VO <sub>2(max)</sub>	↘ S	→	↘ S	↘ NS
MDA	→	↗ NS	→	↘ NS
SOD	↘ S	→	↗ NS	↗ NS
CAT	↘ S	→	→	→
GPx	↘ S	→	→	↗ S
Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(0)</sub>	↘ NS	→	→	→
Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(max)</sub>	↗ S	→	→	→
Sensibilité aux ROS de V <sub>ATP</sub>	↘ S	→	↗ NS	→

**Tableau 12: Synthèse de l'effet de l'entraînement sur les caractéristiques métaboliques et radicalaires et sur la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS chez le rat Wistar et l'anguille européenne.**

Les flèches représentent la variation des paramètres chez les individus entraînés par rapport aux sédentaires :  = augmentation,  = diminution et  = pas de modification. Nm = non mesuré, S = significatif, NS = tendance (une tendance correspond à une variation de plus de 10% et qui n'est pas significative). Les cercles rouges représentent les principales similitudes entre espèces de même sexe.

## **V.5. Approche comparative et intégrative des réponses métaboliques et radicalaires à l'entraînement :**

Ce travail de thèse a été mené chez deux espèces animales. Les comparaisons interspécifiques sont toujours délicates à effectuer compte tenu des facteurs multiples les différenciant. Toutefois dans cette dernière partie, nous avons voulu voir d'une part s'il était possible de dégager des profils métaboliques et radicalaires intra et/ou interspécifiques et d'autre part quels étaient les effets de l'exercice de type endurance. Plus précisément, sur la base de nombreuses données quantitatives recueillies, nous avons cherché à mettre en évidence d'éventuelles discriminations selon l'espèce, le genre, et le statut sédentaire/entraîné. Dans un premier temps, nous comparerons les effets de l'entraînement chez le rat et chez l'anguille. Dans un deuxième temps, nous analyserons globalement les corrélations existantes entre les variables mesurées en utilisant une analyse multivariée (ACP). Il s'agit ici d'une analyse préliminaire, une sorte de cartographie de l'ensemble des données quantitatives. A plus long terme, ce type d'analyse devrait nous permettre de confirmer ou pas la pertinence du modèle poisson dans le champ de l'exercice physique.

### **V.5.1. Comparaison des effets de l'entraînement chez les deux espèces :**

Le tableau 12 présente les effets de l'entraînement au niveau des deux tissus explorés. Globalement, **l'entraînement a induit chez le rat des effets plus nombreux statistiquement significatifs (S), sur les variables mesurées que chez l'anguille et ceci quel que soit le tissu.**

Deux hypothèses, mais qui restent spéculatives, peuvent être avancées. (1) La période d'entraînement de l'anguille (quelques jours) est largement inférieure à celle des rats (six semaines) et peut donc être insuffisante pour induire des modifications significatives de la fonction mitochondriale et radicalaire. (2) L'anguille, comparativement au rat Wistar est une espèce naturellement endurante, de surcroît l'anguille argentée puisqu'elle est pré-adaptée à ce type d'exercice.

L'analyse de ce tableau montre **des similitudes interspécifiques de réponse à l'entraînement selon le genre** essentiellement au niveau du **muscle squelettique**. Ces similitudes concernent des variations de données qui évoluent dans le même sens même s'il ne s'agit parfois que de tendance (Ns). **Chez le mâle uniquement et quelle que soit l'espèce, le rendement de la**



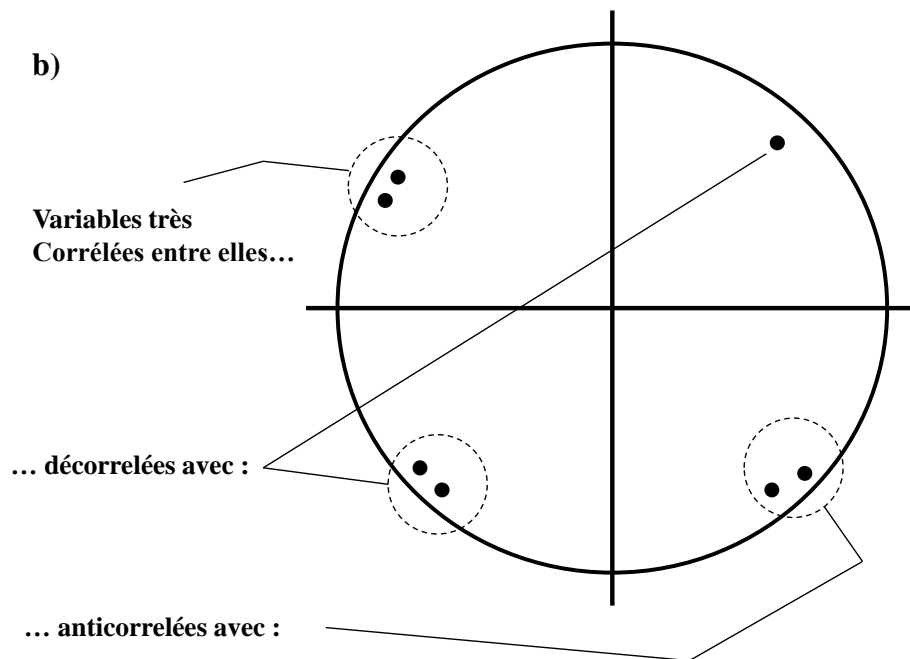
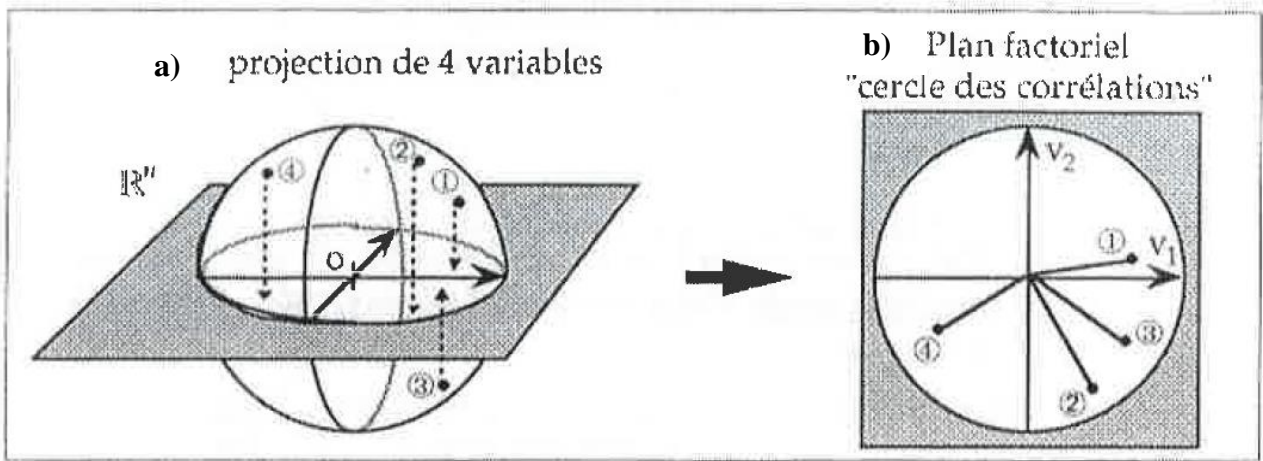


Figure 38 : Représentation de la sphère (a) et du cercle des corrélations (b).

**phosphorylation oxydative augmente accompagnée d'une diminution de production radicalaire.** Ces mécanismes de régulation au niveau de la fonction mitochondriale pourraient contribuer à l'amélioration de leur performance physique.

**Chez la femelle uniquement et quelle que soit l'espèce et le tissu (cœur et muscle squelettique), l'entraînement ne modifie pas la sensibilité de la fonction mitochondriale à l'exposition aux ROS.** L'effet protecteur des œstrogènes commun aux deux espèces pourrait jouer un rôle important en situation d'exercice.

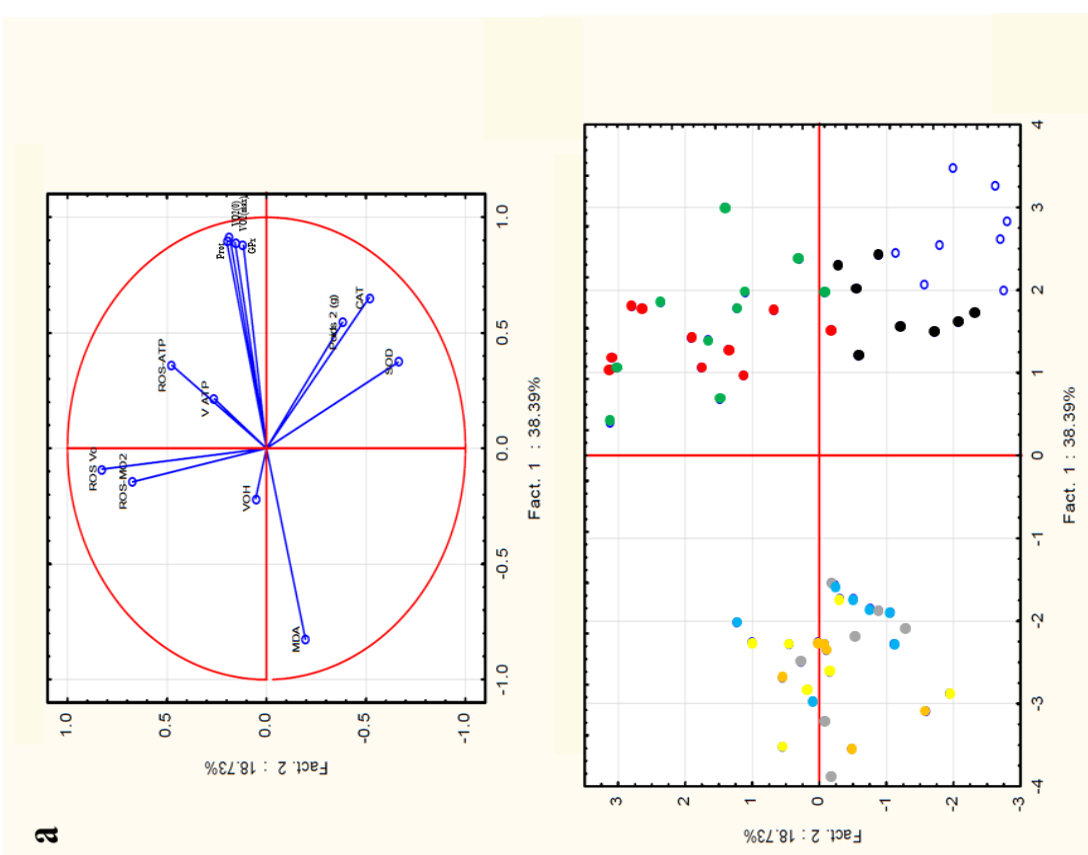
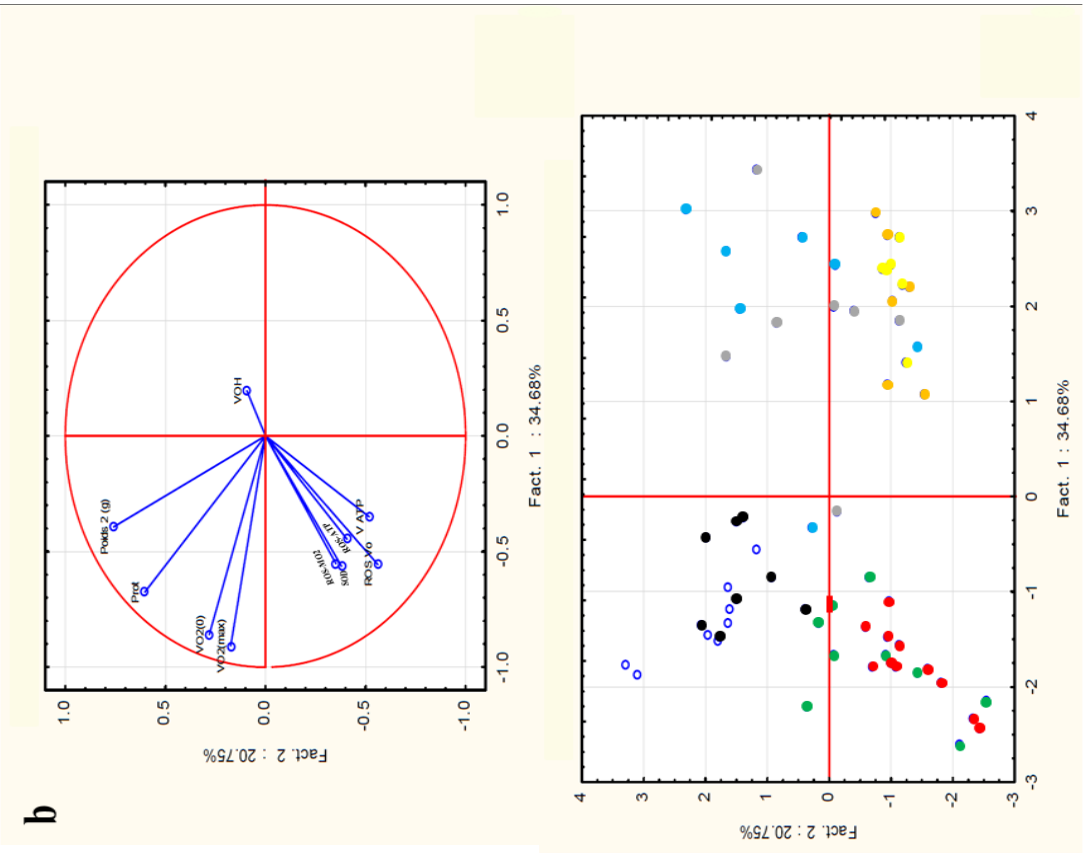
Le fait que globalement les effets de l'entraînement soient souvent plus importants au niveau du muscle squelettique qu'au niveau du cœur n'est pas surprenant. Le muscle rouge est plus plastique suite à l'entraînement entre autres car il est proportionnellement plus impliqué lors d'un effort physique. On sait par exemple que le muscle squelettique peut multiplier par 100 à 200 fois son intensité métabolique (Silva et al., 2009) lorsque le myocarde peut la multiplier pas 10 (Giordano, 2005).

### **V.5.2. Analyse en composantes principales (ACP) :**

L'ACP photographie au mieux l'ensemble des corrélations entre variables. Cette analyse est adaptée à un tableau de variables quantitatives hétérogènes, c'est-à-dire d'unités a priori différentes. La difficulté des différentes échelles de mesures est résolue en réduisant et en centrant chaque variable. Chaque variable a donc une variance égale à 1. Géométriquement, cela revient à traduire ces variables par autant de points géométriques situés sur une sphère (figure 38-a). L'angle fait entre deux variables illustre leur corrélation (coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson). Celle-ci est le cosinus de l'angle : la corrélation est d'autant plus fortement positive que l'angle est aigu, elle est nulle lorsque les deux variables forment un angle droit, elle est d'autant plus négative que l'angle est obtus.

Le "plan de coupe" de la sphère, encore appelée plan factoriel (figure 38-b) est représentée par deux axes  $F_1$  et  $F_2$ . Chacun d'eux explique un pourcentage de la variance. Plus ce chiffre est élevé, meilleure est la pertinence du graphique. Seules les analyses avec des pourcentages cumulés des deux axes supérieures à 40% ont été retenues. Pour chaque analyse, deux graphiques ont été établis : un pour les variables et un pour les individus.

Dans ce travail de thèse, cette ACP a pour objectif d'analyser les corrélations entre les divers paramètres étudiés. La mise en commun, tous animaux confondus, de toutes les variables mesurées puis des analyses plus spécifiques, nous permettront de distinguer d'éventuels groupes



**Figure 39: ACP tous animaux (rats et anguilles) confondus au niveau du muscle (a) et du cœur (b) en prenant en compte le facteur poids.**  
 Pour toutes les ACP de ce travail, l'identification des différentes espèces et groupes se basera sur le tableau suivant:

Rats				Anguilles			
Mâle		Femelle		Mâle		Femelle	
Sélectaire	Entrainé	Sélectaire	Entrainé	Sélectaire	Entrainé	Sélectaire	Entrainé
○	●	●	●	●	●	●	●

d'individus relatifs à l'espèce ou au genre ou au statut sédentaire/entraîné. Nous verrons également s'il est possible d'associer à ces groupes un phénotype métabolique et radicalaire type.

Nous avons choisi ici de présenter essentiellement l'ACP relative au muscle squelettique qui révèle plus d'éléments intéressants qu'au niveau du cœur.

### ***ACP tous animaux confondus au niveau du muscle avec (figure 39) et sans (figure 40) le poids de l'animal***

Parmi les corrélations qui nous semblent les plus pertinentes (figure 39-a), on observe d'une part des corrélations positives étroites entre plusieurs paramètres (teneur en protéines du muscle,  $VO_{2(max)}$ ,  $VO_{2(0)}$  et activité GPx). Par ailleurs, tous ces paramètres sont inversement corrélés au marqueur de stress oxydatif soit le MDA. L'ensemble de ces observations signifie qu'une fonction mitochondriale active est associée à une moindre peroxydation lipidique. Ce résultat confirme bien que le dogme "consommation d' $O_2$  élevée corrélée à une production radicalaire élevée" est bien révolu.

A noter également une corrélation étroite entre la sensibilité de  $VO_{2(max)}$  et de  $VO_{2(0)}$  aux ROS mais pas de  $V_{ATP}$ . Ceci confirme l'hypothèse avancée en discussion. Il existe des susceptibilités différentes aux ROS des structures ou éléments appartenant à une même structure soit la mitochondrie.

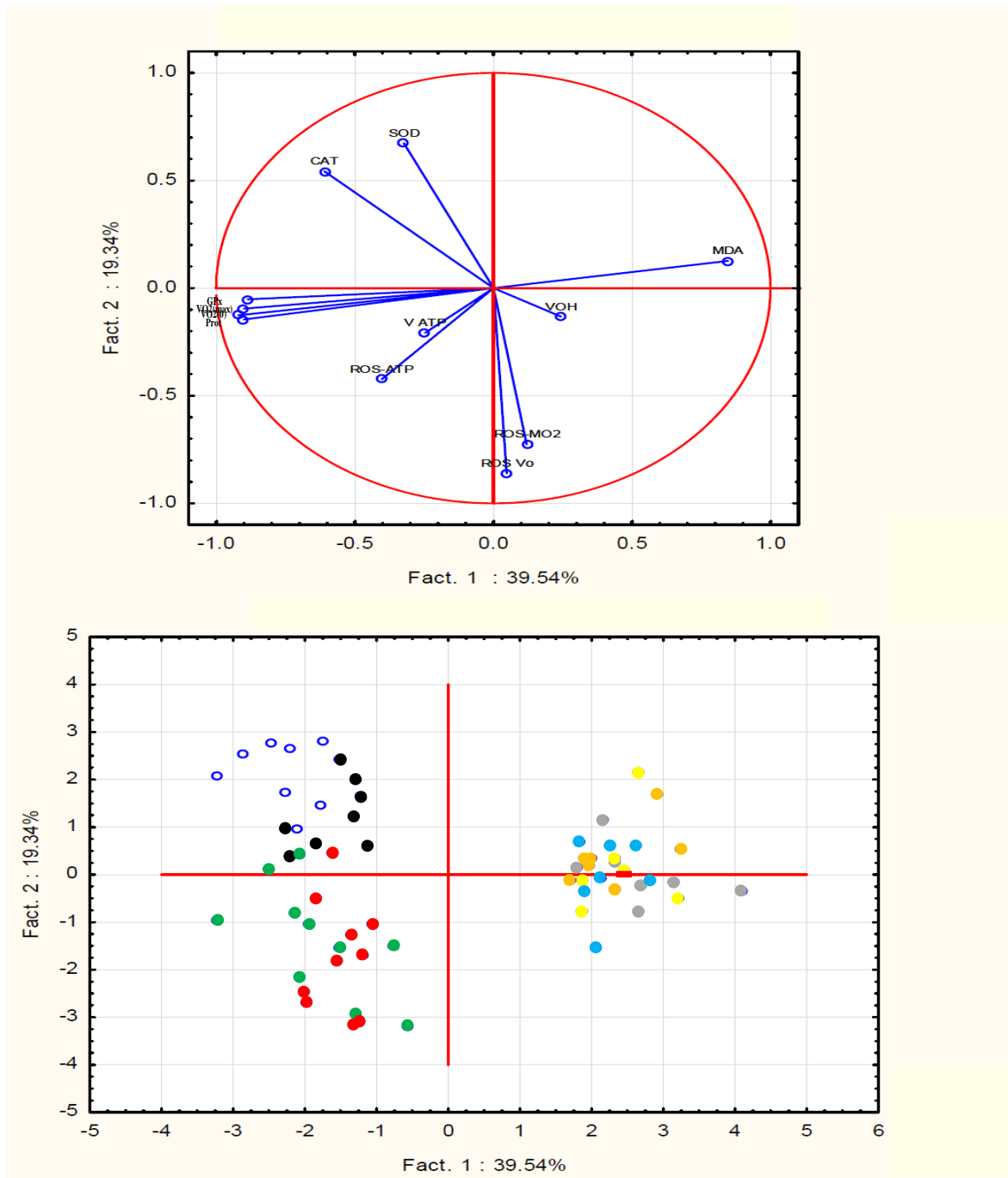
Cette analyse tous animaux confondus met également en évidence des groupes d'individus regroupés par espèce et par genre. Il est possible aussi de discriminer les groupes entraînés et sédentaires. Cette discrimination groupes sédentaires/entraînés est moins évidente chez l'anguille au niveau du muscle, mais apparaît plus nettement au niveau du cœur (figure 39-b).

Ces résultats préliminaires sont intéressants puisqu'ils traduisent différents phénotypes selon l'appartenance à un groupe.

La répartition par espèce et par genre peut être liée à de nombreux facteurs dont la qualité d'endotherme ou d'ectotherme de ces individus ou encore leur poids. En effet, il est connu que la dépense énergétique par unité de masse (taux métabolique ou intensité métabolique) diminue lorsque le poids augmente. Ainsi tous les paramètres mesurés liés à l'intensité métabolique pourraient être étroitement corrélés avec le poids. Sur la figure 39-a, c'est le cas pour les activités antioxydantes comme la SOD et la CAT. Par ailleurs, les endothermes présentent en général un taux métabolique largement plus élevé que les ectothermes de même taille. Si on compare nos anguilles femelles aux rats qui sont de poids comparable, on a une intensité métabolique chez le rat environ cinq fois plus élevée dans le muscle et trois fois plus élevée dans le cœur.



Pour évaluer globalement l'impact du poids, nous avons effectué cette même analyse ACP en enlevant le facteur poids (figure 40). On notera les mêmes corrélations même si la discrimination entre groupes est moins évidente. Le facteur poids influe donc en partie les profils métaboliques et radicalaires.



**Figure 40 : ACP tous animaux (rats et anguilles) confondus au niveau du muscle sans le facteur poids.**  
Les anguilles sont représentées à droite, les rats à gauche.



### ***ACP au niveau du muscle chez le rat et chez l'anguille***

**Chez le rat**, mâles/femelles et sédentaires/entraînés confondus (figure 41-a) nous observons des corrélations positives étroites entre plusieurs paramètres. La sensibilité aux ROS de  $VO_{2(0)}$  de  $VO_{2(max)}$  sont corrélées tandis que la sensibilité aux ROS de  $V_{ATP}$  est inversement corrélée avec les activités CAT et SOD.

Lorsqu'on regarde la répartition des individus (figure du bas), nous constatons une discrimination entre sédentaires et entraînés plus nette chez le mâle. Ceci confirme les effets de l'entraînement plus marqués que chez la femelle (tableau 12). Chez le mâle, les activités SOD et CAT sont mieux corrélées chez les sédentaires que les entraînés, ce qui supporte la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes suite à l'entraînement. Les femelles, en particulier les sédentaires, sont caractérisées par une vulnérabilité de  $V_{ATP}$  aux ROS inversement corrélée aux activités CAT et SOD. Ceci est cohérent avec ce que nous avons montré au niveau du muscle, à savoir des activités enzymatiques antioxydantes, plus élevées chez la femelle leur permettant une meilleure protection de la phosphorylation oxydative contre les ROS.

**Chez l'anguille**, contrairement aux rats, (figure 41-b), la discrimination entre sédentaires et entraînés est moins évidente. Ceci confirme que les effets de l'entraînement sont moins marqués que chez le rat (tableau 12).

L'activité SOD est inversement corrélée à la lipoperoxydation (MDA). Comme chez le mammifère, les systèmes enzymatiques antioxydants représentent la principale protection contre le stress oxydatif chez le poisson. On note aussi une sensibilité aux ROS de  $VO_{2(max)}$  inversement corrélée à celle de  $V_{ATP}$  confirmant ainsi une sensibilité aux ROS différente des complexes de la phosphorylation oxydative.

*Le rat Wistar et l'anguille européenne sont des espèces qui se différencient par leur taux métabolique, leur comportement thermique mais aussi leur longévité, le comportement alimentaire ou la performance à l'endurance. L'ensemble de ces facteurs participe au profil métabolique et radicalaire chez ces deux espèces.*

*Toutefois, l'étude des effets de l'entraînement montre des similitudes de réponses en fonction du genre chez les deux espèces en particulier au niveau du muscle squelettique. Cette analyse préliminaire conforte l'utilisation pertinente du modèle poisson en physiologie de l'exercice.*





## VI. Conclusions et perspectives :

**Le but premier** de ce projet de thèse a été d'étudier **l'effet de l'entraînement en endurance sur la relation étroite entre efficacité énergétique mitochondriale et statut oxydatif**. La régulation de ces mécanismes est déterminante pour l'adaptation de l'individu et sa capacité à développer une performance physique. Les mécanismes adaptatifs de la fonction mitochondriale et des ROS à l'entraînement sont encore loin d'être élucidés chez le mammifère. Dans la littérature, les différents paramètres radicalaires et ceux de la fonction mitochondriale sont souvent étudiés indépendamment, et sont très variables voir parfois contradictoires. La diversité des protocoles d'entraînement, d'espèces animales et tissus utilisés font qu'il est encore difficile de dégager un profil type de réponse à l'entraînement et de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués.

**Dans ce travail**, la performance physique *in vivo* a été mise en lien avec des mesures *in vitro* simultanées (à partir de fibres perméabilisées) de la production radicalaire et du rendement énergétique au niveau mitochondrial. Ces mesures *in vitro* ont nécessité des mises au point au niveau du cœur et du muscle squelettique.

**Chez le rat Wistar mâle**, l'entraînement de six semaines à 60-70% de la VMA induit des réponses métaboliques et radicalaires similaires dans le cœur et le muscle. **L'amélioration de la performance physique s'accompagne d'une amélioration du rendement de la phosphorylation oxydative**. Cette meilleure efficacité de la fonction mitochondriale peut, d'une part, être expliquée par une moindre fuite de protons au niveau de la chaîne respiratoire traduisant un meilleur couplage oxydation/phosphorylation. **Parmi les paramètres qui peuvent influencer la fuite de protons sont évoqués la composition mitochondriale en acides gras et les UCP. Une étude plus approfondie de l'effet de l'entraînement sur ces paramètres pourra apporter des éléments intéressants sur les adaptations structurales et fonctionnelles de la mitochondrie.**

D'autre part, la moindre fuite d'électrons, traduite par la production radicalaire diminuée, suggère également une meilleure utilisation des électrons pour la production d'énergie après entraînement.

Contrairement à la grande majorité des données de la littérature, nous avons observé après entraînement, **une diminution des activités enzymatiques antioxydantes** au niveau des deux tissus. Ce résultat original est tout à fait cohérent lorsqu'il est mis en lien avec la moindre capacité de la mitochondrie à produire les ROS. Il s'agirait d'une adaptation à la production de ROS diminuée au cours de la période d'entraînement. Toutefois, bien que l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants était diminuée, nous avons noté **une meilleure résistance à l'exposition aux ROS de la phosphorylation oxydative après entraînement.**



Il reste difficile de généraliser ces adaptations même au sein d'une même espèce. Il est souvent rapporté la difficulté de discuter les résultats avec d'autres études portant sur des animaux de sexe différent puisque la performance physiologique peut être dépendante du genre. En effet, chez nos animaux sédentaires, nous avons confirmé l'existence de **profils métaboliques et radicalaires différents selon le genre**, à savoir un rendement de la phosphorylation oxydative ainsi qu'une résistance au stress oxydant plus élevés chez la femelle chez le rat Wistar. Dans la littérature, les réponses radicalaires et du métabolisme énergétique selon le sexe sont variables et peu étudiés conjointement.

Ainsi, **notre deuxième objectif** a été d'étudier **l'influence du genre sur les liens entre performance physiologique et réponses radicalaires.**

**Chez le rat Wistar femelle**, l'entraînement induit également une amélioration de la fonction mitochondriale mais qui se traduit différemment de celle du mâle. L'augmentation de la respiration mitochondriale a induit une tendance à l'augmentation de la production d'ATP dans les deux tissus mais contrairement au mâle, aucune modification du rendement énergétique (couplage ou rendement de la phosphorylation oxydative) n'a été observée.

Différemment du mâle, l'entraînement a tendance à augmenter la production radicalaire au niveau du cœur. Cette plus grande capacité à produire les ROS n'est pas accompagnée de modification des activités des systèmes enzymatiques antioxydants. L'absence de modification du contenu en MDA reflète une balance pro/antioxydants bien régulée. On peut supposer que les œstrogènes peuvent exercer des effets antioxydants directs sur l'activité mitochondriale indépendamment de son rôle activateur des systèmes enzymatiques antioxydants. Le rôle des œstrogènes dans la régulation de la production radicalaire a été rapporté. Chez le rat, une ovariectomie induit une hausse de la production radicalaire. Cette dernière est rétablie à la normale lorsque l'ovariectomie est suivie d'une substitution aux œstrogènes (Borrás et al., 2003). **Des expériences de traitements hormonaux *in vivo* et/ou *in vitro* à partir de fibres perméabilisées pourront être réalisées. Elles nous permettront de confirmer les effets du sexe sur les liens métabolisme énergétique/stress oxydant et leur implication au cours de l'entraînement.** Dans ce travail de thèse, nous n'avons pas exploré **les systèmes antioxydants non enzymatiques** comme la vitamine E qui peuvent aussi être impliqués. Il serait également intéressant de les prendre en considération dans des travaux futurs.

**Le troisième objectif** de ce travail de thèse a été de montrer que **l'utilisation du modèle poisson, ici l'anguille européenne argentée, a toute sa place dans le champ de la physiologie de l'exercice.** Les études de l'effet de l'entraînement restent rares chez le poisson, toutefois les quelques travaux effectués semblent révéler une ubiquité des mécanismes cellulaires d'adaptation.



Notre choix du modèle poisson a porté sur l'anguille. Cette espèce **est considérée comme étant athlète et endurante** puisqu'elle effectue une migration de reproduction sur plus de 6000 Km. Elle est également caractérisée par un dimorphisme sexuel important basé sur la taille, un atout dans l'exploration d'éventuelles adaptations métaboliques différentes entre les deux sexes.

Ainsi, nous avons testé l'effet d'un entraînement à la nage de quelques jours d'intensité similaire à celle utilisée pour le rat, à savoir 70% de Ucrit. Avant entraînement, **l'anguille mâle montre une meilleure performance de nage qui s'accompagne d'une plus grande efficacité énergétique mitochondriale que chez la femelle**. Après entraînement, contrairement au rat, il n'y a pas d'inversion des profils métaboliques et radicalaires entre les deux sexes. Les effets de l'entraînement chez l'anguille sont moins marqués que chez le rat. Cependant, même s'il ne s'agit que de tendances, l'entraînement a globalement induit une **amélioration de l'efficacité énergétique mitochondriale** accompagnée d'une moindre production radicalaire au niveau du muscle rouge **chez le mâle**. Au niveau du cœur, la fonction mitochondriale semble être plus résistante aux ROS après entraînement. Ces résultats traduisent **une meilleure plasticité de la fonction mitochondriale chez le mâle** et sont intéressants sur deux plans. Dans **le contexte de la migration de reproduction**, ces adaptations à l'entraînement au niveau cellulaire pourraient contribuer à la capacité de nage supérieure des mâles par rapport aux femelles, permettant une arrivée synchronisée sur leur lieu de reproduction.

Dans la perspective de valorisation du modèle poisson, sont relevées **des similitudes interspécifiques de réponse à l'entraînement selon le genre** essentiellement au niveau du muscle squelettique. En effet, quelle que soit l'espèce, le rendement de la phosphorylation oxydative a augmenté **chez le mâle** en parallèle à une diminution de la production radicalaire. Parallèlement, la sensibilité de la fonction mitochondriale à l'exposition aux ROS n'est pas modifiée **chez la femelle** suite à l'entraînement.

L'ensemble de ces résultats confirme que **les mitochondries utilisent plusieurs stratégies pour améliorer leur rendement énergétique et se préserver du stress oxydatif**. Chez l'anguille, les réponses métaboliques et radicalaires à l'entraînement plus discrètes (tendances) que chez le rat peuvent être liées à une durée d'entraînement insuffisante. Daussin (2007) a montré chez le mammifère l'importance des paramètres fréquence et durée de l'entraînement sur ce type de réponses. Chez le poisson, Morash et al. (2014) ont rapporté chez la truite que l'activité citrate synthase n'est augmentée qu'après quatre semaines d'entraînement. Il est prévu au laboratoire d'étudier **la cinétique de mise en place des régulations métaboliques et radicalaires lors de l'entraînement en endurance, mais aussi l'effet du sexe des individus sur cette cinétique**. Ainsi, seront testées plusieurs durées d'entraînement chez l'anguille.

Quelle que soit l'espèce, l'entraînement semble être plus bénéfique chez le mâle que chez la femelle



en termes d'efficacité énergétique et de résistance de la fonction mitochondriale aux ROS. Ces similitudes interspécifiques de réponse à l'entraînement selon le genre confortent **l'intérêt de l'utilisation du modèle poisson dans le champ de la physiologie de l'exercice.**

On a montré des différences de vulnérabilité aux ROS de la fonction mitochondriale selon le genre. Au sein même de la mitochondrie, ont aussi été mises en évidence des sensibilités aux ROS différentes des complexes et/ou des structures protéiques comme les UCP.

Plusieurs isoformes d'UCP ont été identifiés chez le poisson mais on connaît encore peu leurs propriétés fonctionnelles. La présence d'UCP chez ces ectothermes révélerait d'autres fonctions essentielles que thermorégulatrices classiquement rapportées chez le mammifère. Ces protéines pourraient avoir chez le poisson une fonction similaire à celle du mammifère, à savoir un rôle « antioxydant » en provoquant un « découplage léger » induisant ainsi une baisse de la production radicalaire. **L'étude des liens entre fonction mitochondrie, ROS et UCP fait ainsi partie des perspectives visant à mieux comprendre les processus de régulation des ROS au niveau de la mitochondrie.**

*Ce travail de thèse a évalué la performance physiologique et les réponses radicalaires à l'entraînement à plusieurs échelles d'organisation biologique. Nous avons pu montrer que l'amélioration de la performance physique est liée à des stratégies d'adaptations au niveau du métabolisme énergétique mitochondrial et radicalaire dépendantes du genre et qui, pour certaines, sont communes aux deux espèces animales étudiées.*





## Références bibliographiques

### -A-

Abele, D., and Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *138*, 405–415.

Aikens, J., and Dix, T.A. (1993). Hydrodioxy (perhydroxyl), peroxy, and hydroxyl radical-initiated lipid peroxidation of large unilamellar vesicles (liposomes): comparative and mechanistic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* *305*, 516–525.

Alessio, H.M., Hagerman, A.E., Fulkerson, B.K., Ambrose, J., Rice, R.E., and Wiley, R.L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* *32*, 1576–1581.

Almroth, B.C., Sköld, M., and Sköld, H.N. (2012). Gender differences in health and aging of Atlantic cod subject to size selective fishery. *Biol. Open* [BIO20121446](https://doi.org/10.1098/rsob.121446).

Amérand, A., Vettier, A., Sébert, P., and Cann-Moisan, C. (2005). In vitro effect of hydrostatic pressure exposure on hydroxyl radical production in fish red muscle. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* *10*, 25–28.

Amérand, A., Vettier, A., Sébert, P., and Cann-Moisan, C. (2006). Does hydrostatic pressure have an effect on reactive oxygen species in eel. *Undersea Hyperb Med* *33*, 157–160.

Amérand, A., Vettier, A., Moisan, C., Belhomme, M., and Sébert, P. (2010). Sex-related differences in aerobic capacities and reactive oxygen species metabolism in the silver eel. *Fish Physiol. Biochem.* *36*, 741–747.

Aniagu, S.O., Day, N., Chipman, J.K., Taylor, E.W., Butler, P.J., and Winter, M.J. (2006). Does exhaustive exercise result in oxidative stress and associated DNA damage in the chub (*Leuciscus cephalus*)? *Environ. Mol. Mutagen.* *47*, 616–623.

Anttila, K., Mänttari, S., and Järvilehto, M. (2006). Effects of different training protocols on Ca<sup>2+</sup> handling and oxidative capacity in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* *209*, 2971–2978.

Ascensão, A.A., Magalhães, J.F., Soares, J.M., Ferreira, R.M., Neuparth, M.J., Appell, H.J., and Duarte, J.A. (2005). Cardiac Mitochondrial Respiratory Function and Oxidative Stress: The Role of Exercise. *Int. J. Sports Med.* *26*, 258–267.

Auten, R.L., and Davis, J.M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr. Res.* *66*, 121–127.

Aydin, C., Ince, E., Koparan, S., Cangul, I.T., Naziroglu, M., and Ak, F. (2007). Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. *Cell Biochem. Funct.* *25*, 129–137.



## **-B-**

- Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464–1476.
- Balci, S.S., and Pepe, H. (2012). Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. *Chin. J. Physiol.* 55, 236–244.
- Barp, J., Araújo, A.S.R., Fernandes, T.R.G., Rigatto, K.V., Llesuy, S., Belló-Klein, A., and Singal, P. (2002). Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 35, 1075–1081.
- Battiprolu, P.K., Harmon, K.J., and Rodnick, K.J. (2007). Sex differences in energy metabolism and performance of teleost cardiac tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R827–R836.
- Bejma, J., and Ji, L.L. (1999). Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 87, 465–470.
- Bejma, J., Ramires, P., and Ji, L.L. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol. Scand.* 169, 343–351.
- Belviranlı, M., and Gökbel, H. (2006). Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur J Gen Med* 3, 126–131.
- Bengtsson, J., Gustafsson, T., Widegren, U., Jansson, E., and Sundberg, C.J. (2001). Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 443, 61–66.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
- Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Calduch-Giner, J.A., and Pérez-Sánchez, J. (2011). Feed restriction up-regulates uncoupling protein 3 (UCP3) gene expression in heart and red muscle tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) New insights in substrate oxidation and energy expenditure. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 159, 296–302.
- Billat, L.V., and Koralsztein, J.P. (1996). Significance of the velocity at VO<sub>2</sub>max and time to exhaustion at this velocity. *Sports Med. Auckl. NZ* 22, 90–108.
- Blik, A.M. van der, Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a011072.
- Bo, H., Jiang, N., Ma, G., Qu, J., Zhang, G., Cao, D., Wen, L., Liu, S., Ji, L.L., and Zhang, Y. (2008). Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1373–1381.
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F.V., and Viña, J. (2003). Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 546–552.
- Borras, C., Gambini, J., and Vina, J. (2007). Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 1008–1013.



- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V., and Viña, J. (2010). Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 205–211.
- Børsheim, E., and Bahr, R. (2003). Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption. *Sports Med. Auckl. NZ* 33, 1037–1060.
- Boss, O., Samec, S., Desplanches, D., Mayet, M.H., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1998). Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 335–339.
- Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717–749.
- Brand, M.D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472.
- Brand, M.D., Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J.R., Roebuck, S.J., Buckingham, J.A., Clapham, J.C., and Cadenas, S. (2002). Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem. J.* 368, 597–603.
- Brand, M.D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P.L., and Hulbert, A.J. (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J.* 376, 741–748.
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., and Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755–767.
- Brandes, R., and Kreuzer, J. (2005). Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc. Res.* 65, 16–27.
- Brett, J.R. (1964). The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 21, 1183–1226.
- Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3289–3303.
- Brookes, P.S. (2005). Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 12–23.
- Burelle, Y., and Hochachka, P.W. (2002). Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 92, 2429–2438.



## -C-

Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.

Cambier, S., Bénard, G., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Rossignol, R., Brèthes, D., and Bourdineaud, J.-P. (2009). At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 791–799.

Cantu, D., Schaack, J., and Patel, M. (2009). Oxidative Inactivation of Mitochondrial Aconitase Results in Iron and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated Neurotoxicity in Rat Primary Mesencephalic Cultures. *PLoS ONE* 4, e7095.

Cardoso, S.M., Pereira, C., and Oliveira, C.R. (1999). Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 3–13.

Carlberg, K.A., and Fregly, M.J. (1985). Disruption of estrous cycles in exercise-trained rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 179, 21–24.

Castro, V., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Torgersen, J., Kristensen, T., Claireaux, G., Farrell, A.P., and Takle, H. (2013). Cardiac Molecular-Acclimation Mechanisms in Response to Swimming-Induced Exercise in Atlantic Salmon. *PLoS ONE* 8, e55056.

Chatgililoglu, C., and O'Neill, P. (2001). Free radicals associated with DNA damage. *Exp. Gerontol.* 36, 1459–1471.

Chen, J.J., and Yu, B.P. (1994). Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 411–418.

Chung, H.Y., Baek, B.S., Song, S.H., Kim, M.S., Huh, J.I., Shim, K.H., Kim, K.W., and Lee, K.H. (1997). Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age* 20, 127–140.

Claude, A. (1944). The constitution of mitochondria and microsomes, and the distribution of nucleic acid in the cytoplasm of a leukemic cell. *J. Exp. Med.* 80, 19–29.

Colom, B., Alcolea, M.P., Valle, A., Oliver, J., Roca, P., and García-Palmer, F.J. (2007). Skeletal muscle of female rats exhibit higher mitochondrial mass and oxidative-phosphorylative capacities compared to males. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 19, 205–212.

Cooke, M.S. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214.

Cooper, C.E., Vollaard, N.B., Choueiri, T., and Wilson, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 280–284.

Coulter, I.D., Hardy, M.L., Morton, S.C., Hilton, L.G., Tu, W., Valentine, D., and Shekelle, P.G. (2006). Antioxidants vitamin C and vitamin e for the prevention and treatment of cancer. *J. Gen. Intern. Med.* 21, 735–744.





## **-D-**

- Daussin, F. (2007). Effets d'un entraînement en endurance à charge constante, à charge variable ou à haute intensité chez l'homme: étude intégrative du systémique au cellulaire. Université de Strasbourg.
- Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., and Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *107*, 1198–1205.
- Davies, M.J., Fu, S., and Dean, R.T. (1995). Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *Biochem J* *305*, 643–649.
- Davison, W. (1997). The Effects of Exercise Training on Teleost Fish, a Review of Recent Literature. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *117*, 67–75.
- Davison, W., and Goldspink, G. (1977). The Effect of Prolonged Exercise on the Lateral Musculature of the Brown Trout (*Salmo Trutta*). *J. Exp. Biol.* *70*, 1–12.
- Delhumeau, G., Cruz-Mendoza, A.M., and Gomez Lojero, C. (1994). Protection of cytochrome c oxidase against cyanide inhibition by pyruvate and alpha-ketoglutarate: effect of aeration in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *126*, 345–351.
- Díaz-Herrera, P., Torres, A., Morcuende, J.A., García-Castellano, J.M., Calbet, J.A., and Sarrat, R. (2001). Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats. *Histol. Histopathol.* *16*, 29–35.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.
- Duine, J.M., Floch, F., Cann-Moisan, C., Mialon, P., and Caroff, J. (1998). Simultaneous measurement of monoamines, their metabolites and 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoates by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Application to rat brain dialysates. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* *716*, 350–353.
- Durif, C. (2003). La migration d'avalaison de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*: caractérisation des fractions dévalantes, phénomène de migration et franchissement d'obstacles (Toulouse 3).

## **-E-F-G-**

- Ellerby, D.J., Spierts, I.L., and Altringham, J.D. (2001). Slow muscle power output of yellow- and silver-phase European eels (*Anguilla anguilla* L.): changes in muscle performance prior to migration. *J. Exp. Biol.* *204*, 1369–1379.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., and Mignotte, B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* *942*, 157–183.
- Farrell, A.P., Johansen, J.A., and Suarez, R.K. (1991). Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* *9*, 303–312.



- Fenning, A., Harrison, G., Dwyer, D., Rose-Meyer, R., and Brown, L. (2003). Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol. Cell. Biochem.* *251*, 51–59.
- Fernström, M., Tonkonogi, M., and Sahlin, K. (2004). Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle. *J. Physiol.* *554*, 755–763.
- Fisher-Wellman, K., and Bloomer, R.J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn. Med. DM* *8*, 1.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., and Wong, P.K. (1984). Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing high pressure liquid chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *J. Biochem. Biophys. Methods* *10*, 221–235.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Wong, P.K., Altmiller, D.H., and Rickard, R.C. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic. Res. Commun.* *1*, 163–172.
- Fostier, A., and Jalabert, B. (2011). *La truite arc-en-ciel* (Editions Quae).
- Fridovich, I. (1997). Superoxide Anion Radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *J. Biol. Chem.* *272*, 18515–18517.
- Gallaugh, P.E., Thorarensen, H., Kiessling, A., and Farrell, A.P. (2001). Effects of high intensity exercise training on cardiovascular function, oxygen uptake, internal oxygen transport and osmotic balance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during critical speed swimming. *J. Exp. Biol.* *204*, 2861–2872.
- Gandhi, S., and Abramov, A.Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2012*, e428010.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité Chim.* *91*.
- Georgieva, K.N., and Boyadjiev, N.P. (2004). Effects of nandrolone decanoate on VO<sub>2</sub>max, running economy, and endurance in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* *36*, 1336–1341.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., and Fenn, W.O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* *119*, 623–626.
- Giordano, F.J. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* *115*, 500–508.
- Goglia, F., and Skulachev, V.P. (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 1585–1591.
- Gomes, E.C., Silva, A.N., and de Oliveira, M.R. (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2012*, 756132.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E., and Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 126–131.
- Grim, J.M., Miles, D.R.B., and Crockett, E.L. (2010). Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J. Exp. Biol.* *213*, 445–452.



Gul, M., Demircan, B., Taysi, S., Oztasan, N., Gumustekin, K., Siktar, E., Polat, M.F., Akar, S., Akcay, F., and Dane, S. (2006). Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *143*, 239–245.

## **-H-I-J-**

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* *11*, 298–300.

Hatcher, E.L., Chen, Y., and Kang, Y.J. (1995). Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radic. Biol. Med.* *19*, 805–812.

Helenius, M., Hänninen, M., Lehtinen, S.K., and Salminen, A. (1996). Aging-induced Up-regulation of Nuclear Binding Activities of Oxidative Stress Responsive NF- $\kappa$ B Transcription Factor in Mouse Cardiac Muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *28*, 487–498.

Helge, J.W., Wu, B.J., Willer, M., Daugaard, J.R., Storlien, L.H., and Kiens, B. (2001). Training affects muscle phospholipid fatty acid composition in humans. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *90*, 670–677.

Holk, K., and Lykkeboe, G. (1998). The impact of endurance training on arterial plasma K<sup>+</sup> levels and swimming performance of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* *201*, 1373–1380.

Holloszy, J.O., and Coyle, E.F. (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* *56*, 831–838.

Holmström, K.M., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 411–421.

Hood, D.A. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* *90*, 1137–1157.

Imbrogno, S. (2013). The eel heart: multilevel insights into functional organ plasticity. *J. Exp. Biol.* *216*, 3575–3586.

Irrcher, I., Ljubcic, V., and Hood, D.A. (2009). Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 $\alpha$  transcription in skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C116–C123.

Jackson, M.J. (2005). Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *360*, 2285–2291.

Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., and Brand, M.D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* *47*, 53–67.

Ji, L.L. (2007). Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. *Exp. Gerontol.* *42*, 582–593.

Ji, L.L., and Leichtweis, S. (1997). Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age* *20*, 91–106.



Ji, L.L., Stratman, F.W., and Lardy, H.A. (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle: Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 150–160.

Johnston, I.A., and Moon, T.W. (1980). Endurance exercise training in the fast and slow muscles of a teleost fish (*Pollachius virens*). *J. Comp. Physiol.* 135, 147–156.

Jones, T.E., Baar, K., Ojuka, E., Chen, M., and Holloszy, J.O. (2003). Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E96–E101.

Judge, S., Jang, Y.M., Smith, A., Selman, C., Phillips, T., Speakman, J.R., Hagen, T., and Leeuwenburgh, C. (2005). Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1564–R1572.

## **-K-L-**

Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 77–94.

Kalofoutis, A., Lekakis, J., and Miras, C. (1981). Heart mitochondrial and microsomal phospholipid fluctuations induced by chronic exercise in rats. *Int. J. Biochem.* 13, 195–199.

Kazakov, R.V., and Khalyapina, L.M. (1981). Oxygen consumption of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) males and females in fish culture. *Aquaculture* 25, 289–292.

Keilin, D. (1925). On Cytochrome, a Respiratory Pigment, Common to Animals, Yeast, and Higher Plants. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* 1905-1934 98, 312–339.

Kieffer, J.D. (2000). Limits to exhaustive exercise in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 126, 161–179.

Kirkland, J.B. (1991). Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells: role of activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1092, 319–325.

Klinge, C.M. (2008). Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis. *J. Cell. Biochem.* 105, 1342–1351.

Korzeniewski, B. (2003). Regulation of oxidative phosphorylation in different muscles and various experimental conditions. *Biochem. J.* 375, 799–804.

Kowaltowski, A.J., and Vercesi, A.E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 463–471.

Kunz, W.S., Kuznetsov, A.V., Schulze, W., Eichhorn, K., Schild, L., Striggow, F., Bohnensack, R., Neuhofer, S., Grasshoff, H., Neumann, H.W., et al. (1993). Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1144, 46–53.





- Lee, C.G., Devlin, R.H., and Farrell, A.P. (2003). Swimming performance, oxygen consumption and excess post-exercise oxygen consumption in adult transgenic and ocean-ranched coho salmon. *J. Fish Biol.* *62*, 753–766.
- Leek, B.T., Mudaliar, S.R.D., Henry, R., Mathieu-Costello, O., and Richardson, R.S. (2001). Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *280*, R441–R447.
- Leichtweis, S.B., Leeuwenburgh, C., Parmelee, D.J., Fiebig, R., and Ji, L.L. (1997). Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischæmic rat heart. *Acta Physiol. Scand.* *160*, 139–148.
- Lemasters, J.J. (1984). The ATP-to-oxygen stoichiometries of oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. An analysis of ADP-induced oxygen jumps by linear nonequilibrium thermodynamics. *J. Biol. Chem.* *259*, 13123–13130.
- Lemoine, S., Granier, P., Tiffocche, C., Berthon, P.M., Rannou-Bekono, F., Thieulant, M.-L., Carré, F., and Delamarche, P. (2002). Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* *174*, 283–289.
- Letellier, T., Malgat, M., Coquet, M., Moretto, B., Parrot-Roulaud, F., and Mazat, J.-P. (1992). Mitochondrial Myopathy Studies on Permeabilized Muscle Fibers I. *Pediatr. Res.* *32*, 17–22.
- Levin, B.E., and Dunn-Meynell, A.A. (2004). Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *286*, R771–R778.
- Li, N., Hao, M., Phalen, R.F., Hinds, W.C., and Nel, A.E. (2003). Particulate air pollutants and asthma. *Clin. Immunol.* *109*, 250–265.
- Lin, C.S., and Klingenberg, M. (1980). Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* *113*, 299–303.
- Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chyu, D.W., Brooks, G.A., Ames, B.N., and Chu, D.W. (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *89*, 21–28.
- López-Cruz, R.I., Zenteno-Savín, T., and Galván-Magaña, F. (2010). Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *156*, 50–56.
- Low, P.S., Bada, J.L., and Somero, G.N. (1973). Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 430–432.
- Lumini-Oliveira, J., Magalhães, J., Pereira, C.V., Aleixo, I., Oliveira, P.J., and Ascensão, A. (2009). Endurance training improves gastrocnemius mitochondrial function despite increased susceptibility to permeability transition. *Mitochondrion* *9*, 454–462.



## **-M-N-**

Madamanchi, N.R., Li, S., Patterson, C., and Runge, M.S. (2001). Reactive Oxygen Species Regulate Heat-Shock Protein 70 via the JAK/STAT Pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *21*, 321–326.

Mailloux, R.J., and Harper, M.-E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 1106–1115.

Marcil, M., Bourduas, K., Ascah, A., and Burelle, Y. (2006). Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *290*, H1549–H1557.

Mark, F.C., Lucassen, M., and Pörtner, H.O. (2006). Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* *1*, 365–374.

McClelland, G.B., Craig, P.M., Dhekney, K., and Dipardo, S. (2006). Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Physiol.* *577*, 739–751.

McKenzie, D.J., Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Taylor, E.W., Bolis, C.L., and Steffensen, J.F. (2003). Tolerance of chronic hypercapnia by the European eel *Anguilla anguilla*. *J. Exp. Biol.* *206*, 1717–1726.

McManus, J., McEneny, J., Young, I.S., and Thompson, W. (1996). The effect of various oestrogens and progestogens on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro. *Maturitas* *25*, 125–131.

el Midaoui, A., Tancrede, G., and Nadeau, A. (1996). Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. *Metabolism.* *45*, 810–816.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* *191*, 144–148.

Mittal, C.K., and Murad, F. (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3', 5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *74*, 4360–4364.

Mokhtar, N., Lavoie, J.P., Rousseau-Migneron, S., and Nadeau, A. (1993). Physical training reverses defect in mitochondrial energy production in heart of chronically diabetic rats. *Diabetes* *42*, 682–687.

Morash, A.J., Vanderveken, M., and McClelland, G.B. (2014). Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. *Front. Physiol.* *5*.

Mortelette, H. (2010). Etude comparative de la relation entre espèces réactives dérivées de l'oxygène et métabolisme musculaire : effets de l'entraînement. Université de Brest.

Mortelette, H., Amérand, A., Sébert, P., Belhomme, M., Calvès, P., and Moisan, C. (2010). Effect of exercise training on respiration and reactive oxygen species metabolism in eel red muscle. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *172*, 201–205.

Mosavat, M., Mohamed, M., and Mirsanjari, M.O. Effect of Exercise on Reproductive Hormones in Female Athletes. *Int.J.Sport and Exercise Sci.* *5*, 7-12



Moyes, C.D. (1996). Cardiac metabolism in high performance fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *113*, 69–75.

Murphy, M.P. (1989). Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *977*, 123–141.

Nibbelink, M., Arnaud, E., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2002). La protéine découplante du tissu adipeux brun (UCP1) : la fin des dogmes. *Médecine/sciences* *18*, 780–783.

Noori, S. (2012). An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *J. Clin. Cell. Immunol.* *01*.

## **-O-P-Q-**

Ouhabi, R., Boue-Grabot, M., and Mazat, J.P. (1998). Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: assessment of the ATP/O values in situ. *Anal. Biochem.* *263*, 169–175.

Palstra, A.P., and van den Thillart, G.E.E.J.M. (2010). Swimming physiology of European silver eels (*Anguilla anguilla* L.): energetic costs and effects on sexual maturation and reproduction. *Fish Physiol. Biochem.* *36*, 297–322.

Pankhurst, N.W. (1982). Changes in body musculature with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *J. Fish Biol.* *21*, 417–428.

Papa, S., Lorusso, M., and Capitanio, N. (1994). Mechanistic and phenomenological features of proton pumps in the respiratory chain of mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* *26*, 609–618.

Paroo, Z., Dipchand, E.S., and Noble, E.G. (2002a). Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *282*, C245–C251.

Paroo, Z., Haist, J.V., Karmazyn, M., and Noble, E.G. (2002b). Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ. Res.* *90*, 911–917.

Patch, L.D., and Brooks, G.A. (1980). Effects of training on  $VO_{2max}$  and  $VO_2$  during two running intensities in rats. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *386*, 215–219.

Pham-Huy, L.A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* *4*, 89–96.

Pollack, M., and Leeuwenburgh, C. (1999). Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. *Handb. Oxid. Antioxid. Exerc. Amst. Elsevier Sci. BV* *881–923*.

Porter, R.K. (2001). Allometry of mammalian cellular oxygen consumption. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *58*, 815–822.

Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol. Rev.* *88*, 1243–1276.

Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Martin, D., Lieu, F.K., Ji, L.L., and Herb, R.A. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* *265*, H2094–H2098.



Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., and Dudley, G. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266, R375–R375.

Quintella, B.R., Mateus, C.S., Costa, J.L., Domingos, I., and Almeida, P.R. (2010). Critical swimming speed of yellow- and silver-phase European eel (*Anguilla anguilla*, L.). *J. Appl. Ichthyol.* 26, 432–435.

## **-R-S-**

Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W., and Goto, S. (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7, 34–42.

Reboul, C., Tanguy, S., Gibault, A., Dauzat, M., and Obert, P. (2005a). Chronic hypoxia exposure depresses aortic endothelium-dependent vasorelaxation in both sedentary and trained rats: involvement of L-arginine. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 99, 1029–1035.

Reboul, C., Tanguy, S., Dauzat, M., and Obert, P. (2005b). Altitude negates the benefits of aerobic training on the vascular adaptations in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37, 979–985.

Rexroth, S., Poetsch, A., Rögner, M., Hamann, A., Werner, A., Osiewacz, H.D., Schäfer, E.R., Seelert, H., and Dencher, N.A. (2012). Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 381–387.

Rockl, K.S.C., Witczak, C.A., and Goodyear, L.J. (2008). Signaling Mechanisms in Skeletal Muscle: Acute Responses and Chronic Adaptations to Exercise. *IUBMB Life* 60, 145–153.

Rodríguez, A.M., Roca, P., Bonet, M.L., Picó, C., Oliver, P., and Palou, A. (2003). Positive correlation of skeletal muscle UCP3 mRNA levels with overweight in male, but not in female, rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R880–R888.

Rosa, E.F., Silva, A.C., Ihara, S.S.M., Mora, O.A., Aboulafia, J., and Nouailhetas, V.L.A. (2005). Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 99, 1569–1575.

Saks, V.A., Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., Tranqui, L., Olivares, J., Winkler, K., Wiedemann, F., et al. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 81–100.

Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2009). NF- $\kappa$ B Signaling in the Aging Process. *J. Clin. Immunol.* 29, 397–405.

Sangiorgi, G., Roversi, S., Biondi Zoccai, G., Modena, M.G., Servadei, F., Ippoliti, A., and Mauriello, A. (2013). Sex-related differences in carotid plaque features and inflammation. *J. Vasc. Surg.* 57, 338–344.

Sanz, A., and Stefanatos, R.K.A. (2008). The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Curr. Aging Sci.* 1, 10–21.

Sanz, A., Hiona, A., Kujoth, G.C., Seo, A.Y., Hofer, T., Kouwenhoven, E., Kalani, R., Prolla, T.A., Barja, G., and Leeuwenburgh, C. (2007). Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp. Gerontol.* 42, 173–182.





- Scaion, D., Belhomme, M., and Sébert, P. (2008). Pressure and temperature interactions on aerobic metabolism of migrating European silver eel. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *164*, 319–322.
- Schmitz, K.H., Warren, M., Rundle, A.G., Williams, N.I., Gross, M.D., and Kurzer, M.S. (2008). Exercise effect on oxidative stress is independent of change in estrogen metabolism. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *17*, 220–223.
- Sébert, P. (2013). Sex Differences in Energy Metabolism. *Eel Physiol.* *98*.
- Sébert, M.-E., Amérand, A., Vettier, A., Weltzien, F.-A., Pasqualini, C., Sébert, P., and Dufour, S. (2007). Effects of high hydrostatic pressure on the pituitary-gonad axis in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* *153*, 289–298.
- Selman, C., McLaren, J.S., Collins, A.R., Duthie, G.G., and Speakman, J.R. (2002). Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch. Biochem. Biophys.* *401*, 255–261.
- Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* *48*, 158–167.
- Sieck, G.C., and Regnier, M. (2001). Invited Review: plasticity and energetic demands of contraction in skeletal and cardiac muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *90*, 1158–1164.
- Silva, L.A., Pinho, C.A., Scarabelot, K.S., Fraga, D.B., Volpato, A.M.J., Boeck, C.R., De Souza, C.T., Streck, E.L., and Pinho, R.A. (2009). Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* *105*, 861–867.
- Siu, P.M., Donley, D.A., Bryner, R.W., and Alway, S.E. (2003). Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *94*, 555–560.
- Siu, P.M., Bryner, R.W., Martyn, J.K., and Alway, S.E. (2004). Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1150–1152.
- Skulachev, V.P. (1996). Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q. Rev. Biophys.* *29*, 169–202.
- Sohal, R.S., Svensson, I., Sohal, B.H., and Brunk, U.T. (1989). Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech. Ageing Dev.* *49*, 129–135.
- Somani, S.M., Frank, S., and Rybak, L.P. (1995). Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *51*, 627–634.
- Somero, G.N. (1973). Thermal modulation of pyruvate metabolism in the fish *Gillichthys mirabilis*: The role of lactate dehydrogenases. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 205–206.
- Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D.G., and Pae, H.-O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J. Signal Transduct.* *2011*, e792639.
- Steinhausen, M.F., Steffensen, J.F., and Andersen, N.G. (2005). Tail beat frequency as a predictor of swimming speed and oxygen consumption of saithe (*Pollachius virens*) and whiting (*Merlangius merlangus*) during forced swimming. *Mar. Biol.* *148*, 197–204.



Stuwe, S.R., Gwartz, P.A., Agarwal, N., and Mallet, R.T. (2000). Exercise Training Enhances Glycolytic and Oxidative Enzymes in Canine Ventricular Myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *32*, 903–913.

Sun, M.-W., Zhong, M.-F., Gu, J., Qian, F.-L., Gu, J.-Z., and Chen, H. (2008). Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* *31*, 805–816.

## **-T-V-**

Tesch, F.-W., and Thorpe, J.E. (2003). *The eel* (Oxford, UK: Blackwell Science).

Teulier, L., Omlin, T., and Weber, J.-M. (2013). Lactate kinetics of rainbow trout during graded exercise: do catheters affect the cost of transport? *J. Exp. Biol.* *216*, 4549–4556.

Theron, M., Guerrero, F., and Sébert, P. (2000). Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure. *J. Exp. Biol.* *203*, 3019–3023.

Thompson, J.A., and Reitz, R.C. (1978). Effects of ethanol ingestion and dietary fat levels on mitochondrial lipids in male and female rats. *Lipids* *13*, 540–550.

Thorp, D.B., Haist, J.V., Leppard, J., Milne, K.J., Karmazyn, M., and Noble, E.G. (2007). Exercise training improves myocardial tolerance to ischemia in male but not in female rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *293*, R363–R371.

Tiidus, and Bombardier (1999). Oestrogen attenuates post-exercise myeloperoxidase activity in skeletal muscle of male rats. *Acta Physiol. Scand.* *166*, 85–90.

Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2004). Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 7771–7778.

Turrens, J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* *17*, 3–8.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* *552*, 335–344.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 44–84.

Valle, A., Català-Niell, A., Colom, B., García-Palmer, F.J., Oliver, J., and Roca, P. (2005). Sex-related differences in energy balance in response to caloric restriction. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *289*, E15–E22.

van den Thillart, G., van Ginneken, V., Körner, F., Heijmans, R., Van Der Linden, R., and Gluvers, A. (2004). Endurance swimming of European eel. *J. Fish Biol.* *65*, 312–318.

van Ginneken, V.J.T. van, and Maes, G.E. (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its Lifecycle, Evolution and Reproduction: A Literature Review. *Rev. Fish Biol. Fish.* *15*, 367–398.

van Ginneken, V.J.T., and van den Thillart, G.E.E.J.M. (2000). Physiology: Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* *403*, 156–157.



van Ginneken, V., Antonissen, E., Müller, U.K., Booms, R., Eding, E., Verreth, J., and van den Thillart, G. (2005). Eel migration to the Sargasso: remarkably high swimming efficiency and low energy costs. *J. Exp. Biol.* *208*, 1329–1335.

Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Sharov, V.G., Kapelko, V.I., and Saks, V.A. (1987). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim. Biophys. Acta* *892*, 191–196.

Venditti, P., Masullo, P., and Di Meo, S. (1999). Effect of training on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* *372*, 315–320.

Venditti, P., Bari, A., Di Stefano, L., and Di Meo, S. (2007). Role of mitochondria in exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle from hyperthyroid rats. *Arch. Biochem. Biophys.* *463*, 12–18.

Ventura-Clapier, R., Mettauer, B., and Bigard, X. (2007). Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure. *Cardiovasc. Res.* *73*, 10–18.

Vettier, A., and Sébert, P. (2004). Pressure resistance of aerobic metabolism in eels from different water environments. *Mitochondrion* *3*, 347–354.

Viña, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardó, F.V., Cuesta, A., Ferrero, J.A., Terada, L.S., and Repine, J.E. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* *49*, 539–544.

Viña, J., Gambini, J., García-García, F.J., Rodríguez-Mañas, L., and Borrás, C. (2013). Role of oestrogens on oxidative stress and inflammation in ageing. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* *16*, 65–72.

Vollaard, N.B.J., Shearman, J.P., and Cooper, C.E. (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med. Auckl. NZ* *35*, 1045–1062.

## **-W-Y-Z-**

Wagner, P.D. (2010). Limiting factors of exercise performance. *Dtsch Z Sportmed* *61*, 108–111.

Walsh, B., Tonkonogi, M., and Sahlin, K. (2001). Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *442*, 420–425.

Weber, J., and Senior, A.E. (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Lett.* *545*, 61–70.

Williams, G.S.B., Boyman, L., Chikando, A.C., Khairallah, R.J., and Lederer, W.J. (2013). Mitochondrial calcium uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 10479–10486.

Wright, D.C., Han, D.-H., Garcia-Roves, P.M., Geiger, P.C., Jones, T.E., and Holloszy, J.O. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 $\alpha$  expression. *J. Biol. Chem.* *282*, 194–199.



- Wüst, R.C.I., Myers, D.S., Stones, R., Benoist, D., Robinson, P.A., Boyle, J.P., Peers, C., White, E., and Rossiter, H.B. (2012). Regional skeletal muscle remodeling and mitochondrial dysfunction in right ventricular heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H402–H411.
- Yamamoto, T., Ohkuwa, T., Itoh, H., Sato, Y., and Naoi, M. (2002). Effect of gender differences and voluntary exercise on antioxidant capacity in rats. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 132, 437–444.
- Zelevnikar, R.J., Dzeja, P.P., and Goldberg, N.D. (1995). Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J. Biol. Chem.* 270, 7311–7319.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337–349.
- Zoll, J., Sanchez, H., N’Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Bigard, X., Serrurier, B., Fortin, D., Geny, B., Veksler, V., et al. (2002). Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 543, 191–200.
- Zonderland, M.L., Bär, P.R., Reijneveld, J.C., Spruijt, B.M., Keizer, H.A., and Glatz, J.F. (1999). Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 79, 391–396.





# Liste des figures et des tableaux

## Figures

**Figure 1** : Cascade de formation des ROS et mécanismes de défense antioxydants cellulaires.

**Figure 2** : Les dommages de l'ADN mitochondrial dus au stress oxydatif.

**Figure 3** : Les voies d'inhibition de la tyrosine phosphatase des protéines par les ROS ou par des changements de l'état redox thiol / disulfure.

**Figure 4** : Illustration de l'oxydation des lipides.

**Figure 5** : Rôle physiologique des espèces réactives dérivées de l'oxygène.

**Figure 6** : Les principales voies de signalisation activées en réponse à un stress oxydatif.

**Figure 7** : Sources intracellulaires des espèces réactives dérivées de l'oxygène ROS.

**Figure 8** : Illustration des différents sites et interactions de ROS produites par les cellules du muscle squelettique.

**Figure 9** : Structure de la mitochondrie et fonctionnement de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative.

**Figure 10** : Transfert et fuite des protons à travers la membrane interne mitochondriale.

**Figure 11** : Sites et mécanisme de la fuite d'électrons.

**Figure 12** : Filières métaboliques aérobie et anaérobie.

**Figure 13** : Courbe type de la théorie de l'hormesis et les effets de l'exercice

**Figure 14**: Voies de signalisation impliquées dans la biogénèse mitochondrial et l'oxydation des acides gras, dans le cœur et dans le muscle squelettique, au cours de l'entraînement.

**Figure 15** : Rôle des œstrogènes dans l'expression des enzymes antioxydantes.

**Figure 16** : Système expérimental utilisé pour l'entraînement à la course des rats.

**Figure 17** : Protocole d'entraînement à la course utilisé pour le rat.

**Figure 18** : Système expérimental utilisé pour l'entraînement à la nage des anguilles.

**Figure 19** : Débit d'eau ( $m.s^{-1}$ ) en fonction de la puissance délivrée par la pompe (Hz).

**Figure 20** : Protocole d'entraînement à la nage utilisé pour les anguilles.

**Figure 21** : Protocole de détermination de la vitesse critique de nage ( $U_{crit}$ ) des anguilles.



**Figure 22** : Système de mesure de la consommation d'oxygène.

**Figure 23** : Enregistrement type lors de la mesure de la consommation d'oxygène ( $VO_2$ ) dans les fibres perméabilisées.

**Figure 24** : Vitesse critique de nage ( $U_{crit}$ ) d'anguilles européennes mâles et femelles.

**Figure 25** : Fréquence de battements de queue en fonction de la vitesse de nage chez l'anguille mâle et femelle avant (1) et après (2) entraînement à la nage.

**Figure 26** : Effet du genre sur la fonction mitochondriale chez le rat Wistar.

**Figure 27** : Sensibilité de  $VO_2$  ( $VO_{2(0)}$  et  $VO_{2(max)}$ ) et  $V_{ATP}$  aux ROS selon le genre chez le rat Wistar.

**Figure 28**: Effet de l'entraînement à la course sur la fonction mitochondriale chez le rat Wistar.

**Figure 29** : Effet de l'entraînement sur la sensibilité de  $V_{O_2}$  (a) et  $V_{ATP}$  (b) aux ROS chez le rat Wistar mâle et femelle.

**Figure 30** : Effet du genre sur la fonction mitochondriale chez l'anguille.

**Figure 31** : Sensibilité de  $VO_2$  ( $VO_{2(0)}$  et  $VO_{2(max)}$ ) et  $V_{ATP}$  aux ROS selon le genre chez l'anguille européenne.

**Figure 32** : Effet de l'entraînement à la nage sur la fonction mitochondriale chez l'anguille.

**Figure 33** : Effet de l'entraînement sur la sensibilité de  $V_{O_2}$  ( $V_0$  et  $V_{max}$ ) (a) et  $V_{ATP}$  (b) aux ROS chez l'anguille mâle et femelle.

**Figure 34** : Relation entre consommation d'oxygène in vivo et vitesse maximale aérobie.

**Figure 35** : Hypothèse sur la fuite d'électrons et la conductance aux protons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale chez le rat Wistar a) mâle et b) femelle.

**Figure 36** : Cycle de vie de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L.

**Figure 37** : Hypothèse sur la fuite d'électrons et la conductance aux protons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale chez le rat Wistar mâle a) sédentaire et b) entraîné.

**Figure 38** : Représentation de la sphère (a) et du cercle des corrélations (b).

**Figure 39** : ACP tous animaux (rats et anguilles) confondus au niveau du muscle (a) et du cœur (b) en prenant en compte le facteur poids.

**Figure 40** : ACP tous animaux (rats et anguilles) confondus au niveau du muscle sans le facteur poids.

**Figure 41** : ACP chez le rat (a) et chez l'anguille (b) niveau du muscle.



## **Tableaux :**

**Tableau 1 :** Types d'exercice en fonction de l'intensité et les différents types de fibres musculaires et de filières énergétiques sollicités.

**Tableau 2 :** Données de la littérature concernant l'effet de l'exercice physique chronique et aigu sur les statuts métaboliques, radicalaires et antioxydant au niveau du cœur et du muscle squelettique de rat.

**Tableau 3 :** Poids des rats Wistar mâles et femelles au début du protocole expérimental.

**Tableau 4 :** Données morphométriques pour la détermination du sexe des anguilles.

**Tableau 5 :** Protocole d'évaluation de la vitesse aérobie maximale (VMA).

**Tableau 6 :** Effets de six semaines d'entraînement à la course sur le poids et la vitesse maximale aérobie (VMA) du rat Wistar mâle et femelle.

**Tableau 7 :** Effets de l'entraînement sur le poids chez l'anguille mâle et femelle.

**Tableau 8 :** Effet du genre sur les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT et GPx), de la citrate synthase (Cs) et sur le contenu en malondialdéhyde (MDA) chez le rat Wistar mâle et femelle.

**Tableau 9 :** Effet du protocole d'entraînement à la course sur les activités enzymatiques antioxydantes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx), sur la citrate synthase (Cs) et sur le contenu en MDA chez le rat Wistar mâle (a) et femelle (b).

**Tableau 10 :** Effet du genre sur les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT et GPx), de la citrate synthase (Cs) et sur la lipopéroxidation chez l'anguille mâle et femelle.

**Tableau 11 :** Effet du protocole d'entraînement à la nage sur les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT et GPx) sur la citrate synthase (Cs) et sur la lipopéroxidation chez l'anguille mâle (a) et femelle (b).

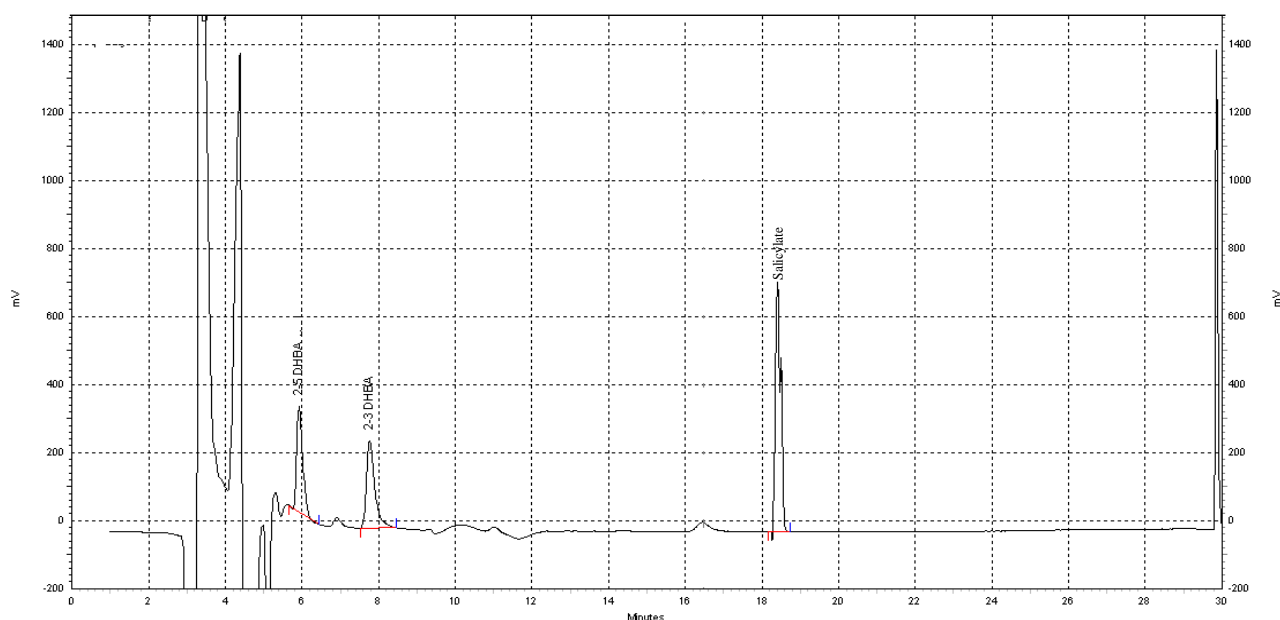
**Tableau 12 :** Synthèse de l'effet de l'entraînement sur les caractéristiques métaboliques et radicalaires et sur la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS chez le rat Wistar et l'anguille européenne.



# Annexes

## Annexe 1 : Conditions chromatographiques pour la quantification de la production du radical hydroxyle

- La colonne utilisée est une colonne Hypersil ODS (4,6 mm x 250 mm, particules greffées de 5  $\mu\text{m}$ ) protégée par une précolonne munie d'un fritté (0,45  $\mu\text{m}$ )
- La phase mobile est constituée de 97% de solution tamponnée (acétate sodium 48,23mM, acide citrique 10mM, EDTA 0,13mM et Sodium Océtyl Sulfate 0,52mM) et de 3% d'acétonitrile, le tout est filtré à 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Le pH est ajusté à 3,8 avec de l'acide acétique glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) puis dégazée aux ultrasons avant d'être utilisée.
- Pendant l'analyse, le débit de la phase mobile est fixé à 0,8 mL/min.
- Le potentiel appliqué au niveau du détecteur est de +700 mV et la sensibilité est de 1 nA pleine échelle.



**Chromatogramme type représentant le 2-3 et le 2-5 DHBA.** Leurs temps de rétention sont respectivement 6 min et 8 min.





## Annexe 2 : Mesure de l'activité SOD

\* Le muscle cardiaque ou squelettique congelé est récupéré puis broyé à 4°C dans une solution tampon TE (Tris/ 75 mM et EDTA 5 mM ; cf. III.4.2. *Les extraits musculaires*)

\* La solution réactionnelle: Elle est composée d'hypoxanthine (1mM) et d'adrénaline (0.3mM) préalablement dissoute dans du HCl (1 M), Tris 75 mM et EDTA 5 mM, pH 7,4.

\* Les mesures ont été effectuées à 37°C pour les rats et à 15°C pour l'anguille.

\* La réaction est déclenchée par l'ajout de la xanthine oxydase (0,12 unité).

- Le tableau suivant présente la préparation des cuves ou des microplaques pour la mesure de l'activité de la SOD :

	En cuve				En microplaque	
	Rat		Anguille			
	Muscle/Cœur		Muscle		Cœur	
	contrôle	échantillon	contrôle	échantillon	contrôle	échantillon
Extrait tissulaire	-	80µl	-	160µl	-	10µl
tampon d'extraction	80µl	-	160µl	-	10µl	-
solution réactionnelle tamponnée	910µl	910µl	830µl	830µl	188µl	188µl
Xanthine oxydase (équivalent à 0,12 unité)	10µl	10µl	10µl	10µl	2µl	2µl

L'activité de la SOD est calculée par le biais du pourcentage d'inhibition de la réduction de l'adrénaline en adrénochrome par rapport au contrôle :

$$\frac{V_c - V_{SOD}}{V_c} * 100 = \% inhibition$$

$V_c$  = pente de la courbe contrôle

$V_{SOD}$  = pente de la courbe représentant l'échantillon

1 unité de SOD ( $U_{SOD}$ ) = 50% d'inhibition

L'activité est exprimée  $U_{SOD}.mg^{-1}$  de protéines.



### Annexe 3 : Mesure de l'activité GPx

\* Le muscle cardiaque ou squelettique congelé est récupéré puis broyé à 4°C dans une solution tampon TE (Tris 75 mM et EDTA 5 mM ; cf. III.4.2. *Les extraits musculaires*).

\* La mesure de l'activité GPx est réalisée dans des cuves en quartz de 1 mL à l'aide d'un spectrophotomètre. Le Glutathion Réduit (GSH), la glutathion réductase (GR), le NADPH et le tert butyl Hydroperoxyde (t-BuOOH) sont ajoutés au tampon d'extraction TE selon le tableau suivant :

	Rat	Anguille
Extrait tissulaire	100µl	300 µl
TE	767 µl	565 µl
GSH (1 mM)	50µl	50 µl
NADPH (14 µM)	50µl	50 µl
GR (1,36 U.mL <sup>-1</sup> )	3µl	5 µl
t-BuOOH (0,2 mM)	30 µl	30 µl

#### Mesure en Cuve de quartz de 1 mL

-La réaction est déclenchée par l'ajout du peroxyde organique (t-BuOOH)

-La disparition du NADPH est mesurée à 340nm au spectrophotomètre

-La mesure s'effectue à 15°C pour les poissons et à 37°C pour les rats.

-L'activité GPx est calculée grâce à la formule de Beer-Lambert.

Coefficient d'extinction molaire :  $\epsilon=6220 \text{ L/mol/cm}$

$$\Delta C \text{ (nmol NADPH/min/mg)} = \frac{\Delta A_{340} \text{ (DO/min)} \times V_{\text{cuve}} \text{ (ml)} \times V_{\text{tampon extraction}} \text{ (ml)}}{\epsilon \text{ (m L/mol/cm)} \times l \text{ (cm)} \times V_{\text{extrait}} \text{ (ml)} \times \text{contenu protéique (mg)}}$$

-L'activité GPx est exprimée en nmol NADP<sup>+</sup> produit.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines.



## Annexe 4 : Mesure de l'activité citrate synthase (Cs)

\* Le muscle cardiaque ou squelettique congelé est récupéré puis broyé à 4°C dans une solution tampon TE' (Tris HCl 0,1M; cf. III.4.2. *Les extraits musculaires*).

\* Mesure au spectrophotomètre à 412 nm :

- Les mesures se font à 37°C pour le rat et à 15°C pour l'anguille dans une cuve en quartz de 1 ml.

-Ajouter dans l'ordre suivant :

790 µl d'eau ultra pure

+ 100µl de DTNB 1M

+ 30 µl d'acétyl CoA 12,3 mM

+ 30µl d'extrait tissulaire (pour déclencher la réaction)

- Suivre l'absorbance de l'activité acétyl CoA hydrolase pendant 3 min. Quand la réaction est stable, l'activité Cs est déclenchée par l'ajouter de 50 µl d'oxaloacétate (0,1 M).

- Suivre l'activité Cs pendant 5-10 min.

L'activité Cs est calculée grâce à la formule de Beer-Lambert.

$$\Delta C \text{ (nmol NADPH/min/mg)} = \frac{\Delta A_{340} \text{ (DO/min)} \times V_{\text{cuve}} \text{ (ml)} \times V_{\text{tampon extraction}} \text{ (ml)}}{\epsilon \text{ (m L/mol/cm)} \times l \text{ (cm)} \times V_{\text{extrait}} \text{ (ml)} \times \text{contenu protéique (mg)}}$$

Coefficient d'extinction molaire :  $\epsilon=13600 \text{ L/mol/cm}$

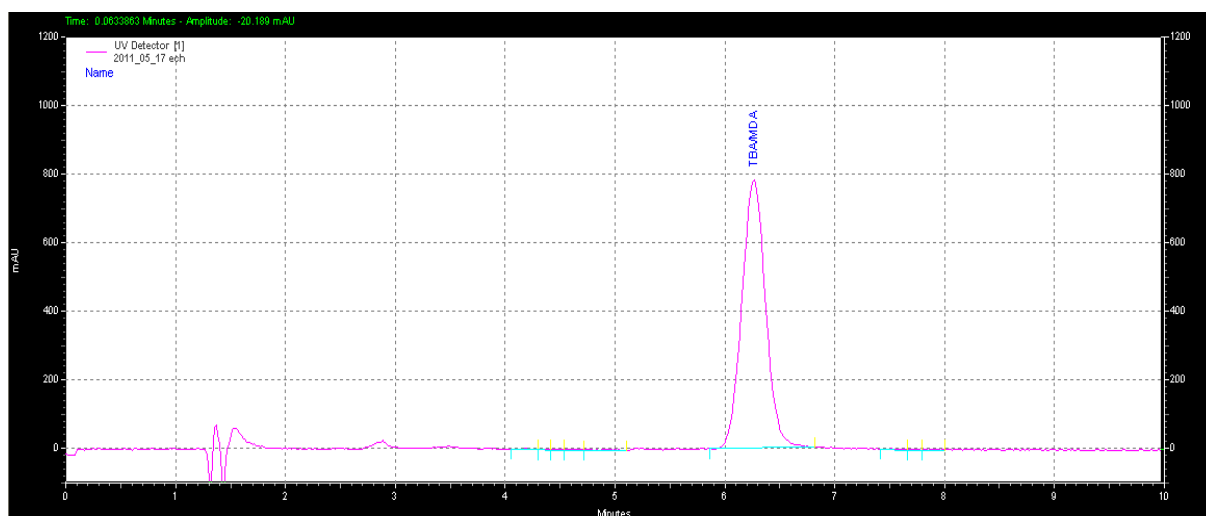
L'activité Cs est exprimée en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines.



## Annexe 5 : Quantification du malondihaldéhyde (MDA)

\* La phase mobile utilisée est constituée d'un mélange de 65% de tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM) et de 35% de méthanol. Le pH est ajusté à 5,8 avec de la potasse (KOH 1 M) puis la solution est filtrée (0,45  $\mu\text{m}$ ) et dégazée avant d'être utilisée. Le débit de la pompe est de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

\* Le complexe TBA/MDA (de couleur rose) est séparé par HPLC (colonne Hypersil ODS ; 4,6 mm x 150 mm, particules greffées de 5  $\mu\text{m}$ ) et est détecté au spectrophotomètre UV à 532nm..

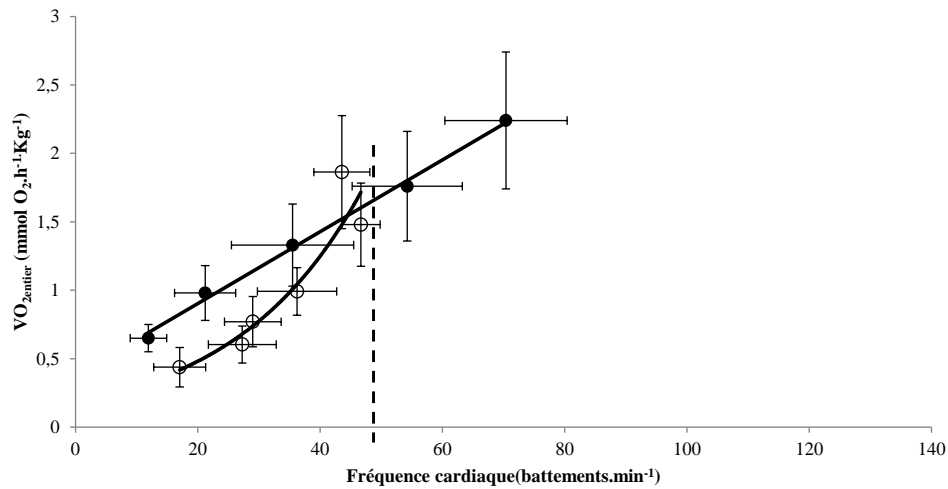


**Chromatogramme type représentant le complexe MDA-TBA.** Le temps de rétention du complexe est de 6,5 min.

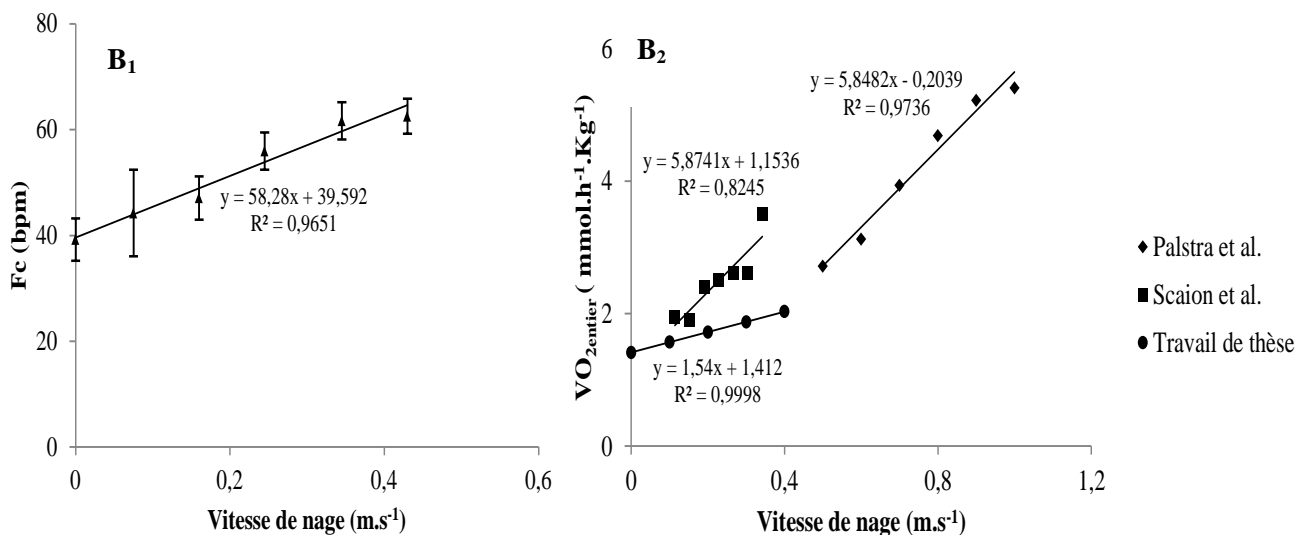




## Annexe 6



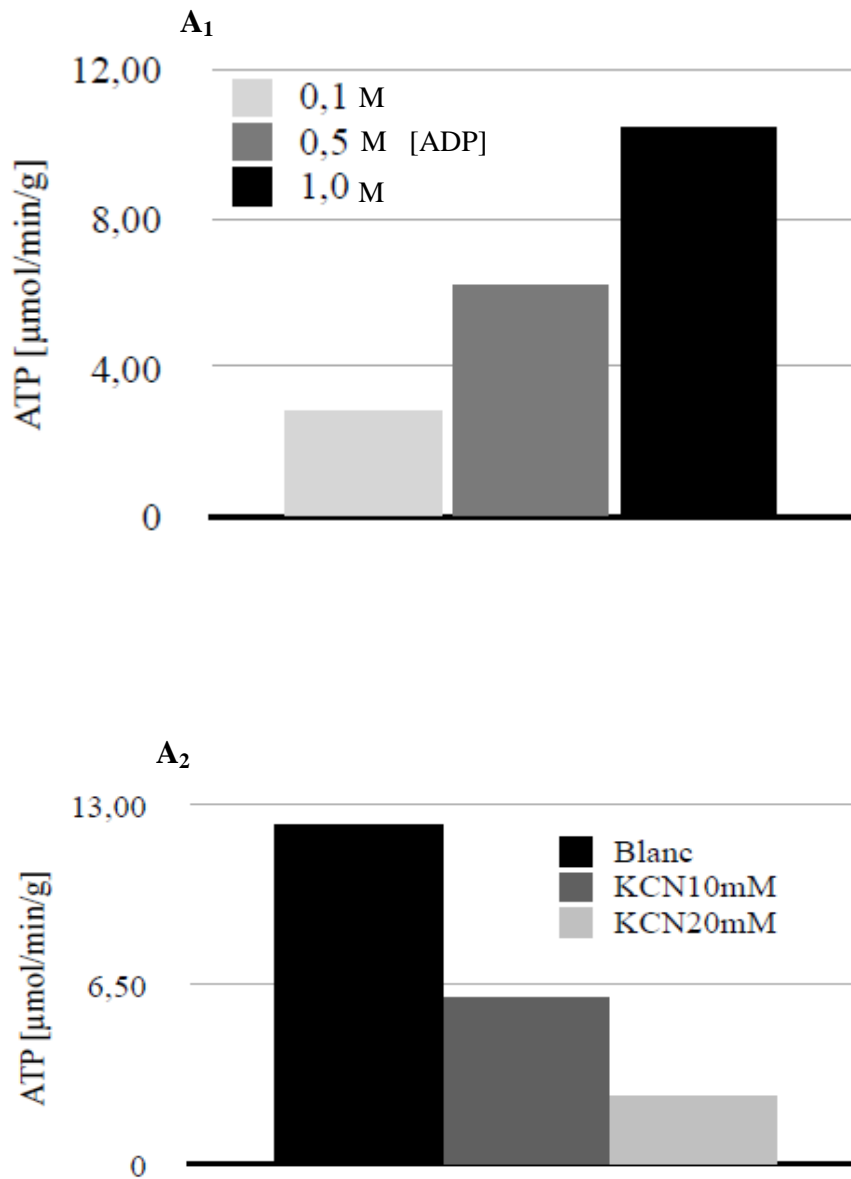
**Figure A :** Effet de la température (●) et de la pression hydrostatique (○) sur la relation entre consommation d'oxygène de l'animale entier ( $VO_{2entier}$ ) et fréquence cardiaque (Fc) chez l'anguille femelle. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SD.  $R^2 = 0,996$  pour la température et  $R^2 = 0,935$  pour la pression hydrostatique. La ligne en pointillés représente la valeur (environ 50 BPM) que la fréquence cardiaque ne dépasse pas en réponse à l'effet de la pression hydrostatique.



**Figure B :** Effet de la vitesse de nage sur la fréquence cardiaque (Fc) et sur la consommation d'oxygène de l'animale entier ( $VO_{2entier}$ ) chez l'anguille argentée. L'effet de la vitesse de nage nage sure  $VO_{2entier}$  a été estimé en utilisant (extrapolation) la relation linéaire Fc/ $VO_{2entier}$  obtenue dans la figure 36. La relation  $VO_{2entier}$ /vitesse de nage obtenue est comparée avec les données de la littérature.

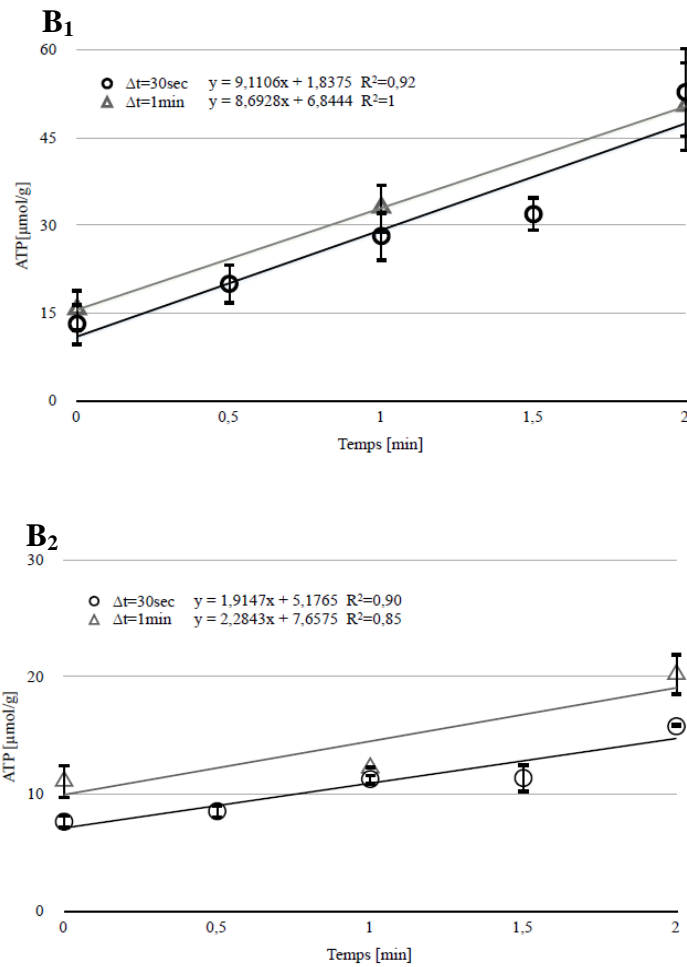


## Annexe 7



**Figure A : Production d'ATP en fonction de différentes concentration en (A<sub>1</sub>) ADP et (A<sub>2</sub>) de KCN.** Moyennes  $\pm$  SEM exprimées en  $\mu\text{mol ATP}/\text{min}/\text{g}$  de tissu. L'ADP stimule le complexe F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase et le KCN est un inhibiteur spécifique de la cytochrome oxydase.





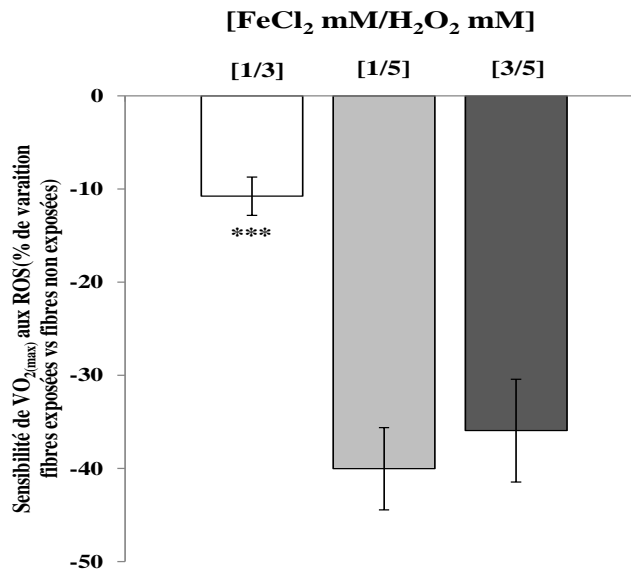
**Figure B : Production d'ATP par les fibres musculaires cardiaques (B<sub>1</sub>) et fibres musculaires rouges (B<sub>2</sub>).** Les prélèvements sont effectués à intervalle de temps différents ( $\Delta t=30$  sec ou 1min). Moyennes (coeur n=5 ; muscle n=4)  $\pm$  SEM exprimées en  $\mu\text{mol ATP/g}$  de tissu.

Type de fibres	$\text{VO}_{2(\text{max})}$ ( $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$\text{V}_{\text{ATP}}$ ( $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$\text{V}_{\text{ATP}}/\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\mu\text{mol ATP} \cdot \mu\text{mol O}_2^{-1}$ )
Coeur	$435 \pm 24$	$11,59 \pm 1,35 *$	$6,45 \pm 0,95 *$
Muscle rouge	$437 \pm 13$	$3,37 \pm 0,96 *$	$3,69 \pm 0,74 *$

**Tableau : Consommation en oxygène maximale ( $\text{VO}_{2(\text{max})}$ ), production d'ATP ( $\text{V}_{\text{ATP}}$ ) et rapport  $\text{V}_{\text{ATP}}/\text{VO}_{2\text{max}}$  des fibres perméabilisées de coeur et de muscle rouge de truite; Moyennes (N=7)  $\pm$  SEM;  $*P < 0,05$  (comparaison intertissulaire).**



## Annexe 8



**Figure : Effet des concentrations en FeCl<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [mM/mM] sur la sensibilité de la consommation en oxygène maximale VO<sub>2(max)</sub>.** La sensibilité aux ROS est représentée par le pourcentage de variation de VO<sub>2(max)</sub> mesurée dans les fibres exposées par rapport aux fibres non exposées au système générateur de ROS. Les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM, N=7 \*\*\**P*<0,001 [1/3] vs [1/5] et [3/5].

	Muscle Rouge	Cœur
VO <sub>2(0)</sub>	- 14,09 ± 11,20	3,57 ± 10,48*
VO <sub>2(max)</sub>	- 43,37 ± 4,12	- 28,71 ± 2,86*

**Tableau : Pourcentages de variation de la respiration mitochondriale des fibres exposée vs fibres non exposées aux ROS.** Moyenne ± SEM, N= 6, \**P*<0,05 cœur vs muscle rouge.





Rats	Mâle		Femelle	
	Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraînée
N	8	8	10	10
Poids <sub>1</sub> à 7 semaines (g)	270 ± 3	269 ± 3	214 ± 2	216 ± 2
Poids <sub>2</sub> à 13 semaines (g)	422 ± 10 <sup>###</sup>	380 ± 10 <sup>###*</sup>	272 ± 5 <sup>###</sup>	257 ± 3 <sup>###*</sup>

### A) vitesse maximale aérobie (Km/h)

Avant entraînement VMA <sub>1</sub>	1,45 ± 0,10	2,04 ± 0,12 <sup>**</sup>	1,80 ± 0,08	1,93 ± 0,08
A mi-parcours VMA <sub>mi-parcours</sub>	Nm	2,24 ± 0,14 <sup>‡</sup>	Nm	2,34 ± 0,11 <sup>‡</sup>
Après entraînement VMA <sub>2</sub>	Nm	Nm	1,63 ± 0,06	2,22 ± 0,12 <sup>‡</sup>

### B) Caractéristiques métaboliques

Tissu	Coeur		Gastrocnémien		Coeur		Gastrocnémien	
	Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraînée	Sédentaire	Entraînée
N	8	8	8	8	10	10	10	10
Contenu protéines (mg.g <sup>-1</sup> )	63,7 ± 4,0 <sup>§§§</sup>	61,2 ± 1,6	47 ± 1	47 ± 2	40,1 ± 2,1	43,8 ± 3,3	45 ± 3	52 ± 2
Activité citrate synthase (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de protéines)	542 ± 42 <sup>§</sup>	559 ± 35	188 ± 18	162 ± 12	682 ± 39	670 ± 36	146 ± 19	144 ± 17
Consommation d'O <sub>2</sub> basale VO <sub>2(0)</sub> (μmol O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,19 ± 0,10 <sup>§</sup>	0,930 ± 0,053 <sup>*</sup>	0,681 ± 0,046	0,541 ± 0,040 <sup>*</sup>	0,902 ± 0,026	1,04 ± 0,08	0,655 ± 0,049	0,708 ± 0,044
Consommation d'O <sub>2</sub> maximale VO <sub>2(max)</sub> (μmol O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,60 ± 0,12	1,62 ± 0,08	0,942 ± 0,077	0,949 ± 0,112	1,54 ± 0,07	1,75 ± 0,06 <sup>*</sup>	0,934 ± 0,028	1,17 ± 0,09 <sup>*</sup>
Production d'ATP V <sub>ATP</sub> (μmol ATP.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	2,63 ± 0,47 <sup>§§§</sup>	5,38 ± 1,19 <sup>*</sup>	2,18 ± 0,48 <sup>§</sup>	4,93 ± 1,24 <sup>*</sup>	7,23 ± 0,80	9,24 ± 1,46	4,22 ± 0,58	5,26 ± 1,10
Rapport V <sub>ATP</sub> /VO <sub>2(max)</sub>	1,74 ± 0,37 <sup>§§§</sup>	3,40 ± 0,78	2,32 ± 0,45 <sup>§</sup>	6,42 ± 2,15	4,71 ± 0,55	5,35 ± 1,06	4,54 ± 0,61	4,43 ± 0,76

### C) Métabolisme des ROS

Production des ROS								
Production des <sup>•</sup> OH V <sub>OH</sub> (ng DHBA.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	4,37 ± 0,91	3,13 ± 0,84	6,44 ± 0,40	2,81 ± 0,62 <sup>***</sup>	3,55 ± 0,50	7,36 ± 2,82	6,90 ± 1,59	7,54 ± 1,20
Rapport V <sub>OH</sub> /VO <sub>2(max)</sub>	2,63 ± 0,49	1,92 ± 0,49	6,76 ± 0,46	3,14 ± 0,91 <sup>**</sup>	2,36 ± 0,43	4,39 ± 2,06	7,25 ± 1,59	6,87 ± 1,23
Activités enzymatiques antioxydantes								
SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	3,75 ± 0,20 <sup>§§§</sup>	2,32 ± 0,16 <sup>***</sup>	5,03 ± 0,18 <sup>§§§</sup>	4,17 ± 0,18 <sup>**</sup>	4,57 ± 0,17	4,32 ± 0,19	2,81 ± 0,13	2,85 ± 0,17
CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	3,01 ± 0,29	2,91 ± 0,28	6,97 ± 0,84 <sup>§§§</sup>	3,95 ± 0,35 <sup>**</sup>	2,58 ± 0,70	2,28 ± 0,68	1,17 ± 0,46	0,82 ± 0,31
GPx (μmol NADPH oxydé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	5,86 ± 0,34 <sup>§§</sup>	3,85 ± 0,29 <sup>***</sup>	1,90 ± 0,11	1,01 ± 0,08 <sup>***</sup>	12,3 ± 0,6	11,5 ± 0,8	1,74 ± 0,18	1,46 ± 0,20
Indice de peroxydation lipidique								
Contenu en MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)	20,4 ± 3,1	20,1 ± 2,7	20,0 ± 2,1 <sup>§</sup>	21,1 ± 2,0	20,3 ± 3,4	17,9 ± 4,0	11,7 ± 1,1	14,1 ± 1,7

### D) Sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS (% de variation fibres exposées vs non exposées)

Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(0)</sub>	-25,9 ± 5,7 <sup>§§§</sup>	-10,7 ± 6,2	-61,1 ± 5,6 <sup>§§</sup>	-52,8 ± 5,1	+11,6 ± 6,3	+2,3 ± 8,6	-18,9 ± 9,5	-23,9 ± 8,7
Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(max)</sub>	-29,9 ± 4,1	-39,0 ± 1,3 <sup>*</sup>	-46,6 ± 4,5 <sup>§</sup>	-59,9 ± 3,3 <sup>*</sup>	-18,1 ± 6,6	-24,6 ± 4,2	-22,6 ± 7,2	-35,6 ± 7,5
Sensibilité aux ROS de V <sub>ATP</sub>	-47,8 ± 5,8 <sup>§§§</sup>	-34,9 ± 2,5	-50,3 ± 4,8 <sup>§§§</sup>	-34,2 ± 5,6 <sup>*</sup>	-14,8 ± 5,6	-25,9 ± 5,4	-23,9 ± 4,4	-28,4 ± 3,5

**Tableau A : Effet de l'entraînement sur la performance de course (A), les caractéristiques métaboliques (B) et radicalaires (C) et la sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS (D) chez le rat Wistar.** Les mesures de VO<sub>2(0)</sub>, VO<sub>2(max)</sub>, V<sub>ATP</sub> et V<sub>OH</sub> ont été réalisées sur des fibres perméabilisées. La sensibilité des paramètres de la fonction mitochondriale aux ROS est présentée en % de variation fibres exposées vs non exposées aux ROS. Le contenu total en protéines, le contenu en MDA (indice de peroxydation lipidique), ainsi que les activités citrate synthase (Cs), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx) ont été mesurés dans les extraits tissulaires. Les valeurs sont exprimées par les moyennes ± SEM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 et \*\*\*P<0,001 entraîné vs sédentaire. §P<0,05, §§P<0,01, §§§P<0,001 sédentaire mâle vs sédentaire femelle (par groupe) ; †P<0,05, ††P<0,01, †††P<0,001 avant vs après entraînement (test apparié), Nm = non mesuré.



Anguilles	Mâle		Femelle	
	Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraînée
N	6	6	7	7
Taille (m)	0,385 ± 0,007 <sup>§§§</sup>	0,444 ± 0,043	0,579 ± 0,038	0,587 ± 0,035
Poids <sub>1</sub> à 7 semaines (g)	89,5 ± 7,2 <sup>§§§</sup>	95,0 ± 8,7	344 ± 41	338 ± 36
Poids <sub>2</sub> à 13 semaines (g)	86,8 ± 6,8	92,0 ± 8,6	336 ± 39	331 ± 38

### A) vitesse critique de nage

Avant entraînement Ucrit 1 (m.s <sup>-1</sup> )	0,422 ± 0,051	0,416 ± 0,041	0,482 ± 0,048	0,495 ± 0,027
Après entraînement Ucrit 2 (m.s <sup>-1</sup> )	0,419 ± 0,051	0,525 ± 0,051 <sup>***</sup>	0,484 ± 0,048	0,598 ± 0,031 <sup>***</sup>
Avant entraînement Ucrit 1 (Lc.s <sup>-1</sup> )	1,10 ± 0,14	0,949 ± 0,078	0,856 ± 0,100	0,872 ± 0,096
Après entraînement Ucrit 2 (Lc.s <sup>-1</sup> )	1,09 ± 0,14	1,20 ± 0,09 <sup>***</sup>	0,858 ± 0,099	1,05 ± 0,11 <sup>***</sup>

### B) Caractéristiques métaboliques

Tissu	Coeur		Muscle rouge		Coeur		Muscle rouge	
	Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraîné	Sédentaire	Entraînée	Sédentaire	Entraînée
N	6	6	6	6	6	6	6	6
Contenu protéines (mg.g <sup>-1</sup> tissu)	23,5 ± 2,3	25,1 ± 3,5	15,4 ± 1,5	15,3 ± 1,0	29,7 ± 4,8	28,5 ± 4,6	17,5 ± 1,5	20,1 ± 2,0
Activité citrate synthase (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de protéines)	Nm	Nm	79,9 ± 10,0	83,1 ± 5,5	Nm	Nm	81,7 ± 9,9	79,1 ± 6,5
Consommation d'O <sub>2</sub> basale VO <sub>2(0)</sub> (μmol O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	0,470 ± 0,019 <sup>§§§</sup>	0,457 ± 0,033	0,068 ± 0,008	0,084 ± 0,017	0,302 ± 0,016	0,300 ± 0,020	0,080 ± 0,006	0,079 ± 0,005
Consommation d'O <sub>2</sub> maximale VO <sub>2(max)</sub> (μmol O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	0,597 ± 0,063	0,564 ± 0,072	0,199 ± 0,022	0,213 ± 0,032	0,614 ± 0,072	0,529 ± 0,034	0,261 ± 0,032	0,283 ± 0,037
Production d'ATP V <sub>ATP</sub> (μmol ATP.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	6,31 ± 1,78	4,52 ± 1,28	2,96 ± 0,70	4,05 ± 0,65	4,59 ± 0,90	3,55 ± 1,22	3,51 ± 0,80	2,04 ± 0,61
Rapport V <sub>ATP</sub> /VO <sub>2(max)</sub>	10,4 ± 2,9	8,6 ± 3,0	13,9 ± 2,5	22,1 ± 10,1	6,81 ± 1,42	4,44 ± 0,60	13,5 ± 3,8	5,69 ± 0,74

### C) Métabolisme des ROS

Production des ROS								
Production des radicaux hydroxyles V <sub>OH</sub> (ng DHBA.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Nm	Nm	5,93 ± 0,50	4,44 ± 0,30*	11,06 ± 4,89	6,73 ± 1,51	10,8 ± 4,4	15,1 ± 2,9
Rapport V <sub>OH</sub> / VO <sub>2(max)</sub>	Nm	Nm	29,6 ± 3,7	20,2 ± 3,3	21,3 ± 12,5	10,7 ± 2,7	39,1 ± 18,7	50,5 ± 13,1
Activités enzymatiques antioxydantes								
SOD (U.mg <sup>-1</sup> protéines)	2,52 ± 0,28	2,83 ± 0,44	2,99 ± 0,36	3,43 ± 0,30	2,56 ± 0,33	3,32 ± 0,45	3,22 ± 0,28	2,97 ± 0,42
CAT (nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> transformé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	Nm	Nm	95,4 ± 6,8	90,1 ± 12,7	Nm	Nm	118 ± 22	122 ± 18
GPx (nmol NADPH oxydé.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protéines)	19,4 ± 2,7	19,9 ± 3,3	21,8 ± 4,4	24,4 ± 4,7	24,3 ± 3,2	37,0 ± 4,5*	22,2 ± 3,0	34,8 ± 4,9*
Indice de peroxydation lipidique								
Contenu en MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tissu)	ND	ND	66,5 ± 8,5	64,4 ± 4,5	ND	ND	61,6 ± 9,6	86,5 ± 15,7

### D) Sensibilité de la fonction mitochondriale aux ROS (% de variation fibres exposées vs non exposées)

Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(0)</sub>	-18,2 ± 3,0 <sup>§§§</sup>	-13,5 ± 2,6	-43 ± 7	-40 ± 4	-41,4 ± 4,8	-31,7 ± 5,1	-38,8 ± 7,1	-35,9 ± 5,8
Sensibilité aux ROS de VO <sub>2(max)</sub>	-47,5 ± 4,2	-33,1 ± 4,4*	-41 ± 4	-41 ± 8	-42,6 ± 4,2	-37,7 ± 4,1	-33,5 ± 3,9	-35,2 ± 4,7
Sensibilité aux ROS de V <sub>ATP</sub>	-40,4 ± 7,0	-49,1 ± 7,4	-42 ± 18	-56 ± 9	-44,3 ± 6,3	-45,8 ± 3,6	-47,3 ± 5,7	-52,9 ± 3,5

**Tableau B : Effet de l'entraînement sur la performance de nage (A), les caractéristiques métaboliques (B) et radicalaires (C) et la sensibilité aux ROS (D) chez l'anguille européenne argentée.** Les mesures de VO<sub>2(0)</sub>, VO<sub>2(max)</sub>, V<sub>ATP</sub> et V<sub>OH</sub> ont été réalisées sur des fibres perméabilisées. La sensibilité des paramètres de la fonction mitochondriale aux ROS est présentée en % de variation fibres exposées vs non exposées aux ROS. Le contenu total en protéines, le contenu en MDA (indice de peroxydation lipidique), ainsi que les activités citrate synthase (Cs), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx) ont été mesurés dans les extraits tissulaires. Les valeurs sont exprimées par les moyennes ± SEM. \*P<0.05, entraîné vs sédentaire de même sexe. (par groupe), §§§P<0.001 sédentaire mâle vs sédentaire femelle (par groupe), # # p< 0.01, # # # p<0.001 avant vs après entraînement (test apparié). Nm = non mesuré.



# Annexe 10 : Publications

Research article

## Effect of exercise training on oxidative stress and mitochondrial function in rat heart and gastrocnemius muscle

Firas Farhat, Julie Dupas, Aline Amérand, Christelle Goanvec, Annie Feray, Bernard Simon, Nathalie Guegueniat, Christine Moisan

Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, EA4324-ORPHY, SFR ScInBios, UFR Sciences et Techniques, France

**Objective:** This study aimed to explore the effect of endurance training on oxidative parameters and mitochondrial function in gastrocnemius and heart muscle.

**Methods:** Male Wistar rats were trained by running for 6 weeks. *In vitro* measurements of the rates of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) production, oxygen consumption (in either the absence, basal rate ( $V_0$ ), or the presence, maximal rate ( $V_{\text{max}}$ ), of adenosine diphosphate), and adenosine triphosphate (ATP) production were made simultaneously in permeabilized fibers. The mitochondrial function was explored after exposure or non-exposure to an *in vitro* generator system of reactive oxygen species (ROS).

**Results:**  $V_{\text{max}}$  was not affected by training, but  $V_0$  decreased. In conditions of maximal mitochondrial functioning, an increase in ATP rate and a decrease in  $\cdot\text{OH}$  production occurred simultaneously. *In vitro* ROS exposure disturbed mitochondrial function, but training modified the vulnerability of  $V_{\text{max}}$  and ATP rate to ROS in different ways.

**Discussion:** We hypothesize that the part of  $V_{\text{max}}$  devoted to proton leakage was decreased in trained rats, consequently improving ATP synthesis. The data suggest that, after training, there is more efficient use of electrons in respiratory chain energy production, rather than a greater ROS scavenging capacity.

**Keywords:** Training, Reactive oxygen species, Oxidative phosphorylation, ROS susceptibility, Muscle, Heart

### Introduction

The mitochondrion is the main supplier of cellular adenosine triphosphate (ATP) in skeletal and heart muscles, through oxidative phosphorylation.<sup>1</sup> During mitochondrial functioning, electron transfer along the respiratory chain leads to the formation of most of the radicals and other reactive oxygen species (ROS) produced in these tissues.<sup>2</sup> Of the total mitochondrial  $\text{O}_2$  consumed, 1–2% is converted to superoxide radicals ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), subsequently leading to the formation of other ROS such as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and the potentially harmful hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ). This last radical species may react with many molecules in living cells, interfering with cellular processes including mitochondrial biogenesis and energy metabolism.<sup>3</sup>

It is known that exercise increases ATP demand, particularly in heart and skeletal striated muscle. The

source of ATP depends on the exercise protocol (type, duration, intensity) and the type of muscle fibers recruited. During exercise, many sites of ROS production also depending on the protocol may be activated such as enzymes (xanthine oxidase, NADPH oxidase) and mainly the mitochondrial electron transport chain.<sup>4</sup> While acute exercise and high-intensity chronic exercise induce ROS formation that potentially causes damage to cell functions, chronic moderate exercise can lead to adaptive mechanisms decreasing oxidative stress<sup>5</sup> and radical leakage at the respiratory chain level.<sup>6,7</sup> These mitochondrial mechanisms through which regular exercise exerts beneficial effects, including the relationships between mitochondrial energy metabolism and generation of ROS, are not yet well understood. Training effects are often reported on antioxidant defense mechanisms and sometimes related to changes in ROS production and/or oxidative stress markers, but can be difficult to interpret. Indeed, the results are highly dependent on numerous parameters, such as exercise protocol

[1] Correspondence to: Christine Moisan, Université de Bretagne Occidentale, France. Email: Christine.Moisan@univ-brest.fr

(type, duration, and frequency), species and strain, age, tissue, and gender.<sup>5,8,9</sup> Previous studies investigated the effects of training on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production at the mitochondrial level and results were often conflicting. Starnes et al.<sup>7</sup> reported that exercise training (treadmill 5 days per week, 60 minutes per day for 10 weeks) decreased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from cardiac mitochondria of male Fischer 344 rats. Venditti et al.<sup>6</sup> also reported a decrease in mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from gastrocnemius muscle of male Wistar rats after swimming-based training. In contrast, Marci et al.<sup>10</sup> showed that exercise training (treadmill 4 days per week during 10 weeks) in female Sprague-Dawley rats did not modify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in myocardial mitochondria. Among the adaptations to repeated prolonged exercise, changes in mitochondrial vulnerability toward ROS can occur, but differ widely between studies. Leichtweis et al.<sup>11</sup> showed that decrease in heart mitochondrial respiration by exogenous ROS was more pronounced in male Sprague-Dawley rats after rigorous swim training than in untrained animals. On the contrary, Chandwaney et al.<sup>12</sup> reported lower vulnerability to exogenous ROS of muscle mitochondria in trained male Fischer 344 (treadmill 5 days per week for 10 weeks) than in untrained rats.

The data from these previous studies are therefore sometimes conflicting because exercise protocol, rat strain, and tissues analyzed are different. To our knowledge, the present study provides the first investigation of the influence of endurance training in male Wistar rat on mitochondrial respiratory function in both cardiac and skeletal muscle, including ATP generation and oxidative parameters.

The influence of moderate chronic exercise (treadmill 5 days per week, 1 hour per day, 6 weeks) was studied in rat skeletal and cardiac muscle by measuring (1) mitochondrial respiratory function (simultaneous measurements of oxygen consumption, ATP, and <sup>•</sup>OH release from permeabilized fibers); (2) enzymatic antioxidant defenses and oxidative damage (lipoperoxidation); and (3) the vulnerability of mitochondria function to *in vitro* ROS exposure.

## Methods

### Animal care

All experimental procedures were approved by the French Ethics Committee (CEFEA n°74) and the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' under the reference 00560.01.

Wistar male rats (n=16), 6 weeks of age (at their arrival) were obtained from Janvier Breeding Center (Le Genest-Saint Isle, France), for use in this study. They were housed in a 21±1°C room with a 12:12 hours light/dark photoperiod. Water and food (standard rat chow) were provided *ad libitum*.

### Training protocol

Maximal aerobic speed (MAS) was evaluated for each rat at 8.5 weeks on a motor-driven treadmill (0% incline). This protocol consisted of an exercise session where the speed was progressively incremented by 0.2 km/hour and then by 0.1 km/hour every 1.5 minutes. MAS was also evaluated after 3 weeks of training to adapt training intensities.

Rats were randomly assigned to either trained (n=8) or sedentary (n=8) groups. Trained rats ran on a treadmill 5 times per week for 60 minutes per day for 6 weeks, at a speed equivalent to 60–70% of their MAS. Sedentary rats were handled identically to trained rats, except that the treadmill was left turned off.

Forty-eight hours after the last session of exercise training, the rats were anesthetized intramuscularly (ketamine/xylazine: 100/15 mg/kg). After anesthesia, the thoracic cage was opened and the heart removed. Ventricle and gastrocnemius muscle were taken. One part of the tissue was used immediately; the remainder was frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until use.

### Permeabilized fibers preparation

The left ventricle and gastrocnemius muscle (middle of left muscle head) were minced into fine pieces (~5 mg/piece). Fibers were placed in buffer A (10 mM EGTA, 20 mM taurine, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MES potassium, 0.5 mM dithiothreitol, 15 mM phosphocreatine, and 5 mM ATP; at pH 7.4) containing saponin (100 µg/ml) to selectively destroy the integrity of the sarcolemma. After 20 minutes of incubation, fibers were washed twice in buffer A for 10 minutes to completely remove the saponin and metabolites. All incubations and washing procedures were carried out with mild stirring at 4°C.<sup>13</sup>

### Mitochondrial respiration measurement

The mitochondrial oxygen consumption rate of control and ROS-exposed fibers (around 20 mg) were measured polarographically using a Strathkelvin 928 6-Channel Oxygen System and a Clark-type electrode in a water-jacketed glass chamber maintained at 37°C and equipped with magnetic stirring. The measurement was carried out in 2 ml of a respiratory medium (20 mM Tris, 150 mM KCl, 0.08 mM EDTA, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.2). First, basal respiration (V<sub>0</sub>), defined as state 4 in mitochondria preparation, was assessed by adding the Krebs cycle intermediates pyruvate/malate (12 mM/6 mM). Then, maximal adenosine diphosphate (ADP)-stimulated respiration (V<sub>max</sub>), defined as state 3 in mitochondria preparation, was measured by adding 5 mM ADP. The respiratory substrates (pyruvate/malate and ADP) were used at saturating

concentrations.<sup>14</sup> Mitochondrial respiration rate is expressed in  $\mu\text{mol O}_2/\text{minute/g}$  of tissue.

**Rate of ATP production by permeabilized fibers**  
ATP synthesis in muscle fibers was measured in the respiratory medium in the presence of respiratory substrates (see above), as described by Ouhabi et al.<sup>15</sup> and Cambier et al.<sup>16</sup> We verified that there was no ATP production after addition of pyruvate/malate ( $V_0$  conditions). ATP synthesis was initiated by adding 5 mM ADP ( $V_{\text{max}}$  conditions) and was recorded over 2 minutes as follows: every 1 minute after ADP addition, a 20  $\mu\text{l}$  aliquot was withdrawn, quenched in 100  $\mu\text{l}$  dimethyl sulfoxide, and diluted in 5 ml distilled water. The quantity of ATP was measured by bioluminescence with a Berthold detection system luminometer. Standardization was performed with known quantities of ATP (0–500 nmol) measured under the same conditions. The rate of ATP synthesis ( $V_{\text{ATP}}$ ) was calculated using a linear regression. Rates were expressed in  $\mu\text{mol ATP/minute/g}$  tissue.

- 3 **Rate of  $\text{HO}^\bullet$  production by permeabilized fibers**  
For the other part of permeabilized fibers,  $^\bullet\text{OH}$  radical production ( $V_{\text{OH}}$ ) was determined with an indirect method previously described by Amérand et al.<sup>14</sup> Briefly, salicylic acid is used as an  $^\bullet\text{OH}$  radical trapper, and its hydroxylation gives two stable metabolites (2,3- and 2,5-dihydroxybenzoic acid, DHBA), which are further quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Knauer – Smartline Autosampler 3900) coupled with electrochemical detection (Bioanalytical system-LC 4C). The incubation of permeabilized fibers with salicylic acid was performed under the same conditions of temperature and saturated substrate concentrations as the  $V_{\text{O}_2}$  measurements.  $V_{\text{OH}}$  production rate was expressed in ng of DHBA/minute/g tissue.

#### Malondialdehyde content in heart and gastrocnemius muscles

- 4 Malondialdehyde (MDA) content, used as an index of lipoperoxidation, was determined according to a method described by Morlette et al.<sup>17</sup> Muscle was homogenized with a polytron homogenizer in a 2% methanolic solution with 1% butylhydroxytoluene. In the presence of 1% phosphoric acid, a complex forms between MDA and TBA (7.4 mM) after development of the reaction at 100°C for 30 minutes. The TBA/MDA complex was extracted in n-butanol, then evaporated at 37°C and the residue was re-dissolved in the mobile phase. The TBA/MDA complex was separated by HPLC and detected by UV spectrophotometry (BIO-TEK KONTRON) at 532 nm and expressed in nmol/g tissue.

**Antioxidant enzyme activities and protein content in heart and gastrocnemius muscles**  
Enzyme activities and protein content were determined by UV spectrophotometry (UVIKON XL model) at 37°C.

For antioxidant-enzyme activities and protein content, samples from frozen tissues were placed in an extraction buffer (75 mM TRIS and 5 mM EDTA) at 4°C and pH 7.4 for homogenization with a polytron homogenizer prior to centrifugation. After centrifugation at 12 000 g for 10 minutes at 4°C of the resulting supernatant, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and the protein content were determined:

- Total SOD activity was measured at 480 nm using the method that inhibits the adrenaline-adrenochrome reaction.<sup>18</sup> One unit (U) of SOD is equal to the amount of sample needed to cause 50% inhibition compared with the control (100%). SOD activity is expressed in U/mg protein.
- CAT activity was determined at 240 nm through its ability to transform  $\text{H}_2\text{O}_2$  into  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$ .<sup>19</sup> The assay concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was 10 mM in 75 mM TRIS and 5 mM EDTA buffer at pH 7.4. CAT activity is expressed in  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{minute/mg}$  protein.
- GPx activity was assessed at 340 nm with an indirect method adapted from Ross et al.<sup>20</sup> Briefly, GPx activity was determined from the decrease of NADPH induced by a coupled reaction with glutathione reductase. GPx activity is expressed in  $\mu\text{mol NADPH oxidized/minute/mg}$  protein.
- Protein content was measured by the colorimetric method using the BC Assay Protein Quantitation Kit (Uptima-Interchim, France, #FT-40840A).  $\text{Cu}^{2+}$  is reduced to  $\text{Cu}^+$  by proteins in an alkaline medium. The BC Assay (bicinchoninic acid) chelates  $\text{Cu}^+$  ions with very high specificity to form a water soluble purple-colored complex. The absorbance of this final  $\text{Cu}^+$  complex is measured with a spectrophotometer at 562 nm and is directly proportional to the protein concentration expressed in mg/g tissue.

#### Citrate synthase activity

Citrate synthase (CS) activity was assessed at 412 nm using DTNB (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid).<sup>21</sup> Samples from frozen tissues were placed in an extraction buffer (100 mM TRIS) pH 8.1 at 4°C for homogenization with a polytron homogenizer. Measurement was performed on muscle homogenate at 37°C and expressed in nmol/minute/mg protein.

#### In vitro ROS exposure

A part of the permeabilized fibers were exposed to exogenous ROS by incubating them with  $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  according to the Fenton reaction ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + ^-\text{OH} + ^\bullet\text{OH}$ ). We adapted the



method to rat heart and gastrocnemius permeabilized fibers.<sup>22</sup> In total, 20 mg of permeabilized fibers (four pieces) were transferred to 1.5 ml of buffer A containing 1 mM FeCl<sub>2</sub> and 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We determined in preliminary experiments that these concentrations would decrease maximal fiber respiration between 30 and 60%. After 30 minutes of incubation in the dark, fibers were washed twice for 5 minutes in 1.5 ml of buffer A. Permeabilized fibers, which are regarded as the control, were incubated in buffer A without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or FeCl<sub>2</sub>. All incubations and washing procedures were carried out with mild stirring at 4°C. Measurement of oxygen consumption and ATP production rate was then determined.

**Data analysis**

Results are expressed as mean±SEM. Statistical significance was evaluated with unpaired Student's

t-tests after testing the distributions for normality (Lilliefors' test). Significance was set at P < 0.05.

**Results**

**Effects of training on mitochondrial function**

**Oxygen consumption of permeabilized fibers**

In heart and skeletal muscle, the mitochondrial respiration in the absence of ADP (V<sub>0</sub>) was significantly lower (P < 0.05) in trained rats than in sedentary rats, while maximal ADP-stimulated respiration (V<sub>max</sub>) does not differ between the two groups (Fig. 1A).

**ATP rate (V<sub>ATP</sub>)**

The rate of ATP production was undetectable (Nd) in absence of ADP (Fig. 1B). After ADP stimulation, V<sub>max</sub> was significantly higher (P < 0.05) in trained rats than in sedentary rats (heart: 5.4±1.2 vs.

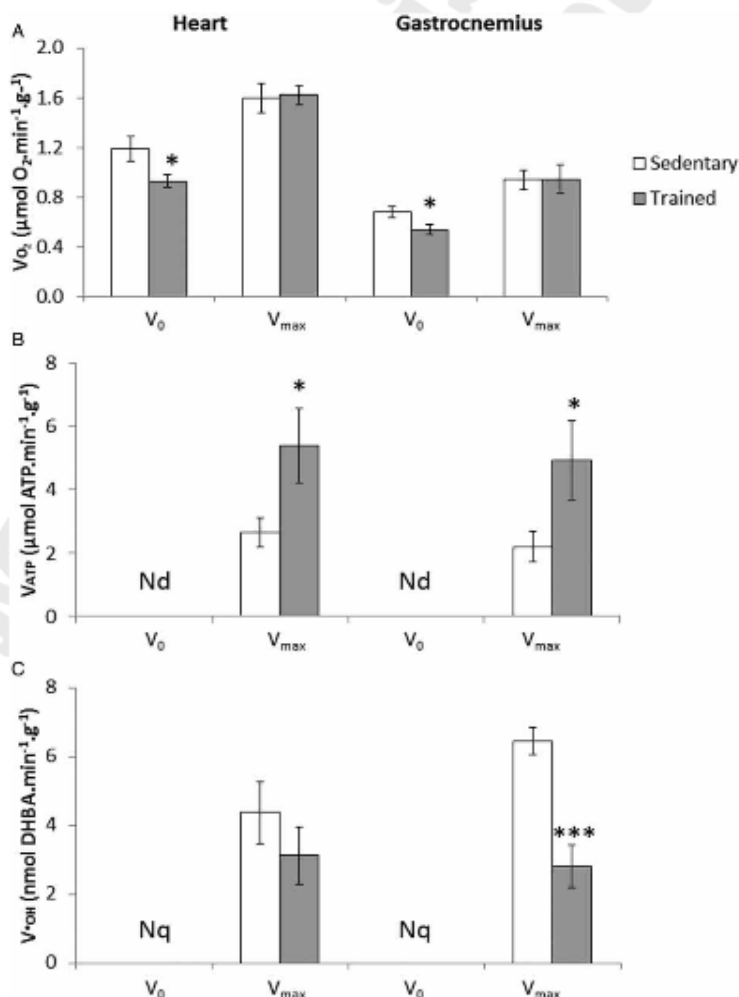


Figure 1 Effect of training on (A) oxygen consumption V<sub>O2</sub>, (B) ATP production V<sub>ATP</sub>, and (C) \*OH production V<sub>oh</sub> rates in permeabilized heart and gastrocnemius muscle fibers. V<sub>O2</sub> and V<sub>ATP</sub> were measured in the absence (V<sub>0</sub>) and in the presence (V<sub>max</sub>) of ADP and V<sub>oh</sub> was measured only in the presence of ADP. Nd = not detected and Nq = not quantified. Values are means ± SEM, \*P < 0.05 and \*\*\*P < 0.001 relative to sedentary rats, N = 8.

$2.6 \pm 0.5 \mu\text{mol ATP/minute/g}$ ; gastrocnemius:  $4.9 \pm 1.4$  vs.  $2.2 \pm 0.5 \mu\text{mol ATP/minute/g}$ ; Fig. 1B).

#### $\cdot\text{OH}$ rate ( $V\cdot\text{OH}$ )

In Fig. 1C, we observe a significantly lower rate of  $\cdot\text{OH}$  production in the gastrocnemius muscle of trained rats compared with those of sedentary rats ( $P < 0.001$ ). The rate was about  $6.4 \pm 0.4 \text{ nmol DHBA/minute/g}$  for sedentary rats against  $2.8 \pm 0.6 \text{ nmol DHBA/minute/g}$  for trained rats, i.e. a difference of about  $-56\%$ . In heart tissue, the production of  $\cdot\text{OH}$  also tended to be about  $-28\%$  lower in trained rats (not significant).

#### Effect of training on MDA content and antioxidant enzyme activities

The 6 weeks training did not induce any change in lipid peroxidation. The MDA content did not differ between trained and sedentary rats. As far as tissue protein content and CS activity are concerned, no significant difference was observed between the two groups.

However, Table 1 shows that training induced lower activity of antioxidant enzyme systems. SOD and GPx activities were significantly lower in heart and gastrocnemius muscles of trained rats, ( $P < 0.01$  or better). CAT activity was also lower in gastrocnemius muscle ( $P < 0.01$ ).

#### Effect of training on mitochondrial function after in vitro ROS exposure

As expected, in trained and sedentary rats, in vitro ROS exposure significantly decreased  $V_{\text{O}_2}$  and  $V_{\text{ATP}}$  ( $P < 0.05$ ).

Fig. 2 shows an inverse effect of training on vulnerability of maximal mitochondrial function to ROS exposure. Moreover, in trained rats,  $V_{\text{O}_2\text{max}}$  vulnerability is significantly higher than in sedentary rats (39 vs. 30% in heart and 60 vs. 47% in gastrocnemius),  $P < 0.05$  (Fig. 2A). In contrast, training induces lower  $V_{\text{ATP}}$  sensitivity significantly in gastrocnemius muscle

(34 vs. 50%,  $P < 0.05$ ) and non-significantly in heart (35 vs. 48%,  $P = 0.059$ ) (Fig. 2B).

#### Discussion

The major aim of this study was to investigate the effects of moderate endurance training on ROS production in relation to mitochondrial function in both cardiac and gastrocnemius muscle of rat, and to examine their vulnerability to ROS after training. The use of permeabilized muscle fibers has the advantage to assess, in situ, the mitochondrial function since isolation of mitochondria tends to alter their integrity.<sup>23</sup> Whatever the type of exercise, the mitochondrial electron transport chain is considered an important source of ROS in muscle fibers. In such conditions, enhanced ATP requirements increases oxygen flux in the heart and skeletal muscle mitochondria, and may favor a high rate of free radical leakage.<sup>24</sup> Oxygen consumption may reach 10–20 times the systemic levels and as much as 100–200 times the skeletal muscle levels, resulting in high increases in mitochondrial electron flux.<sup>5</sup> In the same manner, myocardial tissue can increase its oxygen consumption by 10 times during vigorous exercise; high oxygen flux in mitochondria may also lead a higher rate of leakage of free radicals.<sup>25</sup> It is clearly established that chronic exercise produces significant adaptations both in skeletal and cardiac muscle, which improve the oxidative capacity. However, training may also elicit adaptation that protects tissues from further ROS-induced damage<sup>11</sup>. In many studies, training has some positive gene modulator effects on enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems,<sup>26</sup> but such effects cannot be generalized because the intensity of endurance training and the duration of the session may influence the adaptations of these antioxidant systems.

The first main result of the present study is that training induces a concomitant increase in ATP production rate and decrease in  $\cdot\text{OH}$  production (in conditions of maximal mitochondrial functioning,  $V_{\text{max}}$ ) suggesting an improvement in energy efficiency. The

Table 1 Effect of training on protein and MDA contents, CS, SOD, CAT, and the GPx activities in heart and gastrocnemius muscle

		Protein (mg/g tissue)	CS (nmol/minute/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT ( $\mu\text{mol}$ transformed $\text{H}_2\text{O}_2$ /minute/mg protein)	GPx ( $\mu\text{mol}$ oxidized NADPH/min/mg protein)	MDA (nmol/g tissue)
Heart	Sedentary (N=8)	$63.7 \pm 4.0$	$542 \pm 43$	$3.8 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.3$	$5.9 \pm 0.3$	$20.4 \pm 3.1$
	Trained (N=8)	$61.2 \pm 1.6$	$559 \pm 35$	$2.3 \pm 0.2^{***}$	$2.9 \pm 0.3$	$3.9 \pm 0.3^{***}$	$20.1 \pm 2.7$
Gastrocnemius	Sedentary (N=8)	$46.8 \pm 1.2$	$188 \pm 18$	$5.0 \pm 0.2$	$7.0 \pm 0.8$	$1.9 \pm 0.1$	$20.0 \pm 2.1$
	Trained (N=8)	$47.3 \pm 1.7$	$162 \pm 12$	$4.2 \pm 0.2^{**}$	$4.0 \pm 0.3^{**}$	$1.0 \pm 0.1^{***}$	$21.2 \pm 2.0$

Values are means  $\pm$  SEM,  $^{**}P < 0.01$  and  $^{***}P < 0.001$  relative to sedentary rats.

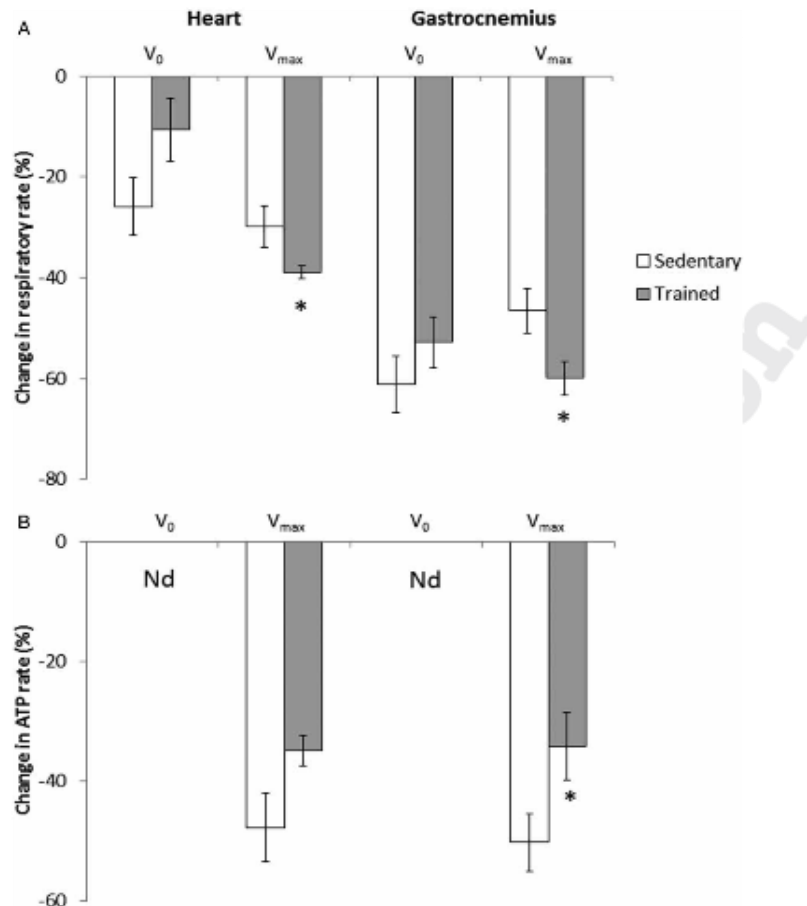


Figure 2 Effect of training on vulnerability of mitochondrial function to ROS ((A) respiration  $V_0$  and  $V_{max}$  and (B) ATP production  $V_{ATP}$ ) in permeabilized heart and gastrocnemius muscle fibers of sedentary (white histograms,  $N = 8$ ) and trained rats (gray histograms,  $N = 8$ ).  $V_0$ ,  $V_{max}$ , and  $V_{ATP}$  were measured after 30 minutes of incubation in buffer A containing  $H_2O_2 + FeCl_2$  for treated fibers and in buffer A alone for untreated fibers. The change in respiratory and ATP rates is expressed relative to fibers without  $H_2O_2$  and  $FeCl_2$  according to this formula:  $[(V_{Treated} - V_{Untreated}) / V_{Untreated}] \times 100$ . Values are means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  relative to sedentary rats. Nd = not detected.

second main observation is the decrease in activity of the antioxidant defense system in both cardiac and gastrocnemius muscles of trained rats but with no evidence of oxidative stress, estimated by MDA quantification.

Training significantly decreases the non-ADP-stimulated respiration ( $V_0$ ) around  $-23\%$  in heart and  $-17\%$  in gastrocnemius (Fig. 1).  $V_0$  is due to back leakage of protons into the mitochondrial matrix through other ion inner membrane channels rather than through  $F_0F_1$  ATP synthase. This proton backflow can occur either through the lipid bilayer or can be facilitated by the inducible uncoupling proteins (UCP). It is known that this non-ATP productive pathway could account for around 20–25% of basal metabolic rate.<sup>27</sup> In perfused rat muscle, it was measured at 35% in contracting preparations and 50% in resting muscle.<sup>28</sup> So, the observed decrease in

$V_0$  can be interpreted as a decreased permeability of the inner mitochondrial membrane to protons, which could lead to the passage of protons through ATP synthase and so increase the coupling of oxidative phosphorylation. Lumini-Oliveira et al.<sup>29</sup> also showed decreased permeability of the inner mitochondrial membrane, not in permeabilized fibers but in mitochondria, which was estimated by the measurement of the ratio between uncoupled respiration (induced by cyanide *m*-chlorophenylhydrazine addition) and the respiratory rate in the presence of oligomycin. Boss et al.<sup>30</sup> showed a decrease in UCP3 and UCP2 in heart and skeletal muscle of rat after endurance training, and concluded that there was a higher level of metabolic efficiency. Therefore, in our study, a decrease in  $V_0$  after training could mean that oxidative efficiency is related not to quantitative adaptations such as an increase in mitochondrial

mass but to a change in the permeability of the inner mitochondrial membrane.<sup>31</sup> We did not observe differences in CS activity in gastrocnemius and heart muscles with training (Table 1). The determination of CS activity is classically used as a marker of mitochondrial biogenesis. Pinho et al.<sup>9</sup> also reported no change in CS activity in mixed gastrocnemius muscle in male Wistar rats treadmill-trained for 12 weeks. In conditions of moderate training, unchanged CS activity is also frequent in heart, while CS activity is often increased in slow twitch skeletal muscle such as soleus.<sup>32</sup> Siu et al.<sup>33</sup> suggested that heart tissue, may be because its continual activity, has a sufficient pre-existing oxidative capacity to supply the energy requirement during exercise.

Maximal ADP-stimulated respiration ( $V_{max}$ ) of permeabilized fibers was not affected by endurance training (Fig. 1). Other studies using different types of exercise in rat have also shown no difference in  $V_{max}$  or state 3 in mitochondria. Servais et al.<sup>34</sup> and Judge et al.<sup>35</sup> reported unchanged state 3 respiration in quadriceps muscle and in heart, respectively, of rats that performed voluntary wheel-running exercise. Venditti et al.<sup>6</sup> also reported unaffected mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle after swimming training and in heart after running training, respectively. More generally, however, improvement in maximal ADP-stimulated respiration in permeabilized fibers or state 3 in mitochondria are increased in humans and animals. For example, 14 weeks of endurance treadmill running induced a significant increase in state 3 (12% with pyruvate/malate as substrates) and in respiratory control ratio (44%) equivalent to state 3/state 4 ratio in skeletal muscle of Wistar rats.<sup>29</sup> These results suggest that different adaptations occur at the mitochondrial level and/or reflect the variability of the protocols used.

In the present study, the respiratory data show that the acceptor control ratio ( $V_{max}/V_0$ ), a parameter representing the degree of coupling between oxidation and phosphorylation, is improved by around 17% after training in heart and gastrocnemius muscle. The hypothesis of an improvement in the electron transport to phosphorylation coupling is also supported by measurements of ATP and ROS production.

The rate of ATP release by permeabilized muscle fibers, measured in conditions of maximal mitochondrial functioning is significantly higher in trained rats (32% in the gastrocnemius muscle and 52% in the heart muscle) (Fig. 1). El Midaoui et al.<sup>36</sup> also found an increase in ATP production rate of 33% in the gastrocnemius muscle after 10 weeks endurance training and Wiborn et al.<sup>37</sup> showed a 50% increase in human vastus lateralis after 6 weeks of endurance training.

It is also important to take into account some methodological considerations when interpreting our data. The method used in our study to estimate the ATP production rate in permeabilized fibers does not assess true mitochondrial ATP synthesis. The measured ATP is the result of the overall yield between ATP synthesis and hydrolysis. The method used measures the maximal in vitro capacity for ATP production. Some precautions were taken to ensure that the major part of ATP measured was related to oxidative phosphorylation. Oxygen consumption rate ( $V_{O_2}$ ) was measured in parallel to ATP measurement, as shown in Fig. 1. Indeed, we observe that the measured  $V_{ATP}$  occurs when ADP is added to stimulate oxidative phosphorylation. The absence of  $V_{ATP}$  in conditions of basal respiration ( $V_0$ ) shows that the permeabilization procedure eliminated intracellular ADP. Other sources or consumers of ATP than mitochondria are potentially present, although the permeabilization procedure eliminates most metabolites and cytosolic enzymes, such as phosphocreatine or glycolytic enzymes, adenylate kinase, ATP hydrolases and synthesis enzymes.<sup>15</sup> In particular, because several ATP hydrolases are located in the membrane and perhaps not lost with the permeabilization, EDTA was used to chelate cytosolic magnesium and so inhibit the activity of these enzymes. In our study, the increase in ATP rate with training was not associated with an enhancement in oxygen consumption rate, which could at first appear surprising. However, we can hypothesize that for the same  $V_{max}$ , the proportion that is devoted to proton leakage is decreased and ATP synthesis is thus improved. Other mechanisms not explored in the present study can be involved in the increase in ATP rate. For example, training may increase the ADP/ATP exchange at the mitochondrial level<sup>38</sup> and induce changes in the activity of mitochondrial creatine kinase.<sup>39</sup> These mechanisms may increase the ADP diffusion into mitochondrial matrix for rephosphorylation and activate respiration.

Concerning ROS, endurance training decreases  $^{\bullet}OH$  production from skeletal and cardiac muscle permeabilized fibers measured in conditions of maximal mitochondrial functioning (Fig. 1). These results agree with the decreased mitochondrial  $H_2O_2$  release obtained by Venditti et al.<sup>6</sup> in gastrocnemius muscle of Wistar rat after a swimming protocol (5 days per week for 10 weeks). Long-term voluntary wheel running or exercise training (running training for 16 weeks) also diminished  $H_2O_2$  production from heart mitochondria in Fisher rats.<sup>7,35</sup>

Classically, a decrease in ROS production ( $^{\bullet}OH$  or  $H_2O_2$ ) is related to enhanced antioxidant enzyme activities or to lowered superoxide generation. In our present study, SOD and GPx activities, expressed in mg protein, are lower in trained rats compared with

sedentary ones in cardiac and skeletal muscle (Table 1). CAT activity is also decreased in gastrocnemius but is stable in heart. These results are unusual because in most studies using training the activity of these enzymes is upregulated<sup>40</sup> or unchanged.<sup>26</sup> The decrease in antioxidant enzymes activity could be an adaptation to the lower ROS production related to a decrease in electron leak at the mitochondrial level. It is known that the extent of adaptation of antioxidant enzymes depends on the training intensity, duration, and type of muscle. A decrease in SOD activity has been reported with voluntary exercise.<sup>41</sup> Gul et al.<sup>24</sup> also showed a decrease in the activities of GPx and reductase in the heart of rats that had performed endurance training for 8 weeks.

Decrease in antioxidant enzyme activities could make the heart and gastrocnemius muscle vulnerable to oxidative stress, but no increase in lipoperoxidation (MDA) was observed after training (Table 1); this result is also consistent with that obtained by Gul et al.<sup>24</sup> But it remains difficult to confirm that no oxidative stress occurred because protein or DNA damage was not analyzed.

Whatever the tissue considered and the rat activity level (sedentary or trained), *in vitro* ROS exposure disturbed mitochondrial function (Fig. 2). Incubation of the fibers in the presence of ROS decreased not only  $V_{\text{max}}$  but also  $V_0$  and  $V_{\text{ATP}}$  in both heart and skeletal muscle. The relative decrease in respiratory rate  $V_{\text{O}_2}$  was greater in gastrocnemius than in heart, suggesting a better antioxidant protection of this latter (although this was not confirmed by antioxidant enzymatic enzyme measurements in our study, see Table 1).  $V_{\text{ATP}}$  rate sensitivity to ROS was similar in both tissues. As shown in Fig. 2, training modifies mitochondrial sensitivity to ROS in gastrocnemius muscle and in heart (tendency,  $P=0.059$ ) but differently from Walsh et al.<sup>22</sup> These previous authors showed that the vulnerability of mitochondrial respiration to ROS was unchanged after endurance training in skinned fibers. In our study, the sensitivity of  $V_0$  to ROS was not modified by training, in contrast to  $V_{\text{max}}$  that was more inhibited by *in vitro* ROS exposure. In parallel,  $V_{\text{ATP}}$  in muscle fibers from trained rats showed a greater resistance to ROS exposure than those from sedentary rats, suggesting that energy production was better protected after training.

It is interesting to note that training does not seem to affect the different components of the respiratory chain in the same manner. It is well known that some compounds involved in the mitochondrial function are particularly ROS sensitive; the most frequently cited being ATP/ADP translocase,  $F_0F_1$  ATPase, UCP 2 and 3, but also the permeability transition pore.<sup>16</sup> It would be interesting to investigate,

using specific inhibitors, the activity and/or expression of some of these proteins and of the complexes of the respiratory chain after exposure to ROS. We can speculate that training produces an adaptation in muscle which modifies the vulnerability of some specific mitochondrial components to ROS. Leichtweis et al.<sup>11</sup> suggested that some components of heart mitochondria chronically exposed to the exercise-induced oxidative stress became more sensitive to ROS exposure. After training, some of these components especially involved in the phosphorylating system (ATP synthase, adenine nucleotide translocase, and phosphate transporters) could be less affected by ROS exposure. Because antioxidant enzymatic activities were lower in trained rats we suggest that other non-enzymatic antioxidants present in the cell, including vitamin E, GSH and ubiquinone could be involved in the oxidative protection. These antioxidants were not examined in the present study, but they could also be modified by endurance training.<sup>40</sup> A future investigation of these non-enzymatic antioxidants would be interesting.

The data detailed above, when separately analyzed and compared to the literature, are at first surprising, but once put into perspective lead to a consistent interpretation. In this study performed in Wistar males, endurance training of 6 weeks leads similar responses in permeabilized fibers of heart and gastrocnemius. Under conditions of maximal mitochondrial functioning (ADP-stimulated respiration), a decrease was observed in ROS production (a tendency in heart muscle and a significant effect in gastrocnemius) in parallel to an increase in ATP rate. These data suggest that there is a better use of electrons at the respiratory chain level to produce energy rather than a greater capacity to scavenge  $\text{O}_2^-$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$ , because antioxidant enzyme activities decreased. After training, the unchanged ADP stimulated respiration but a decrease in  $V_0$  suggested a modification of proton membrane permeability.

Our results confirm that after endurance training, mitochondria use multiple strategies to reduce free radical leakage and enhance mitochondrial function.<sup>42</sup>

## Disclaimer statements

Contributors

5

Funding

Conflicts of interest

Ethics approval All experimental procedures have been approved by the French Ethics Committee (CEFEA n°74) and the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" under the reference 00560.01.

## References

- Yaniv Y, Juhászová M, Nuss HB, Wang S, Zorov DB, Lakatta EG, et al. Matching ATP supply and demand in mammalian heart: in vivo, in vitro, and in silico perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1188:133-42.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82(1):47-95.
- Yoboue ED, Devin A. Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis. *Int J Cell Biol* 2012;2012:403870.
- Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008;88(4):1243-76.
- Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, et al. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2009;105(6):861-7.
- Venditti P, Masullo P, Di Meo S. Effect of training on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1999;372(2):315-20.
- Stames JW, Barnes BD, Olson ME. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca<sup>2+</sup>-induced dysfunction. *J Appl Physiol* (1985) 2007;102(5):1793-8.
- Pinho CA, Tromm CB, Tavares AM, Silva LA, Silveira PC, Souza CT, et al. Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life Sci* 2012;90(13-14):553-9.
- Pinho RA, Andrade ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 2006;30(10):848-53.
- Marcol M, Bourduas K, Asch A, Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(4):1549-57.
- Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Parmelee DJ, Fiebig R, Ji LL. Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. *Acta Physiol Scand* 1997;160(2):139-48.
- Chandwaney R, Leichtweis S, Leeuwenburgh C, Ji LL. Oxidative stress and mitochondrial function in skeletal muscle: effects of aging and exercise training. *Age (Omaha)* 1998;21(3):109-17.
- Mortellette H, Moisan C, Sebert P, Belhomme M, Amerand A. Fish as a model in investigations about the relationship between oxygen consumption and hydroxyl radical production in permeabilized muscle fibers. *Mitochondrion* 2010;10(5):555-8.
- Amerand A, Vettier A, Sebert P, Cann-Moisan C. In vitro effect of hydrostatic pressure exposure on hydroxyl radical production in fish red muscle. *Redox Rep* 2005;10(1):25-8.
- Ouhabi R, Boue-Grabot M, Mazat JP. Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: assessment of the ATP/O values in situ. *Anal Biochem* 1998;263(2):169-75.
- Cambier S, Benard G, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Rossignol R, Brethes D, et al. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(4):791-9.
- Mortellette H, Amerand A, Sebert P, Belhomme M, Calves P, Moisan C. Effect of exercise training on respiration and reactive oxygen species metabolism in ed red muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;172(3):201-5.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247(10):3170-5.
- Beers RF, Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195(1):133-40.
- Ross SW, Dalton DA, Kramer S, Christensen BL. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001;130(3):289-303.
- Sere P. Citrate synthase: [EC4.1.3.7.Citrate oxaloacetate-lyase(CoA-acylating)]. *Methods Enzymol* 1969;13:3-11.
- Walsh B, Tonkonogi M, Sahlin K. Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres. *Pflügers Arch* 2001;442(3):420-5.
- Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, et al. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* 1998; 184(1-2):81-100.
- Gul M, Demircan B, Taysi S, Oztasan N, Gumustekin K, Siktar E, et al. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006;143(2):239-45.
- Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005;115(3):500-8.
- Ascensao A, Ferreira R, Magalhaes J. Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 2007;117(1):16-30.
- Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* 2000;35(6-7):811-20.
- Rolfe DF, Newman JM, Buckingham JA, Clark MG, Brand MD. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 1):C692-9.
- Lumini-Oliveira J, Magalhaes J, Pereira CV, Aléixo I, Oliveira PJ, Ascensao A. Endurance training improves gastrocnemius mitochondrial function despite increased susceptibility to permeability transition. *Mitochondrion* 2009;9(6):454-62.
- Boss O, Sarnec S, Desplanches D, Mayet MH, Seydoux J, Muzzin P, et al. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *FASEB J* 1998;12(3):335-9.
- Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, et al. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 2002; 543(Pt 1):191-200.
- Zonderland ML, Bar PR, Rejnveid JC, Spruijt BM, Keizer HA, Glatz JF. Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999;79(5):391-6.
- Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* (1985) 2003;94(2):555-60.
- Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, et al. Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2003;35(1):24-32.
- Judge S, Jang YM, Smith A, Selman C, Phillips T, Speakman JR, et al. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289(6):1564-72.
- El Midaoui A, Tancredi G, Nadeau A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. *Metabolism* 1996;45(7):810-6.
- Wiborn R, Hagenfeldt L, von Döbeln U. Measurement of ATP production and respiratory chain enzyme activities in mitochondria isolated from small muscle biopsy samples. *Anal Biochem* 2002;311(2):139-51.
- Fernstrom M, Tonkonogi M, Sahlin K. Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle. *J Physiol* 2004;554(Pt 3):755-63.
- Guennero K, Wuyam B, Mezin P, Vivodtzev I, Vendelin M, Borel JC, et al. Functional coupling of adenine nucleotide translocase and mitochondrial creatine kinase is enhanced after exercise training in lung transplant skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289(4):1144-54.
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1994; 266(2 Pt 2):375-80.
- Selman C, McLaren JS, Collins AR, Duthie GG, Speakman JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys* 2002;401(2):255-61.
- Dassin FN, Rasseaux L, Bouitbir J, Charles AL, Dufour SP, Geny B, et al. Different timing of changes in mitochondrial functions following endurance training. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44(2):217-24.



## **Hydrostatic pressure and temperature modulate cardiac performance in European eel *Anguilla anguilla* L.**

F. Farhat, A. Amérand, B.Simon, M. Belhomme, P. Calvès, P. Sébert, C. Moisan

Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, EA4324-ORPHY, SFR ScInBios, UFR Sciences et Techniques, 6 Avenue Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France

**Running headline:** Cardiac performance modulation in eel

### **Abstract**

During its transoceanic migration, partly performed at depth, the European silver eel *Anguilla anguilla*(L.1758) is subjected to acute changes in temperature and pressure. In vivo experiments were performed on this eel to separately examine the influences of temperature (5-25°C) and hydrostatic pressure (0.1-10.1 MPa) on cardiac function by measuring heart rate (HR) and oxygen consumption rate (MO<sub>2</sub>). MO<sub>2</sub> increased (from 0.5 to a maximal value of approximately 2 mmol.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>) with increasing temperature or hydrostatic pressure. In the same manner, HR increased with temperature (10 to 90 beats.min<sup>-1</sup>) whereas increasing pressure from 8.1 MPa to 10.1 MPa tended to stabilize HR at 45 beats.min<sup>-1</sup>. When oxygen pulse(OP) was negatively correlated with temperature, it was positively correlated with pressure. Earlier in vitro experiments described in the literature showed that the contractile force of the ventricular myocardium is increased by an acute temperature decrease from 20 to 10°C which may serve to maintain cardiac output. The present in vivo experiments not only confirm these results but also suggest that this eel's cardiac performance is modulated at high pressure via inotropic rather than chronotropic adjustments. During its transoceanic migration, the silver eel is capable of maintaining cardiac output when faced with acute temperature or pressure fluctuations.

**Keywords:** Heart rate, Oxygen consumption, Oxygen pulse, Temperature, Hydrostatic pressure.

**Abbreviations:** MO<sub>2</sub>: Oxygen consumption rate, HR: Heart rate, OP: Oxygen pulse, Vs: Stroke volume, BPM: Beats.min<sup>-1</sup>.



## 1. Introduction

In ectotherms, many intrinsic as well as extrinsic factors interact to influence oxygen consumption rate ( $MO_2$ ) and heart rate (HR). For the cardiovascular system, Fick's convection equation describes the relationship between HR and  $MO_2$  as:

$$MO_2 = HR \times V_s \times (CaO_2 - CvO_2) \text{ (Fick, 1870)}$$

where  $V_s$  is stroke volume,  $HR \times V_s$  is the cardiac output (or  $V_b$ ), and  $CaO_2$  and  $CvO_2$  are the arterial and venous oxygen contents, respectively. When considered together,  $V_s \times (CaO_2 - CvO_2)$  is often referred to as the oxygen pulse, or OP (Clark et al, 2005). In most fish species, an increase in cardiac output occurs through the contribution of elevation in both  $V_s$  and HR (Korsmeyer et al., 1997). Some teleosts, particularly salmonids, modulate  $V_b$  through changes in  $V_s$  rather than HR while other teleosts, such as pike, modulate  $V_b$  by changes in HR (Armstrong, 1998).

Temperature is also a well-known determinant of the relationship of  $MO_2$  and HR relationship (Claireaux et al., 1995). The simplest way to express the temperature sensitivity of a metabolic process is to calculate the temperature coefficient, or  $Q_{10}$ . Temperature generally affects oxygen consumption and the intrinsic pacemaker rate with a  $Q_{10}$  of 2–3 in a variety of vertebrates (Fry, 1971). However, physiological states and slight environmental variations affect the relationship between HR and  $MO_2$  such that several relation curves can exist for a single species (Thorarensen et al., 1996). Changes in  $MO_2$  and HR are often studied in relation to temperature or exercise (Barrionuevo and Burggren, 1999; Farrell et al., 1985; Lefrançois and Claireaux, 2003), but few studies have examined the effects of hydrostatic pressure (Sébert, 2002).

Temperature and pressure are two important environmental factors present in the thermodynamic equations applied to biological systems (Johnson and Eyring, 1970). An increase in temperature can compensate for an increase in pressure when regulatory mechanisms are absent (Biltonen, 1990; Somero, 1978). These effects were verified in lipid bilayers, where an increase in pressure induces a phase transition from a liquid state (sol) to a gel state (Siebenaller et al., 1982), similar to that seen with a decrease in temperature. As concerns heart rate, Belaud et al. (1976) also demonstrated fish-specific effects of hydrostatic pressure as a bradycardia above 24.5°C and a tachycardia below this temperature. On the other hand, other studies performed *in vitro* (oxygen consumption of red muscle fibers) showed that an increase in hydrostatic pressure of 10.1 MPa can be compensated by an increase in temperature of 3–5°C (Scaion and Sébert, 2008).

Performing these types of *in vitro* experiments on the European eel *Anguilla anguilla* (L. 1758) is of interest because this fish is naturally subjected to the interaction of both temperature and

pressure factors during its oceanic spawning migration from Europe to the Sargasso Sea; a migration performed partly at depth (Tesch and Thorpe, 2003). Before departure, eels metamorphose from the yellow non-migratory and sexually immature stage to the silver migratory one. This metamorphosis, called silvering, is characterized by morphological and physiological changes (Durif et al., 2000; Pankhurst, 1982). Silvering could also provide adaptation to deep sea conditions, for example by changes in gill structure and muscle aerobic capacity (Sébert et al., 2003). Deelder (1970) was the first to report that the natural temperature range of *A. anguilla* was from 0 to 30°C, reflecting its wide geographical distribution.

Aarestrup et al. (2009) recently showed that silver eels performed daily migrations between the depth of about 200 m and 1000 m during their spawning migration. During its migration at depth, this eel would have to cope with both low temperature and high pressure, which act in the same way according to thermodynamic law. Scaion and Sébert (2008) reported that these experimental conditions allow the optimization of energy metabolism in terms of mitochondrial efficiency. The question that should be addressed is how the cardiac function adapts.

Methling et al. (2012) reported *in vitro* cardiac responses following exposure to temperatures that these eels encounter during their life cycle. The authors observed an increase in adrenergic tone of ventricular muscle that was influenced by acute temperature decreases from 20°C to 10°C. They concluded that adrenaline acts to maintain an adequate contractile force to compensate for the decrease in HR while the eels perform their diel vertical migrations. However, during these vertical migrations, in addition to temperature, hydrostatic pressure can influence physiological processes.

*In vivo* and *in vitro* experiments in European eel demonstrated the impact of pressure on physiological processes. Belaud et al. (1976), Sébert and Barthélémy (1985a) and Sébert et al. (1995) showed in the yellow eel that  $MO_2$  and HR, studied separately, increased when animals were exposed to high pressure and demonstrated that high pressure could induce bradycardia and tachycardia at high and at low temperature, respectively. In a similar manner, in the isolated heart, the twitch tension produced by the atria showed sensitivity to high pressure (Gennser et al., 1990) and was more pronounced at low temperature. These observations indicate that pressure should not be neglected when explaining the migration strategy of the European eel (Scaion and Sébert, 2008). The ability of eel cardiac muscle to work during acute temperature and/or pressure changes may be essential for survival in the environmental conditions encountered during migration.

The goal of this study was to examine the acute effects of decreased temperature or increased hydrostatic pressure on cardiac convection in silver *A. anguilla*. Of particular interest were the relationship between  $MO_2$  and HR and the contribution of HR and Vs (estimated through the

calculation of the OP) to the changes in  $MO_2$ . The results are discussed in the context of the eel's natural environment including its diel vertical migration.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Animals**

Nine female ( $288 \pm 17$  g;  $57 \pm 1$  cm) silver freshwater European eels *Anguilla anguilla* (L. 1758). were used. Eels were captured during their downstream migration by a professional fisherman on the Loire River (France) between Angers and Nantes. The eels were kept without food in the laboratory in tap water that was aerated and renewed continuously. The stabling room was open to the exterior in order to maintain natural conditions of photoperiod and water temperature ( $15^\circ\text{C}$ ) for at least one month before use. The silvering stage was checked using the equation from Durif et al. (2000). Eye diameters and pectoral fin length measurements were used to calculate different indexes: PFI = pectoral fin index and OI = ocular index according to Durif et al. (2005). This verification confirmed that all the eels were at the silver stage (stage IV) at the time of the experiments.

### **2.2. Surgery**

Eels were anesthetized with essential clove oil (1 mL diluted first in ethanol and then in 10 L water). A small incision was made on the surface below the heart (approximately 2 cm). Two copper electrodes ( $0.25\text{ cm}^2$ ) with electrical wires were implanted and positioned within the pericardial cavity as described by Sébert and Barthélémy (1985a). The incision was closed with three or four sutures. The fish were then removed from the operating table and placed in a recovery tank filled with fresh aerated tap water at  $15^\circ\text{C}$ . All fish were maintained a minimum of three days (3–4 days) in the recovery tank prior to the experiments.

### **2.3. Heart rate and oxygen consumption measurements**

Routine metabolic rate was measured during the temperature and pressure protocols. The measurement of  $MO_2$  of whole animals was performed using closed respirometry. This method was chosen based on the constraints of the pressure experimental system. The  $MO_2$  was measured with a Clark-type electrode, with pressure compensation to avoid shifts during the compression period (Sébert et al., 1995) and permanent stirring of water close to the electrode. The electrode was calibrated at 0% (sodium sulfite) and 100% air saturated water before testing

each fish at 15°C. The electrode provided one measurement of water O<sub>2</sub> concentration per second with a potential accuracy of ± 0.2 mg.L<sup>-1</sup> (2% of the reading). The accuracy of the MO<sub>2</sub> determination was indicated by the regression coefficient of the slope, R<sup>2</sup>. For all animals, R<sup>2</sup> was between 0.95 and 0.99 under the effect of temperature and between 0.83 and 0.99 under the effect of hydrostatic pressure. After each experimental run, the MO<sub>2</sub> measurement was tested without animals to eliminate the possibility of background O<sub>2</sub> consumption. MO<sub>2</sub> was expressed in mmol of O<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>

HR was measured via electrodes connected to a Biopac MP35 data acquisition system that delivered an electrocardiogram (ECG) signal. Due to the invasive nature of the surgery needed to place the electrodes for HR measurement, a recovery period of at least three days was systematically imposed before the experiments. Several studies have reported that post-instrumentation recovery periods of less than 24 h are not sufficient to obtain resting HR values (Clark et al., 2005; Weber et al., 1998). HR was expressed in beat.min<sup>-1</sup> (abbreviated BPM for beats per minute).

## **2.4 Pressure protocol**

Eels were tested individually in a 5-L experimental aquarium placed in a hyperbaric chamber, as previously described by Sébert et al. (1990). The animal was maintained at atmospheric pressure (0.1 MPa) and at 15°C for one night before the start of the experiment. Temperature (15°C ± 1°C) was kept constant during all pressure experiments. During the experimental period, eels were exposed to high hydrostatic pressure from 0.1 to 10.1 MPa (at 2 MPa steps). The hyperbaric chamber air was compressed at a rate of 0.2 MPa.min<sup>-1</sup>, as described by Sébert et al. (1997). At each pressure step, the water circuit was closed and HR and MO<sub>2</sub> were recorded for 30 min. At the end of the confinement, the partial pressure of oxygen (P<sub>WO<sub>2</sub></sub>) was 15.4 ± 0.43 kPa. The air saturation of the water was ensured before each record by opening the water circuit during each pressure step change. Following exposure to high pressure, the hyperbaric chamber was decompressed at a rate of 0.2 MPa.min<sup>-1</sup>.

## **2.5 Temperature protocol**

Eels were placed one at a time in a 5-L temperature-controlled experimental aquarium full of well-aerated water (P<sub>WO<sub>2</sub></sub> between 23.1 ± 1.6 kPa at 5 ± 0.2°C and 18.3 ± 0.52 kPa at 25 ± 0.4°C) one night before the experiment. The animal rested for 2 hours while the aquarium water was progressively cooled to 5 ± 0.2°C. We exposed each eel to temperature variations from 5 ± 0.2°C

to  $25 \pm 0.4^\circ\text{C}$  (in  $5^\circ\text{C}$  steps). The transition from one temperature to another took 15 min. Thermodynamics shows that 10.1 MPa is equivalent to  $4\text{--}5^\circ\text{C}$  in biological systems (Sébert et al., 1995); therefore, as our pressure protocol needed about 10-15 min for a step change, we used the same duration for the temperature changes.

The electrocardiogram was continuously recorded. At each step, the water inflow was closed and the decrease in  $P_{\text{wO}_2}$  then recorded for 30 min. The  $\text{MO}_2$  was calculated always over the first 10 min. The minimal  $P_{\text{wO}_2}$ , measured at  $25^\circ\text{C}$  at the end of the recording, was  $10.01 \pm 0.63$  kPa. This value was still higher than the critical partial oxygen pressure, which did not exceed 4 kPa in eels in this range of temperatures (Cruz-Neto and Steffensen, 1997; McKenzie et al., 2003; Sébert and Barthélémy, 1985b). Temperature sensitivity was evaluated by calculating  $Q_{10}$  following the equation  $Q_{10} = (R_2/R_1)^{[10/(T_2-T_1)]}$ , where  $R_2$  and  $R_1$  are the parameter values at temperatures  $T_2$  and  $T_1$ , respectively (Dejours, 1981).

## 2.4. Data analysis

Different graphic representations (linear, exponential, logarithmic, or polynomial) were used according to the best correlation obtained. The significance of the correlation coefficient ( $R$ ) was validated by the Pearson test. The  $Q_{10}$  values and  $\text{HR}/\text{MO}_2$  relationship were expressed by the mean  $\pm$  SD. Statistical significance was evaluated with paired Student's  $t$ -tests after testing the distributions for normality (the Lilliefors test). Significance was set at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

An increase in temperature led to an increase in both HR and  $\text{MO}_2$  and a decrease in OP (figures 1a, b and c, respectively). In the range of experimental temperatures ( $5$  to  $25^\circ\text{C}$ ),  $\text{MO}_2$  and HR plotted against temperature revealed exponential relationships ( $y = ae^{bx}$ ) and both regressions were significant ( $R^2 = 0.84$  for HR and  $R^2 = 0.72$  for  $\text{MO}_2$ ,  $P < 0.05$ ).

The  $\text{MO}_2$  increased from approximately  $0.5 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  at  $5^\circ\text{C}$  to  $2.2 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  (figure 1b). For the same range of temperatures, HR also showed increased values from around 10 to 75 BPM (figure 1a). The OP decreased significantly ( $R^2 = 0.37$ ,  $P < 0.05$ ) from approximately  $0.9 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{beat}^{-1}$  to  $0.5 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{beat}^{-1}$  (figure 1c).

The  $Q_{10}$  values for  $\text{MO}_2$ , HR and OP were calculated over temperature changes between  $5\text{--}15^\circ\text{C}$ ,

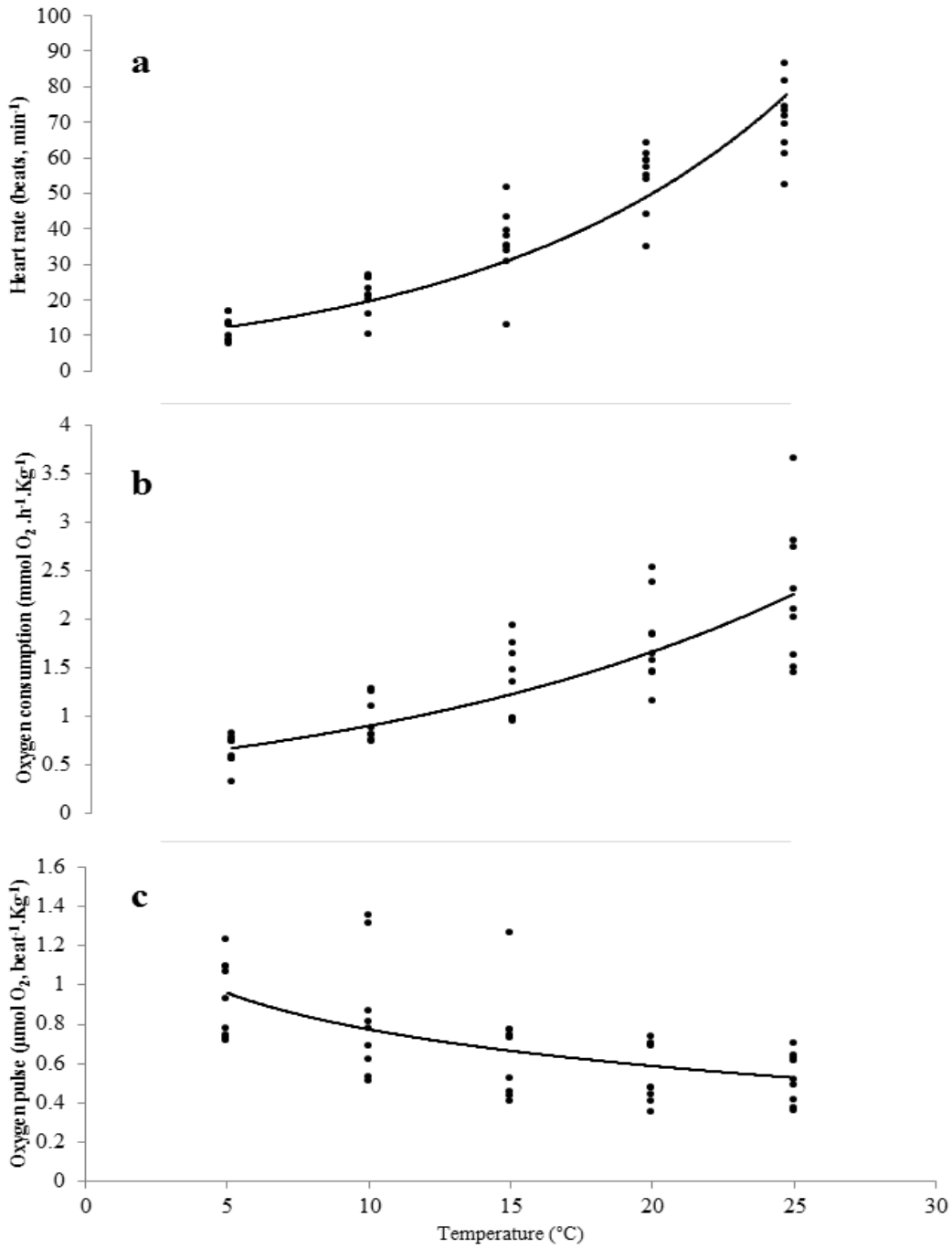


Figure 1: Effect of temperature on: a- heart rate [ $y = 8.366 (\pm 2.791) e^{0.091 (\pm 0.013) x}$ ,  $R^2 = 0.84$ ], b- oxygen consumption rate [ $y = 0.509 (\pm 0.120) e^{0.061 (\pm 0.013) x}$ ,  $R^2 = 0.72$ ], c- oxygen pulse [ $y = 1.071 (\pm 0.257) e^{0.031 (\pm 0.014) x}$ ,  $R^2 = 0.37$ ],  $N = 9$ . All estimated parameters of the equations were significant ( $P < 0.05$ ).

10–20°C and 15–25°C. Figure 2 shows that MO<sub>2</sub> and HR were more sensitive at low than at high temperatures. For HR and MO<sub>2</sub>, the differences between 5–15°C and 15–25°C were significant. By contrast, the Q<sub>10</sub> value for the OP was significantly higher at high temperature than at low temperature. The Q<sub>10</sub> for the 15–25°C interval was close to 1, indicating that OP was globally independent from temperature at that temperature range.

Figure 3 shows HR during the pressure experiment (compression and decompression); this bell curve illustrates the relationship between HR and pressure.

Figures 4a, b and c present the pressure effects on HR, MO<sub>2</sub> and OP, respectively. In the range of experimental pressures used (0.1 to 10.1 MPa), the relationship between MO<sub>2</sub> and pressure was exponential ( $R^2 = 0.82$ ,  $P < 0.05$ ), as was observed for the effects of temperature. However, the relationship between HR and pressure was polynomial ( $R^2 = 0.78$ ,  $P < 0.05$ ), meaning that HR values tended to stabilize progressively at higher pressure. From approximately 8 MPa, HR showed no further increase and remained at about 45 BPM (shown by the horizontal dashed line) even at 10.1 MPa.

Although MO<sub>2</sub> varied from approximately 0.5 mmol.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> at 0.1 MPa to 2 mmol.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> at 10.1MPa, HR changed from 15 BPM to 45 BPM. In contrast to the effects of temperature, the exponential relationship between OP and pressure was positively correlated ( $R^2 = 0.60$ ,  $P < 0.05$ ).

The relationship between HR and MO<sub>2</sub> (expressed as means ± SD in figure 5) under the effects of temperature was linear ( $R^2 = 0.996$ ,  $P < 0.05$ ). Under hydrostatic pressure, HR never exceeded 50 BPM (the vertical dashed line around 50 BPM) and the relationship between HR and MO<sub>2</sub> was exponential ( $R^2 = 0.935$ ,  $P < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Silver European eels *Anguilla anguilla* (L. 1758) have to cope with changes in temperature and hydrostatic pressure encountered during their oceanic spawning migration, which is partly performed at depth (Sébert, 2008). Migration to reach the Sargasso Sea is not only horizontal but also diel vertical. Aarestrup et al. (2009) demonstrated that migrating eels dive into colder waters (6–8°C) during the day and occupy shallow waters at night (12–14°C). Hence, in their natural environment, eels could be exposed to the combined effects of low temperature and high pressure.

Methling et al. (2012) observed an increase in adrenergic tone of the ventricular muscle in

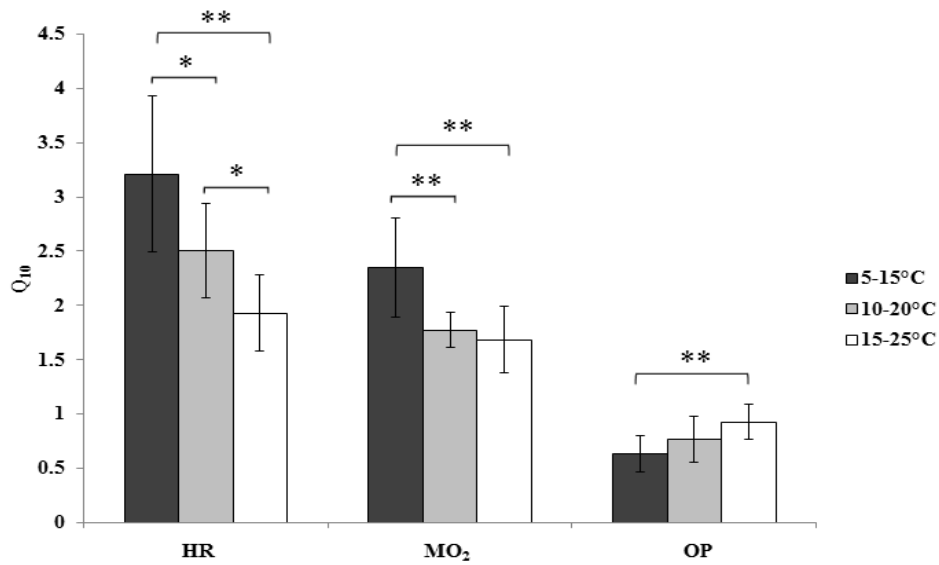


Figure 2:  $Q_{10}$  computed for heart rate, oxygen consumption rate and oxygen pulse measured at three temperature intervals: 5–15°C, 10–20°C and 15–25°C. Plotted values are means  $\pm$  SD, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ,  $N = 9$ .

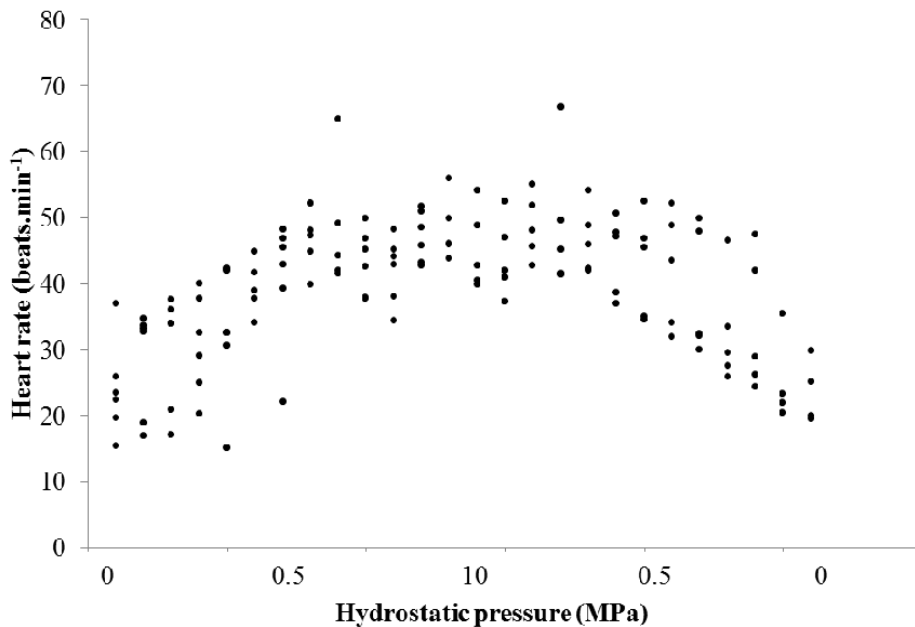


Figure 3: The relationship between the heart rate and hydrostatic pressure [ $y = -0.1533 (\pm 0.05) x^2 + 4.222 (\pm 1.4) x + 18.816 (\pm 7.0)$ ,  $R^2 = 0.545$ . All estimated parameters of the equation were significant ( $P < 0.05$ )],  $N = 7$ . The graphic represents compression and decompression stages.



response to an acute temperature decrease from 20°C to 10°C. They concluded that, at low temperature, the contractile force was maintained to compensate for the decrease in HR while eels performed their diel vertical migrations. In the present study, the main objective was to examine the acute effects of decreasing temperature as well as increasing hydrostatic pressure on European silver eel cardiac convection. Future studies will be performed to investigate the combined effects of temperature and pressure.

During our temperature protocol, the eels were continuously at rest, whereas during the pressure protocol, eels exhibited short intermittent activity mainly during compression and shortly after reaching a pressure around 8 MPa (see the second part of this discussion). Other than during these short periods of activity, the eels were at rest. The chosen experimental ranges of temperature (5 to 25°C) and pressure (0.1 MPa to 10.1 MPa) were determined according to the environmental tolerance range of the European eel (Deelder, 1985; Tesch and Thorpe, 2003).

#### **4.1. Effects of temperature**

Several studies have noted a relation between cardiovascular performance and metabolic rate in adult teleosts. Both HR and  $MO_2$  increase with swimming speed and temperature (Korsmeyer et al., 1997). In the present study, as expected, HR and  $MO_2$  increased exponentially (figure 1a and 1b, respectively) according to temperature between 5°C and 25°C (figure 1a and 1b). The  $MO_2$  versus HR relationship (figure 5) also showed a good correlation ( $R^2 = 0.996$ ,  $P < 0.05$ ), indicating that, at least under these experimental conditions (resting animal and temperature range), one parameter can be used to predict the other. As expected, HR and  $MO_2$  showed global  $Q_{10}$  values between two and three (Gehrke and Fielder, 1988). Both physiological processes were more sensitive to temperature variations in the low temperature range and HR was more sensitive than  $MO_2$  (figure 2), but the difference in sensitivity between HR and  $MO_2$  decreased in the high temperature range.

In a previous study, European silver eels acclimated for one week showed a  $Q_{10}$  value of about 2.1 in the 18–24°C range (estimated from the  $MO_2$  values of Degani et al., 1989). This value is close to the  $Q_{10} 1.7 \pm 0.3$  calculated in the present study. In the same manner, Scaion et al. (2008) and Methling et al. (2013) showed, after one day and four weeks of acclimation, respectively, a decrease in temperature sensitivity in the high temperature range (from 4.1 at 9–15°C to 1.4 at 15–22°C and from 3.5 at 0–10°C to 1.8 at 10–20°C, respectively). Note that after an acute temperature change, we obtained comparable sensitivity for  $MO_2$  (from 2.4 at 5–15°C to 1.7 at 15–25°C). Consequently, even if acclimation and the acute effects of temperature occur on

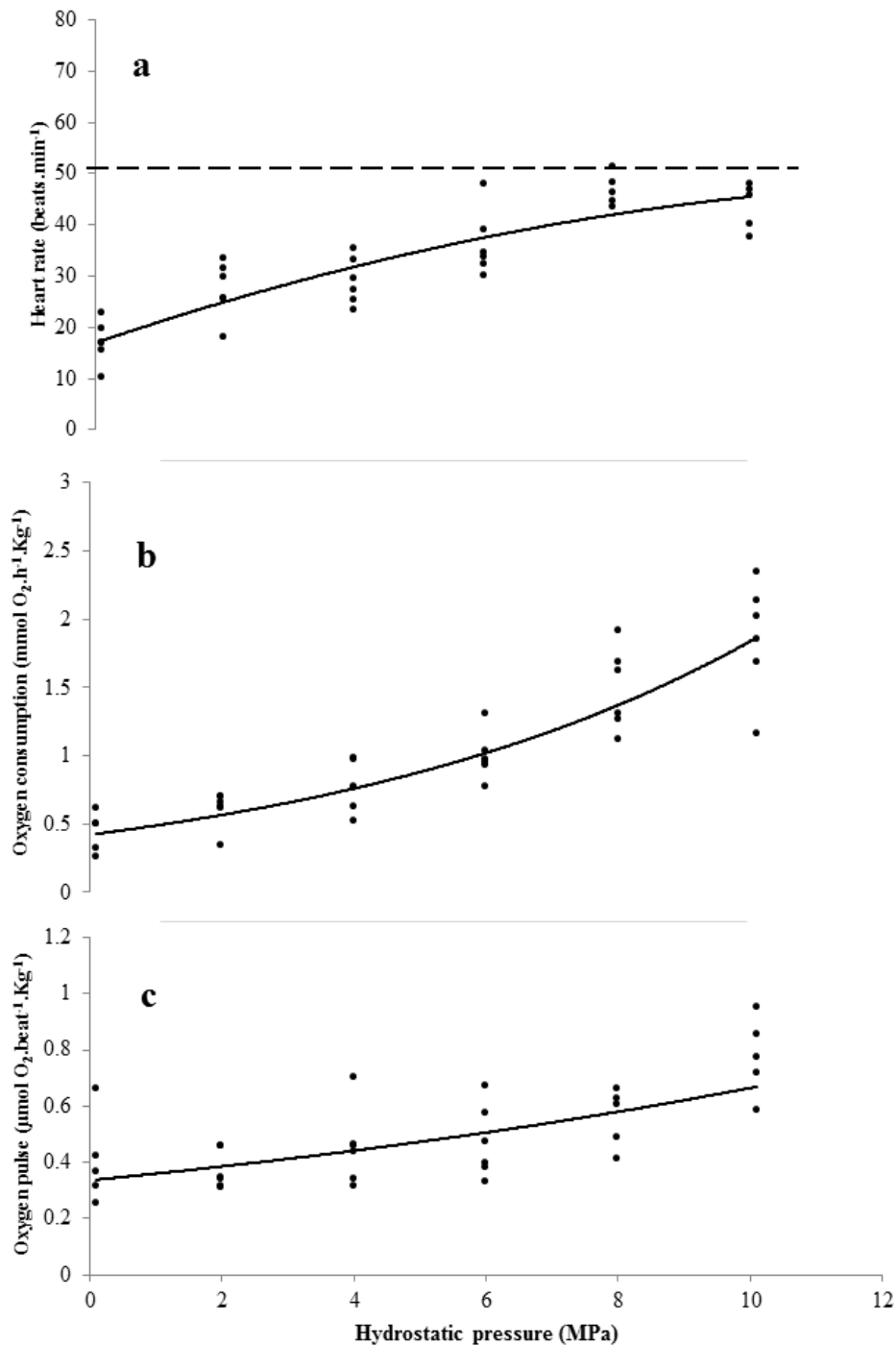


Figure 4: Influence of hydrostatic pressure on: a- heart rate [ $y = -0.187 (\pm 0.227) x^2 + 4.51 (\pm 2.34) x + 16.84 (\pm 4.69)$ ,  $R^2 = 0.78$ ,  $N = 6$  except for 8.1 and 10.1MPa where  $N = 5$ ], b- oxygen consumption rate [ $y = 0.4197 (\pm 0.12) e^{0.149 (\pm 0.048) x}$ ,  $R^2 = 0.82$ ,  $N = 6$  except for 0.1 MPa where  $N = 5$ ] and c- oxygen pulse [ $y = 0.3852 (\pm 0.12) e^{0.068 (\pm 0.018) x}$ ,  $R^2 = 0.60$ ,  $N = 6$  except for 8.1 and 10.1 MPa where  $N = 5$ ]. All estimated parameters of the equations were significant ( $p < 0.05$ ). The dashed line represents the value that heart rate does not exceed (around 50 BPM).

different time scales, our findings indicate some similitudes for  $MO_2$  in studies on European eels using a similar range of temperatures.

In the same manner, our data for metabolic rate are comparable with those of similar studies. Methling et al. (2011) reported a standard metabolic rate around  $0.9 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  at  $10^\circ\text{C}$  in female eels maintained in seawater. Our  $MO_2$  data are similar ( $0.98 \pm 0.23 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) to those of eels maintained in fresh water ( $10^\circ\text{C}$ ). Scaion et al. (2005) also measured  $MO_2$  around  $0.8 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ , at  $15^\circ\text{C}$  (fresh water).

Compared with  $MO_2$  and HR, the OP in our study suggests a decreasing relationship with temperature, and the  $Q_{10}$  values reveal a different sensitivity in the low range of temperatures. The OP is greater at low temperature, as noted in other species such as Murray cod (Clark et al., 2005). Graham and Farrell (1985) also showed that adrenergic activation, which participates in cardiac control, was less at higher temperatures. A number of studies suggested that teleosts, mainly salmonids, modulate cardiac output through changes in Vs rather than HR. Methling et al. (2012) showed, in the eel, that the increase in adrenergic tone acts as a compensatory mechanism at low temperatures and that cardiac performance is modulated via inotropic rather than chronotropic adjustments. Hence, on the basis of Fick's relation, the high OP concomitant to low HR at low temperature ( $5\text{--}10^\circ\text{C}$ ) confirms an increase in contractile force of the ventricular myocardium to maintain cardiac output, as reported *in vitro* by Methling et al. (2012). These responses could potentially reflect an adaptive strategy for minimizing energy expenditure during eel migration, as reported in carp concerning their life period in extreme winter conditions (Tiitu and Vornanen, 2001).

#### **4.2. Effects of hydrostatic pressure**

Eels were subjected to compression ( $0.2 \text{ MPa per min}$ ) up to  $10.1 \text{ MPa}$ . Clearly, the effects induced by stress linked to the compression and decompression protocol can only be isolated from those of hydrostatic pressure *per se* with substantial difficulty. However, this effect related to pressure is illustrated by the bell curve generated when HR is related to both periods of compression and decompression (figure 3). Previous experiments in eels treated with atropine (anticholinergic drug) and in isolated hearts treated with propranolol (noradrenergic beta blocker) showed a specific effect of compression (Belaud et al., 1976).

In the present study, eels submitted to compression exhibited increase both in  $MO_2$  and in HR, but with exponential and logarithmic forms, respectively (figure 2b and 2a, respectively). For example, if the same value of  $MO_2$  ( $1.8 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) was obtained during the temperature

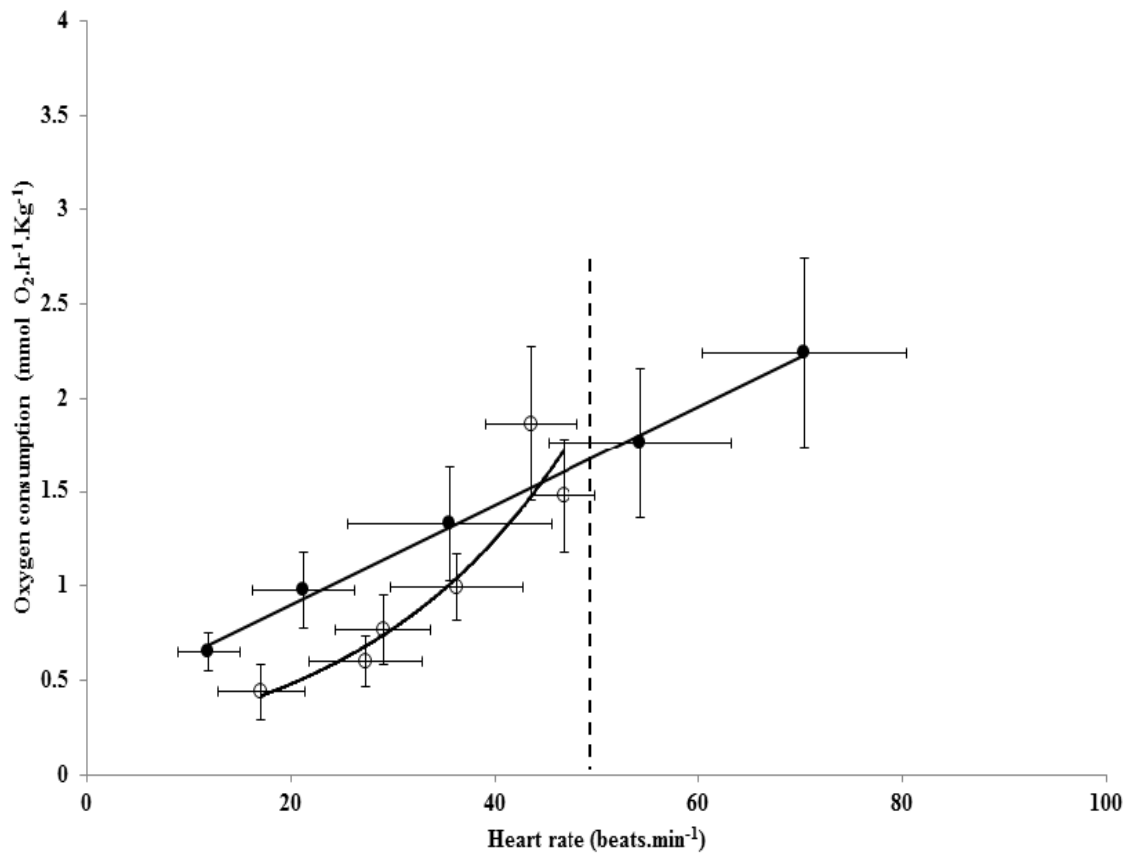


Figure 5: The relationship between heart and oxygen consumption rates in response to changes in temperature (○) and hydrostatic pressure (●). Values correspond to the average  $\pm$  SD.  $N = 9$ ,  $R^2 = 0.996$  for temperature and  $N = 6$ ,  $R^2 = 0.935$  for hydrostatic pressure except for 8.1 and 10.1 MPa where  $N = 5$ . Under pressure, as under temperature conditions, each value was significantly different from the other values ( $P < 0.05$ ). The dashed line represents the value (around 50 BPM) that the heart rate does not exceed in response to the hydrostatic pressure effect.

protocol at 20°C and during the pressure protocol at 10.1 MPa, the related HR were different (respectively 60 and 46 BPM). Therefore, at high hydrostatic pressure, HR does not exceed the barrier of 50 BPM, as shown in yellow eels by Sébert and Barthélémy (1985a). This barrier is illustrated in figure 4a (the horizontal dashed line) and in figure 5 (the vertical dashed line). This HR barrier (around 8 MPa) could correspond to the pressure threshold that matches the pressure at which the eel begins to have seizures, which was 7.9 MPa at 22°C in female eels (Scaion et al. 2008). The stagnation of HR translates to an inhibitory chronotrope effect, which could be explained through vagal activation or through the release of catecholamines (mainly norepinephrine and epinephrine) from the chromaffin tissue and adrenergic nerve endings. Indeed, exposure to 10.1 MPa for one hour does not modify catecholamine content in the heart; however, a decrease in beta agonist effect has been highlighted suggesting a lower sensitivity of the receptors at high pressure (Sébert and Barthelemy, 1985a).

An exponential increase in OP related to pressure (figure 4c) is observed when OP decreased related to temperature (figure 1c). According to the Fick's relation, a modification in  $MO_2$  with unchanged HR could arise due to a change in the VS and/or the difference in oxygen content between arterial and venous blood. The difference between  $CaO_2$  and  $CvO_2$  is assumed to be unchanged under pressure. This has been shown in fish such as trout (although these are less resistant to high pressure), where  $CaO_2$  is not changed when the fish is subjected to a pressure of about 10.1 MPa (Sébert et al., 1987). Inotropic adjustments could be established to compensate for the negative chronotropic effect at high pressure. Therefore, at high pressure, when the HR remains stable, the contractile heart strength increases to maintain cardiac output.

These observed effects of pressure on metabolic rate and HR are related to thermodynamics, illustrated by the equations of Clapeyron-Clausius and Johnson-Eyring (Johnson and Eyring, 1970). In the same way as temperature does, pressure can modify enzyme kinetics, membrane fluidity and, more generally, the structure and/or function of macromolecules. For example, in mammals, hydrostatic pressure inhibits synaptic activity and transmission, probably by action on  $Ca^{2+}$  movements and ion conductance (Friedrich et al., 2002). In the same manner, in pressure-adapted fish such as the silver eel (Gennser et al., 1990), pressure increased the twitch tension in cardiac muscle, probably through an enhanced intracellular calcium content following the action potential (Ranatunga and Geeves, 1991)

In the context of eel migration partly performed at depth, potential interaction between temperature and hydrostatic pressure must be considered. Hydrostatic pressure acts differently on  $MO_2$ , HR and heart twitch at low or high temperature (Belaud et al., 1976; Gennser et al., 1990; Sébert et al., 1984). According to Scaion and Sébert (2008), a specific temperature/pressure combination optimizes energy metabolism. Indeed, during long-term

exposure at high pressure (10.1 MPa over 31 days), the  $MO_2$  decreased exponentially with time after compression (1.4 days) and at a lower level than observed at atmospheric pressure (Simon et al., 1989). These studies therefore indicate that the best conditions in terms of energy economy for transoceanic migration are high hydrostatic pressure and low temperature.

In the present experiment, we exposed eels to rapid changes in pressure (at a temperature around 15°C), an environment probably closer to those encountered during diel vertical migration than those used in previous research. Aarestrup et al. (2009) demonstrated that eels predominantly moved between depths of 200 meters (2.1 MPa) and 1000 meters (10.1MPa), with an average temperature variation of 11°C. Our results show that, during acute decreases in temperature or increases in pressure, the eel maintains its cardiac output despite the HR decrease with temperature or HR stability with high pressure. This occurs most likely through an increase in myocardium contractile force. In this preliminary study, we did not test different acute combined effects of temperature and hydrostatic pressure on cardiac convection, which complicates drawing any conclusions regarding whether cardiac output at depth (1000 m) and low temperature (5–10°C) would be maintained by positive inotropy. In future investigations, in order to bring conditions closer to those of migration and to perform the necessary experiments to answer this question (re: acclimation and acute exposure), examination of cardiac convection in silver eels acclimated for several weeks to diel changes in high pressure and low temperature could provide important insights.

In summary, our results obtained *in vivo* under conditions of high hydrostatic pressure confirm those obtained *in vitro* at low temperature by Methling et al. (2012) and demonstrate the importance of including a factor such as pressure when interpreting physiological processes in the silver eel. This study also confirms the remarkable ability of the silver European eel to regulate its cardiac function (Imbrogno, 2013) and maintain cardiac output in the face of the acute temperature and/or pressure fluctuations encountered during its long transoceanic migration performed partly at depth.

### **Acknowledgment**

We would like to thank Helen McCombie-Boudry of the Bureau de Traduction de l'Université (BTU) of the University of Western Brittany, Brest, France for her assistance with the improvement of the English in this article.

## References

- Aarestrup, K., Økland, F., Hansen, M. M., Righton, D., Gargan, P., Castonguay, M., Bernatchez, L., Howey, P., Sparholt, H., Pedersen, M. I., McKinley, R. S., 2009. Oceanic spawning migration of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Science*. 325, 1660-1660.
- Armstrong, J.D.,1998. Relationships between heart rate and metabolic rate of pike: integration of existing data. *J. Fish Biol.* 52, 362–368.
- Barrionuevo, W.R., Burggren, W.W.,1999. O<sub>2</sub> consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276, 505–513.
- Belaud, A., Barthelemy, L., Le Saint, J., Peyraud, C., 1976. Trying to explain an effect of “per se” hydrostatic pressure on heart rate in fish. *Aviat. Space Environ. Med.* 47, 252–257.
- Biltonen, R.L.,1990. A statistical-thermodynamic view of cooperative structural changes in phospholipid bilayer membranes: their potential role in biological function. *J. Chem. Thermodyn.* 22, 1–19.
- Claireaux, G., Webber, D., Kerr, S., Boutilier, R.,1995. Physiology and behaviour of free-swimming Atlantic cod (*Gadus morhua*) facing fluctuating temperature conditions. *J. Exp. Biol.* 198, 49-60.
- Clark, T.D., Ryan, T., Ingram, B.A., Woakes, A.J., Butler, P.J., Frappell, P.B., 2005. Factorial Aerobic Scope Is Independent of Temperature and Primarily Modulated by Heart Rate in Exercising Murray Cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Physiol. Biochem. Zool.* 78, 347–355.
- Cruz-Neto, A.P., Steffensen, J. F., 1997. The effects of acute hypoxia and hypercapnia on oxygen consumption of the freshwater European eel. *J. Fish Biol.* 50, 759-769.
- Deelder, C.L. (1970). Synopsis of biological data on the eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). *FAO fish. Synop.*, 80, rev 1.
- Degani, G., Gallagher, M. L., Meltzer, A., 1989. The influence of body size and temperature on oxygen consumption of the European eel, *Anguilla anguilla*. *J. Fish Biol.* 34, 19-24.
- Dejours, P., 1981. *Principles of Comparative Respiratory Physiology*, second ed. Elsevier, Amsterdam.
- Durif, C., Elie, P., Dufour, S., Marchelidon, J., Vidal, B., 2000. Analyse des paramètres morphologiques et physiologiques lors de la préparation à la migration de dévalaison chez l’anguille européenne (*Anguilla anguilla*) du lac de Grand-Lieu (Loire-Atlantique). *Cybium*. 24, 63–74.
- Durif, C., Dufour, S., Elie, P., 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J. Fish Biol.* 66, 1025–1043.

Farrell, A.P., Wood, S., Hart, T., Driedzic, W.R., 1985. Myocardial oxygen consumption in the sea raven, *Hemitripterus americanus*: the effects of volume loading, pressure loading and progressive hypoxia. *J. Exp. Biol.* 117, 237–250.

Fick, A., 1870. Über die Messung des Blutquantums in den Herzventrikeln. *Verh. Phys. Med. Ges. Würzburg.* 2, 16.

Friedrich, O., Kress, K.R., Ludwig, H., Fink, R.H., 2002. Membrane ion conductances of mammalian skeletal muscle in the post-decompression state after high-pressure treatment. *J. Membr. Biol.* 188, 11-22.

Fry, F.E.J., 1971. The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish, in: Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 1–98.

Gehrke, P.C., Fielder, D.R., 1988. Effects of temperature and dissolved oxygen on heart rate, ventilation rate and oxygen consumption of spangled perch, *Leiopotherapon unicolor* (Günther 1859), (Percoidei, Teraponidae). *J Comp. Physiol. B.* 157, 771–782.

Gennser, M., Karpe, F., Ch. Örnhagen, H., 1990. Effects of hyperbaric pressure and temperature on atria from ectotherm animals (*Rana pipiens* and *Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.* A. 95, 219–228.

Graham, M., Farrell, A., 1985. The seasonal intrinsic cardiac performance of a marine teleost. *J. Exp. Biol.* 118, 173–183.

Imbrogno, S., 2013. The eel heart: multilevel insights into functional organ plasticity. *J. Exp. Biol.* 216, 3575-3586.

Johnson, F. H., Eyring, H., 1970. The kinetic basis of pressure effects in biology and chemistry. In: Zimmerman A.M. (Eds.), *High Pressure Effects on Cellular Processes*. Academic press, New York, pp. 1-44.

Korsmeyer, K.E., Lai, N.C., Shadwick, R.E., Graham, J.B., 1997. Heart rate and stroke volume contribution to cardiac output in swimming yellowfin tuna: response to exercise and temperature. *J Exp Biol.* 200, 1975–1986.

Lefrancois, C., Claireaux, G., 2003. Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope and scope for heart rate in the common sole *Solea solea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259, 273–284.

McKenzie, D.J., Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Taylor, E.W., Bolis, C.L., Steffensen, J.F., 2003. Tolerance of chronic hypercapnia by the European eel *Anguilla Anguilla*. *J. Exp. Biol.* 206, 1717-1726.

Methling, C., Tudorache, C., Skov, P. V., Steffensen, J. F., 2011. Pop up satellite tags impair swimming performance and energetics of the European eel (*Anguilla anguilla*). *PLoS ONE.* 6, e20797.



Methling, C., Steffensen, J.F., Skov, P.V., 2012. The temperature challenges on cardiac performance in winter-quiescent and migration-stage eels *Anguilla anguilla*. *Comp. Bioch. Physiol. A*. 163, 66–73.

Methling, C., 2013. Cardio-respiratory Physiology of the European Eel (*Anguilla anguilla*) in Extreme Environments. Faculty of science, University of Copenhagen. Academic advisors: John F. Steffensen and Peter V. Skov. PhD thesis.

Pankhurst, N. W. 1982. Changes in body musculature with sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J. Fish Biol.* 21, 417-428.

Ranatunga, K. W., Geeves, M. A., 1991. Changes produced by increased hydrostatic pressure in isometric contractions of rat fast muscle. *J. Physiol.* 441, 423-431

Scaion, D., Vettier, A., Sébert, P., 2005. Pressure and temperature interactions on aerobic metabolism in migrating silver eels: results in vitro. *Undersea Hyperb. Med.* 35, 27–33.

Scaion, D., Sébert, P., 2008. Glycolytic fluxes in European silver eel, *Anguilla anguilla*: sex differences and temperature sensitivity. *Comp. Bioch. Physiol. A*. 151, 687–90.

Scaion, D., Belhomme, M., Sébert, P., 2008. Pressure and temperature interactions on aerobic metabolism of migrating European silver eel. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 319–22.

Sébert, P., Le Bras, Y.M., Barthelemy, L., Peyraud, C., 1984. Effects of high hydrostatic pressure on catecholamine contents in tissues of the eel acclimatized at two temperatures. *Aviat. Space Environ. Med.* 55, 931–934.

Sébert, P., Barthélémy, L., 1985a. Hydrostatic pressure and adrenergic drugs (Agonists and Antagonists): Effects and interactions in fish. *Comp. Bioch. Physiol. C* 82, 207–212.

Sébert, P., Barthélémy, L., 1985b. Effects of high hydrostatic pressure per se, 101 atm on eel metabolism. *Resp. Physiol.* 62, 349-357.

Sébert, P., Barthélémy, L., Caroff, J., Hourmant, A., 1987. Effects of hydrostatic pressure per se (101 ATA) on energetic processes in fish. *Comp. Bioch. Physiol. A* 86, 491–5.

Sébert, P., Barthélémy, L., Simon, B., 1990. Laboratory system enabling long-term exposure ( $\geq 30$  d) to hydrostatic pressure ( $\leq 101$  atm) of fishes or other animals breathing water. *Mar. Biol.* 104, 165–168.

Sébert, P., Simon, B., Barthélémy, L., 1995. Effects of a temperature increase on oxygen consumption of yellow freshwater eels exposed to high hydrostatic pressure. *Exp. Physiol.* 80, 1039–1046.

Sébert, P., Simon, B., Pequeux, A., 1997. Effects of hydrostatic pressure on energy metabolism and osmoregulation in crab and fish. *Comp. Bioch. Physiol. A* 116, 281–290.

Sébert, P., 2002. Fish at high pressure: a hundred year history. *Comp. Bioch. Physiol. A* 131, 575–585.

- Sébert, P., 2003. Fish adaptations to pressure. In: Val A.L. and Kapoor B.G. (Eds.) Fish adaptations. Science Publishers, Enfield. pp 73-95.
- Sébert, P., 2008. Fish muscle function and pressure. In: Sébert, P., Onyango, D. W., Kapoor, B.G., (Eds.) Fish life in special environments. Science Publisher, Enfield. pp 233-256.
- Siebenaller, J.F., Somero, G.N., Haedrich, R.L., 1982. Biochemical characteristics of macrourid fishes differing in their depths of distribution. *Biological Bulletin* 163, 240–249.
- Simon, B., Sébert, P. and Bartélémy, L., 1989. Effects of long term exposure to hydrostatic pressure per se (10.1 MPa) on eel metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 1247–1251.
- Somero, G.N., 1978. Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 9, 1–29.
- Tesch, F.-W., Thorpe, J.E., 2003. The eel. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Thorarensen, H., Gallagher, P.E., Farrell, A.P., 1996. The limitations of heart rate as a predictor of metabolic rate in fish. *J. Fish Biol.* 49, 226–236.
- Tittu, V., Vornanen, M., 2001. Cold adaptation suppresses the contractility of both atrial and ventricular muscle of the crucian carp heart. *J. Fish Biol.* 59, 141–156.
- Webber, D.M., Boutilier, R.G., Kerr, S.R., 1998. Cardiac output as a predictor of metabolic rate in cod *gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* 201, 2779–2789.

# Résumé

## Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène : effets du genre et de l'entraînement en endurance chez le rat Wistar et l'anguille européenne

La mitochondrie est le siège principal de la production d'énergie sous forme d'ATP en conditions aérobies, mais aussi d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS). La fonction mitochondriale est étroitement liée à la production de ROS puisque ces derniers, selon leur taux, peuvent altérer ou optimiser le rendement énergétique. La plasticité structurale et fonctionnelle de la mitochondrie est essentielle au maintien de l'homéostasie dans toute situation qui nécessite des ajustements métaboliques comme l'exercice physique. Les mécanismes adaptatifs de la fonction mitochondriale et des ROS lors de l'entraînement sont encore loin d'être élucidés ainsi que l'impact du genre sur ces réponses. Dans cette perspective, deux modèles animaux (rat Wistar et anguille européenne) ont été choisis.

Les effets d'un entraînement en endurance de même intensité (70% de la vitesse maximale aérobie de course ou de nage) ont été étudiés chez le rat Wistar et l'anguille européenne argentée. Cette dernière est une espèce endurente capable d'effectuer une migration de reproduction de 6000 km et caractérisée par un dimorphisme sexuel de taille. Des mesures *in vitro* de la consommation d'oxygène, la production radicalaire et d'ATP ont été effectuées simultanément à partir de fibres perméabilisées de cœur et de muscle squelettique. La vulnérabilité ou résistance de la fonction mitochondriale à l'exposition à un système générateur de ROS (mimant un stress oxydant) a également été étudiée.

Avant entraînement, chez le rat Wistar, la femelle présente une fonction mitochondriale plus efficiente énergétiquement et plus résistante aux ROS, alors que chez l'anguille, ce profil métabolique et radicalaire est plutôt observé chez le mâle. Après entraînement, quelle que soit l'espèce, la meilleure performance physique observée s'accompagne de modifications métaboliques et radicalaires différentes selon le genre et l'espèce. Chez le rat, l'amélioration de la fonction mitochondriale se traduit différemment selon le sexe. Chez le mâle, l'entraînement induit une amélioration du rendement énergétique via un meilleur couplage entre oxydation et phosphorylation et/ou une meilleure utilisation des électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Chez la femelle, l'augmentation de la production d'ATP serait liée à l'augmentation de la consommation d'oxygène mitochondriale. Comme chez le rat, l'entraînement induit globalement chez l'anguille une amélioration du rendement énergétique et de la résistance de la fonction mitochondriale aux ROS, mais uniquement chez le mâle.

L'ensemble de ces résultats montre des réponses métaboliques et radicalaires dépendantes du genre. Quelle que soit l'espèce, l'entraînement semble être chez le mâle plus bénéfique que chez la femelle en termes d'efficacité énergétique mitochondriale et de résistance de la fonction mitochondriale à un stress oxydant. Dans le contexte de la migration de l'anguille, ces adaptations permettraient au mâle, largement plus petit que la femelle, une efficacité de nage supérieure, permettant leur synchronisation d'arrivée sur le lieu de reproduction.

Les similitudes interspécifiques de réponse à l'entraînement selon le genre confortent l'intérêt d'utilisation du modèle poisson dans le champ de la physiologie de l'exercice.

**Mots clés :** Rat Wistar ; Anguille européenne ; Genre ; Modèle poisson ; Entraînement de type endurance ; Fonction mitochondriale ; ROS.