



HAL
open science

Réponses du métabolisme mitochondrial musculaire à la chaleur lors d'une exposition aiguë ex vivo et après une acclimatation associée à un entraînement en endurance

Pierre-Emmanuel Tardo-Dino

► To cite this version:

Pierre-Emmanuel Tardo-Dino. Réponses du métabolisme mitochondrial musculaire à la chaleur lors d'une exposition aiguë ex vivo et après une acclimatation associée à un entraînement en endurance. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1050 . tel-03278517

HAL Id: tel-03278517

<https://theses.hal.science/tel-03278517v1>

Submitted on 29 Mar 2022

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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1050

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 205
Ecole doctorale interdisciplinaire sciences et santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, Biologie, Santé
Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 30/06/2020, par :
Pierre-Emmanuel Tardo-Dino

**Réponses du métabolisme mitochondrial
musculaire à la chaleur lors d'une exposition
aiguë ex vivo et après une acclimatation associée
à un entraînement en endurance**

Devant le jury composé de :

Rapporteurs

Messonnier Laurent, Professeur, Université Savoie Mont Blanc, Chambéry

Thomas-Junius Claire MCU, PhD, Université d'Evry

Examineurs

Richard Ruddy Professeur, MD, PhD, CHU Clermont-Ferrand

Roussel Damien MCU, PhD UMR 5023 Lyon

Directrice de thèse

Koulmann Nathalie Professeure, MD, PhD, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny

Encadrante

Malgoyre Alexandra MD, PhD Institut de Recherche Biomédicale des armées, Brétigny

Invité

Veksler Vladimir, Professeur, Faculté de Pharmacie Paris-Sud INSERM

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

ÉCOLE DU VAL DE GRACE

A Monsieur le médecin général Humbert BOISSEAUX

Directeur de l'École du Val-de-Grâce

Professeur agrégé du Val-de-Grâce

Officier de la Légion d'honneur

Officier dans l'Ordre National du Mérite

Chevalier de l'Ordre des Palmes académiques

Je tiens à vous remercier, **Madame la Professeure Nathalie KOULMANN**, pour votre encadrement, votre soutien, vos conseils, votre rigueur, votre bienveillance et sans qui je ne serais pas ici aujourd'hui. Veuillez trouver ici l'expression de mon immense gratitude et de mon profond respect.

Au **Docteur Alexandra MALGOYRE**, pour ton soutien dans ce travail, tes précieuses recommandations et tes connaissances, qui m'ont permis de progresser dans la réalisation de ce travail. Ton dynamisme, ta curiosité et ton esprit épris de sciences m'ont beaucoup aidé. Je te remercie pour m'avoir accompagné et encouragé.

Je remercie également **Monsieur le Professeur Ruddy RICHARD**, pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail et votre expertise dont il veut bien nous faire profiter.

Merci à **Monsieur le Professeur Vladimir VEKSLER**, pour nous avoir accueillis au sein de votre laboratoire à Châtenay-Malabry et pour vos précieux conseils mitochondriaux.

Je remercie **Madame Claire THOMAS-JUNIUS**, qui nous a accueillis à l'université d'Evry et pour avoir accepté d'être rapporteure de ce travail.

Je remercie **Monsieur le professeur Laurent MESSONNIER** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie **Monsieur Damien ROUSSEL** qui a accepté de siéger dans ce jury.

À **Cyprien et Fabien**, mes chers anciens et amis, merci pour votre soutien et votre compagnonnage, j'en ai été touché.

À toute l'**unité PEACE**, un grand merci, pour l'ambiance studieuse et conviviale que vous créez tous les jours, j'ai hâte de réaliser de nouveaux projets avec vous. Cette équipe est vraiment pleine de ressources.

Merci à **Julien** un plaisir de travailler ensemble, tu as beaucoup contribué au bon déroulement des expérimentations.

Merci à **Keyne** pour ton aide précieuse dans la finalisation de ce manuscrit, et tes conseils toujours appréciés, merci de nous faire profiter de tes talents, avec bonne volonté.

À **Stéphanie et Stéphane** pour toutes ces heures à la paillasse, merci et ça ne fait que commencer.

À **Pierre**, cher camarade, ton tour approche, et je te souhaite une belle réussite.

À **Benoît** pour ton état d'esprit, ton égale bonne humeur et au plaisir de travailler ensemble.

À **Philippe**, merci pour ton aide et ton entrain.

À **Caroline**, de retour parmi nous.

À **Sebastian, Emeric, Walid** pour votre soutien.

À **Mme Dequirez**, merci de toute l'aide que vous donnez à notre équipe.

À **Cyrus**, tant d'années, toujours présent.

À **Carine**, les mots sont insuffisants, merci pour ton soutien de tous les instants, ton amour, ta force et ta joie de vivre. Merci de ta compréhension et de ta patience.

À **Armand**, mon autre joie de vivre, que la vie te sourit.

À **Maman**, merci pour ton soutien et ton amour.

À **François-Marie**, mon frère, ancré en Chine.

À **Marion**, ma sœur, qui le vaut bien, **Mathieu, Emile et Solal**.

Et à toute **ma famille**, par monts et par mer.

À **Roselyne et Patrick**, merci pour votre soutien.

À **Christelle, Julien, Léna, Nino, Stéphanie, Mathieu, Ethan, Jean-Christophe et Anthony**.

À **Papa...**

RÉSUMÉ

Les effets de la chaleur ont été étudiés sur la fonctionnalité mitochondriale de fibres perméabilisées de soleus de rat, dans deux situations différentes. Nous avons comparé une exposition aiguë à deux températures, 35 et 40°C, pour l'oxydation du pyruvate et du palmitoyl-CoA. La chaleur a entraîné une diminution du couplage de la phosphorylation oxydative spécifique pour l'acide gras, médiée par la protéine découplante UCP3, indépendamment d'un stress oxydatif ou d'une altération structurelle. Ainsi, l'utilisation préférentielle des glucides à la chaleur pourrait être au moins en partie due à une altération de l'oxydation des lipides. Dans la seconde étude, nous avons étudié l'effet de l'acclimatation à la chaleur sur les réponses mitochondriales à l'entraînement en endurance. Seul l'entraînement en endurance a induit une augmentation du contenu mitochondrial et des capacités oxydatives mitochondriales. Aucun effet de l'acclimatation à la chaleur n'a été observé sur l'oxydation des lipides ou l'expression de UCP3. En revanche, la limitation par l'acclimatation à la chaleur de l'augmentation des capacités d'oxydation des glucides induites par l'entraînement en endurance interroge sur un frein de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie. De plus, l'entraînement en endurance et l'acclimatation à la chaleur ont induit une augmentation synergique des réserves en glycogène. L'acclimatation à la chaleur pourrait également induire des adaptations du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale et en optimiser la sensibilité à l'oxygène. Ces résultats évoquent un profil glycolytique hypoxia-like.

Mots-clés : Chaleur, acclimatation à la chaleur, entraînement en endurance, respiration mitochondriale, métabolisme, muscle squelettique, découplage, stress oxydatif.

ABSTRACT

The effects of heat on mitochondrial function was studied in permeabilized fibers of rat soleus, in two different situations. We compared acute exposure at two temperatures, 35 and 40°C, on the oxidation of pyruvate and palmitoyl-CoA. Heat-induced a decrease in coupling of oxidative phosphorylation specifically for fatty acid, mediated by the uncoupling protein UCP3, regardless of any oxidative stress or structural alteration. Thus, carbohydrates preferred use at heat could partly be, at least, due to impaired lipid oxidation. In the second study, we investigated the effect of heat acclimation on mitochondrial responses to endurance training. Only endurance training led to an increase in mitochondrial content and mitochondrial oxidative capacities. No effect of heat acclimation was observed on lipid oxidation or on the expression of UCP3. However, heat acclimation-induced limitation of training-induced increase in carbohydrate oxidation capacities raises questions about a brake on the entry of pyruvate into the mitochondria. In addition, endurance training and heat acclimation led to a synergistic increase in glycogen stores. Heat acclimation could also induce adaptations of the IV complex of the mitochondrial respiratory chain and optimize its sensitivity to oxygen. These results suggest a hypoxia-like glycolytic profile.

Keywords : heat acclimation, endurance training, mitochondrial respiration, skeletal muscle metabolism cross-tolerance fatty acid; heat; mitochondrial uncoupling; oxidative stress; skeletal muscle

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	5
RÉSUMÉ	7
ABSTRACT	8
TABLE DES MATIÈRES	9
ABREVIATIONS	13
LISTE DES ANNEXES	14
LISTE DES FIGURES ET TABLES	15
INTRODUCTION.....	17
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	20
I. Généralités sur le métabolisme énergétique	20
1. <i>Les filières</i>	20
a. Métabolisme glucidique.....	20
La glycolyse	21
Devenir du pyruvate	22
Régulation du métabolisme glucidique.....	23
b. Métabolisme lipidique	25
Les transporteurs membranaires des AG sur le sarcolemme	25
Transport mitochondrial des AG	26
La beta-oxydation	28
Régulation de l'oxydation des lipides.....	29
2. <i>Respiration mitochondriale</i>	31
a. Cycle de Krebs (fourniture de l'Acétyl-CoA).....	31
b. Chaîne respiratoire mitochondriale (CRM)	32
c. Déterminants du couplage.....	36
Le couplage de la phosphorylation oxydative	36
La chaîne respiratoire mitochondriale	37
La phosphorylation	38
3. <i>Régulation du métabolisme énergétique</i>	38
a. La disponibilité en substrats.	39
b. La régulation hormonale	40
Insuline/glucagon.....	40
Adrénaline.....	41
c. La régulation mitochondriale	41
Cycle de Randle.....	41
Les étapes clé de l'utilisation du choix du substrat :	42
Régulation du transport des AG dans la mitochondrie.....	42
Rôle central de la PDH dans la balance AG-glucose.....	43

II.	Effets aigus de la chaleur sur le métabolisme énergétique et la mitochondrie	45
1.	<i>Métabolisme glucidique</i>	46
a.	La glycémie.....	46
b.	Utilisation du glucose par le muscle exposé à la chaleur	48
2.	<i>Balance glucido-lipidique</i>	51
3.	<i>Effets de la chaleur sur la mitochondrie.....</i>	54
a.	Chaleur et espèces radicalaires de l'oxygène.....	55
b.	Thermosensibilité mitochondriale	59
4.	<i>Hypothèses mécanistiques des perturbations induites par la chaleur</i>	61
a.	Mécanisme catécholaminergique.....	61
b.	Effet local de la température	63
	Effet Q10.....	63
	Effets de la chaleur sur les propriétés contractiles	64
5.	<i>Influence de l'exposition aiguë à la chaleur selon le type d'exercice</i>	65
III.	Adaptations métaboliques et mitochondriales à la chaleur et à l'entraînement.....	67
1.	<i>Effets de l'acclimatation.....</i>	67
a.	Cinétique d'acclimatation	67
b.	Epargne glucidique.....	69
c.	Effet biogénique et dynamique mitochondriale : amélioration de la fonctionnalité mitochondriale	71
	Biogenèse et exposition chronique à la chaleur	72
	Autophagie et exposition chronique à la chaleur	72
	Fonctionnalité mitochondriale et exposition chronique à la chaleur	74
d.	Tolérance cellulaire	75
e.	Phénotype <i>hypoxia-like</i>	79
2.	<i>Effet de l'entraînement en endurance.....</i>	84
a.	Capacité oxydative et transition lipidique.....	85
b.	Réponses mitochondriales à l'entraînement	86
	Augmentation du contenu mitochondrial.....	86
	Fonctionnalité mitochondriale.....	89
c.	Biogenèse mitochondriale	90
d.	Remodelage mitochondrial.....	94
e.	Plasticité mitochondriale	97
	OBJECTIFS	101
	TRAVAIL EXPERIMENTAL	105
I.	Méthode d'exploration commune aux deux études	105
1.	<i>Principes de la mesure de la respiration mitochondriale</i>	105
a.	Généralités.....	105
b.	Mesure par polarographie : Electrode Clark.....	106
c.	Intérêts de la mesure de la respiration sur tissus perméabilisés.	107
2.	<i>L'exploration de la chaîne respiratoire mitochondriale</i>	108
a.	Validation de la mesure	108
b.	Exemple de protocole classique utilisé pour explorer la respiration mitochondriale	109
II.	Etude 1	111
1.	<i>Protocole expérimental de l'étude</i>	111
a.	Mesure de la respiration mitochondriale	111
b.	Protocoles utilisés	113
	Protocoles en fonction du substrat.....	113

Mesure du Km	114
Evaluation du couplage mitochondrial	114
Validation de la qualité des mitochondries.....	114
c. Les autres mesures	114
Les activités enzymatiques.....	114
L'activité de la citrate synthase (CS).	114
L'activité de la 3-hydroxyl acyl coenzyme A déshydrogénase.....	115
La production d'espèces radicalaires de l'oxygène	115
2. Article	115
III. Étude 2	124
1. Rappel du protocole expérimental	124
a. Conditionnement	124
Acclimatation à la chaleur	124
Entraînement aérobie	125
b. Mesures <i>in vivo</i> et anthropométriques.....	125
Métabolisme de repos	126
Mesure de la vitesse maximale aérobie.....	126
c. Mesures de la respiration mitochondriale	126
d. Mesures biochimiques	128
e. Mesure de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et le remodelage mitochondrial	128
2. ARTICLE	129
DISCUSSION GENERALE	164
I. Originalité et limites de la mesure de la respiration mitochondriale in situ dans cette étude.....	164
1. Conséquences de l'élévation de la température dans la technique de mesure de respiration mitochondriale.....	164
2. Méthodologie dans la deuxième étude : importance de la température de mesure et du choix du muscle.....	166
II. Effet découplant substrat-dépendant de la chaleur sur la phosphorylation oxydative sans altération mitochondriale	168
1. Altération du couplage de l'oxydation des acides gras par la chaleur.	168
2. Possible altération fonctionnelle de la chaîne respiratoire	171
3. Limites de l'évaluation des niveaux d'oxydation des substrats par l'oxygraphie mitochondriale in situ	172
4. Maintien de l'intégrité mitochondriale et de la fonctionnalité mitochondriale à la chaleur aiguë .	173
5. Lipotoxicité et effets potentiellement bénéfiques de la chaleur sur le syndrome métabolique.	173
III. L'acclimatation à la chaleur n'induit pas d'adaptations mitochondriales de nature à potentialiser les effets d'un entraînement en endurance	174
1. Pas d'effet additif sur l'augmentation de contenu mitochondrial induite par entraînement	174
2. Pas d'effet de l'acclimatation à la chaleur sur les adaptations de l'oxydation des lipides à l'entraînement.....	175

3. <i>Acclimatation à la chaleur et entraînement en endurance n'ont pas eu d'effet synergique sur l'efficience et la qualité mitochondriales</i>	176
IV. Effet spécifique substrat-dépendant de l'acclimatation à la chaleur	176
1. <i>L'acclimatation à la chaleur ne semble pas induire de biogenèse mitochondriale.</i>	176
2. <i>Acclimatation à la chaleur et entraînement en endurance ont une action synergique sur les réserves en glycogène</i>	177
3. <i>Renforcement du flux glycolytique</i>	178
4. <i>Exposition à la chaleur en période de récupération</i>	178
SCHEMA BILAN	180
CONCLUSION	182
PERSPECTIVES	183
TRAVAUX REALISES DURANT CE TRAVAIL DE THESE	185
I. En rapport avec le sujet de thèse	185
1. <i>Participation à une étude en vue d'optimiser le protocole d'acclimatation des militaires projetés en milieu chaud</i>	185
2. <i>Communications orales</i>	186
3. <i>Communications affichées</i>	186
II. En parallèle du travail de thèse	187
1. <i>Communication écrite</i>	187
2. <i>Participation à d'autres études.</i>	187
3. <i>Elaboration de l'outil de recherche à l'IRBA</i>	187
4. <i>Participation à un enseignement</i>	188
5. <i>Formation continue</i>	188
BIBLIOGRAPHIE	189
ANNEXES	208

ABREVIATIONS

3-HAD : 3-hydroxyl acyl coenzyme A déshydrogénase	HSP: heat shock protein
ACC : acétyl-CoA carboxylase	HSR: heat shock response
ACS : acyl-CoA synthase	IDL : intermediate-density lipoprotein
ADN : Acide désoxyribonucléique	iHSP : HSP intracellulaire
ADNmt : AND mitochondrial	IL-6 : interleukine - 6
AG : acide gras	IMM : membrane mitochondriale interne
AGCC : AG à courte chaîne	IMP : Inosidine Monophosphate
AGCM : AG à moyenne chaîne	IMTG : intramuscular triglyceride
AGCL : AG à courte chaîne	LDH : lactate déshydrogénase
AGL : AG libre	LDL : low-density lipoprotein
AGNE : AG non estérifiés	LHS : lipase hormone-sensible
AMP : Adénosine mono-phosphate	LTHA : long-term heat acclimation
AMPK : AMP-activated protein kinase	MFN : mitofusin
ANT-1 : adenine nucleotide transporter	MFO : maximal fat oxidation
ATP : Adénosine tri-phosphate	MHC: myosin heavy chain
CACT : carnitine acylcarnitine translocase	miCK : créatine kinase mitochondriale
CaMKII : calmodulin-dependent protein kinase II	MitoVD: densité volumique mitochondriale
CK : Créatine kinase	MnSOD : SOD mitochondriale
COX: cytochrome-c oxydase	MPC : mitochondrial Pyruvate Carrier
CPT : carnitine palmitoyltransférase	MPTP : pore de transition de perméabilité membranaire
CRM : chaîne respiratoire mitochondriale	mTORC1 : mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1
CS: citrate synthase	NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
CTE : chaîne de transport d'électrons	OPA1 : optic atrophy
CytC : cytochrome C	OXPHOS : phosphorylation oxydative
DRP1 : dynamin-related protein 1	P38 MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase
EDL : extensor digitorum longus	PCr : phosphocréatine
eHSP : HSP extracellulaire	PDH : pyruvate-déshydrogénase
ERO: espèces radicalaires de l'oxygène	PDK : pyruvate-déshydrogénase kinase
ETF : electron transfer flavoprotein	PFK : phosphofructokinase
FABPm : fatty acid binding protein	PGC-1 α : peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α
FAD : flavine adénine dinucléotide	Pi : phosphate inorganique
FAT : fatty acide translocase	QR : quotient respiratoire
FATP : fatty acid transport proteins	RCR : respiratory control ratio
FC : fréquence cardiaque	RPE : rates of perceived exertion
G3P : glycerol 3 phosphate	SEM : standard error to the mean
G6P : glucose 6 phosphate	SOD : superoxyde dismutase
GLUT : glucose transporter	UCP : uncoupling protein
GR : globule rouge	UPR : unfolded protein response
GSK : glycogène synthase kinase	VATP : vitesse de phosphorylation de l'ATP
GTP : guanosine triphosphate	VLDL : very low-density lipoprotein
HDL : High-density lipoprotein	VTCA : vitesse de fonctionnement du cycle de Krebs
HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale	$\dot{V}O_{2max}$: consommation maximale en O ₂
HIF : hypoxia-induced factor	
HIIT: High intensity interval training	
HK : hexokinase	
HR : humidité relative	
HSF: heat shock factor	

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de mesure de la respiration mitochondriale *in situ* sur fibres perméabilisées

Annexe 2 : Extraction pour dosage des activités citrate synthase, lactate déshydrogénase, cyclooxygénase et créatine kinase

Annexe 3 : Dosage de l'activité de la citrate synthase

Annexe 4 : Extraction pour dosage de l'activité de la HAD

Annexe 5 : Dosage de l'activité de la HAD

Annexe 6 : Protocole de mesure de la production d'H₂O₂ sur fibres perméabilisées

Annexe 7 : Protocole d'entraînement sur tapis, d'intensité et de durée progressivement croissantes

Annexe 8 : Protocole de test incrémental pour déterminer la vitesse maximale aérobie

Annexe 9 : Dosage des unités glycosyls après hydrolyse du glycogène musculaire

Annexe 10 : Dosage de l'activité Hexokinase

Annexe 11 : Dosage de l'activité 6-phosphofructokinase

Annexe 12 : Dosage de l'activité Lactate déshydrogénase (LDH)

Annexe 13 : Western blot en milieu liquide

LISTE DES FIGURES ET TABLES

Figure 1. Etapes de la glycolyse cytosolique.	21
Figure 2. Régulation de la pyruvate déshydrogénase (PDH).	23
Figure 3 : Transport des acides gras au niveau du sarcolemme.	25
Figure 4 : Transport mitochondrial des acides gras.	27
Figure 5 : Béta-oxydation des acides gras.	28
Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme des acides gras (AG).	29
Figure 7. Cycle de Krebs.	30
Figure 8. Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM).	32
Figure 9. Navette du Glycérol-3-P.	33
Figure 10. Navette du Malate.	33
Figure 11. Bilan énergétique des voies glucidiques et lipidiques pour deux substrats à squelette carboné comparable (6C).	34
Figure 12. Point de croisement glucido-lipidique (cross-over concept).	38
Figure 13. Cycle de Randle.	41
Figure 14. Effet d'une acclimatation à la chaleur de 7 jours sur un exercice prolongé sous-maximal.	44
Figure 15. Espèces radicalaires de l'oxygène.	57
Figure 16. Rôle d'UCP dans le stress oxydatif.	58
Figure 17. Les phases d'acclimatation.	66
Figure 18. La cinétique des adaptations induites par l'acclimatation (exercice à la chaleur) sur la réponse thermorégulatrice à la chaleur.	68
Figure 19. Effet du stress thermique chaud sur les voies d'activation de la transcription de la biogenèse mitochondriale.	72
Figure 20. Plasticité d'acclimatation montrée par l'élargissement de la plage de thermorégulation.	75
Figure 21. Activation de la voie des heat shock proteins (HSP).	77
Figure 22. Localisation et rôle des principales HSP impliquées dans la HSR.	78
Figure 23. Tolérance croisée à l'hypoxie induite par l'acclimatation à la chaleur, par induction d'un phénotype hypoxique.	81
Figure 24. Mécanismes potentiels d'adaptation mitochondriale à la chaleur.	82
Figure 25. Déplétion du glycogène en fonction de la durée d'exercice, au cours d'un exercice de pédalage.	84
Figure 26. Relation entre densité volumique mitochondriale (MitoVD), capacité oxydative musculaire maximale (OXPHOS) (A) et débit maximal de consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2 \text{ max}$) (B).	86

Figure 27 Discordance entre densité mitochondriale et activité de la citrate synthase, dans l'évaluation du contenu mitochondrial en réponse à l'entraînement.	87
Figure 28. Relation entre capacité oxydative musculaire (\dot{V}_{max}), débit de consommation d'oxygène à l'exercice.	88
Figure 29. Principaux signaux et leurs effecteurs induits par une activité musculaire prolongée.	90
Figure 30. La biogenèse mitochondriale participe à la plasticité musculaire induite par l'exercice.	91
Figure 31. Activation par l'exercice du remodelage mitochondrial.	92
Figure 32. L'exercice stimule la mitophagie et la biogenèse mitochondriale.	94
Figure 33. L'entraînement inhibe la fission et stimule la fusion des mitochondries.	95
Figure 34. Electrode de Clark.	105
Figure 35. Principe de la perméabilisation.	107
Figure 36. Exemple d'exploration de la chaîne respiratoire mitochondriale par un protocole SUIT.	109
Figure 37. Dispositif utilisé pour l'exposition passive à la chaleur.	124
Figure 38. Tapis de course utilisé pour l'entraînement des rats.	124
Figure 39. Hypothèses des effets aigus de la chaleur sur le métabolisme musculaire.	178
Tableau 1. Protocoles d'ajout de substrats utilisés pour les mesures de la respiration mitochondriale de l'étude 1	111
Tableau 2 Protocoles d'ajout de substrats utilisés pour les mesures de la respiration mitochondriale de l'étude 2.	126
Tableau 3. Listes des protéines étudiées en Western-Blot (étude 2)	128
Tableau 4. Comparaison des vitesses de respiration maximales (V_{max}) en présence de pyruvate et PCoA mesurées à 22°C lors d'une étude précédente, réalisée sur des rats d'âge similaire, et à 35°C au cours de notre étude n° 1.	162

INTRODUCTION

L'exposition à la chaleur entraîne une diminution des capacités d'endurance à l'exercice. L'élévation de la température profonde altère les capacités aérobies maximales (VO_{2max}) et sous-maximales (fatigabilité à l'effort) par l'impact des contraintes thermorégulatrices sur le système cardio-vasculaire. La déshydratation et la mise en jeu de la balance circulatoire (vasodilatation périphérique versus vasodilatation musculaire) diminuent le débit sanguin distribué aux muscles en activité. Outre les réponses cardiovasculaires, neuro-hormonales et musculaires, les caractéristiques du métabolisme énergétique participent à l'endurance à l'exercice. La fourniture en énergie repose sur l'utilisation des glucides et des lipides, pour un sujet en équilibre nutritionnel. La contribution relative de ces substrats dépend de la durée et de l'intensité d'exercice comme modélisé par Brooks & Mercier. Cette balance glucido-lipidique peut néanmoins être modifiée. L'entraînement aérobie, en optimisant l'utilisation des lipides, permet une épargne des réserves glucidiques qui représentent un facteur limitant de la performance en endurance. Cette balance glucido-lipidique peut également être modifiée par l'environnement thermique.

Qu'elle soit d'origine exogène (élévation de la température environnementale) ou endogène (production métabolique de chaleur), l'exposition aiguë au stress thermique chaud entraîne une augmentation de l'utilisation des glucides pour un exercice à une intensité absolue donnée. L'augmentation de l'utilisation des réserves en glycogène pourrait participer à la fatigabilité accrue à l'exercice à la chaleur. Cette plus grande dépendance du métabolisme énergétique aux glucides s'inscrit dans une réaction à un stress incluant une stimulation adrénergique associée à l'exercice et à l'exposition à la chaleur et des effets locaux de l'élévation de la température musculaire. Ces effets locaux pourraient affecter directement le métabolisme mitochondrial, induire l'utilisation préférentielle des glucides notamment par une altération spécifique de l'utilisation des lipides. La complexité de la voie d'oxydation des lipides, les processus de transport mitochondriaux ou les effets détersifs des lipides sur la membrane mitochondriale peuvent participer à une altération du fonctionnement mitochondrial lors de l'exposition à la chaleur.

Cette diminution des capacités d'endurance à l'exercice à la chaleur peut être limitée par l'entraînement en endurance et l'acclimatation à la chaleur. La mise en place des adaptations respectives à ces deux facteurs/stresseurs entraîne des réponses dont la résultante permet d'améliorer la tolérance à l'exercice à la chaleur. L'entraînement permet d'augmenter la disponibilité l'oxygène par une optimisation de l'appareil cardiovasculaire

(diminution de la fréquence cardiaque, augmentation de l'inotropisme, angiogenèse), des adaptations neuro-hormonales et humorales (sensibilité des récepteurs adrénérgiques, seuils de vasodilatation et de sudation précoces) et musculaires (recrutement des fibres, isoformes de myosine, couplage excitation-contraction). Il induit également des adaptations métaboliques permettant d'augmenter le potentiel oxydatif musculaire par l'augmentation du contenu mitochondrial permettant d'augmenter l'utilisation musculaire de l'oxygène et l'utilisation des lipides.

L'exposition prolongée ou répétée à la chaleur permet d'optimiser les effecteurs de la thermorégulation et d'augmenter la tolérance cellulaire à la chaleur permettant à l'organisme d'augmenter ses capacités de thermolyse et de résistance à la chaleur. L'augmentation du volume plasmatique est une adaptation centrale qui permet de préserver la volémie et de différer le retentissement de la balance circulatoire sur le débit sanguin musculaire et la fonction myocardique. Il est par contre plus difficile de déterminer si une augmentation des capacités aérobies métaboliques musculaires participe de cette meilleure tolérance.

Ces deux facteurs pourraient partager certaines adaptations métaboliques mitochondriales. Ainsi il a été décrit une diminution de la dépendance énergétique aux glucides et une restauration des capacités d'oxydation lipidique avec l'acclimatation à la chaleur. Ces adaptations mitochondriales sont donc proches de celles induites par l'entraînement aérobic et pourraient participer conjointement à une transition de la balance glucido-lipidique plus marquée. Des phénomènes de biogenèse et de remodelage des mitochondries ont également pu être observés à la suite d'une période d'acclimatation à la chaleur, dans des études ne comportant néanmoins pas de mesure de la fonctionnalité mitochondriale. Leur rôle dans l'amélioration du métabolisme énergétique à la chaleur et leur potentialisation avec les adaptations mitochondriales à l'entraînement aérobic demeurent donc à préciser.

Ces perspectives de plasticité mitochondriale à la chaleur interrogent non seulement sur l'effet additif avec les réponses à l'entraînement mais également sur l'effet protecteur dans des situations d'altération du métabolisme mitochondrial telles que le syndrome métabolique ou l'immobilisation prolongée.

Ce travail propose d'étudier les effets de la chaleur sur le métabolisme mitochondrial au moyen de deux modèles d'exposition à la chaleur. Nous avons fait l'hypothèse, dans notre

première étude, qu'une élévation de la température pouvait altérer spécifiquement le fonctionnement mitochondrial et induire des limitations à l'oxydation des lipides. Dans une seconde étude, nous avons supposé que la fonctionnalité mitochondriale pouvait également être le support d'une plasticité à la chaleur de nature à potentialiser les adaptations mitochondriales et métaboliques à l'entraînement. Nous nous sommes intéressés aux effets propres de l'entraînement aérobie et de l'acclimatation à la chaleur et à leur interaction pour identifier d'éventuels mécanismes synergiques ou antagonistes.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralités sur le métabolisme énergétique

1. Les filières

La production d'énergie provient de l'utilisation des glucides, des lipides ou des protéines. Au repos, la part des protéines dans la fourniture en énergie est non négligeable, de l'ordre de 24% de l'énergie totale (O'Hearn, Tingelstad et al. 2016) mais le devient à l'exercice. En effet, à l'exercice, l'utilisation des acides aminés est peu modifiée en valeur absolue mais l'énergie totale fournie augmente fortement. Ainsi la part des acides aminés devient faible dans la fourniture en énergie à l'exercice et est estimée à environ 1% au cours d'un exercice prolongé d'intensité modérée à intense (Henderson, Black et al. 1985, Brooks 1987). L'essentiel de la production d'énergie à l'exercice provient donc de l'utilisation des glucides et des lipides. Au regard de la thématique abordée dans ce travail, la participation des acides aminés, en tant que substrat énergétique, peut être considérée comme négligeable (Brooks 1987, Kasperek, Conway et al. 1992). Le métabolisme des acides aminés ne sera donc plus évoqué.

a. Métabolisme glucidique

Les réserves glucidiques (hydrates de carbone = CHO) sont représentées par les stocks de glycogène hépatique et musculaire (pour un homme de 70 kg environ 150 g et 450 g respectivement) soit un équivalent de 2400 kcal. Les réserves musculaires ne peuvent être redistribuées dans l'organisme, du fait de l'absence d'une glucose-6-phosphatase musculaire, le glucose-6-phosphate ne pouvant traverser la membrane plasmique librement. Seule la réserve hépatique permet la libération de glucose dans le sang, permettant la régulation de la glycémie. Le foie permet de stocker le glucose mais également d'en produire *de novo* par néoglucogenèse à partir de lactate, de glycérol, d'acides aminés glucoformateurs ou de propionyl-CoA.

Le transport sanguin est réalisé sous forme de glucose libre. L'entrée du glucose dans la cellule nécessite des transporteurs, différents selon le tissu considéré. Si les transporteurs Glut-1 sont ubiquitaires, les transporteurs Glut-4 présents au niveau du muscle sont responsables de l'entrée du glucose dans les cellules en réponse à l'insuline et/ou à la contraction musculaire. La régulation du métabolisme glucidique dépend du rapport insuline-glucagon qui permet de maintenir la stabilité de la glycémie (4,5-6 mmol.l⁻¹) malgré la discontinuité des apports alimentaires (post-prandiale, post-absorptive ou jeûne). A l'exercice, la régulation met en jeu

d'autres hormones comme l'adrénaline, ainsi qu'une régulation humorale auto et paracrine via les perturbations du niveau énergétique (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase : AMPK) et électrolytique (Ca^{2+} , H^+ ...) de la cellule. Le contrôle du métabolisme glucidique répond à un double impératif de maintien de la glycémie et de fourniture en énergie.

La glycolyse

La glycolyse consiste en la dégradation progressive d'une molécule de glucose à six carbones en deux molécules de pyruvate à 3 carbones. Elle permet de récupérer une partie de l'énergie du glucose par la réduction de 2 molécules de NAD^+ (nicotinamide adenine nucleotide forme oxydée) en NADH,H^+ (nicotinamide adenine nucleotide forme réduite) et la production de 4 molécules d'ATP (**Figure 1**).

La voie est un carrefour métabolique :

- le **glucose-6-P**, pour la synthèse du glycogène, des pentoses-P, de la glucosamine (glycoprotéines)
- les **trioses-P** pour la synthèse du fructose, des pentoses-P et du glycerol-3P
- le **pyruvate**, en relation avec le lactate et l'alanine dans le cytosol et avec l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate dans les mitochondries.

Le bilan net de cette voie est la production de 2 ATP (consommation de 2 ATP pour la phosphorylation des substrats) et de 2 NADH,H^+ .

Le glucose-6-P peut provenir localement de la glycogénolyse musculaire ou bien du glucose sanguin après une étape de phosphorylation par l'hexokinase. Contrairement au foie, dans lequel la réaction est catalysée par une glucokinase, la phosphorylation du glucose n'est pas réversible dans le muscle. Le G6P présent dans la cellule musculaire ne peut pas repartir dans la circulation.

Le devenir des équivalents réduits NADH,H^+ produits dépend de la disponibilité en oxygène.

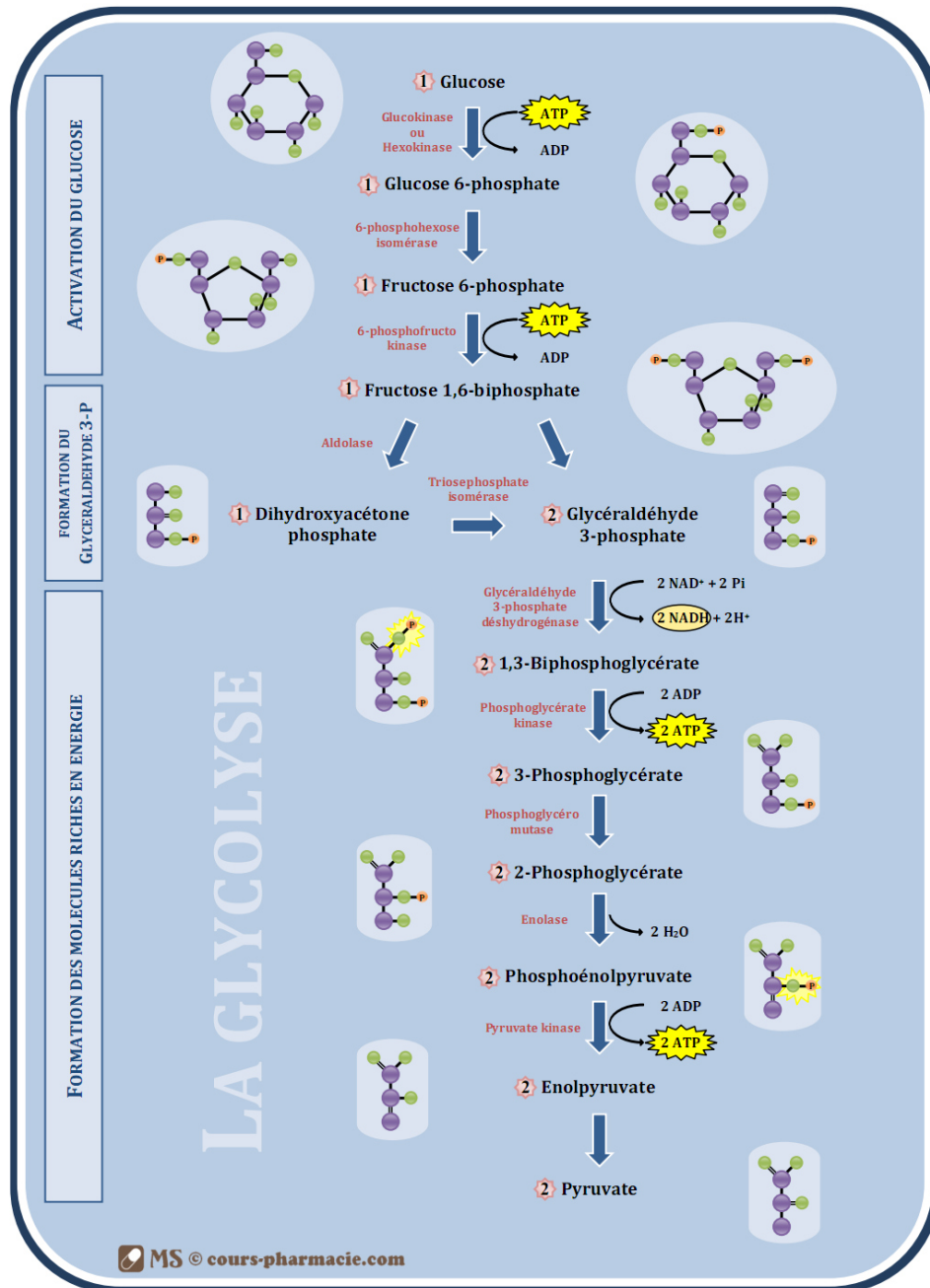


Figure 1. Etapes de la glycolyse cytosolique. L'activation du glucose en G6P, catalysée par l'hexokinase, est irréversible dans le muscle. Le substrat est hydrolysé ou stocké sous forme de glycogène. L'hexokinase et la 6-phosphofructokinase représentent les étapes-clés de la régulation de la glycolyse cytosolique (Simon 2009).

Devenir du pyruvate

En condition anaérobie, la réduction du pyruvate en lactate permet de réoxyder le NADH + H⁺ en NAD⁺ qui peut être réutilisé dans la voie de la glycolyse. La glycolyse anaérobie est catalysée par la lactate-déshydrogénase (LDH). La production d'ATP est faible (2 molécules), mais rapide et ne nécessite pas d'oxygène. La LDH est une enzyme cytoplasmique qui a également

été mise en évidence dans la mitochondrie (Brooks 2009). Il s'agit d'un tétramère de 8 sous-unités M (*muscle*) et H (*heart*) définissant 5 isoformes. Selon la proportion relative en sous-unités M, favorisant la réaction vers la production de lactate, et H, favorisant la réaction inverse, l'activité de l'enzyme catalysera un sens de réaction plutôt que l'autre. Le lactate circulant peut être réutilisé par le myocarde ou le foie, seul organe à pouvoir synthétiser du glucose à partir du lactate (cycle de Cori). Il peut également être réutilisé par le muscle ; ainsi, 70 à 75% du lactate produit à l'exercice peut être réutilisé par les fibres oxydatives. Des transporteurs sarcolemmaux et mitochondriaux du lactate (MCT = *monocarboxylate transporter*) ont été identifiés. En outre, l'entraînement en endurance permettrait d'augmenter la clairance sanguine du lactate, ainsi que l'expression de transporteur du lactate (Thomas, Bishop et al. 2012).

En condition aérobie, les électrons et protons du $\text{NADH} + \text{H}^+$ sont transportés, grâce à des systèmes de navettes, dans la mitochondrie pour être oxydés par la chaîne respiratoire. L'entrée du pyruvate dans la mitochondrie par la pyruvate translocase et les MPC (Mitochondrial Pyruvate Carrier) (Bricker, Taylor et al. 2012, Herzig, Raemy et al. 2012) est suivie d'une formation d'acétyl-CoA catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDH).

Régulation du métabolisme glucidique

Au sein de cette voie, trois enzymes d'activité réversible, peuvent être régulées à plusieurs niveaux : par des effecteurs allostériques via un site de liaison, par des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations/déphosphorylations et transcriptionnelles (expression de leurs gènes).

L'**hexokinase** est inhibée par son produit, le glucose-6-P.

La **phosphofructokinase 1** (PFK 1) est inhibée d'une part par l'ATP, le citrate et l'AMP (adénosine monophosphate) et d'autre part par l'adrénaline, et activée par l'insuline.

L'activité de la **PDH** est inhibée par son produit, l'acétyl-CoA et les équivalents réduits. La PDH est également régulée de façon post-traductionnelle par un système de phosphorylation-déphosphorylation. Elle est active sous forme déphosphorylée alors qu'elle est inhibée après phosphorylation. Les pyruvate-déshydrogénases kinases (PDK), au nombre de trois isoformes (PDK-1, PDK-2 et PDK-4), chacune spécifique d'un des trois sites de phosphorylation de la PDH, sont activées par l'augmentation du ratio $\text{NADH} + \text{H}^+/\text{NAD}^+$, ATP/ADP et $\text{acétyl-CoA}/\text{CoA}$ et inhibées par le pyruvate et le dichloroacétate. Les pyruvate déshydrogénases phosphatases ont 2 isoformes (PDP1 et PDP2). PDP1 est notamment activée par l'augmentation du calcium intracellulaire (**Figure 2**).

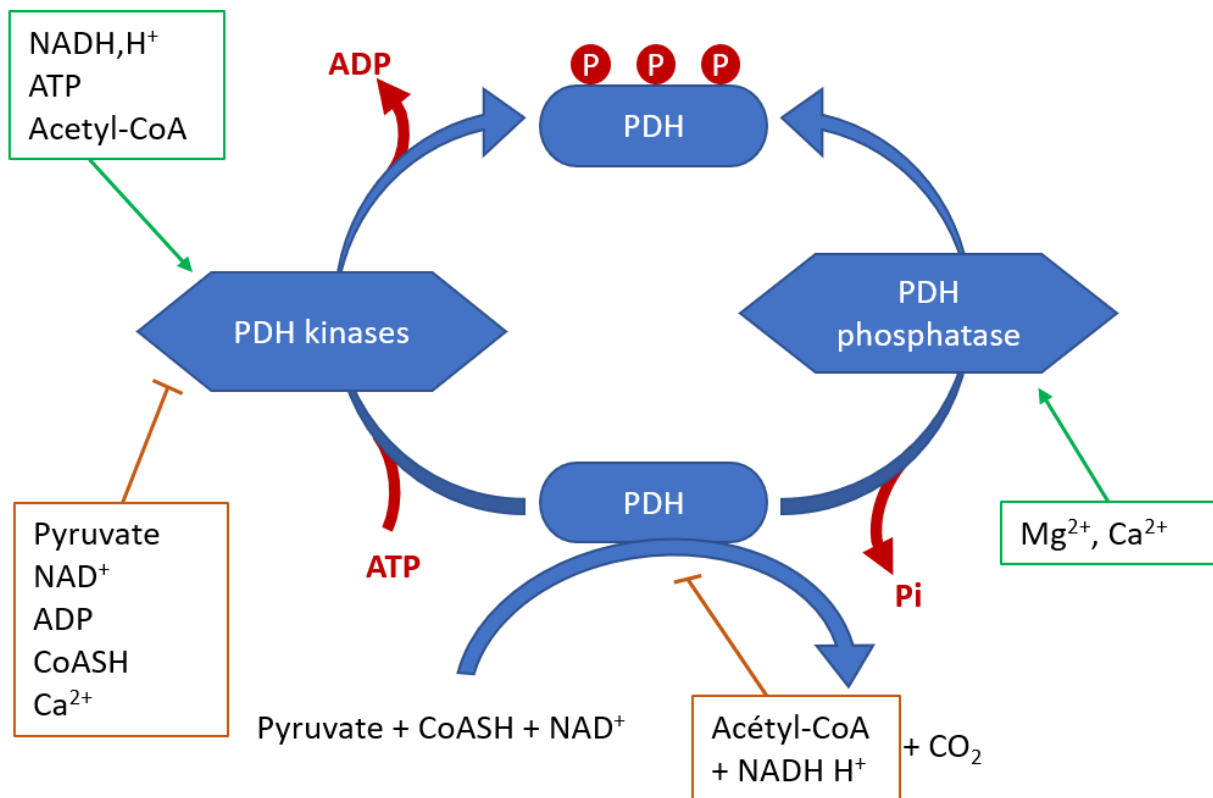


Figure 2. Régulation de la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'activité de la pyruvate déshydrogénase est sous le contrôle de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDH kinase) et de la pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDH phosphatase). Par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation, le PDH est activée par PDH phosphatase et inactivée par PDH kinase. La phosphatase et la kinase sont régulées par différents effecteurs. La PDH est également contrôlée par ses produits finaux.

La glycolyse est inhibée en cas d'excès d'énergie (élévation de l'ATP et du citrate) ou activée en cas de déficit (augmentation de l'ADP et AMP).

A partir du G6P, le muscle peut stocker le glucose sous forme de glycogène, via l'action de la glycogène synthase. Son action est régulée par un système de phosphorylation (forme inactive)

/ déphosphorylation (forme active), contrôlé par la glycogène synthase kinase (GSK), elle-même contrôlée par un système de phosphorylation (forme active)/déphosphorylation (forme inactive) (Beurel, Grieco et al. 2015). La GSK, qui est activée par le glucagon et l'adrénaline, et inhibée par l'insuline, a pour effet d'inhiber la glycogène synthase et donc la synthèse du glycogène.

b. Métabolisme lipidique

Les réserves lipidiques sont situées dans le muscle et le tissu adipeux. D'une masse d'environ 15 kg pour un individu de 70 kg, elles représentent une capacité énergétique d'environ 140000 kcal. Mis à part les triglycérides et les corps cétoniques, leur transport dans le sang se fait sous forme de lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, LDL, IDL et HDL). Les acides gras (AG) peuvent avoir deux origines : triglycérides intramusculaires et du tissu adipeux.

Les transporteurs membranaires des AG sur le sarcolemme

Le passage des acides gras à chaîne courte (AGCC, 4 à 6 carbones) ou moyenne (AGCM, 8 à 10 carbones) du plasma au milieu intramusculaire peut se faire par diffusion simple, à travers la membrane. Pour les acides gras à chaîne longue (plus de 12 carbones) un transporteur est nécessaire (Luiken, Schaap et al. 1999). Plusieurs protéines seraient impliquées : les *fatty acid transport proteins* (FATPs), la *fatty acid translocase* CD36 (FAT CD36) et les *plasma-membrane fatty acid binding proteins* (FABPpm) (**Figure 3**).

Les FATPs sont présentes dans le muscle squelettique (isoformes 1 et 4) et dans le myocarde (isoformes 1 et 6). FATP1 est liée à une acyl-CoA synthétase à longue chaîne, sensible à l'insuline. Elle pourrait ainsi participer à l'augmentation de la captation des AG en réponse à une sécrétion insulinaire, de façon analogue au transport insulino-dépendant du glucose médié par le transporteur Glut-4. Aussi, elle tiendrait un rôle particulier dans la captation des AG en période postprandiale et pourrait participer à l'insulinorésistance périphérique. Dans les modèles de souris déficientes en FATP-1, un défaut d'accumulation des AG dans le muscle est observé en postprandial alors qu'ils s'accumulent dans le foie. S'il ne se développe donc pas d'insulinorésistance musculaire dans ce modèle après un régime riche en graisse, la lipotoxicité au niveau hépatique est accrue et conduit au développement précoce d'une stéatose (Doege and Stahl 2006).

La Fat CD36 serait organisée en un pool qui peut être transloqué à la membrane sarcolemmale sous certaines conditions, comme notamment la contraction musculaire (Bonen, Luiken et al. 2002, Bonen, Campbell et al. 2004). Il existe également une régulation transcriptionnelle en réponse à une élévation des AGL (Bastie, Nahle et al. 2005, Nahle, Hsieh et al. 2008).

La FABPpm serait liée à Fat CD36, les deux protéines agissant de concert pour faciliter la dissociation des AGL de l'albumine qui les transporte dans le plasma (Luiken, Schaap et al. 1999).

Une fois dans la cellule, les acides gras sont activés sous forme d'acyl-coenzyme A (acyl-CoA) par l'acyl-CoA synthase (ACS). L'acyl-CoA ainsi formé se lie à une protéine de transport : l'acyl-CoA Binding Protein (ACBP) qui l'amène au niveau de la membrane externe de la mitochondrie.

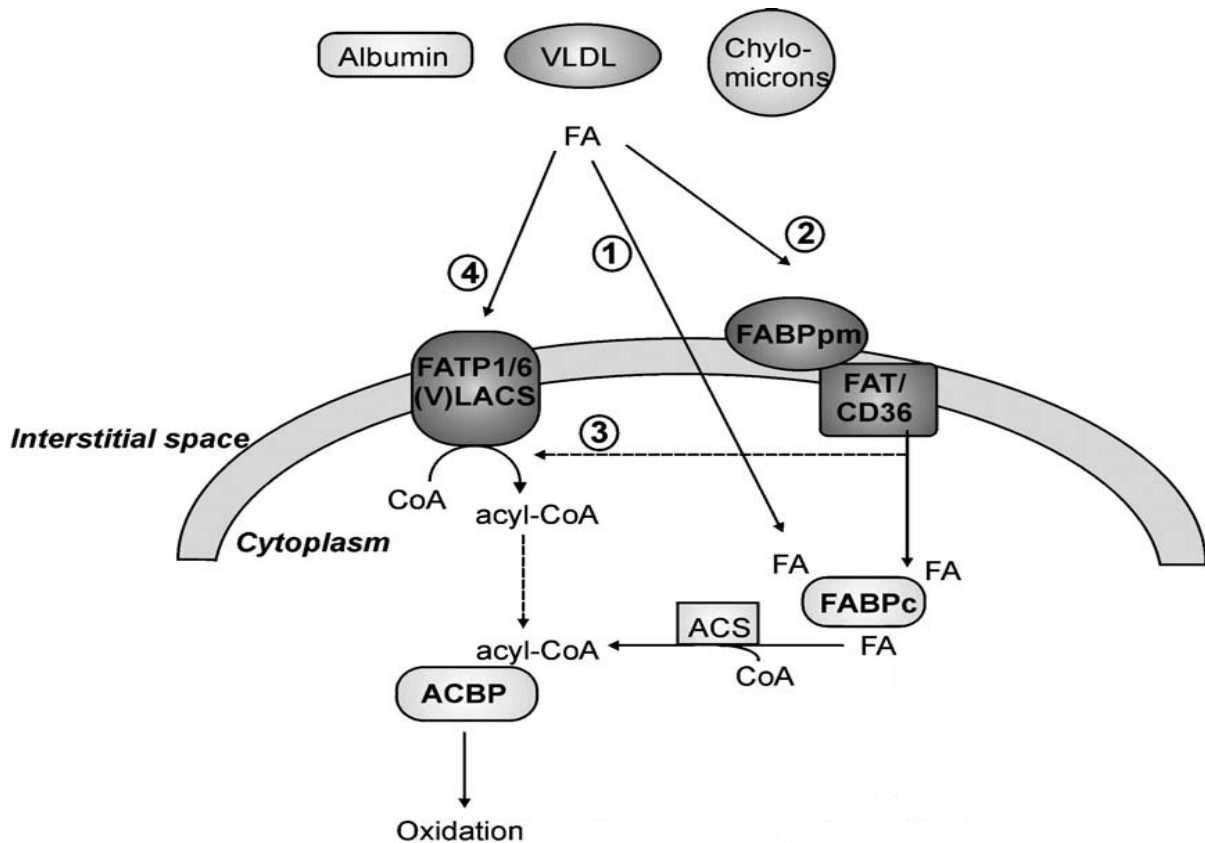


Figure 3. Transport des acides gras au niveau du sarcolemme. ACBP: acyl-CoA binding protein, ACS: acyl-CoA synthase, FABPc: cytoplasmic fatty acid binding protein, FABPpm: plasma-membrane fatty acid binding protein, FAT: fatty acid translocase, FATP : fatty-acid transport protein, VLDL: very low density lipoprotein (Koonen, Glatz et al. 2005).

Transport mitochondrial des AG

Les acides gras à chaînes courtes (AGCC) et moyennes (AGCM) vont pouvoir pénétrer par simple diffusion. Les acides gras à longue chaîne (AGLC) sont, eux, transportés vers la mitochondrie sous forme d'acyl-carnitine (les AGCM peuvent également utiliser ce transport). Les AGLC, sous forme d'acyl-CoA, traversent la double membrane mitochondriale, *via* le système des carnitine palmitoyltransférases (CPT) I et II et de la carnitine acylcarnitine translocase (CACT) (McGarry, Mannaerts et al. 1977, McGarry and Brown 1997) (**Figure 3**).

Ce système de transport, notamment CPT1, serait le régulateur de l'oxydation des lipides et le facteur limitant du transport des AGLC. Cette protéine de transport, CPT-1 est associée à la membrane externe et existe sous trois isoformes principales dont une forme CPT-1a, présente dans le foie et la forme CPT-1b, présente dans le muscle squelettique et le cœur et l'isoforme CPT-1c. La forme musculaire serait notamment plus sensible à l'inhibition de son activité par le malonyl-CoA (Faye, Borthwick et al. 2005). Outre son rôle dans le transport sarcolemmal, FAT CD36 pourrait faciliter le transport mitochondrial des AGLC à l'exercice, en interagissant avec CPT1. La présence de FAT CD36 a été mise en évidence au niveau de la membrane mitochondriale, près de CPT1 (Bonen, Campbell et al. 2004, Bezaire, Bruce et al. 2006). Ce rôle de cofacteur pourrait être mis en jeu dans des situations d'oxydation accrue des AG telles que l'exercice (Holloway, Jain et al. 2009).

Les acyl-carnitine, générés par CPT-1, sont transloqués dans l'espace intermembranaire grâce à la carnitine acylcarnitine translocase (CACT) intégrée dans la membrane interne. La libération de l'AG de la carnitine par la CPT-2 permet le passage de l'acyl-CoA dans la matrice cellulaire et restitue la carnitine, disponible pour le passage d'un nouvel AGLC.

Un déficit génétique en CPT-2 a été découvert pour la première fois en 1973. Selon la mutation identifiée, le tableau varie d'une forme « adulte » bénigne marquée par des épisodes de rhabdomyolyse au cours d'exercices prolongés à une forme « infantile sévère », responsable de malaises avec hypoglycémie et hypocétonémie profondes aboutissant souvent à des morts subites avant l'âge d'un an (Bonfont, Djouadi et al. 2004). L'absence de mutation pour CPT1 connue à ce jour est en faveur de son caractère vital. (**Figure 4**).

Des points de contact entre les 2 membranes mitochondriales seraient des zones de passage privilégiées. De telles zones ont pu être mises en évidence en microscopie électronique (Brdiczka 1991). L'importante concentration de protéines telles que CPT indiquent que ces zones pourraient constituer un point de passage des protéines et des AG (Fraser and Zammit 1998).

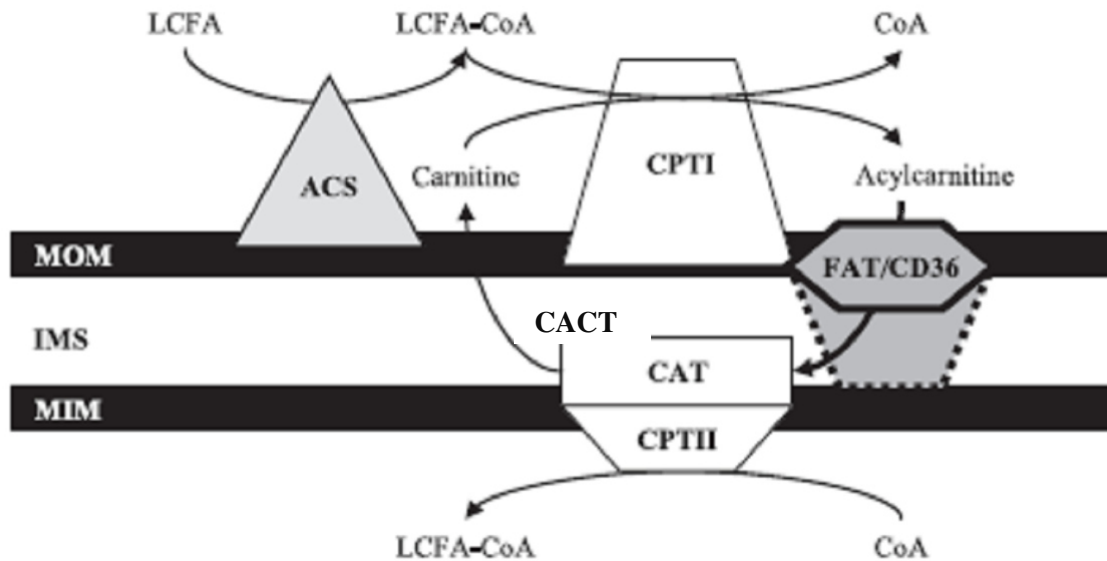


Figure 4. Transport mitochondrial des acides gras. ACS : acyl-CoA synthase, CACT: carnitine acCPTI: carnitine palmitoyl transferase 1, CPTI: carnitine palmitoyl transferase 1, FAT/CD36 : fatty acid translocase, IMS : intermembrane space, LCFA : long-chain fatty acids, CoA : Coenzyme A, MOM : mitochondrial outer membrane, MIM : mitochondrial inner membrane (Bezaire, Bruce et al. 2006)

La beta-oxydation

C'est la voie métabolique capable de fournir le plus d'énergie par gramme de substrat oxydé, utilisée par toutes les cellules, à part les neurones et les globules rouges. Elle a lieu dans les mitochondries. Appelée également hélice de Lynen, la voie de dégradation des acides gras (2nC) consiste en une cascade de réactions itératives permettant d'obtenir n molécules d'acétyl-CoA (2C), n NADH,H⁺ et n FADH₂ (flavine adenine dinucleotide forme réduite) après n-1 cycles. L'initiation de la β-oxydation nécessite l'activation d'un acyl-CoA par condensation de l'acide gras avec le coenzyme A (**Figure 5**).

Exemple : palmitoyl-CoA (16C) + 7 FAD + 7 NAD⁺ + 7 CoA-SH + 7 H₂O => 8 acétyl-CoA + 7 FADH₂ + 7 NADH + 7 H⁺

L'équivalence en ATP est la suivante : 8 acétyl-CoA produisent 96 ATP, 7 FADH₂ produisent 14 ATP et 7 NADH,H⁺ produisent 21 ATP, soit un total de 131 ATP. L'activation de l'acide palmitique en palmitoyl-CoA nécessitant 2 ATP, le rendement net est 129 ATP par molécule de palmitate oxydé (8 ATP par C). A nombre de carbones équivalents, un acide gras génère plus de molécules d'ATP qu'un ose, les oses étant déjà des molécules en partie oxydées.

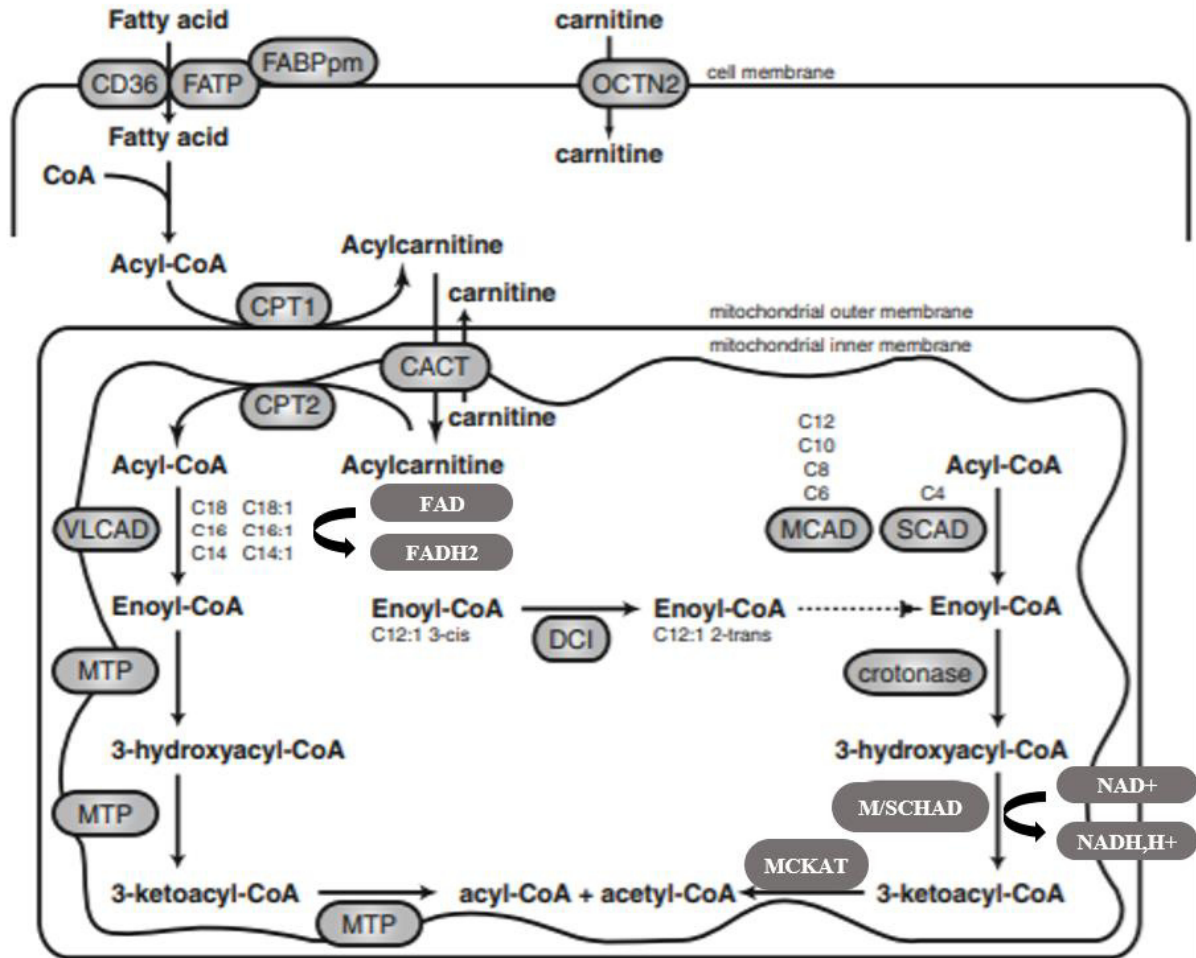


Figure 5. Béta-oxydation des acides gras. Les acides gras dérivés du plasma et des IMTG sont activés dans le cytosol en acyl-CoA gras par les acyl-CoA synthetases (ACS) avant d'entrer dans la mitochondrie. L'acyl-CoA transite à travers la double membrane mitochondriale sous forme d'acyl carnitine, par un système mettant en jeu la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) (I), la carnitine - acyl carnitine translocase (CACT) et la carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2). Après libération de la carnitine, l'acyl-CoA entre dans la β -oxydation (Hélice de Lynen). Une succession de réactions enzymatiques permettent de produire un acétyl-CoA et un acyl-CoA à n-2 carbones, ainsi qu'un FADH₂ et un NADH,H⁺ à chaque tour d'hélice. La régulation de ce métabolisme s'opère au niveau de la CPT-1 qui régule l'entrée des acides gras via la disponibilité en carnitine et en acyl-CoA. L'activité de la thiolase (MCKAT= medium chain 3-k étoacyl-CoA thiolase) est régulée par son produit, acétyl-CoA. La 3-HAD (MSCHAD : medium and short chain hydroxyacyl-CoA déshydrogénase) contrôle l'oxydation des acides gras à courte et moyenne chaîne. L'oxydation des acides gras à longue chaîne débute avec les enzymes liées à la membrane, spécialisées dans la dégradation de ces AG VLCAD et MTP). Après 2-3 tours, les AG sont dégradés dans la matrice, par les enzymes destinées aux AG à moyenne et courte chaîne (dont HAD et thiolase). (Houten and Wanders 2010). DCI: dodecanoyl-CoA delta isomerase, MTP : mitochondrial trifunctional protein, VLCAD : very long chain acyl-CoA déshydrogénase.

Régulation de l'oxydation des lipides

La régulation est principalement assurée par les étapes de transports mitochondriales via notamment CPT-1 (**Figure 6**). Il est assez largement admis que l'activité CPT-1 est inhibée par l'accumulation de malonyl-CoA. La sensibilité au malonyl-CoA pourrait dépendre du tissu considéré. En effet, la quasi-totalité de l'activité CPT-1 serait inhibée dans le gastrocnémien

superficiel (muscle glycolytique) alors que 40% de son activité le serait dans un muscle oxydatif comme le soleus. Il existe ainsi une fraction de CPT-1 résistante à l'inhibition par le malonyl-CoA, en proportion variable selon le muscle considéré (Faye, Borthwick et al. 2005). L'activité de CPT-1 dépend également de la disponibilité en carnitine qui n'est cependant pas limitant en situation physiologique. La concentration en malonyl-CoA dépend directement de l'activité de l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC).

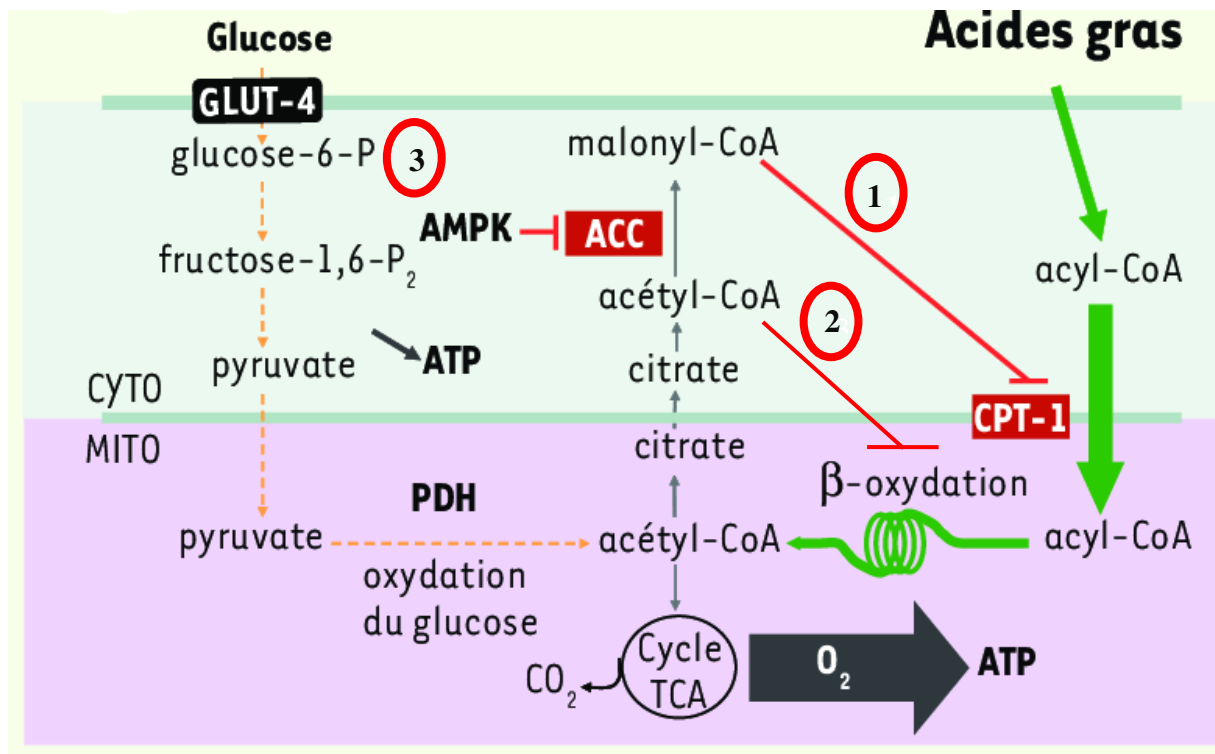


Figure 6. Représentation schématique du métabolisme des acides gras (AG). En situation d'abondance énergétique, la diminution de l'AMPK entraîne une levée d'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase. La formation de malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA est favorisée. Le Malonyl-CoA freine l'entrée des acides gras activés (acyl-CoA) dans la mitochondrie en inhibant l'activité de CPT1(1). L'accumulation d'acétyl-CoA va également inhiber l'activité de la thiolase de la β-oxydation (2). Inversement, un déficit énergétique (diminution de l'ATP, augmentation de l'AMP) se traduit par une augmentation d'activité d'AMPK qui inactive ACC par phosphorylation (3). La diminution du malonyl-CoA va lever l'inhibition de CPT-1 et favoriser l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. D'après (Foretz, Taleux et al. 2006).

La β-oxydation *per se* est également une étape de régulation. La thiolase, une enzyme de la β-oxydation est également inhibée par l'acétyl-CoA. L'oxydation des AG est contrôlée par la disponibilité mitochondriale en AG dont l'entrée est régulée par l'activité de CPT1. La 3- HAD constitue une enzyme clé de la β-oxydation dont le niveau d'activité est le reflet de l'aptitude différente des muscles oxydatif et glycolytique à oxyder les acides gras.

2. Respiration mitochondriale

a. Cycle de Krebs (fourniture de l'Acétyl-CoA)

Le cycle de Krebs est une série de réactions biochimiques dont la finalité est de produire des équivalents réduits qui serviront à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire. Il s'agit d'un cycle car le dernier métabolite, l'acide oxaloacétique, est aussi impliqué dans la première réaction. Il est la voie commune finale de toute molécule d'acétyl-CoA, qu'elle soit issue de la glycolyse ou de la β -oxydation. Le cycle est initié par la réaction de condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate formant le citrate (**Figure 7**).

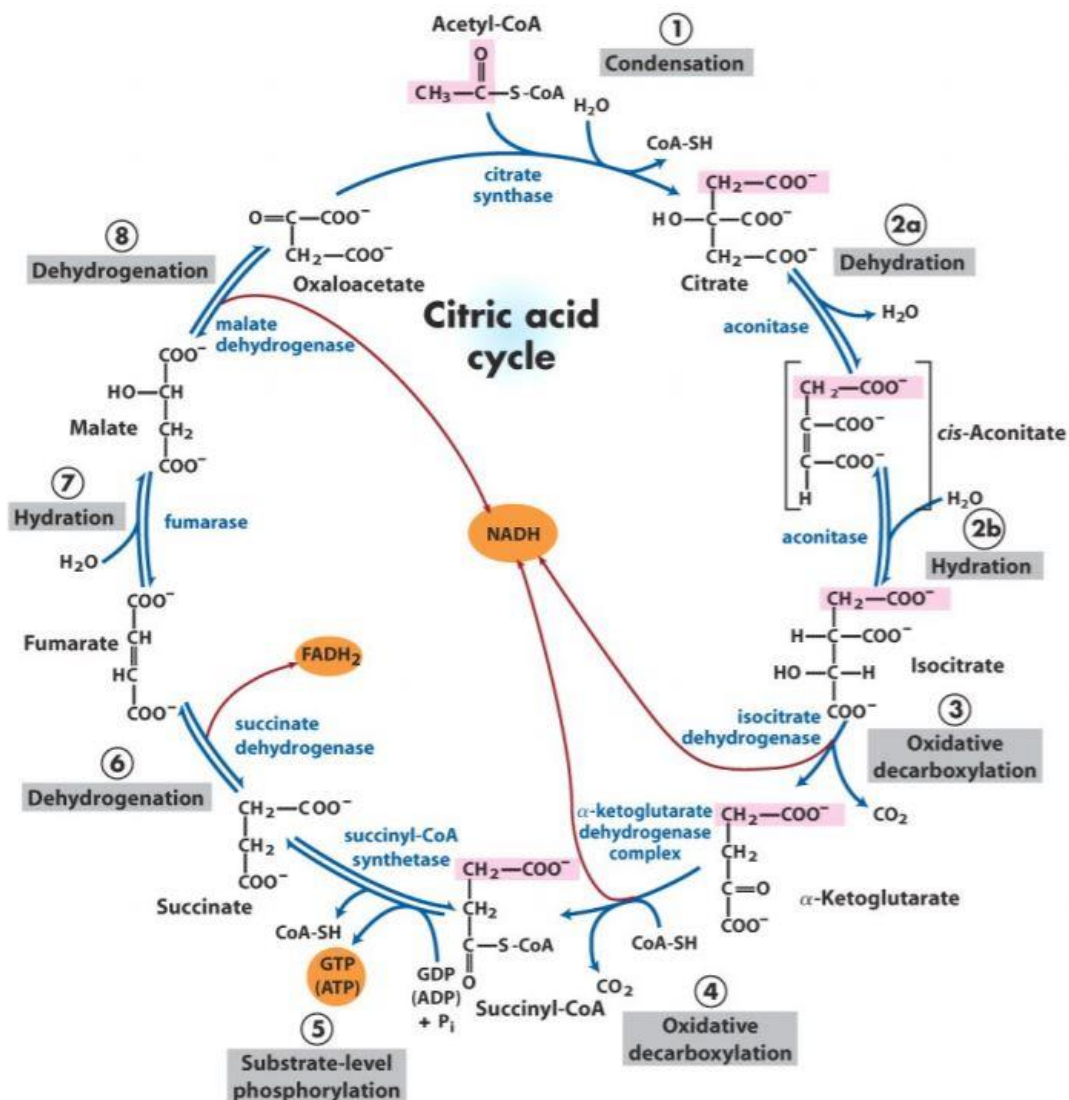
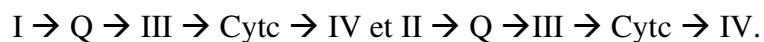


Figure 7. Cycle de Krebs. L'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs entraîne la formation de citrate à partir d'oxaloacétate. L'étape 6 mettant en jeu la succinate déshydrogénase utilise le FADH_2 attaché au complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. La régulation du cycle dépend de la fourniture en acétyl-CoA et de l'utilisation des équivalents réduits NADH, H^+ et FADH_2 permettant de renouveler les équivalents NAD^+ et FAD nécessaire aux réactions d'oxydation du cycle. Production de 3 $\text{NADH} + \text{H}^+$ et 1 FADH_2 par molécule d'acétyl-CoA d'après (Boyle 2005)

b. Chaîne respiratoire mitochondriale (CRM)

Le terme de phosphorylation oxydative est employé pour décrire le couplage entre les oxydations d'équivalents réducteurs et la phosphorylation de l'ADP. Ce processus implique cinq complexes à multiples sous-unités, insérés dans la membrane interne et constituant la chaîne respiratoire et responsable de la succession de réactions d'oxydoréduction. L'oxydation du NADH,H⁺ au niveau du complexe I (NADH-ubiquinone réductase) et du succinate au niveau du complexe II (succinate-ubiquinone réductase) fournissent les flavines réduites (NAD⁺ pour le complexe I et FAD pour le complexe II) qui permettent le transfert de protons et électrons au coenzyme Q. Les électrons sont transportés le long de la chaîne de transport des électrons, par les complexes I, II, III et IV via 2 composés mobiles l'ubiquinone (Q) et le cytochrome-c (Cyt-c) qui se déplacent à l'intérieur de la bicouche lipidique de la membrane interne. Une orientation spécifique de ces différents éléments dirige le transport des électrons selon des séquences précises :



Le transfert d'électrons permet la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire uniquement au niveau des complexes I, III et IV (cytochrome c-oxydase). L'accepteur final des électrons est l'oxygène qui est réduit en deux molécules d'eau par le complexe IV (**Figure 8**).

L'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, crée un gradient électrochimique de protons qui génère une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane interne ($\Delta\psi = -220\text{mV}$) et constitue une source d'énergie électrochimique (appelée force protomotrice) utilisée pour la synthèse d'ATP au niveau de l'ATP synthase ou complexe V. La force protomotrice générée par l'oxydation du NADH,H⁺ est supérieure à celle générée par l'oxydation du FADH₂. Un flux de NADH,H⁺ est nécessaire et doit être entretenu pour maintenir le potentiel de membrane.

Le NADH,H⁺ est le plus important, quantitativement. Ce coenzyme mobile peut être produit dans le cytosol et la matrice. Cependant, le NADH ne peut pas traverser librement la membrane mitochondriale. Le pool cytosolique utilise donc 2 systèmes de navette pour transférer les équivalents réduits (H⁺) dans la matrice afin d'être oxydés dans la CRM.

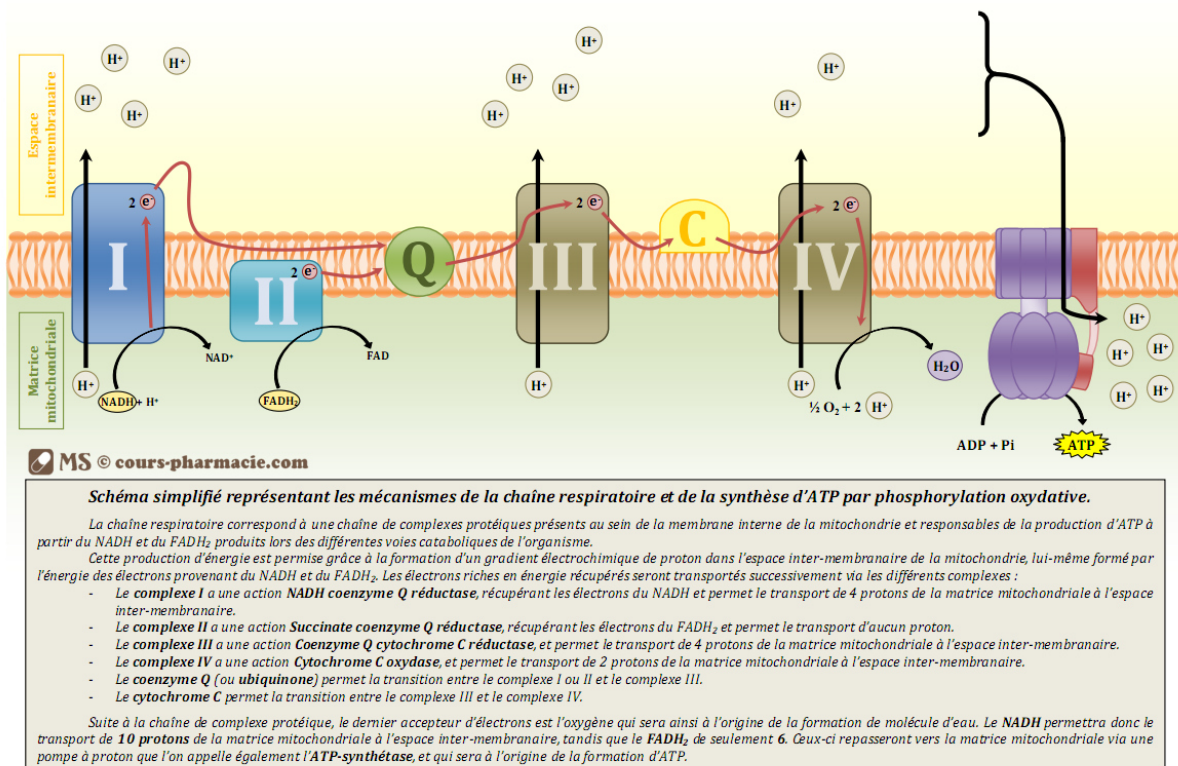


Figure 8. Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). La chaîne respiratoire mitochondriale assure une succession de réactions d'oxydoréductions à partir des équivalents réduits NADH, H⁺ et FADH₂. Le transfert d'électrons entre complexes génère un pompage des protons H⁺ vers l'espace intermembranaire. Le gradient électro-chimique de H⁺ crée une force protomotrice dont l'énergie est couplée à la phosphorylation de l'ADP par le complexe V. L'oxygène est l'accepteur final des électrons traversant la CRM. L'activité de la chaîne respiratoire est contrôlée par la disponibilité en ADP (consommation de l'ATP) et en substrats et O₂ (Simon 2009).

La navette glycerol-3-P (G3P), assurée par la glycerol-3-P déshydrogénase, réalise le transfert des équivalents réducteurs du NADH + H⁺ cytosolique vers le FADH₂ de la membrane interne mitochondriale via le G3P. Dans certaines études, le glycérol-3-P est d'ailleurs utilisé comme substrat pour étudier spécifiquement l'activité du complexe II (**Figure 9**).

La navette malate-aspartate comprend en fait deux phases : un cycle malate-aspartate pour le transfert des protons et un cycle glutamate-aspartate pour le renouvellement de l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit par le NADH + H⁺ en malate dans le cytosol. Le malate diffuse alors librement dans la matrice en échange de l' α -cétoglutarate. Dans la mitochondrie, le malate est oxydé en oxaloacétate, par le NAD⁺ qui est ainsi réduit en NADH + H⁺ disponible pour la CRM. Ces réactions sont catalysées par une enzyme présente dans les deux compartiments, la malate déshydrogénase. Le cycle glutamate-aspartate permet la régénération de l'oxaloacétate cytosolique à partir de l'oxaloacétate matriciel. L'aspartate amino-transférase catalyse la transamination de l'oxaloacétate en aspartate. L'aspartate traverse la membrane en échange d'un glutamate et est re-transaminé en oxaloacétate (**Figure 10**).

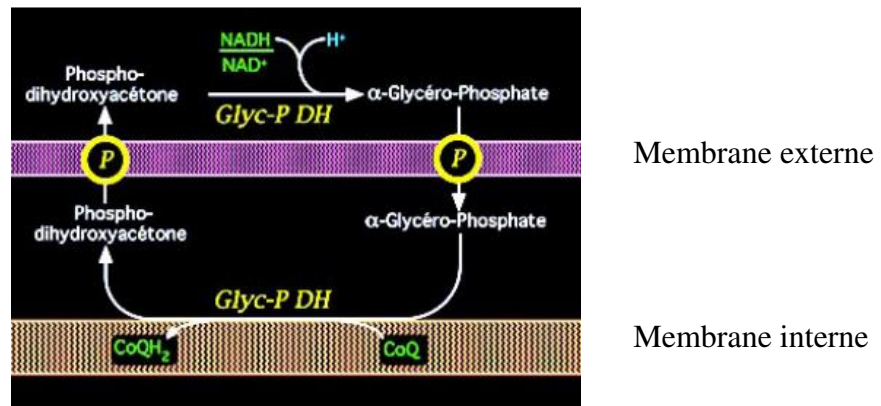


Figure 9. Navette du Glycérol-3-P. (Malgoyre 2011). Le NADH, H⁺ produit par la glycolyse ne peut pas passer la membrane mitochondriale. Le pouvoir réducteur est transmis au FAD⁺ de la chaîne respiratoire mitochondriale via une glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique qui interagit avec le NADH et une glycérol-3-phosphate déshydrogénase membranaire contenant FAD. NADH, H⁺ : nicotinamide adenine dinucleotide (forme réduite) FADH₂ : flavin adenine dinucleotid (forme réduite)

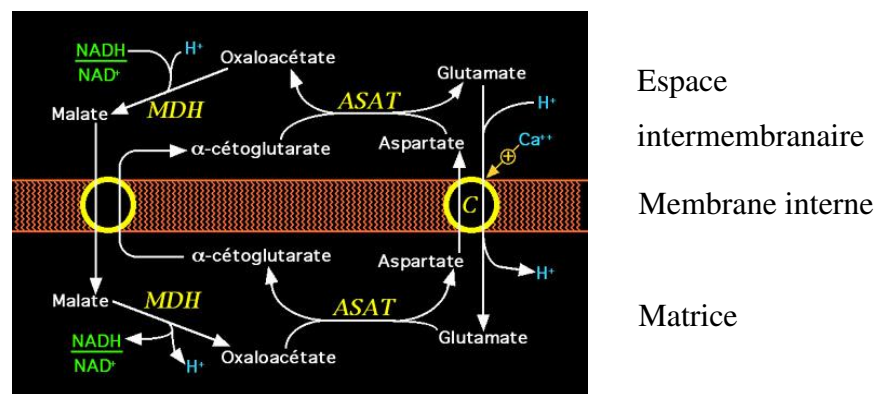


Figure 10. Navette du Malate. (Malgoyre 2011) Le NADH, H⁺ cède son pouvoir réducteur au malate, catalysé par la MDH cytosolique. Le malate entre dans la mitochondrie par un transporteur. Il est oxydé en oxaloacétate et fournit le pouvoir réducteur au NAD⁺. L'oxaloacétate forme l'aspartate. Qui sort dans le cytosol. MDH : malate déshydrogénase, ASAT : aspartate aminotransférase.

Le FADH₂ est un coenzyme fixe de la membrane mitochondriale donnant ses protons au coenzyme Q. Sa réduction a une triple origine. Il peut être produit :

- par l'oxydation du succinate en fumarate par la succinate déshydrogénase (complexe II de la CRM) du cycle de Krebs
- par l'oxydation du G3P comme vu précédemment avec la navette G3P
- par l'oxydation des acyl-CoA lors de la bêta-oxydation. Les FADH₂ sont transportés par une protéine de transfert, ETF : *electron transfer flavoprotein*.

Au total, l'oxydation d'une molécule de glucose (6 carbones) aura produit 10 NADH,H⁺/2 FADH₂ (2 NADH,H⁺ issus de la glycolyse, 2 NADH,H⁺ issus de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA et 6 NADH,H⁺/2 FADH₂ formés par les 2 molécules d'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs) alors que l'oxydation d'une molécule d'hexanoate (acide gras à 6 carbones) aura produit 11 NADH,H⁺/8 FADH₂ (2 NADH,H⁺ et 2 FADH produits dans l'hélice de Lynnen et 9 NADH,H⁺/6 FADH₂ issus des 3 molécules d'acétyl-CoA) (**Figure 11**).

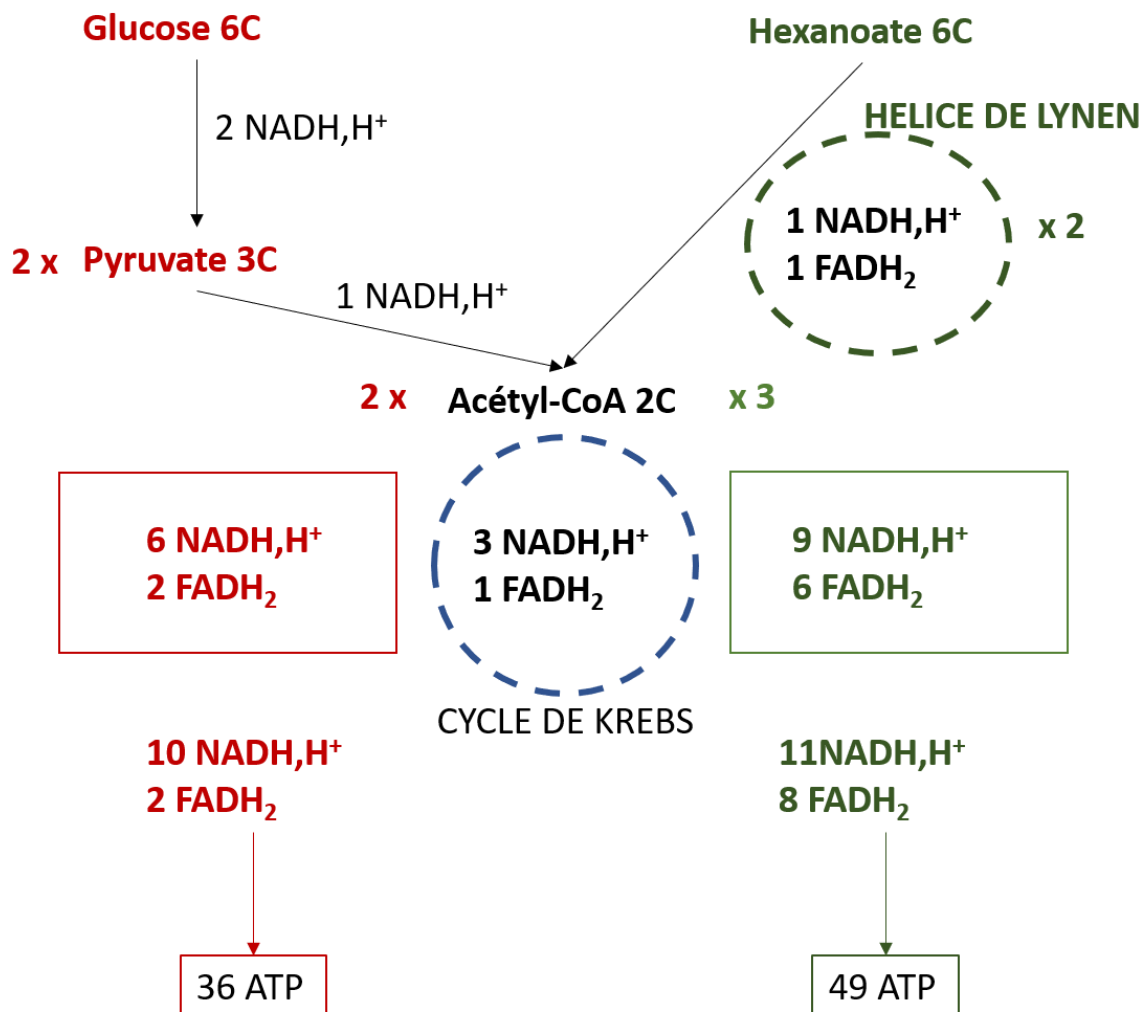


Figure 11. Bilan énergétique des voies glucidiques et lipidiques pour deux substrats à squelette carboné comparable (6C). NADH,H⁺ : nicotinamide adenine dinucleotide (forme réduite) FADH₂ : flavin adenine dinucleotid (forme réduite), ATP : Adénosine triphosphate.

Selon chacun des deux substrats utilisés, la quantité d'énergie générée par la phosphorylation oxydative diffère. Un gramme de glucose fournira 3,87 kcal alors qu'un gramme de lipide fournira 9,68 kcal, soit plus du double. En revanche, la quantité d'énergie produite rapportée au volume d'oxygène consommé est plus importante lors de l'oxydation des glucides que des

lipides. Ainsi l'équivalent énergétique est de 5,19 kcal/litre d'oxygène consommé en présence de glucose et de seulement 4,81 kcal/litre d'oxygène consommé en présence de palmitate. Cette observation est utilisée en physiologie pour déterminer la nature du substrat oxydé par les variations du quotient respiratoire (QR = rapport entre CO₂ produit et O₂ consommé) mesuré en calorimétrie indirecte : il est de 0,7 pour les lipides contre 1 pour les glucides (il faut 1 mole d'oxygène pour oxyder 1 mole de glucose mais environ 1,4 mole d'O₂ pour 1 mole d'AG, bien que cela varie selon le squelette carboné de l'AG). Ce coût en oxygène plus élevé associé à la complexité de la voie des lipides rendent compte d'une différence de débit d'oxydation et d'un métabolisme aérobie plus exigeant en O₂ pour l'oxydation des lipides, participant à la préférence des glucides lorsque l'intensité d'exercice requiert des débits d'énergie et une vitesse d'oxydation plus élevés.

c. Déterminants du couplage

En tant qu'utilisateur final de l'O₂, le contenu mitochondrial est un déterminant de la capacité maximale de captation musculaire de l'O₂. Ainsi, un lien a pu être établi entre performance aérobie et contenu mitochondrial (Hoppeler, Howald et al. 1985, Jubrias, Esselman et al. 2001). L'augmentation du nombre de mitochondries est le premier facteur permettant d'augmenter le fonctionnement mitochondrial et la capacité de synthèse d'ATP. Cependant, des études montrent qu'il est possible, également, d'augmenter la capacité de synthèse d'ATP en améliorant l'efficacité mitochondriale. La mitochondrie consomme moins d'O₂ pour produire de l'ATP, i.e. en augmentant le rapport ATP/O₂ (Larsen, Weitzberg et al. 2007, Siegel, Kruse et al. 2013, Jones 2014). La diminution du rapport P/O (production d'ATP par molécule d'O₂) peut provenir d'une altération du couplage de la phosphorylation oxydative, de la chaîne respiratoire mitochondriale ou de la phosphorylation.

Le couplage de la phosphorylation oxydative

La capacité maximale de production d'ATP peut être altérée par des mécanismes court-circuitant la phosphorylation par une fuite de protons, diminuant le gradient transmembranaire de protons. Cette fuite peut être induite chimiquement (par le dinitrophénol) (Marcinek, Schenkman et al. 2004), par un fort potentiel de membrane (Brand 2000) ou par des protéines canalaire (Harper, Bevilacqua et al. 2004) qui vont détourner la force motrice en augmentant la fuite de protons. De telles protéines canalaire (UCP, *uncoupling protein*) ont été découvertes dans le tissu adipeux brun et sont connues pour induire la production de chaleur par ce mécanisme de fuite de protons chez les espèces hibernants (Nicholls and Locke 1984).

L'isoforme UCP3 serait présente au sein du muscle squelettique, avec ce rôle paradoxal de diminution du couplage. A ce jour, le rôle d'UCP-3 dans le muscle reste encore extrêmement débattu. Parmi les hypothèses, le découplage participerait au contrôle de la dépense énergétique et à la régulation du poids par l'augmentation de la vitesse d'oxydation mitochondriale (Conley, Amara et al. 2013). Davantage retrouvé dans les fibres I avec contenu lipidique augmenté, le découplage participerait à la régulation du métabolisme lipidique et serait un moyen de défense contre le stress oxydatif. Ainsi la lutte contre le stress oxydant majoré lors du vieillissement passerait par une augmentation du découplage qui en corolaire diminue la capacité maximale de phosphorylation et pourrait participer à la fatigabilité accrue observée avec l'âge.

En outre, la nature du substrat oxydé est un élément déterminant sur le rendement de la phosphorylation oxydative (P/O). L'oxydation des glucides produit une proportion plus importante de NADH,H⁺ que de FADH₂ par rapport aux acides gras (Sibille, Filippi et al. 2001). En comparant des substrats avec un même nombre de carbone, le glucose produit 10 NADH,H⁺ et 2 FADH₂ alors que l'hexanoate produit 12 NADH,H⁺ et 6 FADH₂. L'oxydation du glucose produit davantage d'électrons et donc de force promotrice que l'acide gras. La production d'ATP par molécule d'oxygène est plus efficace (5,19 kcal.L⁻¹ O₂ pour les glucides contre 4,81 kcal.L⁻¹ O₂ pour les AG).

La chaîne respiratoire mitochondriale.

La chaîne respiratoire mitochondriale caractérise la capacité de réduction de l'oxygène à partir des équivalents réducteurs NADH,H⁺ et FADH₂ fournis par l'oxydation des substrats. Son fonctionnement détermine donc la vitesse d'oxydation (VO₂) et de fourniture en H⁺ pour la phosphorylation. Ce flux d'O₂ semble lié à la masse mitochondriale. Néanmoins, certaines situations comme le vieillissement pourraient altérer le fonctionnement de la CRM. Une expérience chez la souris a montré une diminution de la production maximale d'ATP liée à l'âge alors que le contenu de la CRM avait augmenté (Siegel, Wilbur et al. 2012). Dans une autre étude, l'augmentation de la capacité maximale de production d'ATP n'était que partiellement expliquée par l'amélioration du couplage ATP/O, et résultait donc d'une amélioration du fonctionnement de la CRM. L'administration de SS31, un anti-oxydant a permis de restaurer une résistance à la fatigue chez des souris âgées. La plus grande oxydation des complexes liée au stress oxydatif du vieillissement, corrigée par le SS31, a permis de restaurer l'efficacité de la CRM. (Siegel, Kruse et al. 2013). Dans ce cas, le moins bon fonctionnement de la CRM était dû à la production d'ERO, avec une altération du flux d'O₂, responsable d'une fatigue musculaire sans altération du couplage.

La phosphorylation

Le contrôle de la phosphorylation pourrait également représenter un facteur de l'efficacité mitochondriale. La synthèse d'ATP par l'ATP synthase est sous le contrôle du rapport ATP/ADP. Cette régulation fait intervenir le contrôle de la navette créatine -phosphocréatine par la créatine-kinase qui permet de maintenir un niveau d'ADP favorable à la synthèse d'ATP, et une protéine transmembranaire, ANT-1 (*adenine nucleotide transporter*) assurant l'échange par translocation bidirectionnelle entre cytosol et matrice de l'ADP et de l'ATP (Chance and Williams 1956, Conley, Kemper et al. 2001, Perry, Kane et al. 2012). Néanmoins, la concentration en ADP n'explique pas à elle seule la régulation de la production mitochondriale d'ATP. L'ANT-1 modifierait l'affinité mitochondriale pour l'ADP. Cette régulation est notamment importante dans le passage d'une situation de repos à une phase d'exercice. En effet, l'affinité mitochondriale pour l'ADP est faible dans des conditions de faible demande en ATP mais s'élève drastiquement lorsque la concentration en ADP augmente comme cela a été observé à l'exercice (Perry, Kane et al. 2012). En l'absence de créatine, cette affinité pour l'ADP est 20 fois plus grande dans les mitochondries de muscle glycolytiques comparée à celles de mitochondrie de muscles oxydatifs. De plus, les situations d'entraînement (Zoll, Sanchez et al. 2002) ou certaines interventions nutritionnelles (oméga 3) (Herbst, Pagliialunga et al. 2014) sont connues pour modifier la sensibilité des mitochondries à l'ADP notamment par modification de l'expression du complexe protéique ANT1-créatine kinase mitochondriale (mi-CK). La modification de la sensibilité de la mi-CK entraînerait une augmentation de l'affinité pour l'ADP (Perry, Kane et al. 2012). Des mécanismes de régulation allostérique mais également traductionnels et post-traductionnels semblent impliqués dans cette régulation de la phosphorylation par la sensibilité à l'ADP via l'ANT1 (Jeneson, Schmitz et al. 2009, Wang, Murray et al. 2013, Herbst, Pagliialunga et al. 2014).

3. Régulation du métabolisme énergétique

Les glucides et les lipides sont les substrats majeurs du métabolisme énergétique. Leur contribution relative dépend du statut nutritionnel de l'individu, des apports et des réserves en glycogène, de la puissance et de la durée (quantité d'énergie par unité de temps) requise par l'activité. Dans la situation classique d'un sujet ayant les apports nutritionnels adaptés (bien nourri), la balance de contribution des acides gras et des glucides (CHO) à l'exercice peut être modélisée par le concept de *cross-over* (Figure 12) (Brooks and Mercier 1994). La contribution relative des substrats se caractérise par une augmentation de la part des glucides au détriment des lipides avec l'augmentation de la puissance d'exercice. Le point de croisement glucido-

lipidique (PCGL) correspond à la puissance relative d'exercice pour laquelle la contribution des 2 substrats est égale dans la fourniture en énergie. Ainsi, l'oxydation des lipides est prépondérante lorsque la puissance développée par l'organisme (énergie dépensée par unité de temps) est basse comme dans le métabolisme de base ou dans les exercices d'intensité modérée (Brooks and Mercier 1994). La participation des lipides augmente également avec la durée d'exercice, pour des intensités modérées, notamment par la diminution de la disponibilité en glucides liée à la diminution des réserves en glycogène (Holloszy, Kohrt et al. 1998). Lorsque l'intensité augmente, la part des glucides augmente pour devenir majoritaire après le PCGL.

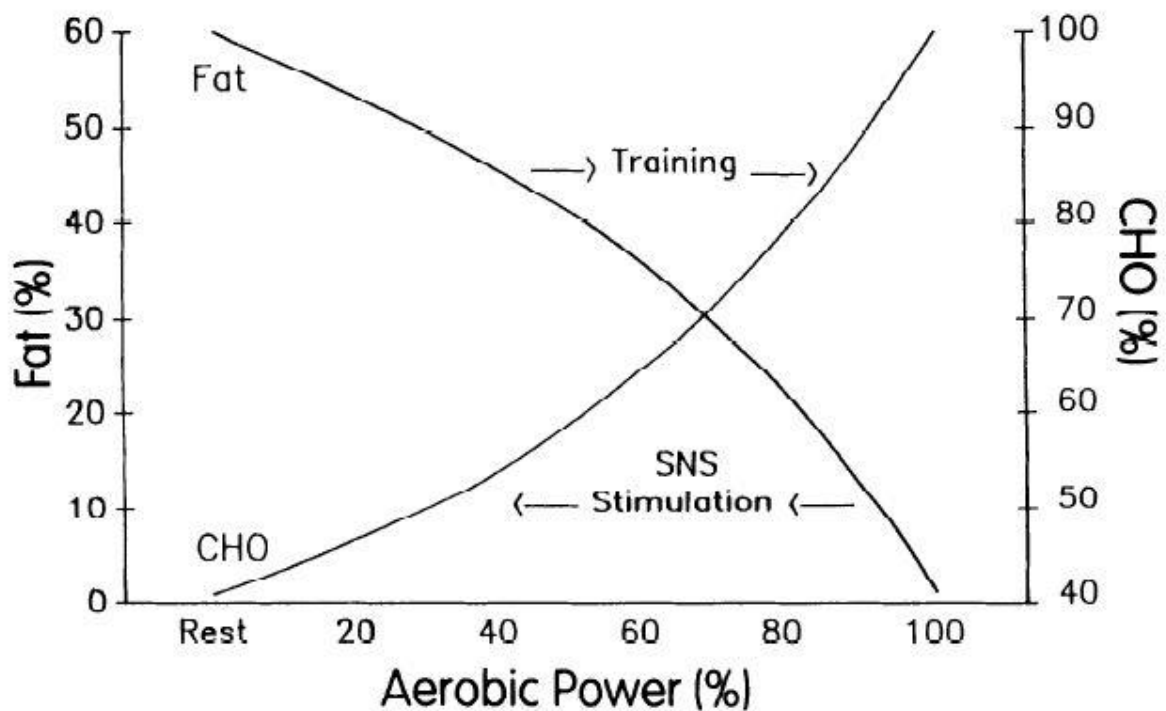


Figure 12. Point de croisement glucido-lipidique (cross-over concept). La contribution relative des glucides (%CHO) augmente au détriment de l'oxydation des lipides (%Fat), en fonction de la puissance relative d'exercice. Le point de croisement correspond à la puissance pour laquelle la contribution des glucides dans la fourniture en énergie devient majoritaire. Après entraînement, le glissement vers la droite de la courbe traduit une augmentation de la contribution des lipides dans la fourniture en énergie pour une intensité d'exercice relative donnée. La diminution de la contribution des glucides (moins de glycogène) s'accompagne d'une moindre stimulation par le système nerveux sympathique (SNS) (Brooks and Mercier 1994).

a. La disponibilité en substrats.

L'organisme module l'utilisation des substrats en fonction de leur disponibilité. Notamment, l'alimentation influence l'utilisation des substrats comme le montrent de nombreuses études, au travers des modifications du QR. En post-prandial, le quotient respiratoire égal à 1 traduit une utilisation exclusive des glucides pour la fourniture en énergie, liée à leur disponibilité accrue (Thomas, Peters et al. 1992, Kahlhofer, Lagerpusch et al. 2014). Inversement, à distance

d'un repas comme durant un jeûne, la diminution du QR traduit une augmentation de l'oxydation des lipides, en lien avec la diminution de la disponibilité en glucides (Thomas, Peters et al. 1992, Thyfault, Rector et al. 2006). Les divers entraînements et stratégies alimentaires qui ont pu être proposés dans le cadre d'une perte de poids ou de l'amélioration de la performance s'appuient notamment sur la sollicitation de cette flexibilité alimentaire (Haman, Peronnet et al. 2004, Kahlhofer, Lagerpusch et al. 2014). Par exemple, un effet du régime cétogénique est de favoriser l'utilisation des lipides en mimant un jeûne glucidique. L'épuisement des réserves glucidiques amène l'organisme à utiliser les acides gras pour produire, via le foie, des corps cétoniques utilisables par les cellules et du glucose par néoglucogenèse (Walczyk and Wick 2017) dans le but de restaurer une flexibilité métabolique souvent perdue dans les situations de surpoids du fait d'un défaut d'utilisation des lipides.

A l'exercice sous-maximal, l'augmentation du débit sanguin local permet de favoriser l'apport des substrats glucidiques et lipidiques ainsi que l'O₂. Ils proviennent de la circulation (lipolyse du tissu adipeux, glycogénolyse hépatique) et des réserves intra-musculaires (triglycérides intra-musculaires, glycogène musculaire). La contribution de ces différentes réserves dépend de l'intensité et de la durée d'exercice et de la taille des réserves. Cependant, dans la régulation de la balance glucido-lipidique, la contribution des lipides ne paraît pas directement dépendante de la disponibilité en lipides, puisque leur utilisation diminue malgré l'augmentation de leur disponibilité sanguine (Kiens, Essen-Gustavsson et al. 1993).

b. La régulation hormonale

Insuline/glucagon

Le rapport insuline/glucagon représente les principaux effecteurs la boucle de régulation de la glycémie face à la discontinuité des apports. L'insuline est sécrétée en réponse à l'augmentation de la glycémie. Elle va favoriser son utilisation au niveau du muscle et son stockage principalement au niveau du foie. Par ailleurs, elle favorise le stockage des AG et inhibe leur oxydation. Elle agit sur le transport des substrats (GLUT 4 et FAT CD36)(Luiken, Dyck et al. 2002), l'activité de la PDH, de la Glycogène Synthase et de la lipase hormonosensible (LHS). Les actions hépatiques se caractérisent par une inhibition de la glycogénolyse et de la glycolyse et une stimulation de la synthèse du glycogène. Au niveau du tissu adipeux, la synthèse des triglycérides est favorisée et la lipolyse est inhibée. Pour le glucagon, les effets sont essentiellement hépatiques et inverses de l'insuline. Il stimule également l'oxydation des AG par le foie.

Adrénaline

L'adrénaline favorise la glycogénolyse musculaire (et hépatique) ainsi que la glycolyse anaérobie (via PFK notamment). Elle stimule l'action du glucagon et inhibe celle de l'insuline, renforçant les capacités de mobilisation glucidiques. Elle stimule la lipolyse au niveau du tissu adipeux. A l'exercice, l'activation du système nerveux sympathique et l'augmentation de la concentration en adrénaline et noradrénaline ont des effets sur l'utilisation des substrats, en favorisant l'utilisation des glucides par augmentation de la disponibilité dans le sang et dans le muscle.

Des facteurs autres qu'hormonaux interviennent dans la régulation systémique de la glycémie. Notamment, l'Interleukine-6 (IL-6), une myokine musculaire est produite à l'exercice. Elle intervient dans la disponibilité des substrats. Elle permettrait de stimuler la néoglucogénèse hépatique et la captation du glucose par le muscle, en réponse à une diminution de la réserve glycogénique musculaire, mais également la lipolyse et l'oxydation des lipides (van Hall, Steensberg et al. 2003, Carey, Steinberg et al. 2006).

c. La régulation mitochondriale

Cycle de Randle

L'intérêt de ce modèle est d'identifier un carrefour de régulation de la contribution des deux substrats majeurs dans la fourniture en énergie, même si des études plus récentes ont permis de préciser les mécanismes de régulation. Historiquement, le cycle de Randle décrit l'inhibition de l'oxydation des glucides par l'oxydation des AG. L'accumulation d'un intermédiaire, l'acétyl-CoA, inhibe l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie par inhibition allostérique de la PDH. L'inhibition de l'entrée du pyruvate serait l'étape-clé de la freination de l'oxydation du glucose (Randle, Garland et al. 1963, Randle, Newsholme et al. 1964, Randle, Kerbey et al. 1988, Randle 1995, Randle 1998) (**Figure 13A**). Inversement, il a été ensuite proposé que le flux d'oxydation du glucose pouvait inhiber l'utilisation des lipides via l'accumulation de malonyl-CoA. L'accumulation de malonyl-CoA inhibe CPT1 et stimule l'AG synthase. La moindre entrée d'AG dans la mitochondrie limite leur oxydation (McGarry, Mannaerts et al. 1977, McGarry 1998) (**Figure 13B**). Ainsi, le terme de cycle décrit l'inhibition réciproque entre les voies glucidique et lipidique et non un retour à un état initial. Ce cycle glucose-AG rend compte du contrôle de la balance glucido-lipidique dans son fonctionnement mitochondrial et de l'interrelation entre ces deux métabolismes, sous l'influence des régulations hormonales et humorales, et reposant sur la régulation des deux systèmes enzymatiques clés.

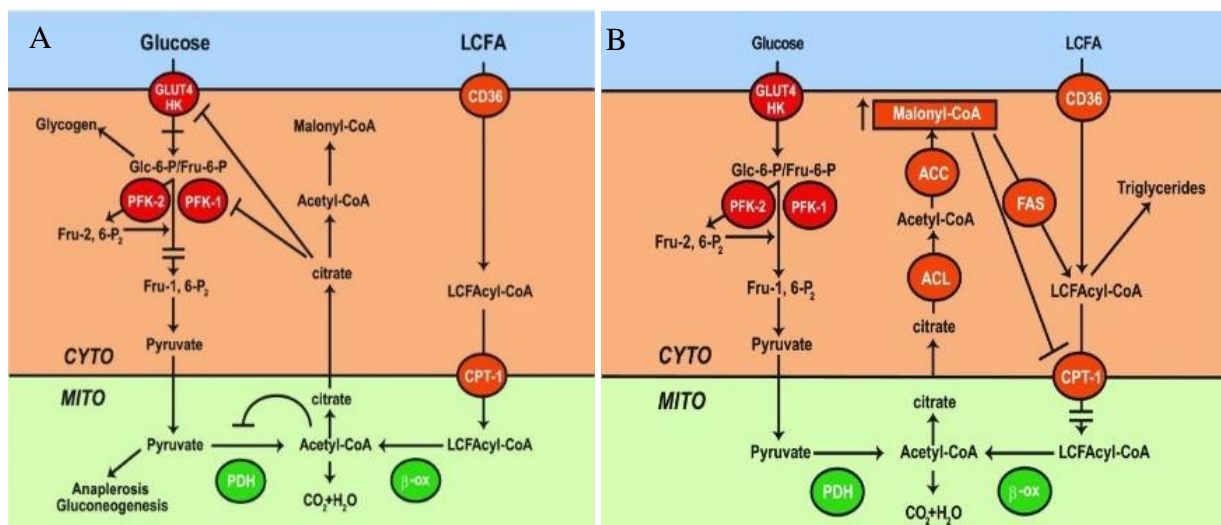


Figure 13. Cycle de Randle. A) Inhibition de l'utilisation du glucose par les acides gras. L'inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) est induite par l'acétyl-CoA et le NADH, dont l'accumulation résulte de l'oxydation accrue des acides gras (LCFA : long chain fatty acids). La phosphofructokinase-1 (PFK-1) est inhibée par le citrate. L'inhibition de l'hexokinase (HK) par le citrate est incertaine. Le glucose est ainsi détourné de l'utilisation vers le stockage (glycogénogenèse, néoglucogénèse) et la synthèse d'intermédiaires (anaplerosis). **B) Inhibition de l'utilisation des acides gras par le glucose.** La formation du malonyl-CoA à partir de l'Acétyl-CoA est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). L'accumulation de malonyl-CoA inhibe l'entrée des acides gras à longue chaîne, au niveau de la carnitine palmitoyl transférase-1 (CPT-1). Les acides gras sont détournés de l'oxydation vers le stockage sous forme de triglycérides. (Hue and Taegtmeyer 2009). ACL : ATP-citrate lyase, CYTO: cytosol, FAS : fatty acid synthase, Glc-6-P : glucose-6-phosphate, Fru-6-P : fructose-6-phosphate, GLUT 4 : glucose transporter-4, MITO: matrice mitochondriale, β -ox : β -oxydation.

Les étapes clé de l'utilisation du choix du substrat :

Régulation du transport des AG dans la mitochondrie

Dans la cellule musculaire, la concentration en malonyl-CoA est finement régulée. Il est produit à partir de l'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et dégradé par une autre enzyme, la malonyl-CoA déshydrogénase (MCD). L'activité de ces deux enzymes est régulée de façon très différente puisque l'ACC est essentiellement inactivée par phosphorylation par l'AMP-activated protein kinase (AMPK), alors que la MCD est essentiellement régulée au niveau transcriptionnel. Lors du passage d'une situation à une autre (repos-exercice...), seule la modulation de l'activité de l'ACC est donc susceptible d'expliquer un changement de la concentration malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est un inhibiteur allostérique de CPT1, comme montré *in vitro* et sur fibres perméabilisées (McGarry, Mills et al. 1983, Smith, Perry et al. 2012). L'inhibition de l'ACC entraîne une diminution de l'accumulation de malonyl-CoA et une levée d'inhibition de CPT1. Cependant, il semble que cette régulation dépende davantage du ratio acides gras / malonyl-CoA. En effet, le niveau d'oxydation des acides gras pourrait varier en l'absence de modification de la concentration de malonyl-CoA, comme le suggèrent certaines études (Odland, Heigenhauser et al. 1996, Odland, Howlett et al. 1998), voire

diminuer avec la concentration en malonyl-CoA. De plus la sensibilité de CPT1 au malonyl-CoA pourrait varier notamment avec l'entraînement (Starritt, Howlett et al. 2000), être diminuée par l'augmentation de la concentration en palmitoyl-CoA (Kolodziej and Zammit 1990, Smith, Perry et al. 2012) ou par des altérations du cytosquelette (processus AMPK dépendant ou plutôt indépendant ?) (Miotto, Steinberg et al. 2017). En outre, l'activité CPT1 non-dépendante de malonyl-CoA pourrait être contrôlée par le pH (Starritt, Howlett et al. 2000).

Dans les exercices de haute intensité, la disponibilité en carnitine a été avancée comme un facteur limitant du transport des AGLC et donc de l'oxydation des AG. La disponibilité importante d'acétyl CoA dans l'espace intermembranaire, au regard de son utilisation dans le cycle de Krebs, peut entraîner un piégeage de la carnitine. La diminution du pool de carnitine ralentit alors l'activité de CPT1. Néanmoins dans cette situation, il semble plutôt que ça soit la vitesse de processing des acylCoA dans l'hélice de Linen qui soit le facteur limitant en aval, aboutissant à une accumulation en amont d'acylCoA limitant secondairement la disponibilité en carnitine.

Rôle central de la PDH dans la balance AG-glucose

Le contrôle de l'oxydation des AG pourrait surtout dépendre de la concentration en acétyl-CoA et de la régulation de l'activité de la PDH. Ainsi, une inactivation de la PDH est enregistrée dans le muscle en réponse au jeûne, ou encore lors d'un régime riche en graisse c'est-à-dire dans des situations physiologiques ou pathologiques dans lesquelles est observé un frein à l'utilisation du glucose dans le muscle (Harris, Bowker-Kinley et al. 2002). De façon plus fondamentale, l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie a d'ailleurs été identifiée comme un des points de contrôle majeur de la respiration enregistrée sur mitochondries isolées du muscle squelettique ou de myocarde (Rossignol, Letellier et al. 2000).

La concentration en acétyl-CoA semble une étape clé de l'utilisation relative des substrats. Sa formation provenant du métabolisme glucidique (pyruvate) ou lipidique (acyl-CoA), la régulation est le résultat de l'interpénétration de ces deux métabolismes contrôlés par la disponibilité en substrats et les régulations hormonales (insuline, adrénaline...) et humorales (Ca^{2+} , pH...).

Or, il apparaît que le contenu en acétyl-CoA en lui-même est surtout régulé par l'activité de la PDH (Harris, Bowker-Kinley et al. 2002). A l'exercice, la stimulation de la PDH croît avec l'intensité (Constantin-Teodosiu, Carlin et al. 1991) mais diminue avec la durée (Watt, Heigenhauser et al. 2002). Son activation serait induite notamment par la contraction et les

perturbations de l'homéostasie calcique induisant une déphosphorylation de la sous-unité PDHE1 α . Cette activité est également modulée par les concentrations en pyruvate et acétyl-CoA, agissant sur la PDK, permettant d'ajuster le flux de la PDH à la glycolyse et au cycle de Krebs (Holness and Sugden 2003, Pilegaard, Birk et al. 2006). En parallèle, la concentration en acétyl-CoA est influencée par l'activité de la CAT. Ainsi, lors d'une élévation de l'acétyl-CoA, il se produit une formation d'acétyl-carnitine qui atténue l'accumulation d'acétyl-CoA, diminuant l'inhibition de la PDH mais, qui, en diminuant la carnitine disponible pour se lier aux acyl-CoA, limite également l'oxydation des AG (Harris, Foster et al. 1987, Sahlin 1990, Constantin-Teodosiu, Carlin et al. 1991, Odland, Howlett et al. 1998, van Loon, Greenhaff et al. 2001, Seiler, Koves et al. 2015). Cette compétition entre concentration en acétyl-CoA et en acétyl-carnitine, pourrait être le principal régulateur de l'activité PDH permettant sans ajustement dynamique en fonction de la puissance d'exercice (Roepstorff, Halberg et al. 2005).

II. Effets aigus de la chaleur sur le métabolisme énergétique et la mitochondrie

La chaleur induirait une augmentation du métabolisme de repos (Consolazio, Shapiro et al. 1961, Consolazio, Matoush et al. 1963, Dimri, Malhotra et al. 1980), et influencerait le niveau de performance lors d'exercices aérobies ou en force (Edwards, Harris et al. 1972, Girard, Brocherie et al. 2015). En effet, de nombreuses études montrent une diminution des capacités d'endurance. L'exposition aiguë à la chaleur diminue tant la capacité ($\dot{V}O_{2max}$) et la puissance maximales aérobies (Klausen, Dill et al. 1967, Rowell, Brengelmann et al. 1969, Saltin, Gagge et al. 1972, Sen Gupta, Dimri et al. 1977) que l'endurance d'efforts sous-maximaux, qu'elle soit estimée par le temps de parcours pour une distance donnée (TT : *time trial*) ou par la durée jusqu'à épuisement d'un exercice d'intensité donnée (*Time to exhaustion*) (Nybo, Rasmussen et al. 2014). Par exemple, aucun sujet parmi 24 n'est en mesure de terminer une marche (Figure 14) de 100 min à 49°C – 20% humidité relative (HR) à 3.5mph soit 5,6 km/h (Pandolf & Young).

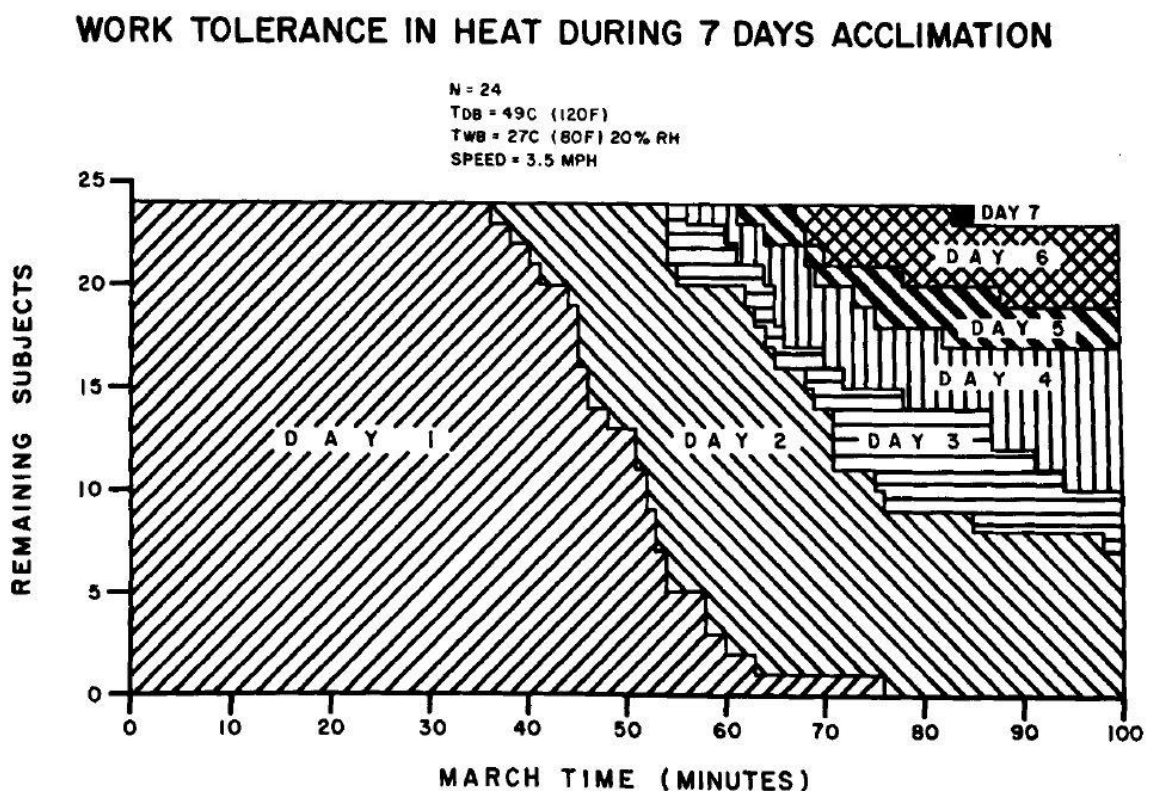


Figure 14. Effet d'une acclimation à la chaleur de 7 jours sur un exercice prolongé sous-maximal (Pandolf 1998)

De même, le temps de maintien avant épuisement d'un exercice sous-maximal (40 min 70%VO₂max) effectué à la chaleur (40°C 20 % HR) est diminué, certains sujets ne parvenant pas au bout de l'exercice (2 sur 13 sujets) alors que le même exercice en ambiance tempérée était bien tolérée (Febbraio, Snow et al. 1994). Sawka, notamment, a montré une diminution de 8% de la VO₂max d'un exercice réalisé à la chaleur (49°C), comparé à un exercice en ambiance tempérée (21°C) (Sawka, Young et al. 1985). Ainsi un exercice réalisé à même intensité absolue correspondra à une intensité relative plus importante à la chaleur que s'il est réalisé en ambiance tempérée (Sawka, Young et al. 1985).

En revanche, l'évaluation de la dépense énergétique à l'exercice sous-maximal à la chaleur montre des effets moins univoques. Certaines études retrouvent une augmentation de VO₂ (Consolazio, Shapiro et al. 1961, Consolazio, Matoush et al. 1963, Fink, Costill et al. 1975, Dimri, Malhotra et al. 1980) alors que d'autres observent au contraire une diminution de la consommation en O₂ (Brouha, Smith et al. 1961, Williams, Bredell et al. 1962, Petersen and Vejby-Christensen 1973, Young, Sawka et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994). Ces observations contradictoires reflètent des différences méthodologiques telles que le statut d'acclimatation, l'intensité d'exercice ou le niveau de stress thermique qui vont influencer le métabolisme énergétique musculaire. L'exposition à la chaleur va perturber la contribution relative des filières aérobie et anaérobie ainsi que la disponibilité et l'utilisation des substrats (Fink, Costill et al. 1975, King, Costill et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994). L'objet de ces rappels est de synthétiser les connaissances et controverses actuelles concernant l'effet aigu de la chaleur sur le métabolisme musculaire.

1. Métabolisme glucidique

Si l'altération du métabolisme glucidique à la chaleur est connue depuis longtemps (Fink, Costill et al. 1975, Febbraio 2001), certaines observations contradictoires interrogent sur les mécanismes encore inconnus et les conséquences sur la performance.

a. La glycémie

Augmentation de la glycémie par la chaleur. Lors de l'exposition passive à la chaleur, la glycémie augmenterait (Akanji, Bruce et al. 1987, Frayn, Whyte et al. 1989, Akanji and Oputa 1991, Schmidt, Matos et al. 1994, Moses, Patterson et al. 1997). Cependant l'interprétation de cette hyperglycémie à la chaleur comme altération du métabolisme glucidique fait l'objet de controverses. L'effet d'une exposition passive à la chaleur (35 vs 23 °C) sur la glycémie veineuse a été mesuré en prenant en compte les variations du débit sanguin cutané, qui

augmente par l'ouverture de shunts artério-veineux du fait de la réponse thermorégulatrice. L'augmentation de la glycémie apparaît corrélée à la vasodilatation cutanée, du fait d'une artérialisation du sang veineux (Frayn, Whyte et al. 1989). Ainsi, les auteurs concluaient à une altération apparente de la tolérance au glucose par l'exposition aiguë à la chaleur.

Stimulation de la glycolyse hépatique. Néanmoins, plusieurs observations plaident pour un impact spécifique de la chaleur aiguë sur le métabolisme du glucose, avec notamment une augmentation de la libération hépatique de glucose (Hargreaves, Angus et al. 1996). L'hyperglycémie à l'exercice à la chaleur serait donc, au moins en partie, le résultat d'un effet sur la régulation hépatique et non due au seul effet « mécanique » de diminution de la différence artérioveineuse en glucose consécutive à l'ouverture de shunts. D'autre part, une augmentation de l'insulinémie est également observée, au repos, à l'exposition passive à la chaleur (Akanji, Bruce et al. 1987, Frayn, Whyte et al. 1989, Akanji and Oputa 1991, Schmidt, Matos et al. 1994, Moses, Patterson et al. 1997). L'exposition à la chaleur induit une élévation de la glycémie et de l'insulinémie post-ingesta (repas ou hyperglycémie provoquée par voie orale) au repos (Faure, Charlot et al. 2016), traduisant une certaine intolérance au glucose induite par la chaleur. De plus, malgré les effets insulino-sensibilisants de l'exercice, la chaleur induit une augmentation de la glycémie post-ingesta après exercice par rapport à la situation témoin. Le stress aigu chaud apparaît comme un stress métabolique puissant capable de contrecarrer les effets métaboliques propres de l'exercice.

Chaleur et charge glycémique. La possibilité d'une hyperglycémie induite par le stress thermique chaud pose la question des conditions de réalisation des tests diagnostiques de dysrégulation de la glycémie. Ainsi, une surestimation des cas d'intolérance au glucose est possible si les tests sont réalisés en ambiance chaude. Une étude a notamment retrouvé, chez certains sujets sains, une diminution de la tolérance à l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) atteignant les critères d'intolérance au glucose lorsque le test était réalisé à 33°C (Akanji and Oputa 1991). Inversement, la vie sous les climats chauds pourrait accroître le risque de pathologie de la régulation du métabolisme glucidique s'il existe bien une insulino-résistance induite par la chaleur comme le suggèrent les études citées précédemment. Il est d'ailleurs troublant de retrouver un taux d'incidence du diabète augmenté dans les populations tropicales, sans néanmoins préjuger de l'importance relative de l'habitus et des conditions environnementales.

Si ces variations systémiques de l'homéostasie glycémique induites par la chaleur sont assez bien établies tant au repos qu'à l'exercice, les mécanismes sous-jacents sont imparfaitement

connus. S'il semble exister une participation hépatique à ces observations (Hargreaves, Angus et al. 1996, Gerich, Meyer et al. 2001), le rôle du muscle, organe le plus consommateur de glucose par sa masse, dans cet équilibre est incontournable.

b. Utilisation du glucose par le muscle exposé à la chaleur

Il convient ici de distinguer l'origine du glucose utilisé par le muscle qui peut trouver son origine dans la circulation sanguine ou dans les stocks de glycogènes intramusculaire. Les effets de la chaleur sur l'utilisation du glucose circulant par le muscle sont très débattus. Certaines études montrent une augmentation de la consommation du glucose sanguin par le muscle (Koshinaka, Kawamoto et al. 2013) alors que d'autres attribuent l'élévation de glycémie lors d'un exercice à la chaleur à une élévation du taux d'apparition du glucose sans variation du taux de disparition et donc de captation par le muscle (Hargreaves, Angus et al. 1996, Koshinaka, Kawamoto et al. 2013)

Augmentation de l'utilisation du glycogène musculaire. Quoiqu'il en soit concernant la captation du glucose circulant, les études portant sur l'utilisation des réserves glucidiques intramusculaires lors d'exercices à la chaleur sont plus nombreuses. Il est communément admis que l'hyperthermie induit une augmentation de l'utilisation des réserves glucidiques intramusculaires lors d'exercices prolongés (Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994, Hargreaves, Angus et al. 1996, Starkie, Hargreaves et al. 1999). Plusieurs études ont montré que l'augmentation de l'utilisation du glycogène musculaire induite par la chaleur était atténuée lorsque l'augmentation de la température profonde était elle-même limitée par diverses contre-mesures telles que l'acclimatation (King, Costill et al. 1985, Young, Sawka et al. 1985, Kirwan, Costill et al. 1987, Febbraio, Snow et al. 1994), l'hydratation (Hargreaves, Dillo et al. 1996, Gonzalez-Alonso, Calbet et al. 1999), la baisse de la température ambiante (Febbraio, Snow et al. 1996, Parkin, Carey et al. 1999), ou le refroidissement (Kozlowski, Brzezinska et al. 1985, Lemmer 2000). De nombreuses études suggèrent donc que l'exposition aiguë à la chaleur a des effets sur le métabolisme glucidique musculaire dépendantes de l'augmentation de la température profonde et/ou musculaire.

Pas d'effet de la chaleur si le stress thermique est insuffisant. Néanmoins certaines études n'ont pas retrouvé d'augmentation de l'utilisation du glycogène lors d'un exercice à la chaleur. Yaspelkis n'a pas retrouvé d'effet de la chaleur sur la glycogénolyse malgré une différence de température d'exposition de 10°C entre les deux groupes. Cependant, les sujets de cette étude étaient acclimatés à la chaleur, et l'élévation de la température profonde de seulement 0,4°C

n'excédait pas l'amplitude des variations circadiennes au repos. De plus, la température musculaire n'étant pas connue, il est difficile de dire si l'absence de différence d'effet de la chaleur sur la glycolyse entre les deux groupes n'était pas liée à une absence d'élévation de la température musculaire dans le groupe réalisant l'exercice à la chaleur (Yaspelkis, Scroop et al. 1993). Il semble donc qu'une augmentation suffisante de la température musculaire soit un préalable important. En effet, l'exercice physique *per se* est connu pour induire une élévation de la température musculaire et une hyperthermie centrale. L'étude d'un stress thermique chaud surajouté implique de pouvoir induire une élévation de température suffisante pour mettre en évidence un effet de la chaleur exogène, distincte de l'hyperthermie d'exercice.

L'intensité d'exercice peut également masquer l'effet propre de la chaleur sur l'utilisation du glycogène à l'exercice. En effet, plus l'effort est intense, plus le métabolisme énergétique repose sur l'utilisation du glycogène (Brooks and Mercier 1994). Ainsi dans l'étude de Maxwell (Maxwell, Gardner et al. 1999), les niveaux d'effort ($115\% \dot{V}O_{2max}$) ont induit un tel niveau de consommation d'énergie que l'effet surajouté de la chaleur sur les réserves en glycogène ne pouvait probablement pas être individualisé du fait d'un niveau d'utilisation déjà maximal dans la situation contrôle.

Disponibilité en glycogène. Les stocks initiaux en glycogène ont pu aussi interférer avec les effets propres de la chaleur. Ainsi, Young ne retrouvait pas d'augmentation de la consommation en glycogène entre un exercice réalisé au chaud et un exercice réalisé au froid mais les stocks en glycogène avant exercice étaient différents entre les deux groupes (Young, Sawka et al. 1995).

Utilisation des glucides à la chaleur. L'utilisation accrue des glucides pose la question de leur devenir métabolique. Les glucides étant utilisés à la fois par les métabolismes aérobie et anaérobie, l'effet de la chaleur lors d'exercices sous-maximaux peut concerner ces deux filières. Plusieurs études montrent que l'augmentation de l'utilisation des CHO au cours d'un exercice réalisé à la chaleur s'accompagne d'une augmentation de la lactatémie (Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Carey et al. 1996, Hargreaves, Dillo et al. 1996, Parkin, Carey et al. 1999), ce qui pourrait être interprété comme une augmentation de la glycolyse anaérobie pour un exercice d'intensité donnée. Dans l'étude de Febbraio de 1996, la chaleur était appliquée localement sur le muscle, lors d'un exercice supramaximal ($115\% \dot{V}O_{2max}$) (Febbraio, Carey et al. 1996). Le but était d'analyser le rôle du métabolisme dans la survenue de la fatigue musculaire à la chaleur, et de discriminer l'effet propre de la

température. Les auteurs ont ainsi montré une augmentation de la lactatémie en parallèle de la diminution du glycogène dans le muscle localement chauffé. Cependant la lactatémie est la résultante d'une part de la production et de l'élimination musculaires du lactate, et d'autre part de son prélèvement par d'autres tissus. La constatation d'une lactatémie augmentée à la chaleur ne signifie pas formellement que le muscle actif est le lieu d'un métabolisme anaérobie augmenté. La preuve que le métabolisme anaérobie a davantage été mis à contribution ne peut être apportée que si l'augmentation de production locale de lactate est mise en évidence. Un argument en faveur de cette hypothèse s'appuie sur le dosage des adénosine phosphates (AdN = ATP+ADP+AMP encore appelé pool nucléotidique) et de la phosphocréatine (PCr). Or une diminution du pool nucléotidique était observée lors de l'exercice, qu'il soit sous-maximal (Febbraio, Snow et al. 1994) ou intense (Febbraio, Carey et al. 1996). De manière concordante, cette dégradation accrue des phosphates à haute énergie, associée à l'augmentation de la glycolyse et de la lactatémie forment un faisceau d'arguments en faveur d'une augmentation du métabolisme anaérobie, et de la glycolyse lors d'un exercice à la chaleur.

Augmentation de la lactatémie controversée. L'effet de la chaleur sur l'augmentation de la glycolyse musculaire et l'activation du métabolisme anaérobie lors de l'exercice à la chaleur demeurent néanmoins controversés, certaines études ne retrouvant pas un tel effet (Young, Sawka et al. 1985, Nielsen, Savard et al. 1990, Yaspelkis, Scroop et al. 1993, Young, Sawka et al. 1995, Maxwell, Gardner et al. 1999). Ainsi, une accumulation intramusculaire de lactates est mise en évidence de façon plus importante chez des sujets ayant réalisé un exercice sous-maximal à la chaleur, mais en l'absence d'augmentation de la glycolyse musculaire (Young, Sawka et al. 1985), tandis que l'augmentation de la lactatémie n'est pas systématiquement retrouvée au niveau du muscle actif (Nielsen, Savard et al. 1990). Plusieurs hypothèses peuvent être discutées concernant les discordances de résultats de lactatémie. La balance circulatoire à l'exercice à la chaleur et la redistribution d'une partie du débit sanguin vers la peau a pu modifier la capacité d'élimination des lactates avec notamment une possible diminution du débit circulatoire splanchnique et surtout la capacité d'efflux du muscle secondaire à la diminution du débit sanguin musculaire.

Malgré les controverses, l'analyse de la littérature suggère que l'exposition aiguë à la chaleur augmente la dépendance du métabolisme énergétique aux CHO et notamment aux dépens des stocks glycogéniques intramusculaire et que celle-ci repose au moins en partie sur une augmentation de la contribution de la glycolyse à l'exercice. De plus, malgré cette dépendance accrue aux CHO, la vitesse de disparition dans le sang du glucose marqué demeure stable. Le muscle n'augmente donc pas sa vitesse d'absorption du glucose sanguin par rapport à l'exercice en neutralité thermique. Dans le contexte d'hyperglycémie induite par la chaleur évoquée précédemment, ce résultat est cohérent avec l'hypothèse de l'augmentation de la production hépatique de glucose avancée par certains auteurs.

Indépendamment de ces effets sur le métabolisme anaérobie, plusieurs études ont montré une augmentation du quotient respiratoire (QR) à l'exercice à la chaleur suggérant que les glucides pourraient être davantage oxydés lors d'un exercice réalisé à la chaleur plutôt qu'en ambiance thermique neutre (Young, Sawka et al. 1985, Dolny and Lemon 1988, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994, Hargreaves, Angus et al. 1996). En couplant la méthode de mesures des échanges gazeux à celle du glucose marqué, Hargreaves montre que l'augmentation du QR observée reflète une augmentation de l'oxydation des glucides de $33 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (234 ± 12 vs $201 \pm 8 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) lorsque l'exercice est réalisé à la chaleur (40°C) comparativement à un exercice de même intensité réalisé à 20°C (Hargreaves, Angus et al. 1996).

2. Balance glucido-lipidique

Les effets de la chaleur sur l'utilisation des CHO interrogent sur la contribution relative d'une part des filières anaérobie et aérobie, d'autre part de la participation des deux principaux substrats énergétiques oxydés (glucides et lipides) à l'exercice, CHO et lipides, dans la fourniture en énergie. Alors que de nombreuses études se sont intéressées aux effets de la chaleur sur le métabolisme des glucides à l'exercice, d'une manière générale, peu d'études se sont réellement intéressées aux conséquences de la chaleur sur l'utilisation des lipides à l'exercice. La contribution des acides gras est généralement envisagée sous l'angle de la balance des substrats et donc par déduction. Les auteurs supposent une moindre contribution des acides gras au regard de l'utilisation accrue des CHO.

Une moindre contribution des lipides. Quelques études suggèrent néanmoins une moindre contribution des lipides dans la fourniture d'énergie à la chaleur mais ne permettent pas d'objectiver une altération de l'oxydation des acides gras à l'exercice à la chaleur. Historiquement, l'expérience de Fink observait que l'utilisation des triglycérides intramusculaires était réduite à 41°C. Néanmoins, elle comparait deux situations cardinales, froid et chaud, sans témoin « tempéré ». D'autres études, depuis, ont également montré une moindre utilisation des lipides à la chaleur (Young, Sawka et al. 1985, Dolny and Lemon 1988, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994, Hargreaves, Angus et al. 1996, Febbraio 2000). De plus, une étude récente suggère qu'à la chaleur la vitesse d'oxydation des lipides serait maximale pour des intensités très faibles d'exercice. Ainsi, la classique courbe en cloche représentant le débit d'oxydation des acides gras en fonction de l'intensité d'exercice ne serait pas transposable à la chaleur. Le niveau d'oxydation des lipides étant déjà quasiment maximal dès les faibles intensités, il ne ferait que diminuer avec l'intensité d'exercice (Gagnon, Perrier et al. 2019). Outre les différences de méthodologie entre ces études, l'ensemble de ces résultats sont basés sur l'interprétation métabolique du QR. Ces mesures par calorimétrie indirecte nécessitent de vérifier une parfaite stabilité ventilatoire et de pH sanguin dans les deux situations d'exercice. Or lors d'une exposition passive à la chaleur, une hyperventilation est classiquement reportée qui peut générer des biais d'interprétation importants (Pilch, Szygula et al. 2010). L'intensité d'exercice et le stress thermique différents peuvent également expliquer les divergences de résultats. Les valeurs de température profonde en fin d'exercice à la chaleur étaient de 40,7°C pour Febbraio et 39°C pour O'Hearn. De plus, l'expérience de O'Hearn se distingue par une phase d'exposition passive à la chaleur de 120 min précédant l'exercice. Cette exposition passive préalable, si elle n'induit pas d'hyperthermie importante, peut avoir modifié le métabolisme lipidique, comme le suggère l'augmentation des AG libres circulants qui s'est prolongée à l'exercice. Ainsi cette augmentation des AG circulants peut avoir modifié le niveau d'oxydation des lipides à l'exercice en augmentant la disponibilité des AG indépendamment de la température d'exercice. Ainsi, l'augmentation d'utilisation des CHO et la diminution d'oxydation des lipides classiquement suggérée en miroir dans certaines autres études ont pu être masquées par cette disponibilité accrue des AG, d'autant plus que l'intensité d'exercice était modérée, inférieure à d'autres études (50%VO₂max vs 70%VO₂max) (Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994). En effet, l'effet de la chaleur sur le métabolisme énergétique semble varier selon l'intensité d'exercice. Une étude récente a montré que pour des exercices d'intensité modérée (52 à 55% de la puissance maximale aérobie), il n'existait pas de différence de contribution entre les CHO et les AG) (Mauder, Plews et al. 2019).

Disponibilité en acides gras. Une autre approche que celle du QR consiste à comparer les concentrations circulantes en acides gras. Plusieurs études n'ont pas retrouvé d'effet de la chaleur sur les AG circulants (Fink, Costill et al. 1975, Nielsen, Savard et al. 1990, Yaspelkis, Scroop et al. 1993, Gonzalez-Alonso, Calbet et al. 1999). Cependant, certaines observations ont pu montrer qu'une exposition aiguë passive à la chaleur pouvait induire une augmentation des acides gras libres circulants (AG non-estérifiés AGNE)(Eddy, Sparks et al. 1976, Yamamoto, Zheng et al. 2003, O'Hearn, Tingelstad et al. 2016). Une étude récente a comparé l'effet d'une exposition passive à la chaleur (42°C) à une ambiance thermique neutre (23°C) sur les concentrations sanguines en lipides, le niveau d'utilisation en CHO et lipides en calorimétrie indirecte, au cours d'un exercice sous-maximal réalisé à 42 ou 23°C (50% VO₂max) (O'Hearn, Tingelstad et al. 2016). Au repos, les auteurs observent une augmentation des AG circulants à la chaleur qui perdure à l'exercice à la chaleur, contrairement à d'autres études citées précédemment (Fink, Costill et al. 1975, Nielsen, Savard et al. 1990, Gregson, Drust et al. 2002, Jentjens, Wagenmakers et al. 2002). La disponibilité en acides gras ne semble donc pas un facteur limitant même si l'interprétation d'une concentration plasmatique doit être faite avec prudence en gardant à l'esprit qu'il s'agit d'un secteur d'équilibre entre production et utilisation des substrats. Ainsi, l'augmentation importante des AG libres circulants observée dans les conditions d'exposition à la chaleur peut être due à une augmentation de la lipolyse, stimulée par le contexte catécholaminergique (Galster, Clutter et al. 1981, Powers, Howley et al. 1982, Iguchi, Littmann et al. 2012), mais également à une moindre utilisation périphérique des lipides circulants par rapport aux triglycérides intramusculaires.

En résumé l'effet du stress thermique chaud aigu peut être considéré comme un facteur décalant le point de croisement glucido-lipidique vers une plus grande utilisation des glucides, mais sans que le métabolisme lipidique à la chaleur n'ait véritablement été exploré notamment dans ces étapes d'oxydation mitochondriales. Il existe plusieurs biais à l'interprétation des résultats disponibles et acquis par des techniques non invasives de physiologie intégrée ne permettant qu'une évaluation indirecte de l'oxydation des substrats.

Quelles que soient les discordances de données concernant le métabolisme lipidique, l'augmentation de la concentration sanguine en acides gras liée à une stimulation catécholaminergique ne semble pas s'accompagner des effets attendus sur l'oxydation des

lipides et pose la question d'une altération de leur utilisation par le muscle lors de l'exposition à la chaleur. Ainsi la chaleur pourrait exercer des effets propres sur le fonctionnement mitochondrial et altérer la phosphorylation oxydative.

3. Effets de la chaleur sur la mitochondrie

Augmentation de la consommation en O₂. Binzoni montre une augmentation de la consommation musculaire en O₂ avec la température (Binzoni, Ngo et al. 2002). Cependant, la consommation en O₂ est une mesure d'aval. Son augmentation pourrait aussi bien traduire une augmentation de la synthèse d'ATP pour répondre à un besoin accru qu'une diminution du rendement (consomme plus d'O₂ pour produire autant d'ATP). Ainsi, Bottinelli (Bottinelli, Canepari et al. 1996) montrait qu'une augmentation de température induisait un coût énergétique accru de la force produite (sur fibres musculaires isolées) et donc de la consommation en O₂. Un mécanisme possible de cette augmentation pourrait être dû à une accélération du métabolisme par effet Q₁₀ (effet coefficient de la température) (Kampmann and Bröde 2015). Ce concept traduit le fait, que dans certains processus physiologiques, l'augmentation de 10°C induit une augmentation de l'activité enzymatique d'un coefficient 2 à 3. Cependant, une étude ancienne a aussi montré que le ratio ADP/O diminuait de manière linéaire avec l'augmentation de la température (Brooks, Hittelman et al. 1971).

Température de fonctionnement de la mitochondrie. A ce jour, la température maximale préservant un fonctionnement normal de la mitochondrie n'est pas connue. Dans leur environnement naturel et en fonctionnement maximal, la température des mitochondries pourrait atteindre 50°C ; c'est le résultat original récemment apporté par Chrétien & al. (Chrétien, Bénit et al. 2018) qui révolutionnerait notre connaissance de la physiologie mitochondriale si ces résultats étaient confirmés. Habituellement, les températures fixées pour l'étude de la fonctionnalité mitochondriale sont choisies d'après des températures tissulaires estimées. Ainsi, la température musculaire est la résultante de la production thermique contractile, de l'activité des mitochondries et des échanges avec le milieu intérieur. En physiologie, il demeure que les données actuellement disponibles sur le fonctionnement mitochondrial musculaire ont été obtenues pour des températures expérimentales situées entre 37 et 42°C, donc bien inférieures à 50°C.

Altération du fonctionnement par la chaleur. Certaines études suggèrent qu'une élévation de la température, bien inférieure à 50°C, induirait des altérations du fonctionnement mitochondrial. Des dommages fonctionnels et structuraux liés à la chaleur sont retrouvés pour

de nombreux organismes différant par leur stade d'évolution : levure (Davidson and Schiestl 2001), bivalves (Heise 2003) ou rat (Qian, Song et al. 2004), à des températures élevées mais présentes dans le vivant (Yeh 1997, Chien 2000). L'étude de Qian s'intéressait aux effets de la chaleur sur le métabolisme mitochondrial de cardiomyocytes. Différents degrés d'hyperthermie ont été induits chez des rats (de 39 à 42°C). Ont été étudiés la respiration mitochondriale (à 37°C) et le métabolisme calcique (contenu cellulaire et mitochondrial en Ca^{2+} , activité Ca^{2+} -ATPase). Dès 39°C, la diminution du *respiratory control ratio* (RCR= rapport des vitesses de respiration mitochondriale en conditions phosphorylantes (V_{max}) et non-phosphorylantes (V_0) et P/O (rapport entre la concentration en ADP et la consommation en O_2) traduisait une altération de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Pour des températures profondes supérieures à 40°C (41 et 42°C), l'étude retrouvait une altération fonctionnelle reposant sur des lésions structurelles (libération de cytochrome C) et des phénomènes d'apoptose (dérégulation de calcicytie, ouverture du pore de transition de perméabilité membranaire (MPTP), activation des caspases, surexpression de Bcl-2) dont on sait que la mitochondrie peut en initier le déclenchement (Green and Reed 1998, Mignotte and Vayssiere 1998). Dans cette étude, les auteurs relient ces lésions à une dysrégulation du Ca^{2+} et à l'ouverture du MPTP. Cette protéine canal est une étape clé de la destruction cellulaire, responsable d'une fuite de Ca^{2+} , de perte du potentiel membranaire et d'une production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ERO). Cette étude montrait qu'une hyperthermie, physiologique car correspondant à des valeurs de température retrouvées dans un muscle en activité, pouvait induire des lésions mitochondriales structurelles et fonctionnelles. Dans une étude récente conduite sur des mitochondries isolées d'hépatocytes, Zukiene retrouve des résultats assez semblables à ceux de Qian. Pour des hyperthermies inférieures à 41°C, le fonctionnement mitochondrial était relativement préservé avec une conservation du potentiel de membrane. Au-delà, il existait une altération progressivement croissante de la phosphorylation oxydative avec la température avec un effondrement du potentiel de membrane. Ces altérations étaient partiellement réversibles jusqu'à 45°C.

a. Chaleur et espèces radicalaires de l'oxygène

La mitochondrie est le lieu de la réduction de l'oxygène. Les espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) sont des produits de ce métabolisme de l'oxygène. En petite concentration, ces molécules constituent des éléments de signalisation pour la cellule, importants pour les phases d'adaptation. Une augmentation incontrôlée des ERO va induire un stress oxydatif se

caractérisant par des effets délétères nombreux du fait de la grande réactivité des espèces radicalaires. (Fig.15)

Augmentation des ERO à la chaleur. Plusieurs études suggèrent, en effet, que la chaleur induirait une production de ERO responsable d'un stress oxydatif (Mujahid, Akiba et al. 2007, Kikusato, Ramsey et al. 2010, Kikusato and Toyomizu 2013, Montilla, Johnson et al. 2014, Kikusato, Yoshida et al. 2015). Kikusato a comparé, chez des oiseaux, l'effet d'une exposition aiguë *in vivo* à 2 températures, 24 et 34°C, sur le métabolisme de mitochondries isolées à partir de muscles oxydatifs *Pectoralis superficialis* (Kikusato, Ramsey et al. 2010, Kikusato and Toyomizu 2013). Il a ainsi montré que le stress thermique chaud avait induit une augmentation de production des ERO en conditions non-phosphorylantes. Ceci exclue la responsabilité d'un défaut de couplage. L'effet de la chaleur sur la production d'ERO est liée à une augmentation de la vitesse d'oxydation générant un potentiel de membrane plus important. L'étude de Montilla (Montilla, Johnson et al. 2014), qui s'est intéressée à des muscles squelettiques chez le cochon conforte un lien entre production d'ERO à la chaleur et potentiel oxydatif. Ainsi, les animaux ont été soumis à un stress thermique chaud aigu (20°C 35-50% HR vs 35°C 20-35% HR). Les muscles ensuite prélevés ont été étudiés en séparant fibres rouges (oxydatives) et blanches (glycolytiques) afin de préciser le rôle du potentiel oxydatif. Le stress thermique a induit un stress oxydatif responsable de lésions uniquement dans les muscles oxydatifs.

Mitochondrie lieu de production d'ERO. La production d'ERO peut avoir différentes origines. La production sélective d'ERO dans les fibres oxydatives et la mise en évidence de l'implication de la Mn SOD (située dans la mitochondrie) orientaient vers une origine mitochondriale de ce stress oxydatif. Plusieurs études viennent renforcer cette origine mitochondriale du stress oxydatif à la chaleur. Ces études ont montré une production d'anions superoxydes qui sont générés par la chaîne de transport d'électrons et son accepteur final, l'O₂ (Mujahid, Sato et al. 2006, Mujahid, Akiba et al. 2007), eux-mêmes générant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le radical Hydroxyl (OH[•]). La chaîne de transport d'électrons et les 4 principales enzymes qui la composent, sont un lieu propice pour la réduction d'O₂ en superoxyde catalysée par la présence des couples à fort potentiel redox. Les complexes I et III sont classiquement connus pour en être les principaux contributeurs (McLennan and Degli Esposti 2000, Genova, Pich et al. 2003, Gredilla, Phaneuf et al. 2004, Lenaz, Baracca et al. 2006). La production d'ERO induit donc un dysfonctionnement de la CRM (Downs and Heckathorn 1998, Monti, Supino et al. 2001, Zhao, Fujiwara et al. 2006).

Des arguments pour l'induction d'un stress oxydatif. D'autres arguments peuvent encore étayer l'induction par la chaleur d'un stress oxydatif mitochondrial comme la peroxydation lipidique ou l'oxydation protéique. Les acides gras polyinsaturés de la membrane mitochondriale sont notamment une cible privilégiée de ces espèces avec la production de malone-dialdéhyde (MDA) (Sakamoto, Tsukamoto et al. 2003, Winger, Millar et al. 2005, Mujahid, Pumford et al. 2007). S'ensuivent des dysfonctionnements bioénergétiques mais également l'amplification de ce stress oxydatif, la peroxydation de la membrane mitochondriale représentant une autre source de radicaux libres (Girotti 1998, Agarwal and Prabakaran 2005). Ces ERO sont également impliqués dans la dénaturation des protéines induite par la chaleur (Mujahid, Pumford et al. 2007). Parmi les multiples protéines ciblées, le complexe de la pyruvate déshydrogénase, les sous-unités de l'ATP synthase ou les enzymes du cycle de Krebs sont des étapes clés dans les dommages induits par la chaleur médiés par les ERO (Rhoads, Umbach et al. 2006). L'ADN est également une cible bien connue des ERO mais un éventuel lien avec l'exposition à la chaleur reste à préciser. Plusieurs études ont montré des dommages par la chaleur concernant l'ADN mitochondrial (ADNmt) avec des mutations impliquant des dysfonctions de la CRM aggravant la production d'ERO (Melegh, Bock et al. 1996, Yakes and Van Houten 1997). **Au total, les ERO induites par la chaleur sont susceptibles d'altérer le fonctionnement mitochondrial tant au niveau du cycle de Krebs, que de la CRM ou de l'ATP synthase (Figure 15).**

La chaleur pourrait diminuer la production d'ERO via des protéines découplantes. Cependant, des travaux récents montrent une diminution de la production d'ERO avec l'augmentation de la température médiée par les protéines découplantes (UCP). Ces protéines découplantes ont pour propriété de détourner le gradient électrochimique produit par la CRM de la production d'ATP. Ainsi, le gradient de protons produit par la chaîne de transfert d'électrons est « court-circuité » par ces canaux et dissipé sous forme de chaleur (Palmieri 1994). Initialement découvertes dans le tissu adipeux brun grâce à leurs propriétés de thermogénèse, elles ont été, depuis, identifiées dans de nombreux tissus, dont le muscle pour UCP 3 (Boss, Samec et al. 1997, Acin, Rodriguez et al. 1999). Ces protéines interviennent dans plusieurs voies comme la thermogénèse ou la régulation de l'utilisation des lipides dans la fourniture en énergie (Adams 2000, Boss, Hagen et al. 2000, Dulloo and Samec 2001, Criscuolo, Gonzalez-Barroso Mdel et al. 2005) mais pourraient aussi jouer un rôle dans la réponse au stress oxydatif (Papa and Skulachev 1997, Brand 2000, Casteilla, Rigoulet et al. 2001, Ehtay, Esteves et al. 2003) (Figure 16). Kikusato (Kikusato and Toyomizu 2013) a

étudié le contenu protéique en UCP aviaire (avUCP) au sein de son modèle de stress oxydatif induit par stress thermique. Il a ainsi montré une baisse du contenu en UCP à la chaleur. L'augmentation des ERO constatée à la chaleur pourrait en partie s'expliquer, dès lors, par une diminution de fuites protoniques que la chaleur induirait par un contenu moindre en UCP. Cette hypothèse a également été proposée par (Mujahid, Sato et al. 2006).

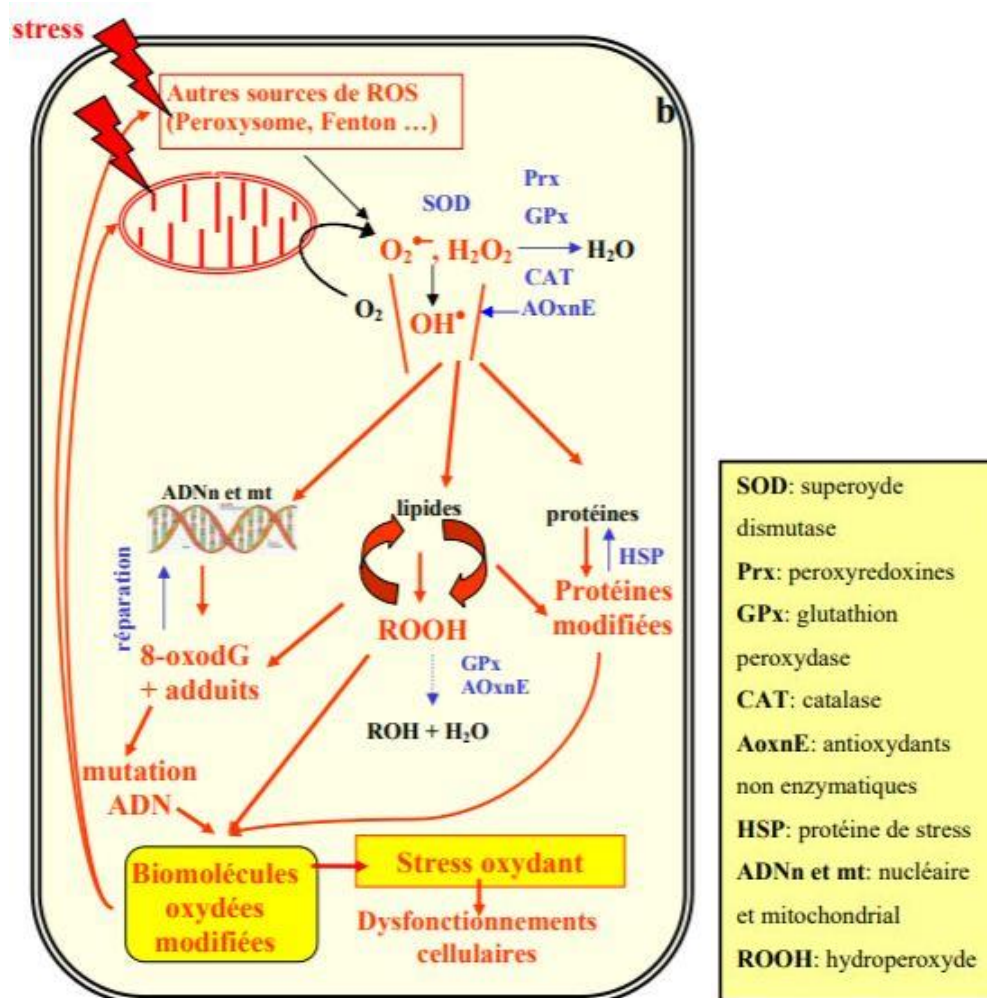


Figure 15. Espèces radicalaires de l'oxygène. Processus oxydatifs lésionnels (en rouge) et mécanismes protecteurs du stress oxydatif (en bleu). L'apparition d'un stress va induire la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) par les mitochondries notamment. La production initiale d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) induit la production d'autres espèces réactives. Le dépassement de ces systèmes aboutit à un cercle vicieux qui augmente la production des ERO et aboutit au dysfonctionnement, voire la mort cellulaire (Servais, Couturier et al. 2003).

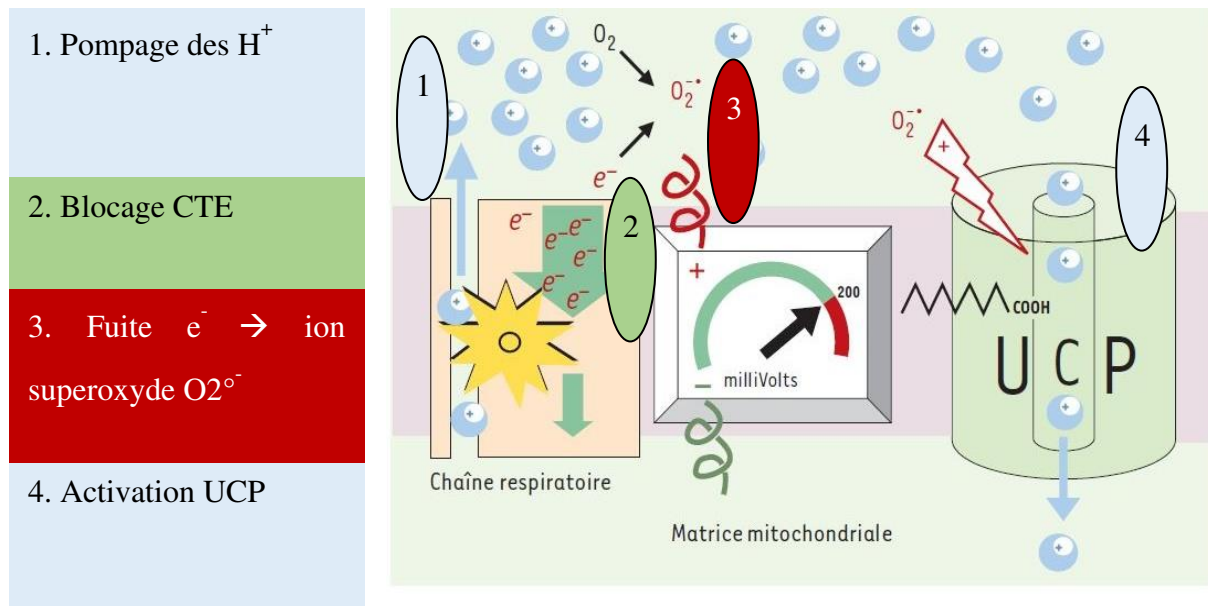


Figure 16. Rôle d'UCP dans le stress oxydatif. L'oxydation des substrats par la chaîne respiratoire mitochondriale produit un gradient de protons (1) qui s'oppose à ce mouvement de protons généré par la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Quand ce gradient devient trop élevé, les électrons sont bloqués dans la chaîne respiratoire (2) et certains peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire pour former l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (3). Cet ion superoxyde interagit avec UCP et augmente le transport de protons par l'UCP. Le retour de protons diminue le gradient électrochimique et débloque la CRM. La reprise de la circulation des électrons diminue le stress oxydatif, au prix d'une perte d'énergie dissipée par UCP (sous forme de chaleur?) Ce phénomène se produit lorsque la mitochondrie n'est pas recrutée pour produire de l'ATP. Si une production d'ATP a lieu, elle se produit avec un potentiel électrochimique plus bas, de l'ordre de 130-150 mV. D'après (Ricquier, Miroux et al. 2002)

Il est difficile de conclure quant aux résultats contradictoires sur la question des ERO à la chaleur. Si le rôle délétère du stress oxydatif n'est plus à démontrer, les effets de la chaleur sur la production d'ERO sont encore controversés. En corollaire, les moyens anti-oxydants semblent participer à la thermosensibilité de la mitochondrie. Ainsi, la diminution de la concentration en MnSOD (Omar, Yano et al. 1987) altère, alors que sa surexpression améliore la résistance à la chaleur (Li and Oberley 1997, Kuninaka, Ichinose et al. 2000, El-Orabi, Rogers et al. 2011). Plusieurs travaux ont ainsi montré que la chaleur pouvait altérer le pouvoir antioxydant de la SOD (Moriyama-Gonda, Igawa et al. 2002, Yang and Lin 2002, Morrison, Coleman et al. 2005). La déplétion en glutathion a également pu augmenter la sensibilité à l'hyperthermie (Shrieve, Li et al. 1986).

b. Thermosensibilité mitochondriale

La sensibilité à la chaleur diffère selon les complexes de la chaîne respiratoire. Des données de la littérature suggèrent une thermosensibilité variable des complexes de la CRM (Downs and Heckathorn 1998). Une étude, réalisée sur des mitochondries de levure, a observé des

différences d'effet de la chaleur (30 vs 42°C) sur la production d'ERO par les complexes de la CRM (Davidson and Schiestl 2001). Cette étude nous apprend que, possiblement, la contribution des complexes dans la production d'ERO par la CRM sous l'effet de la chaleur diffère. En outre, si nous nous référons à la température de dénaturation des complexes, il existe des différences entre complexes (CIII 64°C, CIV : 63°C Cytochrome C 80°C et ATP synthase 60°C) qui démontrent, cependant, une certaine résistance (Gwak, Yu et al. 1985, Rigell and Freire 1987, Wang, Freire et al. 1993, Arrondo, Castresana et al. 1994, Shi, Takamizawa et al. 2008). Dans une autre étude, une diminution du potentiel de membrane induite par la chaleur entraînait une altération spécifique de l'utilisation du glutamate dont le métabolisme sollicite le complexe I de la CRM (Silkuniene, Zukiene et al. 2018).

La réponse mitochondriale à la chaleur est influencée par l'âge. L'âge peut influencer la réponse mitochondriale à la chaleur (Slimen, Najar et al. 2014). Certaines études ont montré une altération liée à l'âge des capacités oxydatives mitochondriales du muscle squelettique en lien avec une altération de la CRM (Trounce, Byrne et al. 1989, Conley, Esselman et al. 2000, Hagen, Krause et al. 2004). Une étude sur hépatocytes de rats a montré que les sujets âgés présentaient une susceptibilité aux lésions induites par la chaleur. La plus grande sévérité des lésions était en lien avec une altération des capacités de réparation mitochondriale. En effet, les systèmes anti-oxydants cytosoliques pourraient rendre compte d'une part de la variabilité de la réponse mitochondriale à la chaleur observée. (Haak, Buettner et al. 2009). La balance oxydative entre production et neutralisation des ERO pourrait participer à la thermosensibilité mitochondriale.

La réponse mitochondriale à la chaleur pourrait également dépendre du genre. Il existe un dimorphisme sexuel de la fonction mitochondriale (biogenèse, flux du calcium) dans des tissus comme le foie ou le cœur (Justo, Boada et al. 2005, Chweih, Castilho et al. 2015). Les observations liées au sexe montrent que les mitochondries des femelles auraient une plus grande thermosensibilité, chez des animaux matures (post-puberté, 3-4mois) (Silkuniene, Zukiene et al. 2018).

Même si des températures intramitochondriales ont récemment été mesurées à plus de 50°C, il semble exister une certaine toxicité de la chaleur sur la fonction mitochondriale voire sur sa structure tout au moins pour des températures au-delà de 41°C. Pour des températures inférieures, les résultats sont plus débattus et il est souvent difficile de conclure tant les méthodes et conditions d'étude varient. Une altération du rendement mitochondrial est le plus communément retrouvée en réponse à la chaleur. Celui-ci pourrait être la conséquence d'une production de radicaux libres accrus et/ou liée à la présence de protéine découplante de type UCP. Le rôle propre de la chaleur en fonction de la nature du substrat oxydé par la mitochondrie n'a été que très peu étudié même si l'hypothèse d'une thermosensibilité variable des différents complexes de la CRM pourrait y participer.

4. Hypothèses mécanistiques des perturbations induites par la chaleur

Dans la réponse du métabolisme énergétique à l'exposition aiguë à la chaleur, deux composantes peuvent être distinguées : la stimulation catécholaminergique et l'effet direct de la température sur le muscle.

a. Mécanisme catécholaminergique

L'adrénaline stimule la glycolyse musculaire. L'exercice est connu pour induire une augmentation de la concentration sanguine en adrénaline. Cette sécrétion d'adrénaline à l'exercice est augmentée par la chaleur (Galbo, Houston et al. 1979, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1996, Hargreaves, Angus et al. 1996, Hargreaves, Dillo et al. 1996, Gonzalez-Alonso, Calbet et al. 1999, Parkin, Carey et al. 1999) et la déshydratation (Hargreaves, Dillo et al. 1996). Or l'un des effets de l'activation des récepteurs β -adrénergiques est de stimuler la glycogène phosphorylase. L'augmentation de l'adrénaline circulante induite par la chaleur devrait médier l'augmentation de l'utilisation des réserves musculaires en glycogène. Plusieurs études (Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1996, Hargreaves, Dillo et al. 1996, Gonzalez-Alonso, Mora-Rodriguez et al. 1997) ont permis de constater une concordance de réponse entre l'augmentation de la concentration d'adrénaline et celle de la glycolyse. Nous disposons de quelques études ayant montré l'effet de l'adrénaline sur le métabolisme des substrats, notamment chez l'animal. Ces études ont montré via l'injection d'adrénaline (Richter, Sonne et al. 1981, Richter, Ruderman et al. 1982, Issekutz 1985) ou la neutralisation de son action par ablation des surrénales (Hashimoto, Knudson et al.

1982) ou utilisation de β -bloquants (Issekutz 1984), qu'elle permettait de stimuler la glycolyse. Néanmoins, la corrélation entre adrénaline et glycolyse n'est pas toujours retrouvée (Nielsen, Savard et al. 1990). La complexité des effets de l'adrénaline explique des observations controversées chez l'Homme. Si à doses supra-physiologiques, a été mis en évidence un effet de l'adrénaline sur la glycolyse (Jansson, Hjemdahl et al. 1986, Spriet, Ren et al. 1988), d'autres études n'ont pas montré d'augmentation de la glycolyse à la suite de l'administration de concentrations physiologiques d'adrénaline (Chesley, Hultman et al. 1995, Wendling, Peters et al. 1996). L'effet de l'adrénaline a été étudié au cours d'un exercice sous-maximal à la chaleur. L'adrénaline a été administrée lors d'un exercice en normothermie (20°C) pour atteindre la concentration observée lors d'un exercice à la chaleur (40°C), c'est-à-dire environ 2 fois la concentration d'adrénaline. Il a ainsi été observé une augmentation de la glycolyse, de l'utilisation du glycogène et de l'oxydation des CHO, mimant la réponse observée pour un même exercice réellement accompli à 40°C. **Ainsi, la glycolyse musculaire à l'exercice réalisé à la chaleur paraît bien médiée par l'adrénaline** (Febbraio, Lambert et al. 1998).

L'adrénaline stimule la glycolyse hépatique. De plus, l'adrénaline serait également impliquée dans la production hépatique de glucose à l'exercice et à la chaleur. Chez l'animal, des observations suggèrent que l'adrénaline stimule la production hépatique de glucose (Richter, Sonne et al. 1981, Sonne, Mikines et al. 1985). De plus, l'injection d'adrénaline a permis d'augmenter cette production de glucose chez des individus entraînés en endurance ou surrénalectomisés (Howlett, Febbraio et al. 1999, Howlett, Galbo et al. 1999). Ainsi, les études *in vivo* suggèrent une augmentation de la production hépatique de glucose et de l'utilisation musculaire au moins en partie médiée par la réponse circulante adrénergique.

Adrénaline et oxydation des glucides. L'exposition aiguë à la chaleur induirait une augmentation du QR à l'exercice, qui pourrait être médiée par l'adrénaline (Febbraio, Lambert et al. 1998). L'implication des catécholamines pose la question de leur mécanisme d'action. Cette augmentation de la concentration d'adrénaline pourrait activer la pyruvate déshydrogénase (Watt, Howlett et al. 2001).

Au regard des études précédentes, le rôle de l'adrénaline dans la réponse du métabolisme lipidique à la chaleur demeure mal connu. Si l'adrénaline est connue pour être un puissant agent lipolytique, notamment par son action sur la lipase hormonosensible, son rôle particulier dans la mobilisation des acides gras n'a jamais été étudié au cours d'un exercice à la chaleur notamment au regard des peptides natriurétiques. A ce jour, il n'est pas possible d'imputer

l'élévation des AG plasmatiques lors d'un exercice à la chaleur à la sécrétion d'adrénaline plutôt qu'à une moindre utilisation par le muscle.

b. Effet local de la température

Plusieurs expérimentations ont été réalisées afin d'étudier l'effet de l'augmentation de la température locale, en s'affranchissant de l'augmentation de la température profonde. Febbraio a comparé l'effet local de deux températures musculaires sur l'utilisation des substrats au cours d'un exercice intense ($115\% \dot{V}O_{2max}$) ou sous-maximal ($70\% \dot{V}O_{2max}$) (Febbraio, Carey et al. 1996, Starkie, Hargreaves et al. 1999). Pour cela, il a utilisé des manchons chauffants et refroidissants afin d'induire localement une augmentation de la température au niveau du muscle actif (quadriceps, en l'occurrence) sans modifier la température profonde. Il a pu montrer que le muscle chauffé utilisait davantage le glycogène, indépendamment d'une augmentation de la température centrale ou d'une stimulation catécholaminergique qu'une exposition générale à la chaleur aurait pu induire.

Plusieurs hypothèses sont suggérées dans la littérature : soit une accélération du métabolisme par effet Q10 ou secondaire à une augmentation de la demande en ATP liée à la fonction contractile, soit une altération rendement mitochondrial que nous avons déjà évoqué dans le chapitre sur les effets mitochondriaux de la chaleur.

Effet Q10

L'augmentation de la température intramusculaire, *per se*, pourrait jouer un rôle sur l'activité d'enzymes-clé du métabolisme énergétique (Kozlowski, Brzezinska et al. 1985, Young 1990). Brooks a montré dans des mitochondries isolées incubées à différentes températures que l'élévation de température (de 25 à 37°C) augmentait la vitesse de respiration en conditions non-phosphorylantes et phosphorylantes (stades 4 et 3) (Brooks, Hittelman et al. 1971). Dans une autre étude de Brooks, la chronologie de décroissance de la VO_2 suivait la décroissance des températures profonde et musculaire. Ainsi, une part de la VO_2 mesurée en récupération, généralement utilisée pour étudier le métabolisme anaérobie, pourrait refléter un effet Q10 sur des réactions catalysées par les enzymes du métabolisme aérobie.

Cet effet de la chaleur représente, classiquement, une augmentation de l'ordre de 2 à 3 fois l'activité enzymatique en réponse à une élévation de 10°C. Ainsi pour une augmentation de 2°C de la température musculaire, les activités enzymatiques augmentent de 20 à 30% environ. Les

preuves directes de cet effet de la température sont néanmoins peu nombreuses dans la littérature. Au cours de l'exercice modéré, l'augmentation locale de la température musculaire induit une augmentation de l'utilisation des réserves en glycogène (Starkie, Hargreaves et al. 1999). Une augmentation de l'utilisation du glycogène était observée avec l'augmentation de la température musculaire mais indépendamment de la température profonde (restée stable) ou d'une altération du pool nucléotidique. En considérant la différence maximale de température (6,9°C) et la diminution des réserves en glycogène (-76%), l'effet de la chaleur sur le muscle paraît s'inscrire dans la fourchette d'un effet Q10 soit + 70% pour une augmentation de 7°C entre le groupe chaud et le groupe témoin.

Effets de la chaleur sur les propriétés contractiles

Augmentation de la force maximale musculaire. Malgré quelques études contradictoires (Dotan and Bar-Or 1980, Yaicharoen, Wallman et al. 2012, Yaicharoen, Wallman et al. 2012), il semble que les performances de sprint unique (Sargeant 1987, Linnane, Bracken et al. 2004), répété (Falk, Radom-Isaac et al. 1998, Girard, Bishop et al. 2013) ou intermittent (Maxwell, Aitchison et al. 1996, Morris, Nevill et al. 2000, Morris, Nevill et al. 2005, Sunderland and Nevill 2005, Hayes, Castle et al. 2014) soient améliorées par la chaleur. Notamment lors d'un exercice unique au cours duquel le muscle est localement chauffé, peut être observée une augmentation de la puissance et de la force maximales. Une exposition passive à la chaleur améliore la puissance développée (11%) lors d'un exercice de pédalage isocinétique (Sargeant 1987).

Accélération du turn-over en ATP. Parmi les mécanismes potentiels de l'effet de la chaleur locale, certains reposent sur la fonction contractile et d'autres sur la fonction métabolique du muscle (Febbraio 2001). La chaleur augmenterait la vitesse d'utilisation de la phosphocréatine (PCr) (Gray, De Vito et al. 2006). Cette hypothèse suppose une contribution plus importante des fibres rapides glycolytiques dont la vitesse de dégradation de la PCr est la plus rapide. Or certains auteurs ont suggéré une activation préférentielle des fibres de type II par la chaleur (Young, Sawka et al. 1985). Ainsi, pour une intensité donnée, la fourniture en énergie pour un exercice réalisé à la chaleur reposerait davantage sur le métabolisme anaérobie.

Couplage excitation-contraction à la chaleur. Des modifications du couplage électromécanique pourraient aussi être impliquées dans les effets de la chaleur locale sur la performance. Selon les études, la chaleur pourrait causer une séquestration plus rapide du Ca^{2+} , un décalage de la relation force- Ca^{2+} vers la droite ou la modification de l'activité ATPase (Bottinelli, Canepari et al. 1996, De Ruyter and De Haan 2000, MacIntosh 2003). Une

accélération des cycles des ponts actine-myosine a été décrite à la chaleur (Edwards, Harris et al. 1972). Ces modifications des propriétés contractiles musculaires par les conséquences sur la vitesse de dégradation de l'ATP qu'elles occasionnent, impliquent des adaptations du métabolisme énergétique et ainsi la chaleur pourrait augmenter le turn-over de l'ATP.

Concernant les mécanismes possibles mis en jeu par la chaleur et expliquant les altérations métaboliques observées, l'ambiance adrénérgique majorée lors d'un exercice à la chaleur participe probablement à la facilitation de la glycolyse. Un effet propre de la température sur le muscle avec un effet Q 10 est communément retrouvé *in situ* mais son rôle *in vivo* reste discuté. Indépendamment de modification métaboliques, il existe des altérations de la chaleur sur le couplage excitation-contraction qui pourraient secondairement modifier les besoins en énergie et le turn-over en ATP. Il reste à ce jour difficile d'expliquer les mécanismes qui concourent au déplacement du point de croisement glucido-lipidique lors d'un exercice à la chaleur. S'il est établi que les perturbations systémiques hormonales ne peuvent en rendre compte, les effets locaux de la chaleur sur les enzymes des voies métaboliques glucidiques et lipidiques n'ont jamais été comparés.

5. Influence de l'exposition aiguë à la chaleur selon le type d'exercice

Selon le type d'exercice considéré, l'effet de la chaleur varie (Maunder, Plews et al. 2019) et pourrait être bénéfique ou délétère. Plusieurs observations suggèrent un effet positif de la chaleur sur les performances maximales. En effet, une revue sur les performances maximales et supra-maximales en athlétisme (100m -1500m) retrouvait une plus grande proportion de records annuels au cours d'événements ayant lieu en été (Haida, Dor et al. 2013).

Exercices intenses. Parmi les hypothèses, la stimulation de la glycolyse à la chaleur pourrait avoir un effet favorable sur les efforts intenses où la composante anaérobie est très importante. Dans les épreuves de sprint, la conjonction d'effets favorables sur le couplage excitation-contraction et le métabolisme glycolytique pourrait être bénéfiques sur la vitesse de contraction, avec le corollaire d'un turn-over accru de l'ATP. Mais cet avantage de la chaleur sur la contraction musculaire pourrait être limité lors de la répétition d'exercice court et intense par une fatigabilité accrue (Maxwell, Aitchison et al. 1996, G. Morris, Nevill et al. 1998, Morris, Nevill et al. 2000, Morris, Nevill et al. 2005, Sunderland, Morris et al. 2008, Hayes, Castle et al. 2014). Des mécanismes centraux pourraient y participer par une inhibition de l'activation

motrice à la chaleur (Drust, Rasmussen et al. 2005, Morris, Nevill et al. 2005). Si cette inhibition centrale conduit à une limitation des performances maximales à la chaleur, elle pourrait cependant prévenir la survenue d'une fatigue d'origine métabolique.

Exercices sous-maximaux. La dépendance du métabolisme aux glucides qui augmentent avec la température conduisant à un épuisement des réserves glycogéniques pourrait être un facteur limitant du maintien d'un exercice à la chaleur (Febbraio, Snow et al. 1994, Gagnon, Perrier et al. 2019). Cependant, l'endurance à l'exercice sous-maximal demeure principalement limitée par la thermorégulation. Les impératifs de thermolyse induisent une contrainte sur le système cardiovasculaire conduisant à une diminution du débit sanguin localement distribué au muscle par la redistribution de la balance circulatoire et la diminution de la volémie (déshydratation). Les connaissances sont encore incomplètes quant à l'importance relative de l'effet de la chaleur sur les facteurs métaboliques et mécaniques de la contraction.

Les effets métaboliques de la chaleur locale, bénéfiques ou délétères, doivent donc être relativiser au regard de ses effets systémiques majeurs bien connus pour être un facteur limitant de la performance. L'utilisation majorée des réserves en glycogène et du métabolisme anaérobie interpelle néanmoins quant à l'altération de la performance de longue durée à la chaleur, en parallèle des limitations cardio-vasculaires. Parmi les mesures de limitation des effets de la chaleur, l'acclimatation permet d'améliorer tolérance et performance à l'effort.

III. Adaptations métaboliques et mitochondriales à la chaleur et à l'entraînement

1. Effets de l'acclimatation

a. Cinétique d'acclimatation

L'acclimatation diminue les effets délétères du stress thermique chaud. L'Homme est capable de s'adapter à un stress thermique chaud répété ou prolongé, grâce à des réponses comportementales et physiologiques. La mise en place de ces adaptations se produit au cours d'une période d'acclimatation, soit par exposition en milieu naturel (*acclimatization* des anglo-saxons), soit par exposition à un stress thermique chaud artificiel (*acclimation*).

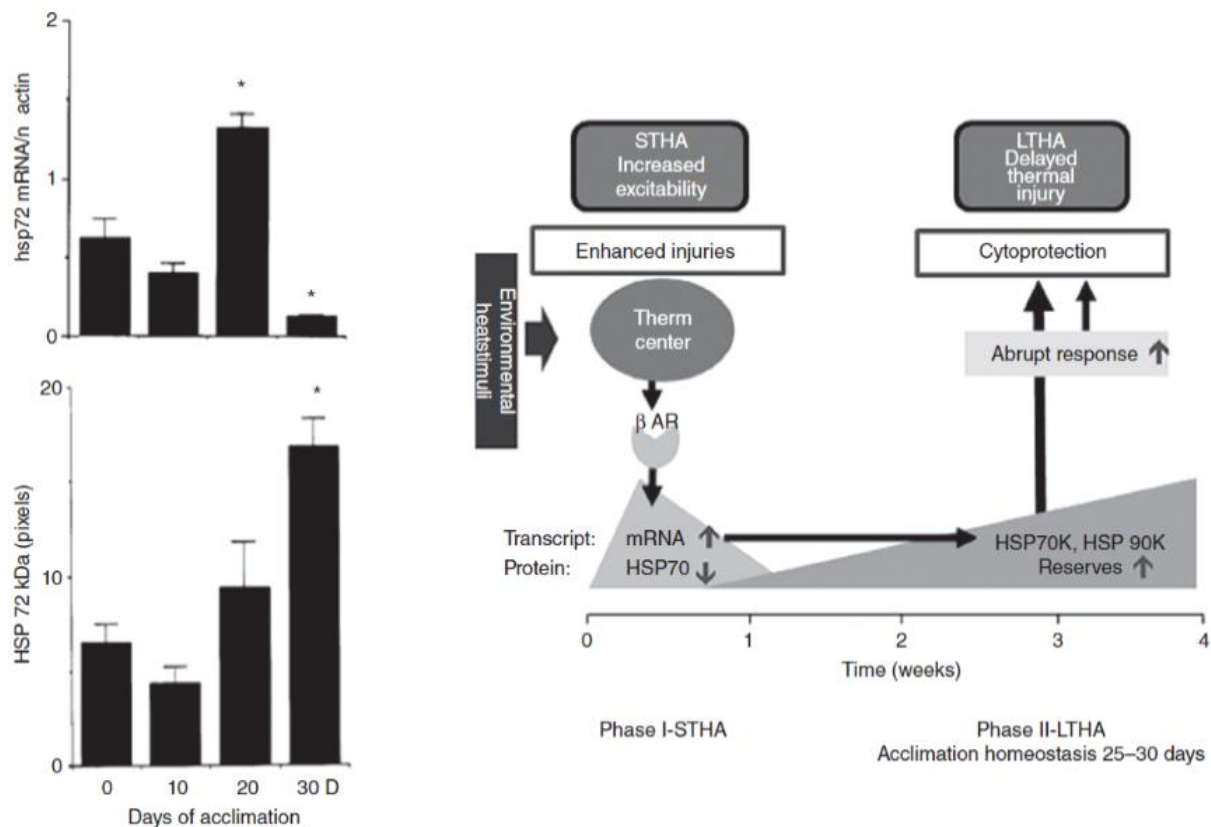


Figure 17. Les phases d'acclimatation. Partie gauche : niveaux de HSP72 (Coeur) dans des groupes de rats témoins (C) et acclimatés à la chaleur (1, 2 et 20 jours). En haut niveau d'expression de transcrits hsp 72 (RNAm par RT-PCR semi-quantitative). * 0.001 > p < 0.005. En bas niveau d'expression protéique HSP (protéines normalisées à un échantillon commercial HSP) dans les différents groupes de rats. Partie droite : cinétique de HSP 70 (protéines et ARNm) durant la phase d'acclimatation. Le stress thermique chaud environnemental stimule la voie afférente des thermorécepteurs qui active les β -récepteurs sympathiques et augmente les réserves cellulaires HSP et contribue à l'élévation du seuil de température de survenue des lésions thermiques (T-TshTI). Le processus est lent. Durant la phase précoce d'acclimatation (STHA), l'élévation du transcrit hsp72 permet d'augmenter la production de HSP70 dont les réserves sont augmentées une fois l'acclimatation achevée. Le phénotype acclimaté permet de retarder la survenue de lésions thermiques par l'augmentation constitutive des réserves HSP72 et une réponse transcriptionnelle accélérée (abrupt response). STHA : short-term heat acclimation LTHA : long-term heat acclimation. D'après (Horowitz 2014).

Le stress thermique chaud peut également être d'origine endogène, provenant de la chaleur produite au cours d'un exercice par les mécanismes de production d'énergie et de contraction. L'exercice physique est d'ailleurs utilisé, dans les protocoles d'acclimatation, pour favoriser les adaptations en intensifiant l'exposition à la chaleur. Le stress thermique chaud d'origine exogène et la production de chaleur endogène, s'ils sont suffisamment intenses, peuvent donc induire un stockage thermique dans l'organisme, qui se traduit par l'augmentation de la température profonde. La répétition des expositions va induire des adaptations (Nybo, Rasmussen et al. 2014). L'acclimatation qui résulte de ces adaptations permet de diminuer les effets délétères sur la performance de l'exposition aiguë à la chaleur (Baker 1965). L'individu acclimaté est capable de supporter plus longtemps un stress thermique environnemental plus intense et/ou lié à l'activité physique (**Figure 17**) (Institute of Medicine Committee on Military Nutrition 1993, Hori 1995, Sawka, Bruce Wenger et al. 2011).

Les réponses d'acclimatation. L'acclimatation à la chaleur se fait selon un continuum commun de modifications dont la cinétique d'instauration peut varier selon les protocoles utilisés. Classiquement, le processus est décrit en deux phases, permettant d'atteindre l'équilibre homéostatique qui caractérise l'achèvement de cette acclimatation. Une première période d'acclimatation, courte (STHA pour *short-term heat acclimation*), et une seconde phase, plus longue (LTHA pour *long-term heat acclimation*) ont été décrites (**Figure 18**). La première phase, classiquement de 8 à 15 jours, correspond à la mise en place de mécanismes immédiats de défense contre le stress thermique afin de maintenir l'homéostasie au travers d'une hyperstimulation des boucles de régulation. La plupart des réponses adaptatives sont supportées par l'appareil cardiovasculaire (fréquence cardiaque, volume d'éjection systolique, contractilité du myocarde, vasomotricité, volémie) et les effecteurs de la thermorégulation (sudation, balance hydrique). Les mécanismes de thermolyse deviennent plus efficaces grâce un déclenchement plus précoce de la vasodilatation périphérique et de la sudation. Le volume sudoral augmente alors que son osmolarité diminue, permettant d'augmenter les capacités de thermolyse par évaporation de la sueur en limitant les pertes électrolytiques. La réponse cardiovasculaire est également modifiée grâce à l'augmentation de la volémie, accompagnée par une bradycardie. Cette réponse permet le maintien de la volémie et de la pression veineuse centrale. Ces adaptations se caractérisent par une diminution de la température profonde de repos et un accroissement des capacités de thermolyse, concourant à un élargissement de la plage de thermorégulation possible. La mise en place de ces réponses se fait selon des cinétiques différentes (Fig. 18). Nous avons récemment montré que l'évolution du confort thermique n'est

pas parallèle aux réponses physiologiques (Malgoyre, Tardo-Dino et al. 2018). La diminution de l'inconfort ressenti survient avant la mise en place de la réponse thermorégulatrice. La seconde phase, LTHA, nécessitant plus d'un mois d'exposition, correspond à la mise en place de la réponse cellulaire, qui accroît la résistance au stress thermique, avec notamment des modifications mitochondriales. Cette réponse va induire un nouvel état homéostatique de la cellule caractérisé par une cytoprotection à la chaleur et notamment médié par des modifications épigénétiques. Ce contrôle épigénétique est probablement un des acteurs de la mémoire à l'origine du maintien ou de la réinduction rapide de la cytoprotection après une période de désacclimatation (Horowitz 2016).

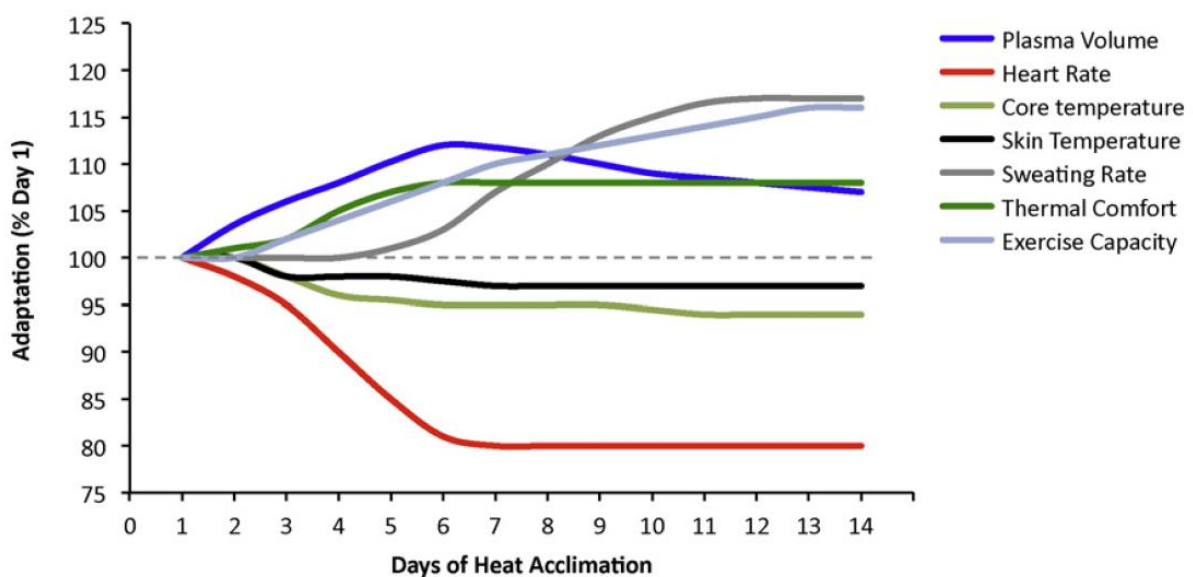


Figure 18. La cinétique des adaptations induites par l'acclimatation (exercice à la chaleur) sur la réponse thermorégulatrice à la chaleur. *Durant la première semaine d'acclimatation, le volume plasmatique croît et la fréquence cardiaque diminue durant un exercice à une intensité absolue donnée. La perception du confort thermique s'améliore. Les températures profonde et cutanée diminuent alors que le débit sudoral augmente pour un exercice à une intensité absolue donnée. Ainsi, la capacité d'exercice aérobie augmente*

Dans cette partie nous n'abordons que les adaptations du métabolisme énergétique en réponse à l'exposition répétée au stress thermique chaud.

b. Epargne glucidique


Diminution de la dépense énergétique. La signature métabolique de l'acclimatation à la chaleur se caractérise par une diminution du métabolisme global et musculaire à la chaleur (Young, Sawka et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994, Sawka, Bruce Wenger et al. 2011). La dépense énergétique au repos diminue (Hori 1995). A l'exercice à la chaleur, une augmentation

de la consommation maximale d'oxygène (Lorenzo, Halliwill et al. 2010, Nybo, Rasmussen et al. 2014) et une consommation d'oxygène moindre pour un exercice sous-maximal à une puissance donnée (Sawka, Pandolf et al. 1983, Pandolf and Young 1992) ont été également observées.

Si cette épargne énergétique et cette amélioration de la capacité aérobie peuvent en partie résulter des adaptations systémiques cardiovasculaires et plasmatiques mentionnées ci-dessus, elles pourraient également être en lien avec des adaptations mitochondriales. En effet, après acclimatation, la consommation en oxygène de mitochondries isolées diminue (Assayag, Saada et al. 2012).

Diminution de la dépendance au glucose. En outre, si l'exposition aiguë au stress thermique chaud augmente la dépendance énergétique au glucose, l'acclimatation à la chaleur induirait un déplacement du métabolisme énergétique de l'utilisation des glucides vers celle des lipides (Young, Sawka et al. 1985, Kirwan, Costill et al. 1987). Cette moindre dépendance aux hydrates de carbone pourrait participer à l'amélioration de l'endurance à l'exercice à la chaleur après acclimatation. Par exemple, une acclimatation à la chaleur de 8 jours à l'aide d'un exercice à 50% VO₂max de 90 min en ambiance chaude (39,6°C, 29% d'humidité) entraîne une moindre utilisation des réserves musculaires en glycogène à l'issue d'un exercice à la chaleur, avec une diminution de la glycémie. La différence artérioveineuse en glucose n'était pas modifiée, montrant ainsi que le muscle n'avait pas prélevé davantage de glucose après acclimatation (Kirwan, Costill et al. 1987). Ainsi, l'acclimatation semble induire une moindre utilisation des CHO dans la fourniture en énergie à l'exercice, ce que semble confirmer l'observation d'une diminution du QR (Young, Sawka et al. 1985, Kirwan, Costill et al. 1987, Febbraio, Snow et al. 1994).

Métabolismes aérobie et anaérobie. L'acclimatation à la chaleur pourrait modifier tant la voie aérobie qu'anaérobie impliquées dans l'utilisation du glucose à l'exercice. L'acclimatation permettrait une moindre accumulation de lactate pour des exercices d'intensité modérée et de durée moyenne (inférieure à 1 heure) (Kirwan, Costill et al. 1987, Febbraio, Snow et al. 1994) même si ce résultat n'est pas constamment retrouvé (Young, Sawka et al. 1985). Deux méta-analyses récentes ont fourni des conclusions opposées sur l'effet de l'acclimatation sur l'accumulation de lactate (Tyler, Reeve et al. 2016, Rahimi, Albanaqi et al. 2019). Febbraio expliquerait la diminution du lactate sanguin par une moindre participation de la glycolyse (Febbraio, Snow et al. 1994), en partie due à une diminution de l'activation sympathique et des catécholamines (Febbraio 2001) réduisant la glycogénolyse. D'autres études suggèrent que la

moindre élévation des lactates avec l'acclimatation à la chaleur pourrait être liée à une diminution du coût énergétique de l'exercice, i.e. la consommation en O₂, (Sawka, Pandolf et al. 1983, Aoyagi, McLellan et al. 1994), dont les hypothèses restent à prouver (Sawka, Pandolf et al. 1983) et qui n'est pas, retrouvée dans d'autres études (King, Costill et al. 1985, Kirwan, Costill et al. 1987). L'augmentation du volume plasmatique consécutive à l'acclimatation à la chaleur, pourrait favoriser, par l'amélioration de la balance circulatoire et le maintien du débit splanchnique, une meilleure élimination des lactates (Bass, Kleeman et al. 1955, Rowell, Brengelmann et al. 1968, Harrison 1985)  la survenue du seuil d'accumulation du lactate pourrait être retardée (Sawka, Pandolf et al. 1983) et la puissance au seuil anaérobie augmentée après acclimatation (Lorenzo and Minson 2010).

Métabolisme lipidique à la chaleur. L'utilisation des lipides à la chaleur après acclimatation a donné lieu à moins de travaux. Le glissement du métabolisme énergétique vers l'utilisation des lipides décrit ci-dessus pour l'épargne glucidique (Young, Sawka et al. 1985, Kirwan, Costill et al. 1987, Febbraio, Snow et al. 1994) n'est cependant pas toujours retrouvé (Robinson, Dill et al. 1941, Robinson, Turrell et al. 1943, Wyndham, Benade et al. 1968). Si la correction de l'hyperglycémie lors d'un exercice après acclimatation est partagée, la concentration en AG circulants tend à augmenter chez Kirwan en post acclimatation (Kirwan, Costill et al. 1987). Il demeure donc difficile de savoir comment évolue la disponibilité en AG au cours de l'acclimatation.

c. Effet biogénique et dynamique mitochondriale : amélioration de la fonctionnalité mitochondriale

Plusieurs études suggèrent des effets de l'acclimatation à la chaleur similaires à ceux d'un entraînement en endurance sur les adaptations du métabolisme mitochondrial (Robinson, Dill et al. 1941, Shvartz, Shapiro et al. 1977, Sawka, Pandolf et al. 1983, Houmard, Costill et al. 1990, Aoyagi, McLellan et al. 1994, Fujii, Honda et al. 2012). Des observations concordantes montrent que la chaleur permettrait par ailleurs d'augmenter le contenu protéique mitochondrial (Naito, Powers et al. 2000, Uehara, Goto et al. 2004, Oishi, Hayashida et al. 2009, Kakigi, Naito et al. 2011). La masse mitochondriale est le résultat d'un équilibre entre synthèse (biogenèse) et destruction (autophagie ou mitophagie) des mitochondries. L'acclimatation à la chaleur pourrait améliorer la fonctionnalité mitochondriale par ces effets quantitatifs.

Biogenèse et exposition chronique à la chaleur

Augmentation du contenu mitochondrial médiée par PGC1- α . L'exposition répétée à la chaleur permettrait de stimuler la biogenèse mitochondriale, via l'activation de PGC-1 α . Liu et Brooks ont pour la première fois mis en évidence une stimulation de la biogenèse mitochondriale par un stress thermique sur des myotubes issus de cellules C2C12 (myoblastes de souris) placées 1 heure par jour pendant 5 jours à 40°C. Ils ont observé une augmentation du contenu protéique mitochondrial et des marqueurs de la biogenèse, tels que PGC-1 α (Liu and Brooks 2012). Yamaguchi a également montré *in vitro*, sur des myoblastes humains, qu'une exposition passive de 7 jours à 39°C a permis d'induire une différenciation vers un phénotype oxydatif (Yamaguchi, Suzuki et al. 2010). Des résultats obtenus *in vivo* dans le muscle squelettique viennent confirmer les observations de Liu. Tamura a étudié l'effet distinct et combiné d'une exposition passive à la chaleur et d'un entraînement en endurance sur des souris pendant 3 semaines (Tamura, Matsunaga et al. 2014). L'exposition à la chaleur a induit une augmentation de l'activité des enzymes mitochondriales (Citratesynthase, 3-hydroxyacyl-coA déshydrogénase) et du contenu en protéines de la CRM (phosphorylation oxydative) dans les muscles *Plantaris* (mixte) et *Soleus* (aérobie). Cet effet de la chaleur sur la biogenèse mitochondriale a été aditif avec ceux de l'entraînement (Seebacher 2009, Seebacher, Murray et al. 2009). En outre, ces effets de l'acclimatation à la chaleur sur le contenu mitochondrial n'étaient plus retrouvés chez des souris dont le gène *pgc1 α* était inactivé (data non publiées, présentées en congrès (Tamura, Kouzaki et al. 2019)) (**Figure 19**).

Autophagie et exposition chronique à la chaleur

L'acclimatation à la chaleur pourrait avoir un effet bénéfique dans des situations d'amyotrophie modulant les processus autophagiques. Plusieurs études ont montré que le stress thermique chaud aidait à la régénération musculaire après lésion ou amyotrophie de décharge (Kojima, Goto et al. 2007, Ohno, Yamada et al. 2010, Hatade, Takeuchi et al. 2014). Un des mécanismes clé de l'atrophie musculaire est la perte des mitochondries par accélération de leur destruction (Powers, Wiggs et al. 2012, Bonaldo and Sandri 2013, Calvani, Joseph et al. 2013). Dans un modèle d'atrophie induite par dénervation sciatique chez des souris, Tamura a montré qu'une exposition à la chaleur *in vivo* de 6 jours avait permis de lutter contre la diminution du contenu protéique et des capacités oxydatives (citratesynthase, complexes de la chaîne respiratoire) préservant de ce fait la masse musculaire. Cette préservation du pool mitochondrial était associée à une diminution de l'activation de la mitophagie et du stress oxydatif (Tamura, Kitaoka et al. 2015).

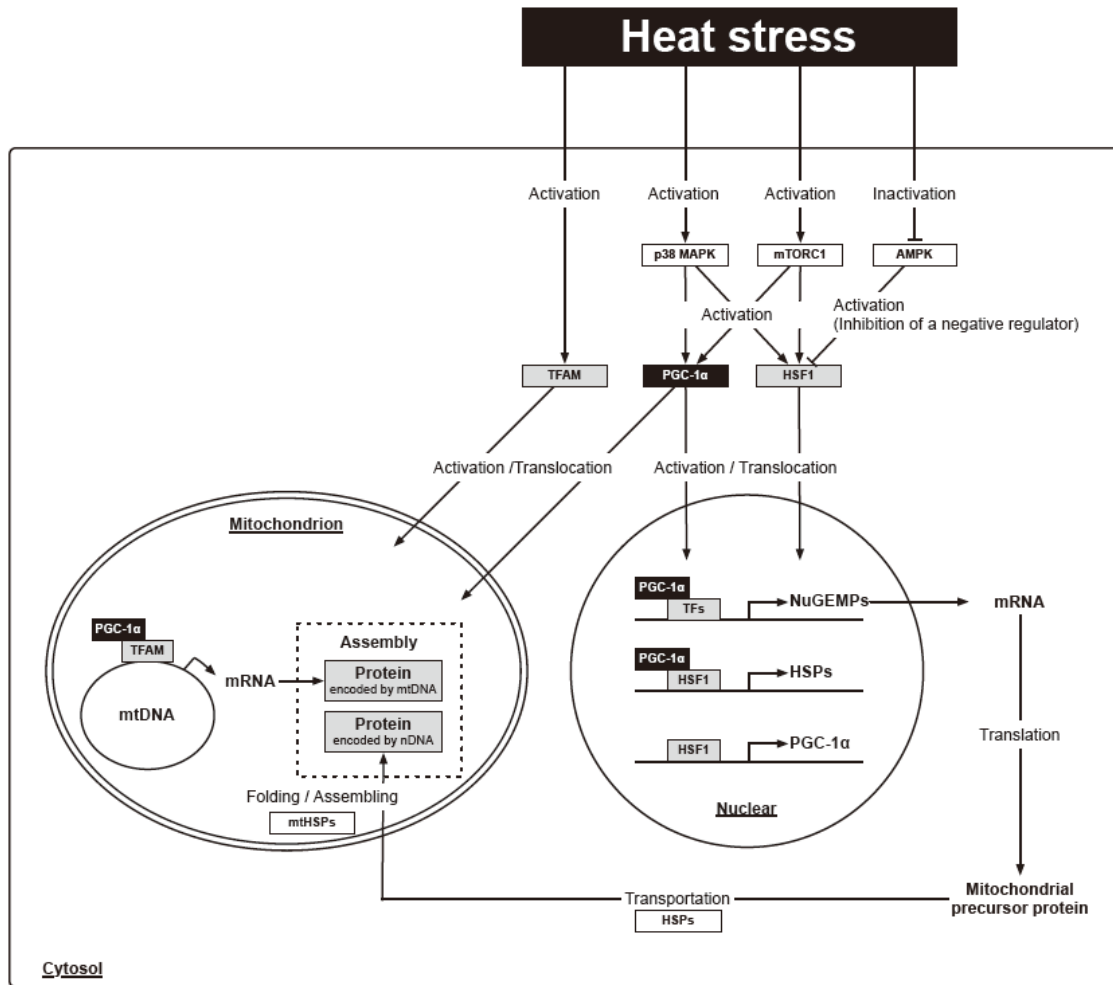


Figure 19. Effet du stress thermique chaud sur les voies d'activation de la transcription de la biogenèse mitochondriale. L'exposition à la chaleur active la transduction de signaux intra-cellulaires qui promeuvent la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, codés au niveau nucléaire (nDNA) et mitochondrial (mtDNA). Outre les facteurs de transcription, des protéines chaperonnes peuvent également contribuer à la stimulation de la biogenèse à la chaleur en augmentant les capacités de régulation post-traductionnelles (Tamura and Hatta 2017).

Possible détérioration mitochondriale par altération du remodelage. Néanmoins, le bénéfice de l'acclimatation à la chaleur sur la fonctionnalité mitochondriale demeure débattu. En effet, un des rôles de la mitophagie est d'éliminer les mitochondries détériorées. L'inhibition du flux mitophagique pourrait avoir un effet délétère sur la qualité du pool mitochondrial. Ainsi, chez des cochons exposés 1 à 3 jours à la chaleur, une diminution des marqueurs d'activation autophagique était observée alors que ceux du contenu mitochondrial étaient augmentés en absence d'activation de la biogenèse. L'acclimatation aurait altéré le renouvellement des mitochondries en inhibant l'activité mitophagique.

L'augmentation du contenu traduirait donc une accumulation de mitochondries défectueuses (Brownstein, Ganesan et al. 2017) posant la question de la fonctionnalité de cette masse mitochondriale accrue.

Fonctionnalité mitochondriale et exposition chronique à la chaleur

Augmentation *in vivo* de la fonction mitochondriale. Récemment, l'amélioration de la fonction mitochondriale par l'exposition répétée à la chaleur a été mise en évidence, indépendamment d'une action sur la biogenèse dans une étude qui présente le double intérêt d'avoir été réalisée chez l'Homme et de mesurer l'effet d'une exposition locale répétée à la chaleur sans exercice physique associé (Hafen, Preece et al. 2018). En exposant un quadriceps à la chaleur locale (+3,9°C d'augmentation de température profonde musculaire) 2h/j pendant 6 jours, le quadriceps controlatéral étant témoin, les auteurs ont observé que l'exposition répétée à la chaleur avait induit une augmentation de la capacité respiratoire mitochondriale, ainsi qu'une augmentation de certaines protéines mitochondriales (CI et CV) et de PGC-1 α . L'activité de la citrate synthase, marqueur communément admis du contenu mitochondrial, n'était pas augmentée. Malgré la réponse PGC-1 α , il n'est pas certain que la biogenèse mitochondriale ait été stimulée dans cette étude. Ces observations montrent qu'une exposition locale répétée à la chaleur a pu induire une augmentation de la fonctionnalité mitochondriale, sans augmentation avérée de la masse mitochondriale.

Possibles modifications de la membrane mitochondriale. L'acclimatation à la chaleur pourrait améliorer spécifiquement l'efficacité mitochondriale (Cassuto 1968, Seebacher 2009, Seebacher, Murray et al. 2009, Assayag, Saada et al. 2012). Un signe important d'acclimatation à la chaleur est en effet la diminution du métabolisme énergétique, réduisant au passage la production endogène de chaleur (Assayag, Saada et al. 2012). Notamment, l'acclimatation à la chaleur modifierait l'activité des complexes I et III ce qui induirait moins d'ERO (Assayag, Saada et al. 2012). En accord avec ces observations, les travaux de Nicholls montraient une meilleure efficacité de la phosphorylation oxydative des mitochondries issues de cobayes acclimatés à la chaleur (Nicholls, Darley-Usmar et al. 2010). Ce maintien de la fonctionnalité médiée par un meilleur couplage pourrait être sous-tendu par la modification de la composition des membranes mitochondriales en cholestérol et acides gras polyinsaturés (Shmeeda, Kaspler et al. 2002). Ce remodelage membranaire permettrait de diminuer la dissipation d'énergie par fuite de protons, donc d'améliorer le couplage (Haines 2001).

Effets de l'acclimatation et de l'entraînement intriqués. A la lumière de ces différentes études, l'acclimatation à la chaleur pourrait induire une amélioration de la capacité oxydative

mitochondriale. Néanmoins, les mécanismes précis de ces effets de l'acclimatation à la chaleur sur le métabolisme mitochondrial restent largement méconnus. La plupart des études utilisent des protocoles d'acclimatation à la chaleur incluant des entraînements en endurance. Les effets de l'entraînement sur l'amélioration de la fonction mitochondriale peuvent masquer certains effets de l'acclimatation à la chaleur. Ainsi la variabilité de certaines réponses à l'acclimatation à la chaleur sur le métabolisme mitochondrial, pourrait provenir du niveau d'endurance des sujets au départ (Weinman, Slabochova et al. 1967, Wyndham, Rogers et al. 1976). En corollaire, l'entraînement en endurance sollicitant également les processus de thermorégulation, les adaptations qui s'ensuivent peuvent aussi résulter de l'hyperthermie d'origine endogène. Même si ces études sont souvent réalisées chez des sujets entraînés afin de minimiser l'impact des courtes périodes d'entraînement, il est souvent difficile de faire la part des choses entre ces deux facteurs. En outre, les quelques études sur l'effet d'une acclimatation passive à la chaleur chez des sujets sédentaires, ne montraient pas d'amélioration de l'endurance à l'exercice à la chaleur mais plutôt un phénotype d'adaptation de la thermorégulation (baisse de température profonde, sudation et vasodilatation précoces) sans baisse de la fréquence cardiaque à l'exercice (Lim, Chung et al. 1997, Beaudin, Clegg et al. 2009).

d. Tolérance cellulaire

Plasticité d'acclimatation. Si l'acclimatation permet de diminuer l'impact physiologique du stress thermique, la thermotolérance correspond aux réponses cellulaires à l'exposition répétée à un stress thermique modéré qui permettent de survivre à des expositions à la chaleur qui seraient létales pour un organisme naïf d'expositions à la chaleur (Moseley 1997, Horowitz 1998). L'acclimatation à la chaleur permet d'augmenter la réserve de thermorégulation (endurance à la chaleur), c'est-à-dire d'élargir la plage de température pour un fonctionnement optimal métabolique (efficacité de la phosphorylation oxydative, biogenèse) mais également de repousser la température de survenue de lésions thermiques (**Figure 20**). La thermotolérance et l'endurance à la chaleur sont deux processus complémentaires dont il semble qu'ils partagent des voies communes de signalisation au travers de la réponse de choc thermique (HSR : *heat shock response*) (Kuennen, Gillum et al. 2011). Maloyan notamment montre que la thermotolérance a permis d'augmenter la survie de rats à des stress de 60% supérieurs à l'exposition létale avant induction de la tolérance (Maloyan, Palmon et al. 1999). Au niveau mitochondrial, plusieurs études montrent une augmentation de la résistance au stress thermique chaud aigu de mitochondries ayant été acclimatées à la chaleur. Cette résistance s'observe sous la forme d'un maintien de la fonction malgré un stress ischémique (Assayag, Saada et al. 2012),

d'une moindre production de ERO (Maloyan, Palmon et al. 1999) ou d'une diminution de morts cellulaires par apoptose (Assayag, Gerstenblith et al. 2010). Les études sur les régimes d'acclimation utilisent de plus en plus le critère de résistance accrue aux lésions induites par la chaleur (Horowitz 2002), à côté des trois autres critères classiques de baisse du métabolisme de base (baisse de la température profonde), température seuil abaissée pour le déclenchement de la thermolyse et augmentation de la réserve cardiovasculaire.

Dynamic thermoregulatory range

$T-T_{sh_{EV}}$, $T-T_{sh_{TI}}$

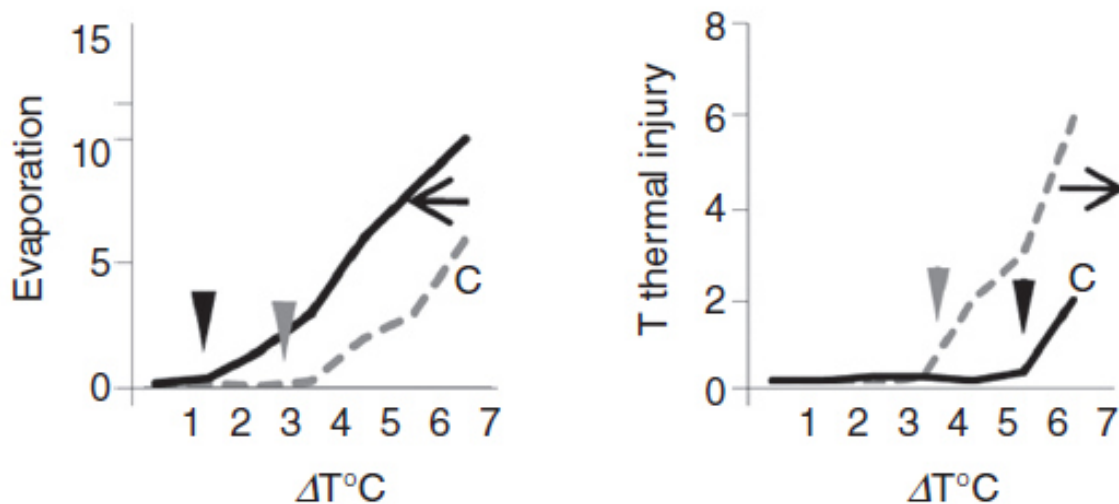


Figure 20. Plasticité d'acclimation montrée par l'élargissement de la plage de thermorégulation. L'acclimation à la chaleur permet d'accroître la tolérance à la chaleur par une sudation plus précoce ($T-T_{sh_{EV}}$: décalage vers la gauche de la courbe) et l'augmentation de la température lésionnelle ($T-T_{sh_{TI}}$: décalage de la courbe vers la droite) (Horowitz 2014).

Réponse cytoprotectrice médiée par HSP. La construction du phénotype cytoprotecteur nécessite du temps. Il ne peut s'inscrire dans les protocoles d'acclimation à court terme (STHA : *short-term heat acclimation*) mettant en place les réponses thermorégulatrices d'endurance à la chaleur. Cette thermotolérance apparaît au cours des protocoles longs (LTHA : *long-term heat acclimation*) (Assayag, Gerstenblith et al. 2010, Assayag, Saada et al. 2012) mais débute dès la phase précoce d'acclimation mettant notamment en jeu les récepteur β -adrénergiques du système sympathique (Maloyan and Horowitz 2002). L'activité transcriptionnelle dépendante de la température est connue depuis les années 60 (Ritossa 1962). Un lien est suggéré entre la réponse cellulaire immédiate (HSR : *heat shock response*) et le processus plus long d'acclimation à la chaleur, mettant en jeu des HSP (*heat shock protein*) (Moseley 1997). La famille des HSP se définit par leur poids moléculaire (de 8 à 110 kDa). Les

HSP sont compartimentées. Les HSP intracellulaires (iHSP) interviennent dans les processus de traitement des protéines dénaturées, de gestion des fragments protéiques, maintien des protéines structurales et de chaperonnage des protéines membranaires (**Figure 21**). Les HSP extracellulaires (eHSP) ont un rôle de signal dans le déclenchement de la réponse immunitaire (Pockley 2003, Asea 2007, Noble 2008). L'expression des HSP augmente au cours et au décours d'une exposition à un stress thermique chaud. La réponse diffère selon l'organe considéré, le cœur et le foie induisant de plus grandes réponses que les muscles. Parmi ces protéines, HSP 72 a été mise en évidence dans les réponses au stress thermique et à l'exercice (Horowitz, Maloyan et al. 1997, Locke 1997). La réponse HSP 72 consiste en une augmentation du transcrit hsp72 à l'initiation de l'acclimatation. Cependant la réponse protéique est différée, l'acclimatation entraîne une augmentation progressive du stock en protéines HSP 72. La synthèse de HSP dépend de la profondeur et de l'accumulation du stress thermique (Maloyan, Palmon et al. 1999). Si l'exercice induit également une synthèse de HSP, la combinaison de l'exercice et de l'exposition à la chaleur réalise une réponse bien plus importante que chacun des stressseurs séparément. L'augmentation d'expression a été corrélée à l'augmentation de la performance et de la puissance aérobie chez le chien (Febbraio and Koukoulas 2000). Inversement, il a été montré l'incapacité de certains hommes, porteurs d'un polymorphisme de HSP 70, à s'acclimater (Horowitz 2014). D'autres HSP telles que HSP 90 interviennent également dans la HSR ; leur cinétique varie selon la durée et l'intensité du stress thermique (Periard, Racinais et al. 2015) Si l'expression d'HSP répond à l'exposition à la chaleur, l'acclimatation a également augmenté les réserves en HSP70 (Horowitz & robinson 2007). Il apparait que le développement de l'acclimatation se caractérise par une augmentation des réserves basales en iHSP (iHSP72 notamment) et une HSR plus rapide (Horowitz 2014) permettant une réponse de moindre intensité (Periard, Racinais et al. 2015). La cellule est mieux préparée et plus réactive. Le stimulus thermique induit un stress moindre. Au cours d'une étude de l'expression des iHSP 72 et 90 pendant 10 jours d'exercice à la chaleur, leur réponse était corrélée aux adaptations physiologiques. Les niveaux basaux de protéines étaient augmentés et la meilleure réponse physiologique était observée chez les individus ayant montré une baisse de l'expression post-exercice (McClung, Hasday et al. 2008). Le niveau de HSP serait corrélé à la performance à l'exercice à la chaleur. Parmi ces protéines chaperonnes, HSP 72 est un marqueur majeur de stress thermique et de lésion thermique. Il dépendrait du niveau de stress thermique (température ambiante, récepteur β adrénergique) et non du stockage thermique, dans une relation dose-dépendante (Flanagan, Ryan et al. 1995).

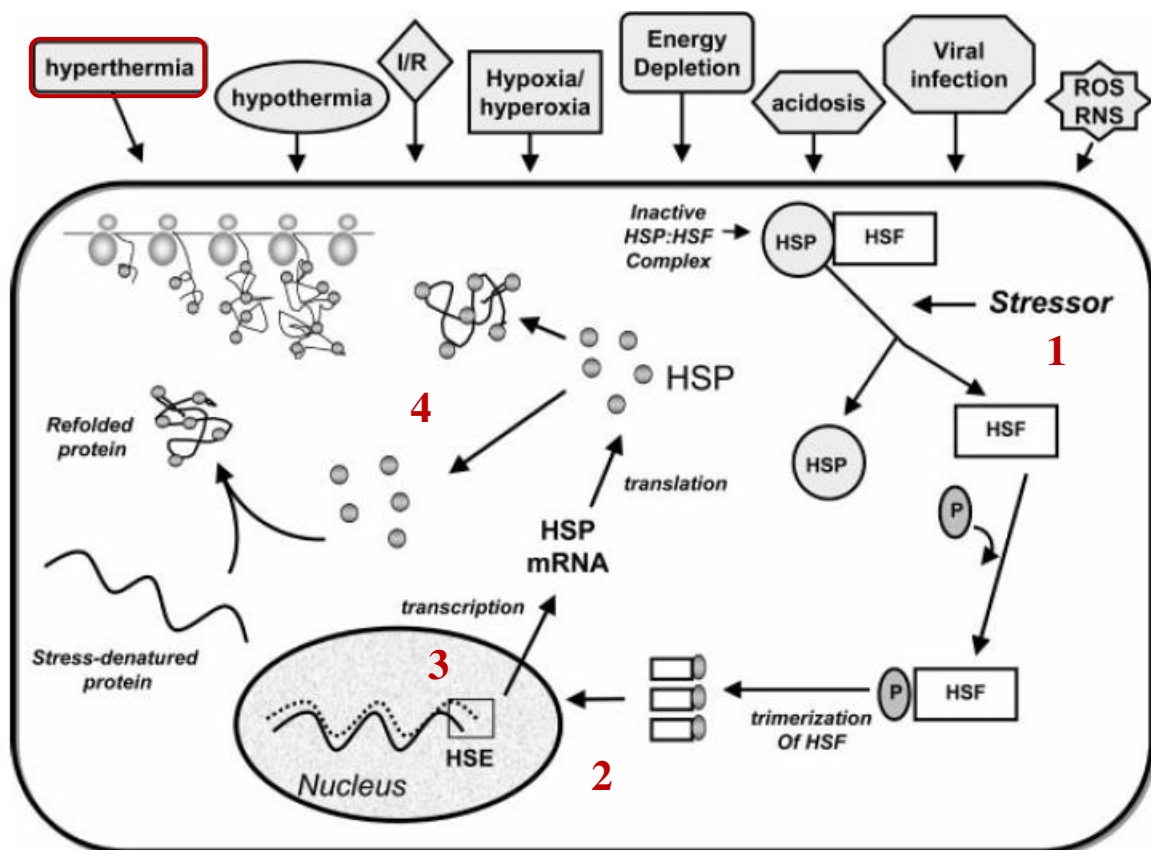


Figure 21. Activation de la voie des heat shock proteins (HSP). Les HSP ont été initialement découvertes en 1962, après exposition à un choc thermique chaud, mais de nombreux autres facteurs de stress sont susceptibles d'induire l'expression de ces protéines. Les HSP sont liés à des facteurs de stress thermique (HSFs) présents dans le cytosol qui rendent inactives les HSP (1). A la suite de l'exposition à un stress hyperthermique, les HSF se séparent des HSP (2). Les HSF vont former, après phosphorylation, des complexes (trimères) qui vont activer, dans le noyau, le promoteur du gène HSP 70 (HSE : heat shock element) (3). L'augmentation de transcription (HSP mRNA) permet d'augmenter la synthèse de protéines HSP 70 (4). Les HSP ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles vont assister l'assemblage et la translocation de protéines nouvellement synthétisées, et la réparation et la récupération de la conformation des protéines dénaturées (5). I/R : ischémie-reperfusion, ROS : espèces réactives de l'oxygène, RNS : espèces réactives de l'azote. (Kregel, 2002).

Mécanismes de protection induits par la réponse HSP. L'acclimatation à la chaleur permettrait ainsi d'améliorer les capacités de maintien de l'homéostasie protéique, augmentant ainsi la plasticité mitochondriale à la température. La fonction des HSP est de lutter contre la réponse UPR (*unfolded protein response*) qui décrit la réponse physiologique à la perte de fonction et la dénaturation de protéines. Sous l'effet de différents facteurs tels que le vieillissement, les protéines se détériorent et perdent leur conformation spatiale. Les HSP permettent d'éliminer les protéines détériorées. Tamura a montré que l'acclimatation à la chaleur permettait d'atténuer la réponse UPR induite par le vieillissement (Tamura, Matsunaga et al. 2017). Les cibles de ces protéines chaperonnes sont multiples (Figure 22). Elles seraient

impliquées dans la biogenèse mitochondriale via PGC-1 α (HSP 70) (Liu, D'Silva et al. 2003, McArdle, Dillmann et al. 2004), le contrôle de la mitophagie via la Parkin (Drew, Ribas et al. 2014) ou l'apoptose (Zeng, Tan et al. 2013). Elles permettraient également de protéger la mitochondrie contre le stress oxydant (Arieli, Eynan et al. 2003).

HSP Family	Cellular Location	Proposed Function
HSP27 (sHSP)	Cytosol, nucleus	Microfilament stabilization, antiapoptotic
HSP60	Mitochondria	Refolds proteins and prevents aggregation of denatured proteins, proapoptotic
HSP70 family:		Antiapoptotic
HSP72 (Hsp70)	Cytosol, nucleus	Protein folding, cytoprotection
HSP73 (Hsc70)	Cytosol, nucleus	Molecular chaperones
HSP75 (mHSP70)	Mitochondria	Molecular chaperones
HSP78 (GRP78)	ER	Cytoprotection, molecular chaperones
HSP90	Cytosol, ER, nucleus	Regulation of steroid hormone receptors, protein translocation
HSP110/104	Cytosol	Protein folding

HSP, heat shock protein; sHSP, small HSP; ER, endoplasmic reticulum.

Figure 22. Localisation et rôle des principales HSP impliquées dans la HSR (Kregel 2002).

Autres voies de signalisation. La réponse à l'acclimatation à la chaleur dépend d'autres gènes que les HSP, activés par la chaleur ou d'autres stimuli. Plus de 200 gènes activés ou inhibés par le stress thermique ont été identifiés. L'exposition à la chaleur a modifié la transcription de gènes impliqués dans l'expression des protéines chaperonnes, le système immunitaire, la transduction du signal, la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'expression d'enzymes du métabolisme glucidique et lipidique notamment, et la transcription (Sonna, Gaffin et al. 2002). La mise en jeu de différents gènes par d'autres stressseurs peut activer des voies transcriptionnelles distinctes et aboutir à des effets séparés conduisant à une meilleure tolérance à la chaleur. Kodesh a ainsi montré qu'une acclimatation à la chaleur et un entraînement en endurance pouvaient agir différemment sur la fonction contractile (couplage ou turn-over calcique) et non de manière additive (Kodesh, Nesher et al. 2011).

La multiplicité et l'interconnexion des voies transcriptionnelles mises en jeu par l'acclimatation à la chaleur confèrent des adaptations pouvant protéger la cellule contre d'autres stress.

e. Phénotype *hypoxia-like*

Réponses adaptatives à la chaleur pouvant sous-tendre une tolérance à l'hypoxie. L'acclimatation à la chaleur permettrait une amélioration de la réponse à un exercice en hypoxie (Heled, Peled et al. 2012, Lee, Miller et al. 2016). L'acquisition d'un phénotype protecteur atténuerait les réponses physiologiques à l'hypoxie aiguë (Lee, Emery-Sinclair et al. 2014). Les adaptations cardiovasculaires induites par l'acclimatation à la chaleur pourraient être bénéfiques pour la tolérance à l'hypoxie et participeraient à une tolérance croisée entre

exposition à la chaleur et à l'hypoxie, induite par l'acclimatation à la chaleur. Les réponses adaptatives concernant la compliance cardiaque (Horowitz, Shimoni et al. 1986), le contrôle vasomoteur (Nielsen, Hales et al. 1993), constituent des adaptations potentiellement bénéfiques pour l'exercice en hypoxie. L'augmentation du temps de transit par la diminution de la fréquence cardiaque et de la viscosité pourrait contribuer à maintenir l'hématose (Powers, Lawler et al. 1989). L'inflation volémique observée à l'acclimatation à la chaleur permettrait de préserver la SpO₂ en situation hypoxique (Gibson, Turner et al. 2015) et d'améliorer la performance en altitude (Convertino, Greenleaf et al. 1980). Inversement, il semble qu'il n'y ait pas de bénéfice de l'acclimatation à la chaleur sur les réponses hypoxiques en absence d'expansion volémique (White, Salgado et al. 2014). L'abaissement de la température profonde en retardant la redistribution du débit sanguin vers la peau pourrait maintenir une perfusion tissulaire participant ainsi à une meilleure tolérance à l'hypoxie. Elle agirait également sur la courbe de dissociation de l'hémoglobine, augmentant son affinité pour l'oxygène (décalage vers la gauche). L'exposition à la chaleur induirait également une hypoxie par diminution du débit sanguin musculaire qui pourrait induire des adaptations tissulaires locales bénéfiques (Rowell, Brengelmann et al. 1968, Fink, Costill et al. 1975, Kozlowski, Brzezinska et al. 1985, Nielsen, Savard et al. 1990).

Induction d'un phénotype proche du phénotype hypoxique. Un autre élément mécanistique repose sur les voies d'activation de la cytoprotection induites par l'acclimatation à la chaleur et qui amélioreraient la résistance cellulaire à l'hypoxie. Cette acclimatation croisée a été beaucoup étudiée dans le cœur, en raison notamment de l'importance de la réponse hypoxique et des moyens de l'améliorer dans la prévention de maladies cardiovasculaires. Dans des modèles d'ischémie-reperfusion de cœurs de rats, l'exposition à un stress thermique répété préalable a permis de diminuer les effets délétères de l'ischémie (Maloyan, Eli-Berchoer et al. 2005). L'acclimatation à la chaleur a également induit une protection contre les lésions cérébrales traumatiques induites chez la souris (Shein, Horowitz et al. 2005, Shein, Horowitz et al. 2007). L'acclimatation à la chaleur induirait un phénotype métabolique proche de celui observé en hypoxie : capacité glycolytique augmentée, augmentation des réserves en glycogène et transcription accrue de la phosphofructo-2 kinase 2 (PFK2), enzyme limitante de la glycolyse (Pescador, Villar et al. 2010, Semenza 2011). Eynan a montré que l'acclimatation à la chaleur avait permis d'induire ce phénotype (Eynan, Knubuvetz et al. 2002). Il existerait une activation de HIF-1 α au cours l'acclimatation à la chaleur, responsable de l'acquisition de ce phénotype métabolique. HIF-1 α est un facteur de transcription majeur dans la régulation de l'homéostasie

de l'oxygène (Fukuda, Zhang et al. 2007, Semenza 2011), découvert par le professeur Gregg Semenza, un des lauréats du Prix Nobel de médecine attribué en 2019 pour les connaissances apportées sur la façon dont les cellules perçoivent et s'adaptent à la disponibilité en O₂. Il active la transcription en formant avec HIF-1 β , un hétérodimère HIF-1 qui se lie à l'ADN. La régulation du système se fait par la dégradation rapide et permanente de HIF-1 α en normoxie, HIF-1 β étant exprimé de manière constitutive. La stabilisation de HIF-1 α permet, en ralentissant sa dégradation, d'augmenter sa concentration et les probabilités d'interaction avec HIF-1 β . Une étude récente permet de relier les effets bénéfiques d'une acclimatation à la chaleur dans un modèle d'ischémie myocardique chez des rats à ce phénotype hypoxique. Les bénéfices de l'acclimatation à la chaleur sur la tolérance cellulaire ont été objectivés par une diminution de la taille d'infarctus du muscle cardiaque et une augmentation du délai de survenue de la rigidité contractile des cardiomyocytes. Les auteurs ont élégamment démontré que ces améliorations nécessitaient l'activation de HIF-1 α et de ses cibles, notamment une augmentation de PDK1 et du ratio COX4.2/COX4.1 (Alexander-Shani, Mreisat et al. 2017). L'augmentation de ces deux composantes permet d'adapter le fonctionnement mitochondrial à une ambiance hypoxique (**Figure 23**).

Adaptations mitochondriales. Les mitochondries sont mieux préparées au stress hypoxique. Un effet délétère de l'hypoxie provient de l'orientation brutale vers le métabolisme anaérobie lactique et de l'ascension rapide de l'acide lactique qui bloque la glycolyse et induit la production d'ERO (Eynan, Knubuvetz et al. 2002). L'augmentation de la PDK1 médiée par l'induction de HIF1 α par l'acclimatation à la chaleur, se traduit par une diminution de l'entrée du pyruvate d'où une moindre respiration mitochondriale et une moindre susceptibilité à la production d'ERO notamment (Kim, Tchernyshyov et al. 2006). Dans l'étude de Shani, le phénotype HA des cellules myocardiques se caractérisait par une moindre production d'ERO et un plus fort potentiel glycolytique. A l'instar d'une acclimatation à l'hypoxie, l'augmentation basale induite par l'acclimatation à la chaleur, a permis une moindre augmentation de PDK1 en réponse au stress hypoxique. En revanche, dans les cardiomyocytes du groupe non acclimaté, le stress hypoxique a induit une forte inhibition de la PDH avec deux conséquences : i) la glycolyse anaérobie augmente brutalement et est rapidement bloquée par l'augmentation de l'acide lactique ; ii) le blocage de la chaîne respiratoire induit la production d'ERO. (Alexander-Shani, Mreisat et al. 2017). De plus, comme le montre l'étude de Shani, l'acclimatation à la chaleur améliore probablement la résistance au stress oxydant en améliorant l'efficacité mitochondriale. L'augmentation de la COX4.2 permettrait d'optimiser le fonctionnement de la

COX. Ainsi, la chaîne de transport d'électrons, plus efficace, optimise la production d'ATP et diminue la production d'ERO, en normoxie ou hypoxie.

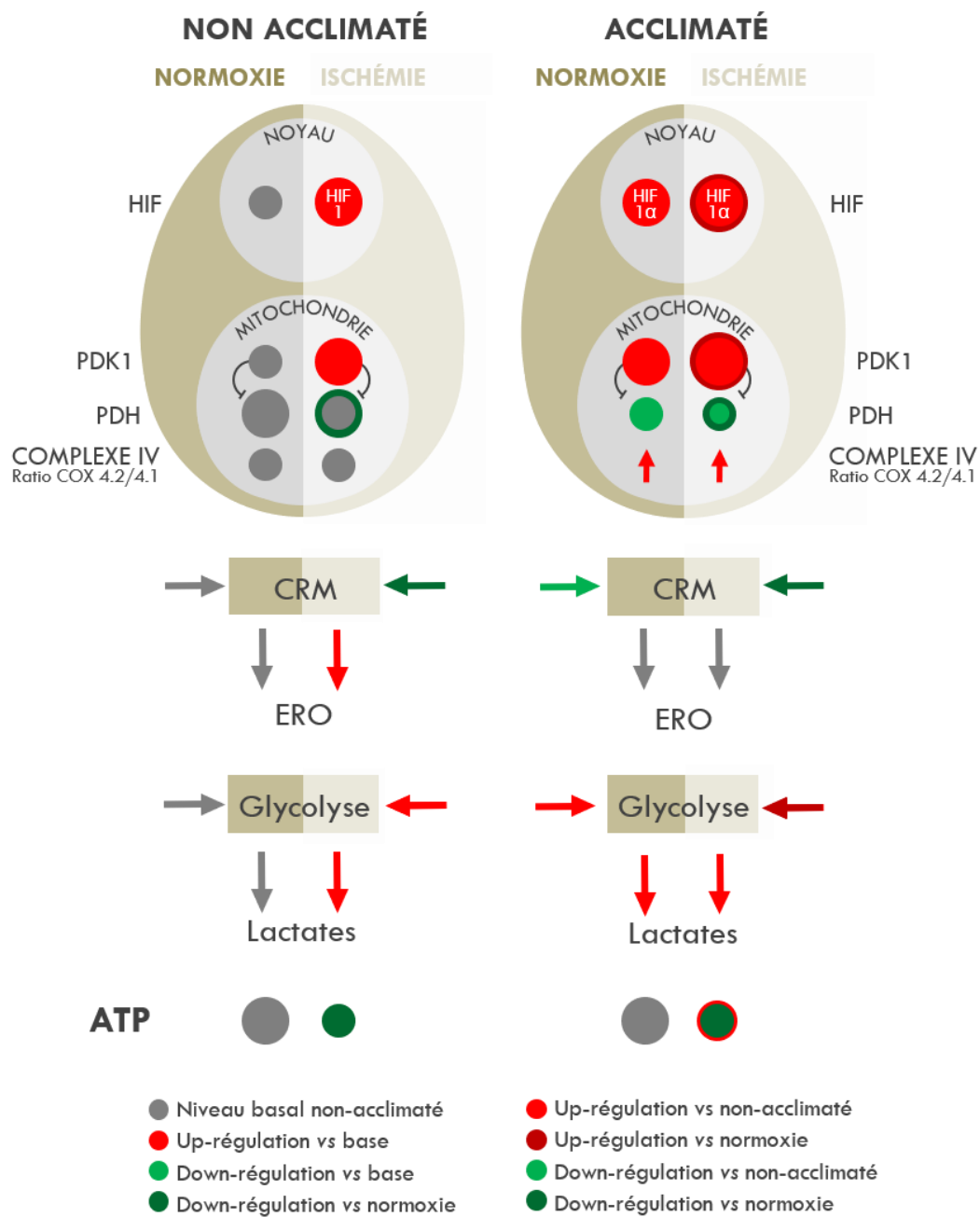


Figure 23. Tolérance croisée à l'hypoxie induite par l'acclimation à la chaleur, par induction d'un phénotype hypoxique. Le principe en est l'acquisition d'une moindre sensibilité à des lésions causées par hypoxie, par une augmentation des réserves et le remodelage de molécules cytoprotectrices. Deux voies sont activées : la PDK-1 et la COX. A gauche. Chez le non-acclimaté à la chaleur, le cœur ischemié montre une élévation très importante de PDK-1. Le flux glycolytique est rapidement stoppé et la production d'ERO significativement plus élevée. A droite. Après 30 jours d'acclimation, la PDK-1 est stimulée, diminuant l'activité de PDH et donc l'utilisation du pyruvate. Durant l'ischémie, bien que PDK ne soit que modérément stimulée, l'activité PDH est sensiblement diminuée. Ainsi, l'atténuation des variations induites par l'hypoxie permet un flux glycolytique plus lent et prolongé et une production d'ERO plus faible. Par ailleurs, la modification du rapport COX4.2/COX4.1 induit un phénotype tolérant à l'hypoxie et une optimisation de la chaîne de transfert d'électrons dans des situations d'altérations de la production d'énergie d'après Alexander-Shani & al (Alexander-Shani, Mreisat et al. 2017).

Ces adaptations croisées permettent de diminuer la production d'ERO en conditions hypoxiques tout en maintenant une capacité de production d'ATP aérobie. L'acclimatation à la chaleur permet d'améliorer le profil protecteur afin de diminuer l'impact de l'hypoxie et permettre un compromis entre limitation du stress oxydatif et maintien de la respiration mitochondriale. Si la tolérance croisée à l'hypoxie par l'acclimatation à la chaleur implique la mise en jeu des HSP (Maloyan and Horowitz 2002), la seule cytoprotection qu'elles confèrent n'est pas suffisante pour induire ce phénotype de résistance à l'ischémie et nécessite l'activation de HIF (Shani).

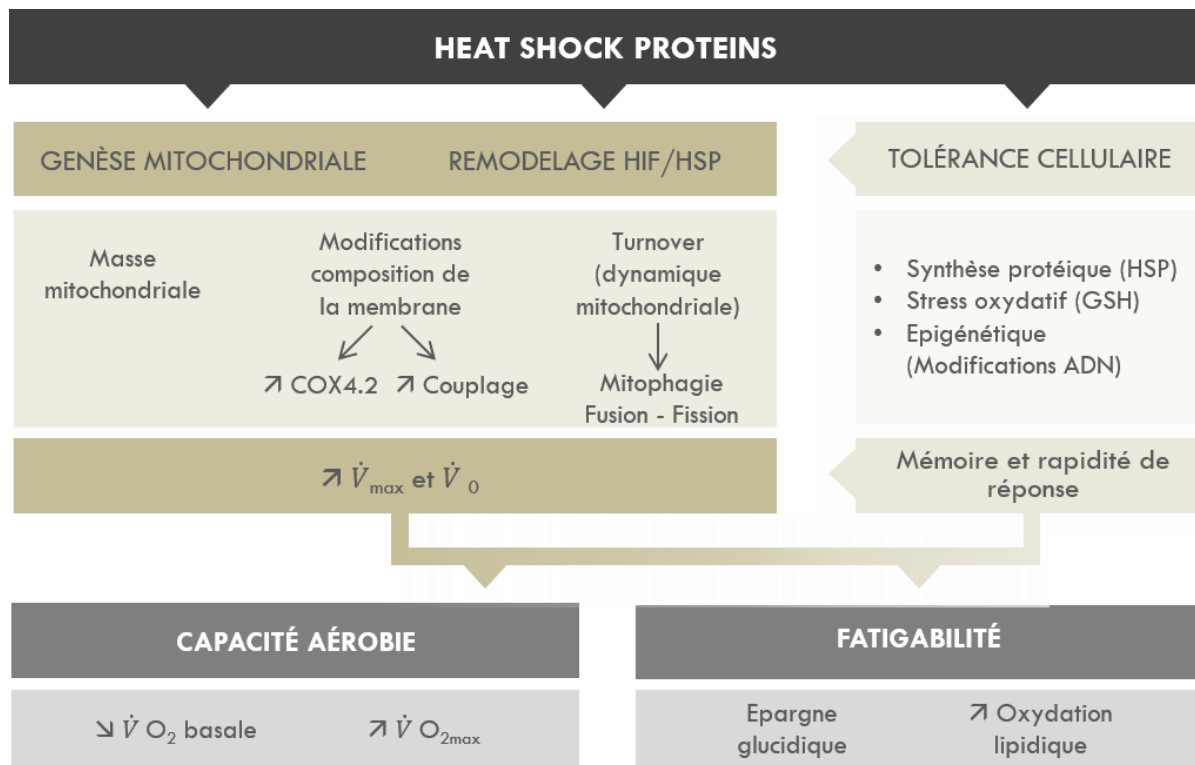


Figure 24. Mécanismes potentiels d'adaptation mitochondriale à la chaleur. L'exposition à la chaleur pourrait activer la voie de la biogenèse mitochondriale (Tamura, Matsunaga et al. 2014). La chaleur pourrait modifier le remodelage mitochondrial, notamment en inhibant les processus mitophagiques et de fission-fusion (Tamura, Kitaoka et al. 2015). En outre des modifications de la composition de la chaîne respiratoire en cytochrome oxydase pourrait être induites par l'acclimatation à la chaleur (augmentation du rapport COX 4.2 /COX4.1) (Alexander-Shani, Mreisat et al. 2017). Divers mécanismes contribuant à l'amélioration de la tolérance cellulaire à la chaleur pourraient être impliqués. L'augmentation de l'expression des HSP par leur rôle de protéines chaperonnes mais aussi probablement par l'activation de voies spécifiques (PGC-1 α ou HIF-1 α) pourraient participer à ces réponses mitochondriales (Liu, D'Silva et al. 2003, Drew, Ribas et al. 2014). Par ailleurs, les modifications des mécanismes antioxydants pourraient jouer un rôle dans la préservation de la fonctionnalité mitochondriale (Tamura, Kitaoka et al. 2015). L'ensemble de ces réponses met en jeu les mécanismes épigénétiques de modification de l'expression du génome afin d'induire la synthèse protéique permettant l'acquisition d'un nouveau phénotype mitochondrial (Horowitz 2014). L'ensemble de ces réponses augmenterait la quantité et modifierait la qualité des mitochondries. Les adaptations mitochondriales permettraient de diminuer le métabolisme de base moins sensible à la chaleur, et d'améliorer l'endurance à l'effort par une augmentation des capacités d'utilisation des lipides et une meilleure résistance à la chaleur.

Plusieurs effets de l'acclimatation à la chaleur sur le métabolisme énergétique sont établis. Une baisse du métabolisme de repos et la correction de la dépendance aux glucides à l'exercice sont communément admises. Par ailleurs, l'acclimatation pourrait augmenter la fonctionnalité mitochondriale notamment au travers des réponses transcriptionnelles cytoprotectrices. L'acclimatation à la chaleur interfère avec plusieurs processus du métabolisme mitochondrial avec de possibles effets biogéniques de la chaleur, d'altération de la mitophagie et d'amélioration du couplage mais avec encore très peu de données sur la fonctionnalité de ce phénotype de mitochondries « thermotolérante » (Figure 24).

Si la tolérance à la chaleur est clairement augmentée par l'acclimatation, les bénéfices des modifications mitochondriales induites par l'acclimatation sur les adaptations métaboliques à l'entraînement en endurance demeurent incertains.

2. Effet de l'entraînement en endurance

L'entraînement physique, particulièrement l'entraînement aérobique, est connu pour augmenter les capacités d'utilisation de l'oxygène et améliorer l'endurance à l'exercice. Il est clairement admis que le débit de consommation maximale en oxygène ($\dot{V}O_{2max}$) est un marqueur majeur de la performance aérobique et qu'il peut être augmenté par l'entraînement en endurance (Coyle 1999, Jacobs, Fluck et al. 2013, Montero, Cathomen et al. 2015, Montero and Lundby 2017).

Des adaptations cardio-vasculaires et neuro-hormonales vont permettre cette augmentation des capacités aérobies. L'amélioration de $\dot{V}O_{2max}$ résulte des adaptations de l'appareil cardio-vasculaire et hématologique. Le débit cardiaque maximal augmente au travers d'une amélioration du volume d'éjection systolique et d'une augmentation du tonus vagal. La réserve cardiaque augmente donc, accompagnée par une augmentation de la volémie. Ainsi, les capacités de prélèvement dans l'air ambiant, de transport et de distribution de l' O_2 sont améliorées par l'augmentation des capacités de convection (volémie, inotropisme cardiaque, hématopoïèse). Au niveau musculaire, après entraînement en endurance, les capacités d'utilisation de l' O_2 sont favorisées localement par la transition vers un phénotype métabolique oxydatif qui se caractérise notamment par une augmentation du nombre de mitochondries. Les capacités d'extraction musculaires de l' O_2 augmentent également, impliquant la stimulation d'une angiogenèse qui permet de favoriser l'apport d'oxygène au muscle via une densité capillaire accrue. L'augmentation de $\dot{V}O_{2max}$ permet de diminuer l'intensité relative d'un

exercice réalisé à une intensité absolue donnée. Ainsi, le stress métabolique induit par cet exercice à intensité absolue donnée diminue. $\dot{V}O_{2max}$ n'est pas le seul déterminant de la performance. Les adaptations concernant l'utilisation des substrats énergétiques jouent également un rôle.

a. Capacité oxydative et transition lipidique

L'endurance à l'exercice dépend notamment du profil d'utilisation des substrats glucidiques et lipidiques. L'épuisement des réserves en glycogène est un facteur limitant du maintien de la performance (Figure 25) (Saltin and Karlsson 1971).

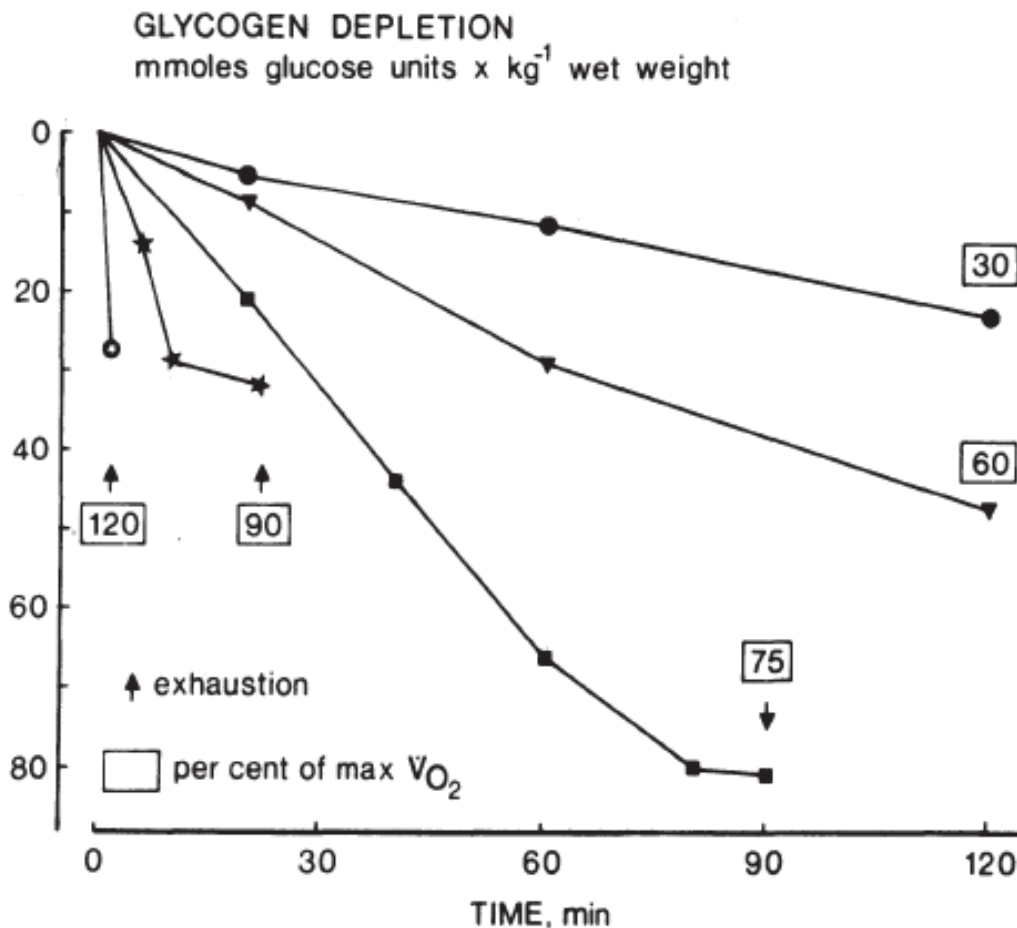


Figure 25. Déplétion du glycogène en fonction de la durée d'exercice, au cours d'un exercice de pédalage. Chaque courbe représente la déplétion moyenne en glycogène au sein du quadriceps des sujets, à une intensité d'exercice relative donnée (30 à 120% $\dot{V}O_{2max}$). La déplétion augmente avec l'intensité d'exercice. L'exercice est interrompu d'autant plus précocement que la déplétion est importante (Saltin and Karlsson 1971).

La part des glucides augmente avec la puissance d'exercice, la contribution relative des glucides et des lipides évoluant en sens inverse en décrivant un point de croisement glucido-lipidique

qui correspond à la contribution égale des deux substrats dans la fourniture en énergie. L'entraînement aérobie permet d'augmenter la contribution des lipides à l'exercice, qui se traduit, dans le modèle de Brooks par un déplacement du point de croisement glucido-lipidique vers la droite (Brooks and Mercier 1994). L'augmentation du débit maximal d'oxydation des lipides chez les sujets entraînés participe à la prolongation de la durée d'exercice, en ralentissant la déplétion en glycogène (Holloszy and Booth 1976, Gollnick and Saltin 1982, Kiens, Essen-Gustavsson et al. 1993).

L'augmentation de la contribution relative des lipides induit une épargne des réserves glucidiques, autorisant le maintien d'un effort plus intense plus longtemps.

b. Réponses mitochondriales à l'entraînement

L'entraînement permet d'induire l'augmentation de la masse et de la fonction mitochondriales (Hoppeler, Howald et al. 1985, Tonkonogi, Walsh et al. 2000, Daussin, Zoll et al. 2008, Meex, Schrauwen-Hinderling et al. 2010, Perry, Lally et al. 2010, Montero and Lundby 2017).

Augmentation du contenu mitochondrial

Il existe un lien entre l'augmentation du contenu mitochondrial et la performance aérobie. Les sujets endurants, avec un $\dot{V}O_2\text{max}$ élevé, ont une densité mitochondriale également élevée (Hoppeler, Luthi et al. 1973, Hoppeler, Howald et al. 1985, Weibel, Taylor et al. 1991).

La biogenèse mitochondriale peut être étudiée du point de vue de l'expression des protéines mitochondrial, du contenu en mitochondries de la fonction respiratoire. Selon les caractéristiques d'entraînement, intensité relative, durée ou volume, les effets sur le pool mitochondrial seront différents.

La synthèse des protéines mitochondriales a été peu étudiée mais semble augmentée par l'entraînement. Elle serait davantage dépendante de l'intensité relative d'exercice. Les entraînements à intensité absolue constante, par la diminution de l'intensité relative impliquée par les adaptations, ne permettraient pas d'induire une signalisation suffisante (Granata, Jamnick et al. 2018). Une augmentation de la synthèse des protéines mitochondriales n'implique néanmoins pas une augmentation du contenu mitochondrial d'autant plus que la dégradation protéique semble également augmentée à l'entraînement (Short, Vittone et al. 2004, Pikosky, Gaine et al. 2006).

Plusieurs méthodes permettent d'étudier le contenu mitochondrial. Une méthode d'évaluation morphologique du contenu mitochondrial par microscopie électronique a été décrite. Elle

permet de mesurer la densité mitochondriale volumique (MitoVD), qui correspond au rapport entre le volume des mitochondries et le volume de la fibre musculaire. Bien que corrélée à la capacité oxydative du muscle (**Figure 26**) (Sjöström, Ångquist et al. 1982) et sensible à l'entraînement en endurance (Hoppeler, Howald et al. 1985, Montero, Cathomen et al. 2015), il existe des discordances concernant les effets de l'entraînement observés sur la MitoVD et ceux observés par l'activité de la CS (**Figure 27**) (Montero, Cathomen et al. 2015). Le contenu mitochondrial est, en effet, classiquement mesuré par l'activité de la CS (Larsen, Nielsen et al. 2012).

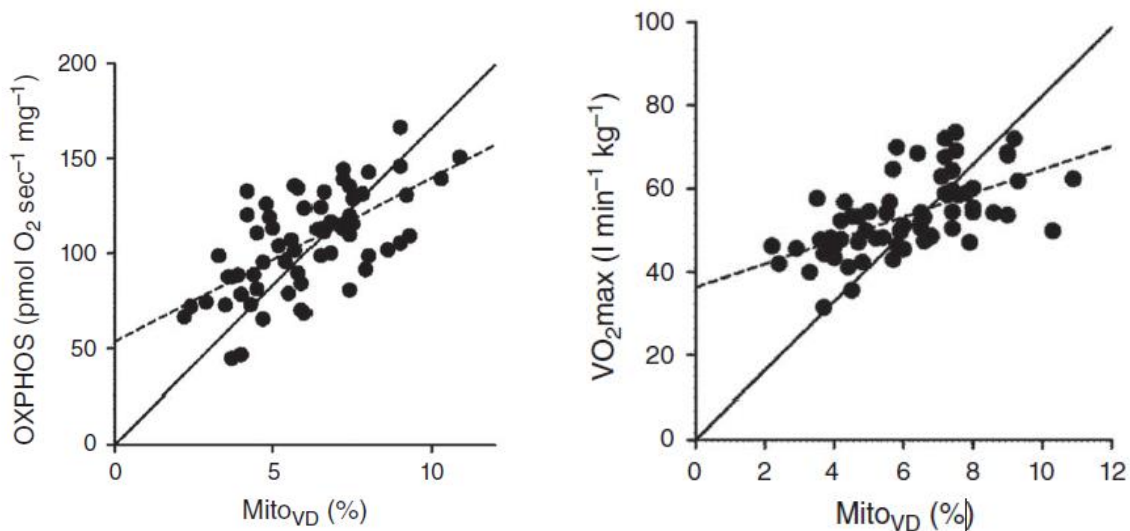


Figure 26. Relation entre densité volumique mitochondriale (MitoVD), capacité oxydative musculaire maximale (OXPHOS) (A) et débit maximal de consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$ max) (B). A : Il existe une corrélation entre MitoVD (en pourcentage du volume musculaire) et la capacité oxydative mitochondriale de fibres musculaires perméabilisées (OXPHOS (pmol O₂. sec⁻¹.mg⁻¹)). B : MitoVD est corrélée au $\dot{V}O_2$ max relatif à la masse (l.min⁻¹.kg⁻¹) (Lundby and Jacobs 2016).

L'entraînement constitue un fort stimulus de l'activité de la CS (Svedenhag, Henriksson et al. 1983, Jacobs, Esbjornsson et al. 1987, Spina, Chi et al. 1996, Jacobs, Fluck et al. 2013). Les effets sur le contenu en mitochondries semblent différer selon le type d'entraînement. En effet, l'augmentation de ce contenu semble davantage liée au volume d'entraînement qu'à l'intensité d'exercice (Svedenhag, Henriksson et al. 1983, Jacobs, Esbjornsson et al. 1987, Spina, Chi et al. 1996). Les réponses de l'activité de la CS ne sont pas observées pour des exercices supra maximaux en comparaison d'exercices à intensité plus modérée à volume de travail égal (Granata, Jamnick et al. 2018). L'activité CS est un marqueur largement reconnu de la masse mitochondriale même si l'absence de modification d'activité en réponse à l'entraînement a pu

être rapportée dans certaines études (Mogensen, Sahlin et al. 2007, Porter, Reidy et al. 2015). L'activité de la CS demeure la technique validée la plus utilisée et, en outre accessible, pour les laboratoires, pour la mesure d'un effet de l'entraînement sur la masse mitochondriale (Brown, Henriksson et al. 1989, Booth and Thomason 1991).

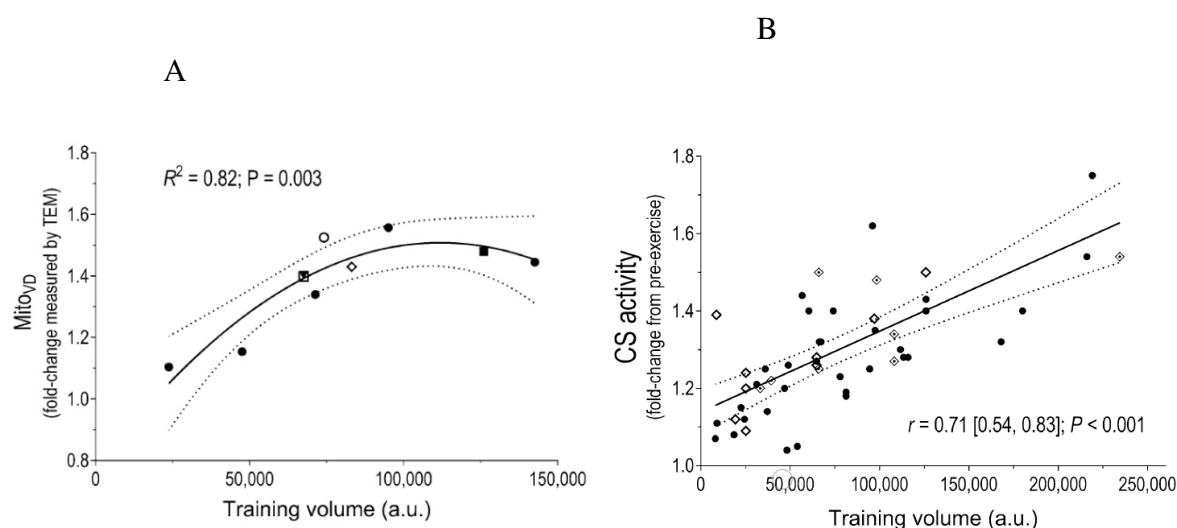


Figure 27 Discordance entre densité mitochondriale et activité de la citrate synthase, dans l'évaluation du contenu mitochondrial en réponse à l'entraînement. A : Relation entre le volume d'entraînement (intensité relative à la puissance maximale d'exercice x durée de la séance x nombre de séances) et les modifications de la densité volumique mitochondriale (Mito_{VD}) dans le vastus lateralis humain. B : Relation entre le volume d'entraînement et les modifications de l'activité Citrate Synthase induites par l'entraînement mesurée dans le vastus lateralis chez des hommes sains. (Granata, Jamnick et al. 2018).

Les réponses sur le contenu mitochondrial à l'entraînement ne peuvent pas être définies uniquement par l'évolution du contenu mitochondrial mesurée par l'activité de la CS. En effet, la réponse du contenu mitochondrial, qu'elle soit mesurée par l'activité de la CS ou Mito_{VD}, peut être dissociée de celle des capacités oxydatives mitochondriales (Jacobs, Siebenmann et al. 2012, Jacobs, Fluck et al. 2013, Montero, Cathomen et al. 2015). La mesure de la capacité respiratoire mitochondriale présente l'avantage de réaliser une évaluation fonctionnelle des capacités de phosphorylation oxydative en lien avec l'augmentation de la masse mitochondriale, sous-tendue par l'augmentation du contenu mitochondrial mais également par la fonctionnalité des mitochondries. Le niveau d'entraînement peut ainsi être caractérisé par la capacité respiratoire masse-spécifique mitochondriale (vitesse de consommation d'oxygène par les mitochondries rapportée à la masse de tissu). Plusieurs études montrent une augmentation de la capacité respiratoire mitochondriale pour une même quantité de tissu considéré (Zoll, Koulmann et al. 2003, Daussin, Zoll et al. 2008, Jacobs, Fluck et al. 2013). Cette augmentation

des capacités oxydatives nécessiterait, en outre, des intensités relatives importantes (Tonkonogi, Walsh et al. 2000, Walsh, Tonkonogi et al. 2001, Pesta, Hoppel et al. 2011) bien que le volume d'entraînement puisse néanmoins influencer. En effet, pour des entraînements de même intensité relative, une augmentation de la capacité respiratoire mitochondriale a pu être observée pour des volumes plus importants, mais néanmoins à des intensités relatives élevées (Granata, Jamnick et al. 2018). En outre, les capacités oxydatives maximales du muscle semblent corrélées aux différences interindividuelles de capacités d'endurance ($\dot{V}O_{2\max}$, $\dot{V}O_2$ au seuil ventilatoire lactique) mais également à l'augmentation de la résistance à la fatigue après un entraînement par intervalles à haute intensité (HIIT) (Figure 28) (Zoll, Sanchez et al. 2002, Jacobs, Fluck et al. 2013). Ainsi, l'intensité relative d'entraînement est un puissant déterminant des capacités oxydatives maximales mitochondriales. Cet aspect est cohérent avec les recommandations concernant l'entraînement HIIT dans l'amélioration de $\dot{V}O_{2\max}$.

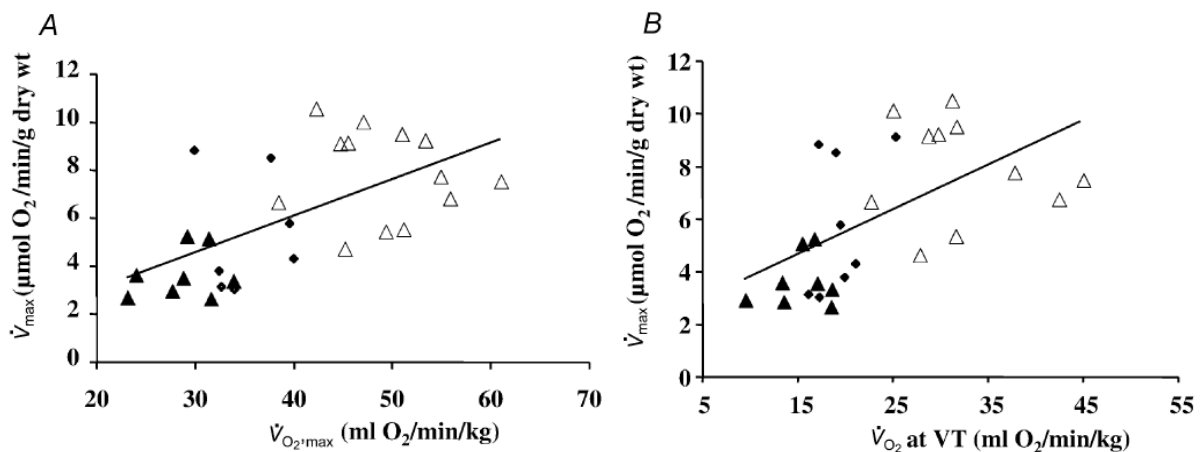


Figure 28. Relation entre capacité oxydative musculaire (\dot{V}_{\max}), débit de consommation d'oxygène à l'exercice. La respiration mitochondriale maximale (\dot{V}_{\max}) est corrélée au débit maximal de consommation d'oxygène ($\dot{V}O_{2\max}$) et au débit de consommation d'oxygène au premier seuil ventilatoire (Zoll, Sanchez et al. 2002).

Fonctionnalité mitochondriale.

Si contenu et capacité respiratoire mitochondriaux évoluent de manière parallèle, une dissociation entre ces variables est constatée dans certaines études. Les capacités oxydatives mitochondriales augmenteraient davantage que l'augmentation de contenu mitochondrial le laisserait prévoir (Montero, Cathomen et al. 2015, Granata, Oliveira et al. 2016, Granata, Oliveira et al. 2016, Meinild Lundby, Jacobs et al. 2018). Cette amélioration de la qualité des mitochondries qui pourrait se traduire par une augmentation de la respiration par unité mitochondriale, peut être mesurée par la vitesse de respiration mitochondriale spécifique (vitesse de respiration mitochondriale rapportée à un marqueur de la masse mitochondriale

comme l'activité citrate synthase). Ainsi, cette augmentation de la capacité mitochondriale spécifique est observée dans les exercices à haute intensité (Granata, Oliveira et al. 2016). Elle a également été rapportée chez les athlètes dans une comparaison avec des sujets moins entraînés (Jacobs and Lundby 2013).

Ces adaptations mitochondriales permettent d'expliquer certaines caractéristiques de la réponse physiologique à l'entraînement aérobie. La transition lipidique pourrait être en partie expliquée par l'augmentation des capacités oxydatives mitochondriales (Gollnick and Saltin 1982, Yoshida, Jain et al. 2013). L'augmentation de la masse mitochondriale diminue le stress métabolique pesant sur les mitochondries, la demande en ATP étant répartie sur un plus grand nombre de mitochondries. Le métabolisme lipidique, dont la vitesse de phosphorylation oxydative est limitante, est en capacité de fournir le débit de renouvellement d'ATP pour des intensités d'exercice plus importantes (Bergström and Hultman 1966). En outre, dans les entraînements à haute intensité type HIIT, une partie de l'augmentation de $\dot{V}O_{2max}$ semble liée à l'amélioration des capacités oxydatives mitochondriales (Jacobs, Fluck et al. 2013). En revanche, dans les exercices en endurance à intensité relative plus faible, les effets plus modestes et limités sur la chaîne respiratoire ne semblent pas corrélés à une augmentation de $\dot{V}O_{2max}$ (Montero, Cathomen et al. 2015). Dans cette dernière étude, l'amélioration de la capacité aérobie maximale semblait d'avantage reposer sur les adaptations hématologiques. Cette observation est concordante avec le fait que la capacité respiratoire mitochondriale dépasse les capacités de transport en O_2 de l'organisme. Dans ce type d'exercice modéré (50 à 65% W_{peak} , 60 min), les capacités mitochondriales, connues pour être supérieures aux capacités convectives dépendantes de l'appareil cardio-vasculaire (Boushel, Gnaiger et al. 2011), n'étaient pas limitantes pour l'utilisation de l' O_2 . En revanche, la réponse mitochondriale à l'entraînement en endurance se traduit plutôt par l'optimisation de l'utilisation des substrats lipidiques. La réponse mitochondriale s'adapte au stimulus d'entraînement. Elle repose sur une augmentation de son contenu et de sa fonctionnalité, dont l'impact sur la performance peut provenir de l'augmentation des capacités oxydatives maximales ou du débit d'utilisation des lipides

c. Biogenèse mitochondriale

L'augmentation du contenu mitochondrial, en réponse à l'entraînement, met en jeu des régulations post-traductionnelles et l'activation transcriptionnelle de gènes d'intérêt pour la synthèse protéique et la formation des mitochondries (Mahoney, Parise et al. 2005). Le

processus de biogénèse mitochondriale est complexe car il requiert un protéome produit à partir des génomes mitochondrial et nucléaire. La première étape de signalisation est initiée par diverses perturbations homéostatiques induites par la contraction. La modification du cycle calcique, le renouvellement en ATP, la production d'ERO et la consommation en O₂ vont induire l'activation des protéines kinases et phosphatases. Cette cascade d'activation aboutit à des modifications post-transcriptionnelles des protéines (Sakamoto and Goodyear 2002). Une variété de signaux physiques et métaboliques intramusculaires peut ainsi mettre en jeu différentes voies de signalisation telles AMPK, CaMKII, PKB et MAPKp38 activées par l'exercice, en fonction de l'intensité et de la durée de l'activité contractile (**Figure 29**) (Koulmann and Bigard 2006).

Table 1 Main effects of physical and metabolic signals associated with endurance exercise characterised by prolonged low-frequency muscle activity

Signal related to endurance exercise	Molecular events	References
Tonic motor nerve activity		
↗ Calcineurin activity	Nuclear translocation of NFAT	[9, 28, 60, 81]
	↗ MEF2 transcriptional activity	[130]
Changes in [Ca ²⁺] _i	↗ p38 activity	[27]
	↗ ERK1/2 activity	[77, 80, 126, 136]
	↗ PKC activity	[80]
	↗ CaMKII activity	[24]
Mechanical stress		
Dynamic exercise	↗ ERK1/2 activity	After exhaustive muscle activity [68, 125, 136]
	↗ p38 activity	Mainly in untrained muscles [136]
Static stretch or eccentric contraction	↗ JNK, ERK1/2 and p38 activities	Major changes [15, 16, 62, 68, 117, 129]
Isometric contraction	↗ ERK1/2 activity	Response to mechanical strain [7, 27, 68, 100]
Metabolic signals		
Changes in ADP to ATP ratio	↗ AMPK activity	PGC-1α gene induction [7, 38, 115]
Hypoxic stress	Physiological activation of HIF-1	Expression of hypoxia-responsive genes [4, 13, 35, 42]

Figure 29. Principaux signaux et leurs effecteurs induits par une activité musculaire prolongée (Koulmann and Bigard 2006).

Ces kinases vont modifier l'état de phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle en modifiant la stabilité des ARN. Le facteur de transcription majeur de la biogenèse induite par l'entraînement, actuellement connu et le plus étudié, est PGC-1α (**Figure 30**). Son activité régulatrice a été démontrée dans plusieurs processus métaboliques : néoglucogénèse hépatique, thermogénèse du tissu adipeux brun, différenciation des fibres musculaires et biogénèse mitochondriale dans les muscles squelettique et cardiaque (Lin, Handschin et al. 2005) Son augmentation a été mise en évidence en réponse à différents types d'exercice (Baar, Wende et al. 2002, Pilegaard, Saltin et al. 2003, Akimoto, Pohnert et al. 2005, Jorgensen, Wojtaszewski et al. 2005, Russell, Hesselink et al. 2005). Des

études par surexpression du gène PGC-1 α ont confirmé son rôle dans la résistance à la fatigue induite par un entraînement en endurance (Lin, Wu et al. 2002, Calvo, Daniels et al. 2008). PGC-1 α participe à l'acquisition de capacités aérobies accrues.

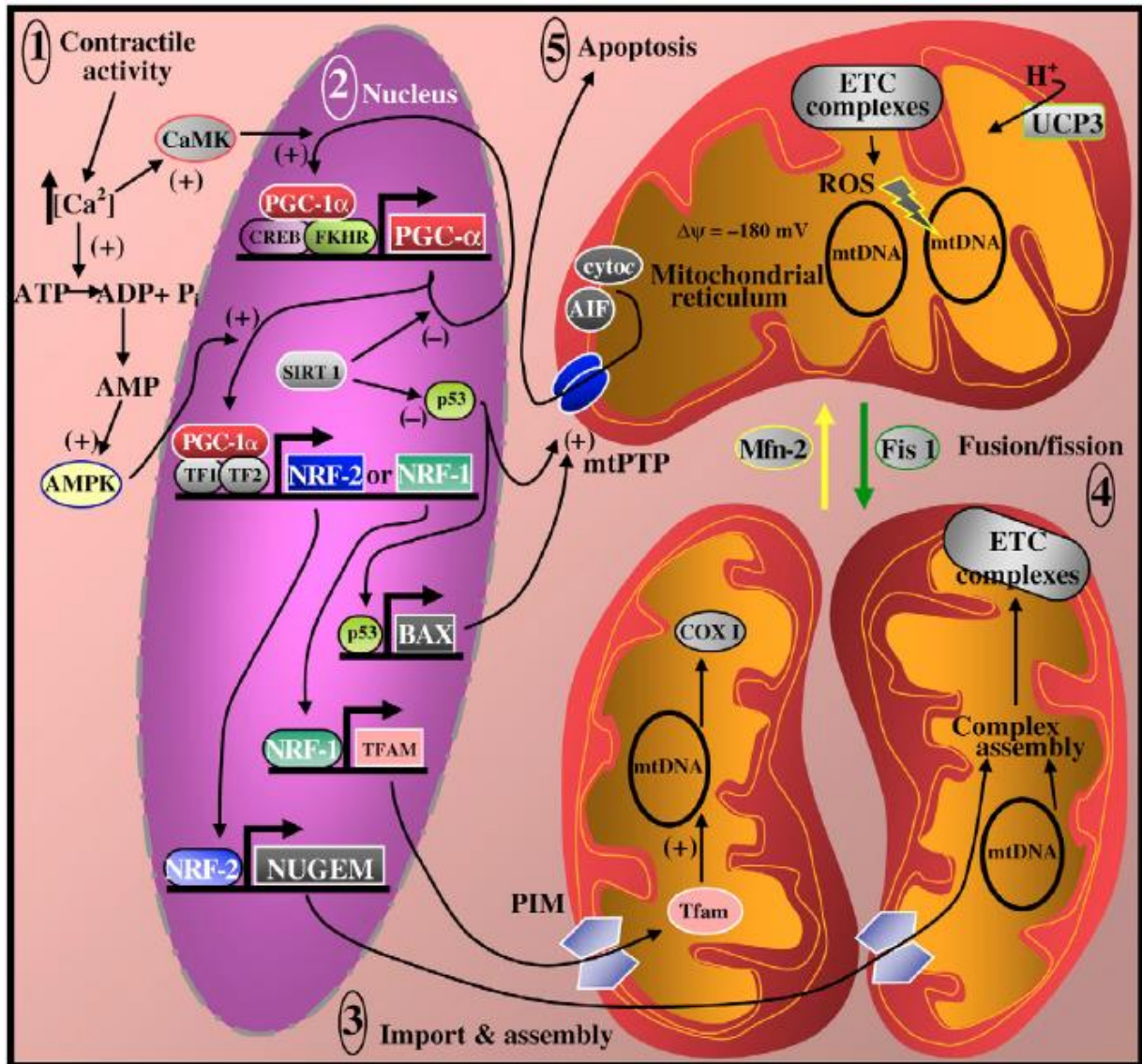


Figure 30. La biogenèse mitochondriale participe à la plasticité musculaire induite par l'exercice. L'activité contractile musculaire est associée à l'élévation du calcium intracellulaire, qui active la signalisation calcium dépendante (CaMK : calcium/calmodulin dependent protein kinase), et une augmentation du turn-over en ATP, qui entraîne l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK). Ces signaux vont stimuler la transcription en interagissant avec le facteur de transcription peroxisome proliferator activated-receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α). PGC-1 α régule l'expression de son propre gène et des facteurs de transcription (NRF-1 et 2 : nuclear respiratory factor-1 et 2) qui contrôlent la transcription de gènes codant des protéines mitochondriales (NUGEMPS : nuclear genes encoding mitochondrial proteins) et, via Tfam (mitochondrial transcription factor A) NEMPS : nuclear encoded mitochondrial proteins). Tfam régule également la synthèse des 13 protéines, dont la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase (COX I), encodées par le génome mitochondrial (mtDNA). La coordination des génomes mitochondrial et nucléaire permet d'assurer la biogenèse mitochondriale. Les processus de fusion, sous l'influence de mitofusine-2 (MFN-2), et de fission, sous l'influence de FIS-1 notamment, agissent sur la morphologie des mitochondries et le reticulum mitochondrial. Le niveau de production de ROS (espèces radicalaires de l'oxygène), lié au potentiel de membrane, peut activer le processus d'apoptose par ouverture du port de modification de perméabilité mitochondriale (Hood, Irrcher et al. 2006). La libération de cytochrome C et de facteur d'induction d'apoptose (AIF) par mtPTP déclenche l'apoptose. La production de ROS peut être réduite

par l'activité des UCP-3 (uncoupling protein-3) qui diminue le potentiel de membrane. La protéine p53, directement et par BAX, facilite le processus d'apoptose. SIRT-1 inhiberait la voie du p53. (Hood, Irrcher et al. 2006)

Ce facteur est même suffisant pour induire une biogenèse mitochondriale, comme le montrent plusieurs expériences de surexpression de PGC-1 α sur culture cellulaire ou souris (Wu, Puigserver et al. 1999, Lehman, Barger et al. 2000, Lin, Wu et al. 2002, Russell, Mansfield et al. 2004). En revanche, il n'est pas le seul facteur d'adaptation à l'entraînement en endurance même si une dysfonction de PGC-1 α induit certaines défaillances qui ne peuvent pas être compensées. Lorsque l'expression du gène PGC-1 α est inactivée, des altérations de la capacité aérobie et de la résistance à la fatigue sont observées. L'inactivation du gène se traduit par des mitochondries plus petites avec des altérations dans le contenu protéique, notamment de la chaîne respiratoire mitochondriale. La respiration mitochondriale paraît également altérée (Leone, Lehman et al. 2005). Cependant, l'inactivation de PGC-1 α n'empêche pas l'induction par l'entraînement en endurance d'une activité transcriptionnelle et d'une augmentation du contenu en protéines mitochondriales de la chaîne respiratoire mitochondriale (Leick, Wojtaszewski et al. 2008).

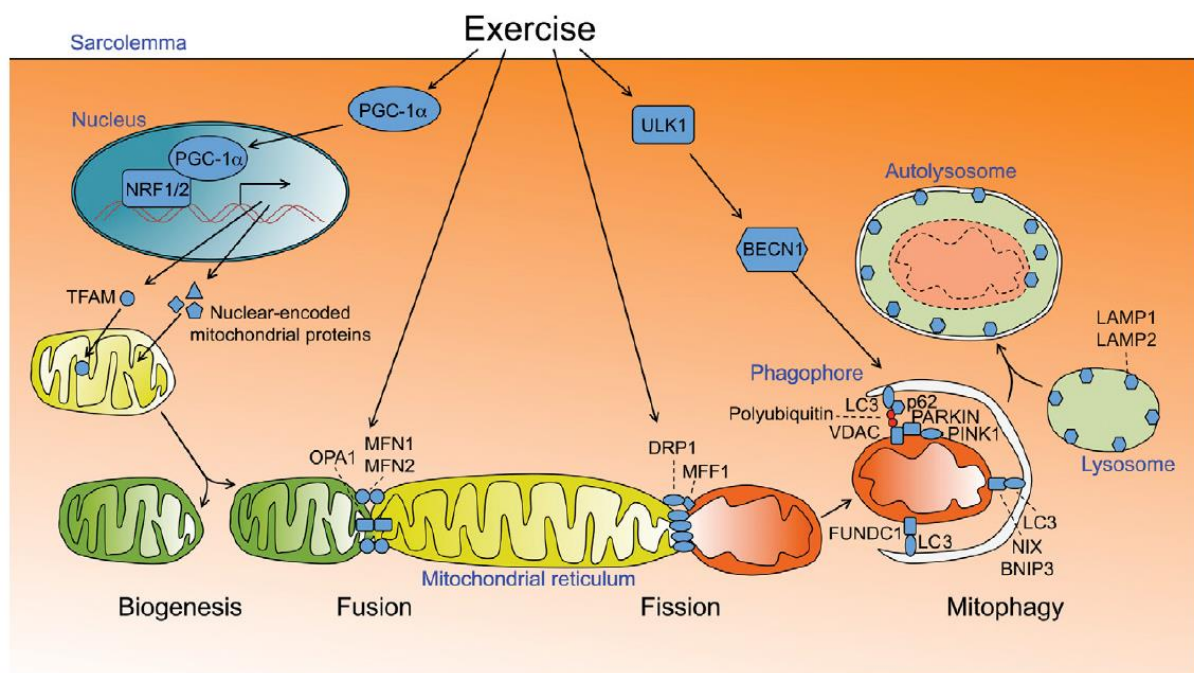


Figure 31. Activation par l'exercice du remodelage mitochondrial. L'exercice stimule la biogenèse en activant la voie PGC-1 α et l'expression des signaux d'aval (NRF1/2 et TFAM). Les nouvelles mitochondries saines (en vert) fusionneraient avec les mitochondries vieillissantes altérées (en rouge). Ces mitochondries pourraient provenir de la fission du reticulum mitochondrial. L'exercice stimulerait la fusion (OPA1, MFN 1 et 1) et la fission (DRP1 et MFF1) des mitochondries. Les mitochondries altérées, avec possiblement une altération de leur potentiel de membrane, entreraient dans le processus d'autophagie, par la mise en jeu de MAP1LC3, PINK/PARKIN/p62, NIX/BNIP3 et FUNDC1. En parallèle, l'exercice pourrait favoriser la formation du phagosome, via ULK1 et BECLIN1, qui va phagocyter la mitochondrie altérée. (Drake, Wilson et al. 2016)

d. Remodelage mitochondrial

L'entraînement en endurance pourrait améliorer la fonctionnalité mitochondriale sans augmenter le contenu en mitochondries, mais en induisant des modifications qualitatives au travers du renouvellement mitochondrial. Les processus de fusion-fission et de mitophagie permettraient d'améliorer, dans son ensemble, le reticulum mitochondrial et, individuellement, le maintien de la qualité de la mitochondrie (**Figure 31**).

L'exercice induirait une augmentation de la fusion et de la fission mitochondriale (Figures 32 et 33) (Cartoni, Leger et al. 2005, Ding, Jiang et al. 2010). La fusion correspond à la jonction entre deux mitochondries de la double membrane mitochondriale (IMM : membrane mitochondriale interne ; OMM membrane mitochondriale externe) (Karbowski, Arnoult et al. 2004). Elle met en jeu des protéines de fusion GTPases, les mitofusin 1 et 2 (MFN1, MFN2) pour OMM et *optic atrophy* (OPA1) pour IMM. La mise en jeu des MFN serait sous le contrôle de PGC-1 α (Cartoni, Leger et al. 2005, Chen, Chomyn et al. 2005). Les connaissances de ces mécanismes, *in vitro*, demandent à être confirmées. La fusion permet de réparer une mitochondrie et présuppose donc que la mitochondrie partenaire est « métaboliquement saine ». Le processus participe ainsi au contrôle de la qualité des mitochondries (Eisner, Lenaers et al. 2014). La fission correspond à la fragmentation de la mitochondrie et serait également activée par l'exercice (Pagano, Py et al. 2014). Elle fait intervenir une autre GTPase, la *dynamin-related protein* (DRP-1) qui se fixe à la mitochondrie détériorée à la suite de la dépolarisation d'OMM (Smirnova, Shurland et al. 1998, Mozdy, McCaffery et al. 2000, James, Parone et al. 2003). Déclenchée par la perte de potentiel de membrane, la fission permet à la mitochondrie de se séparer d'une partie défectueuse. Le fragment entre alors dans le processus d'autophagie. L'activation par l'exercice de ces deux mécanismes se comprend dans un processus de renouvellement afin de maintenir ou améliorer le contenu mitochondrial à la suite d'un stress métabolique. La stimulation de la fission permet d'éliminer les parties endommagées et la fusion de synthétiser de nouvelles. D'ailleurs, d'une manière générale le processus de biogenèse s'appuie sur une synthèse à partir des mitochondries existantes plutôt que d'une synthèse *de novo* (Ryan and Hoogenraad 2007). **L'entraînement induirait une augmentation des processus de fusion et une diminution de la fission, favorisant les mitochondries de plus grande taille (Figure 33)**.

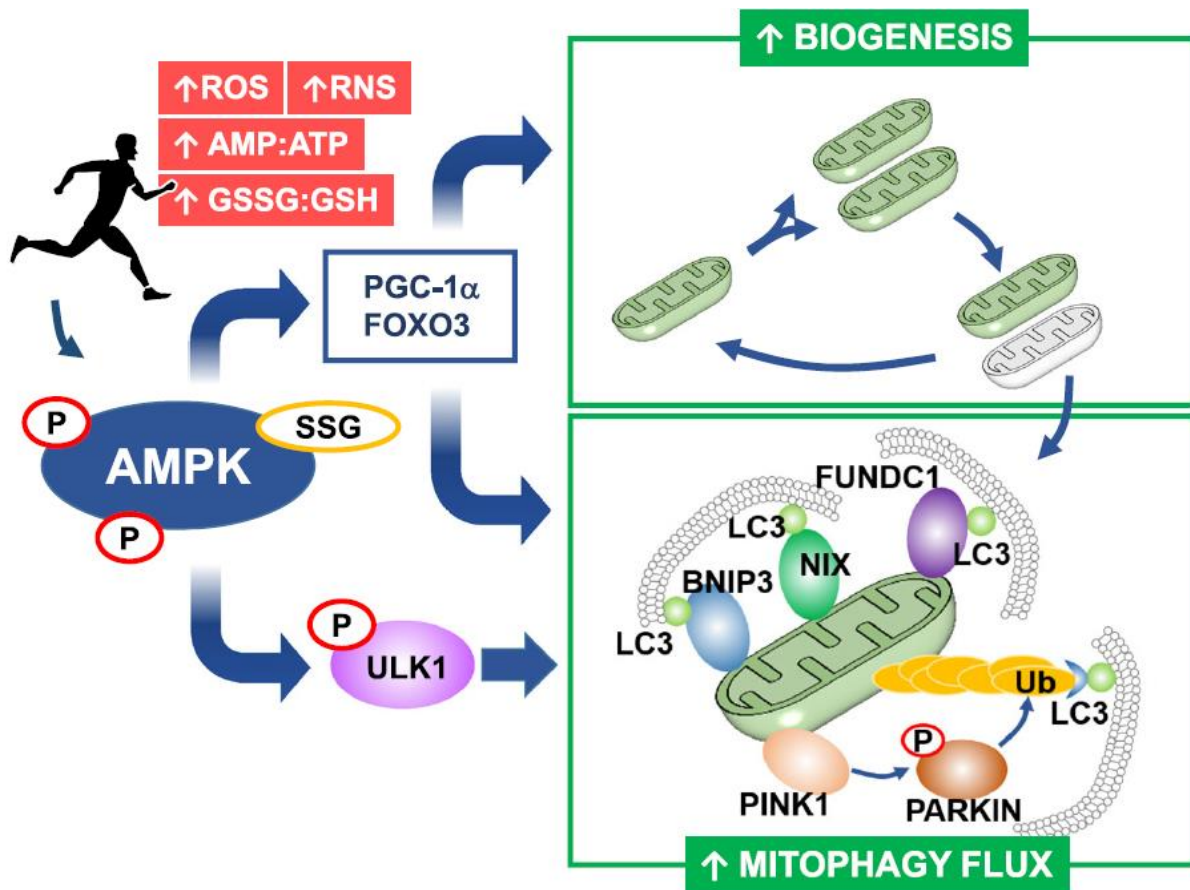


Figure 32. L'exercice stimule la mitophagie et la biogenèse mitochondriale. L'activation de l'AMPK stimulerait la biogenèse mitochondriale et le flux mitophagique. AMP : adenosine monophosphate, AMPK : 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, ATP : adenosine triphosphate, BNIP3 : BCL2 (B cell lymphoma 2)/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3, FOXO 1/3a : forkhead box O1/3a, FUNDC1 : FUN14 domain containing 1, GSSG : glutathion oxydée, GSH : glutathion réduite, LC3 : light chain 3 protein, NIX : Nip3-like protein X (NIX), NRF1 : nuclear respiratory factor 1, PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, NRF1 : nuclear respiratory factor 1, PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1, RNS : espèces radicalaires de l'azote, ROS : espèces radicalaires de l'oxygène, SIRT1 : sirtuin1, TFAM : mitochondrial transcription factor A, TFEB : transcription factor EB, ULK1 : unc-51-like autophagy activating kinase 1. P : phisphorylation, SSG : glutathionylation; Ub : ubiquitination

Les mitochondries, partiellement altérées ou entièrement défectueuses, sont détruites par autophagie. **L'exercice stimulerait le processus d'autophagie** (He, Bassik et al. 2012, Lira, Okutsu et al. 2013, Laker, Xu et al. 2014, Lo Verso, Carnio et al. 2014, Pagano, Py et al. 2014). Ce processus catabolique est appelé mitophagie lorsqu'il concerne la mitochondrie. Le ciblage des mitochondries endommagées implique la stabilisation membranaire de PINK1 (PTEN-induced putative kinase-1) La dépolarisation membranaire interrompt l'internalisation de PINK1 et sa dégradation dans la mitochondrie, en conditions basales (Jin, Lazarou et al. 2010). L'accumulation de PINK permet la fixation de PARKIN et l'ubiquitination de protéines de la mitochondrie, notamment MFN1 et 2 (Chen and Dorn 2013). Cette étape permet de faciliter la fragmentation mitochondriale et l'expression de récepteurs LIR qui vont permettre la fixation

du phagosome (Geisler, Holmstrom et al. 2010). La mitophagie implique également la formation d'un autophagosome, à la suite d'une cascade d'activation aboutissant à la formation d'un complexe ULK1/ATG13/FIP200 dont l'interaction avec AT G6 qui va permettre la formation de la membrane du phagosome (Birgisdottir, Lamark et al. 2013). L'élongation et la fermeture du phagosome autour de la mitochondrie dépend notamment d'une protéine (MAP1LC-3) qui est également impliquée dans la fixation du phagosome à la mitochondrie (Hosokawa, Hara et al. 2009). Le phagosome fusionne ensuite avec un lysosome, aboutissant à la destruction du contenu (Yu and Long 2015). **L'entraînement permettrait d'améliorer la qualité des mitochondries en stimulant la mitophagie** via l'inhibition de mTORC1 par AMPK (Egan, Shackelford et al. 2011). Les effets de l'exercice, unique ou répété, sur les processus autophagiques demeurent mal connus. L'exercice aigu diminuerait la protéine PARKIN et l'entraînement augmenterait la transcription de PINK, ce qui irait dans le sens d'une augmentation de l'autophagie (consommation de PARKIN et augmentation des stocks de PINK). Plus globalement, les effets de l'entraînement sur les mécanismes d'autophagie se caractériseraient par une augmentation de l'autophagie basale (clairance mitochondriale élevée) et des capacités d'autophagie, améliorant le flux autophagique en cas de stress. L'expression de gènes en relation avec l'autophagie ainsi que des marqueurs du flux autophagique en lui-même (augmentation de MAP1LC3 par exemple) semblent en effet augmentés. Cet effet de l'entraînement serait médié par PGC-1 α (Lira, Okutsu et al. 2013).

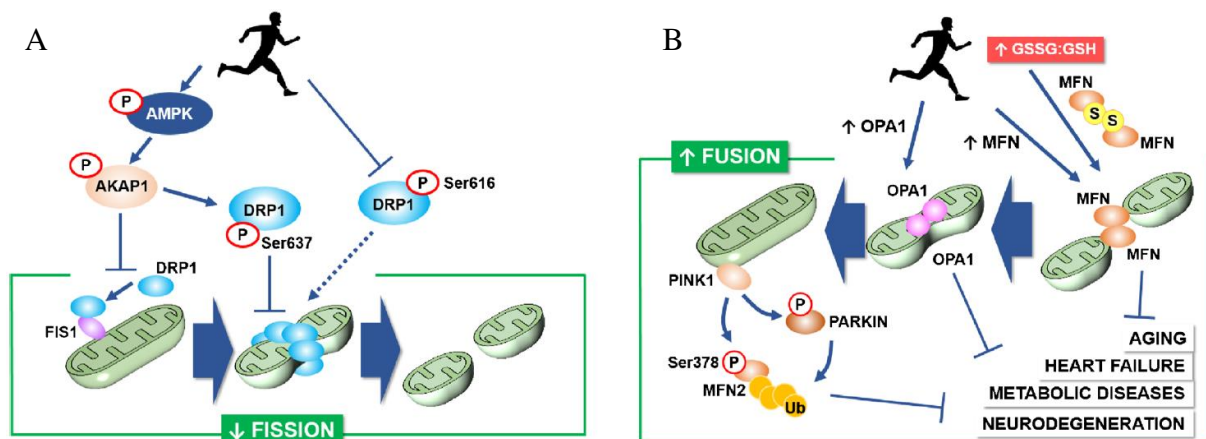


Figure 33. L'entraînement inhibe la fission et stimule la fusion des mitochondries. L'exercice induit des modifications post-traductionnelles qui modèleraient l'activité de DRP1, MFN 1 et 2 et OPA1 et, par conséquent, les processus de fusion et fission. A : L'exercice influence le profil de phosphorylation de DRP1 induisant une inhibition de la fission (phosphorylation de ser637 et déphosphorylation de ser616). L'activation d'AKAP1 inhibe l'interaction entre DRP1 et FIS1. B l'exercice induit une augmentation des niveaux de protéines de fusion MFN 1 et 2 et OPA1. L'exercice génère la production de glutathion oxydée (GSSG) qui favorise l'action des MFN. Enfin, la stabilisation de PINK induit une phosphorylation de MFN2. AKAP1 : A kinase anchor protein 1, DRP1 : Dynamin-related protein 1, FIS 1: fission 1, MFN: mitofusin, OPA 1: optic atrophy 1

In fine ces mécanismes, qui permettent d'accélérer le renouvellement mitochondrial, sont un moyen de contrôler les qualités mitochondriales mais peut-être aussi d'augmenter la plasticité mitochondriale à l'exercice. Il semble que l'accélération de la mitophagie, induite par l'entraînement, améliorerait l'efficacité mitochondriale (Lo Verso, Carnio et al. 2014). Cela permet également d'optimiser le réticulum mitochondrial (Vollestad and Blom 1985). Un intérêt de ce réseau est d'optimiser la circulation de l'énergie au sein de la cellule. La fusion favoriserait le couplage électrique par une coopération entre les mitochondries situées dans les zones riches en O₂ et celles plus reculées, améliorant ainsi l'équilibre global du potentiel membranaire du réseau (Janssen, Heymsfield et al. 2000, Youle and Van Der Blik 2012).

Le remplacement des protéines ou mitochondries altérées pourraient ainsi améliorer la qualité des mitochondries et, subséquemment leur fonction, sans augmenter le contenu protéique ou mitochondrial. Plusieurs observations peuvent étayer cette hypothèse (Mai, Muster et al. 2012). La composition protéique de la membrane mitochondriale pourrait être modifiée, comme c'est d'ailleurs observé à la chaleur. Ainsi, la modification de la forme des crêtes mitochondriales participerait à la stabilité de l'intégrité de la CRM, favorisant une meilleure efficacité du transfert d'électrons (Cogliati, Frezza et al. 2013, Cogliati, Enriquez et al. 2016). La question d'un effet de l'entraînement sur l'ultrastructure des crêtes mitochondriales et son implication sur le couplage demeurent en suspens.

e. Plasticité mitochondriale

La plasticité mitochondriale ne repose pas uniquement sur le contenu enzymatique et la densité.

L'entraînement aérobie permet d'améliorer l'efficacité respiratoire mitochondriale, qui est notamment évaluée par le RCR, qui exprime le rapport entre la capacité respiratoire maximale de OXPHOS (état 3) et la capacité respiratoire minimale résiduelle liée à la fuite de protons (état 4). Plusieurs études montrent que ce ratio est augmenté sous l'effet de l'entraînement (Tonkonogi, Walsh et al. 2000, Zoll, Sanchez et al. 2002, Pesta, Hoppel et al. 2011).

De plus, il semble que l'entraînement altère différemment l'oxydation mitochondriale selon le substrat utilisé, au travers de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi un entraînement en endurance comprenant des séances de HIIT induirait une amélioration de la capacité d'oxydation des acides gras (Pesta and Gnaiger 2012, Jacobs, Fluck et al. 2013, Montero, Cathomen et al. 2015). En effet, l'accroissement de la densité mitochondriale s'est accompagné d'une augmentation plus importante de la capacité de la chaîne de transfert d'électrons pour

l'oxydation des lipides, dépendante des flavoprotéines (ETF : *electron transfer flavoprotein*), que de la capacité de la chaîne de transfert d'électron complète (du Complexe I au Complexe V)(Pesta, Hoppel et al. 2011). L'entraînement aérobie peut ainsi induire une augmentation des capacités d'oxydation des lipides, en lien avec une adaptation qualitative mitochondriale, comme le confirment d'autres études (Jacobs, Fluck et al. 2013, Montero, Cathomen et al. 2015). De plus, cette augmentation de la vitesse d'oxydation des AG est associée à une augmentation de la phosphorylation oxydative. Comme le montre Pesta, via le calcul du RCR pour l'octanoyl-carnitine, la phosphorylation oxydative (reflétée par l'état 3) a davantage augmenté (91%) que la respiration liée à la fuite de protons résiduelle (état 4). Ainsi, lorsque cette respiration mitochondriale est rapportée au contenu mitochondrial (activité de la CS par exemple), Pesta observe que le couplage de la phosphorylation oxydative à l'activité de la CRM est augmenté par l'entraînement, pour l'oxydation de l'acide gras. L'augmentation des capacités oxydatives des acides gras, reposant sur ETF, se traduit donc par une augmentation de la phosphorylation de l'ADP (Pesta, Hoppel et al. 2011). Au total, plusieurs adaptations qualitatives peuvent concourir à améliorer la fonctionnalité mitochondriale et participer à une plasticité substrat-spécifique. Outre une adaptation sélective de certains complexes de CRM, l'efficacité mitochondriale peut s'observer avec une variation du couplage pour un substrat donné.

Cependant, si l'efficacité mitochondriale semble augmenter à l'entraînement et se traduire par une optimisation de l'oxydation des lipides, les observations des effets de l'entraînement sur le couplage mitochondrial de l'oxydation des lipides, demeurent contradictoires. Il semble assez bien établi qu'un découplage de la respiration mitochondriale puisse être induit par les acides gras (Skulachev 1991, Wojtczak and Schonfeld 1993, Skulachev 1998). Il n'est pas clairement établi, en revanche, si le découplage induit par l'entraînement provient d'une altération accrue de l'efficacité des mitochondries ou d'un effet additif du découplage inhérent à l'augmentation du contenu mitochondrial. Dans l'étude de Pesta, l'augmentation du découplage alléguée à l'entraînement n'est plus retrouvée lorsque les vitesses de respiration sont corrigées par le contenu mitochondrial. La respiration mitochondriale spécifique, liée au découplage, diminue même, amenant les auteurs à conclure en une amélioration du couplage (Pesta, Hoppel et al. 2011). Cette observation sur fibres perméabilisées est cohérente avec les résultats d'une étude ultérieure de Zoladz (Zoladz 2016) et qui retrouvait également une amélioration du couplage en pyruvate et en succinate sur mitochondrie isolée et de fait indépendant de la masse mitochondriale. D'autres études, en revanche, suggèrent une augmentation du découplage

mitochondrial aux acides gras (Tonkonogi, Walsh et al. 2000, Befroy, Petersen et al. 2008, Pesta, Hoppel et al. 2011). Contrairement aux travaux de Pesta, Tonkonogi montre que l'entraînement augmente la sensibilité du découplage mitochondrial aux lipides. Dans cette étude, la respiration liée à la fuite de protons, rapportée au contenu mitochondrial, augmentait après entraînement (Tonkonogi, Krook et al. 2000). De même Befroy & al (Befroy et al. 2008) montrent que l'oxydation mitochondriale au repos était augmentée dans les muscles de sujets entraînés par rapport à des sédentaires, alors que la synthèse d'ATP n'était pas augmentée. Ce découplage a été mis en évidence *in vivo* par des techniques d'imagerie à résonance magnétique couplée à l'injection de traceurs marqués. La vitesse d'oxydation était évaluée à partir de la vitesse de fonctionnement du cycle de Krebs (par le débit d'inclusion d'acétate marqué VTCA) et rapportée à la vitesse de phosphorylation de l'ATP (incorporation de P marqué VATP). La diminution du rapport VATP/VTCA, bien qu'étant une mesure indirecte, suggère une augmentation du découplage de OXPHOS, en condition de repos. Néanmoins, l'expérimentation de Befroy est une des seules études réalisées *in vivo* sur la fonctionnalité mitochondriale, alors que les études *in vitro* évaluent les capacités minimales et maximales de fonctionnement mitochondrial avec des concentrations en substrats supra-physiologiques. Il semble que l'augmentation du découplage de la phosphorylation oxydative soit une conséquence de l'entraînement en endurance et participe même à ses effets bénéfiques.

L'augmentation du découplage de l'oxydation des acides gras serait une réponse physiologique de l'entraînement dont le rôle demeure encore mal connu. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées. L'augmentation du métabolisme basal permettrait, par un couplage plus rapide, de faciliter l'adaptation du métabolisme oxydatif lipidique aux demandes en ATP. Le découplage augmenté de l'oxydation des AG utiliserait davantage le gradient de protons et donc préviendrait la production d'ERO en diminuant le potentiel de membrane. Certaines observations en ce sens, ne montreraient pas d'augmentation des capacités antioxydantes à la suite d'un entraînement malgré l'augmentation des capacités aérobies (Tonkonogi, Walsh et al. 2000). Le découplage serait également impliqué dans l'amélioration de l'insulino-sensibilité induite par l'entraînement (Phielix, Meex et al. 2012).

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer ce découplage. Les UCP pourraient être un mécanisme de régulation du métabolisme lipidique et énergétique. Dans des situations de disponibilité accrue en acides gras, telles que l'exercice ou l'entraînement, une augmentation de transcription des UCP a été mise en évidence (Weigle, Selfridge et al. 1998, Schrauwen, Hoppeler et al. 2001, Schrauwen, Hesselink et al. 2002). De plus, il a été montré que les acides

gras pouvaient induire un découplage de la phosphorylation oxydative médié par UCP. En outre, dans la même étude, il apparaissait que la diminution du stress oxydatif observé avec les acides gras, faisait intervenir un découplage médié par les UCP (Jarmuszkiewicz, Woyda-Ploszczyca et al. 2015). Néanmoins, l'implication des UCP dans le découplage aux AG n'est pas retrouvée dans toutes les études (Tonkonogi, Krook et al. 2000), d'autant plus que le lien entre UCP et entraînement reste à confirmer, la transcription UCP pouvant être induite ou le contenu protéique diminué selon l'étude considérée (Pilegaard, Ordway et al. 2000, Schrauwen, Saris et al. 2001).

L'effet de l'entraînement sur le découplage pourrait également être médié par l'échangeur mitochondrial ATP/ADP (ANT1) dont le contenu est augmenté de manière importante par l'entraînement (Fernstrom, Tonkonogi et al. 2004). Il a été observé que cette protéine pouvait également transporter les acides gras à travers la membrane mitochondriale (Andreyev, Bondareva et al. 1989, Skulachev 1991). Ainsi, l'ANT1 serait impliquée dans les processus de fuite de protons et de découplage induit par les AG (Simonyan and Skulachev 1998, Brand 2005, Brand, Pakay et al. 2005). Sparks a notamment montré une augmentation du découplage aux AG liée à l'entraînement (entraîné vs sédentaire), corrélée à l'activité de ANT1. En outre, les auteurs reliaient cet effet découplant à l'effet insulino-sensibilisant de l'entraînement (Sparks, Gemmink et al. 2016).

Les effets métaboliques de l'entraînement pourraient également être médiés par une amélioration du transport des acides gras. Plusieurs études démontrent une augmentation de l'expression de transporteurs notamment CPT1 et CD36. L'entraînement en endurance s'est accompagné d'une augmentation de l'expression de CD36 et CPT1A que la biogenèse seule ne peut expliquer. L'entraînement a induit une augmentation des capacités de transport en acides gras, en parallèle de la biogenèse. (Zoladz, Koziel et al. 2017).

Au total, des modifications qualitatives mitochondriales semblent donc supporter l'hypothèse d'un effet de l'entraînement ciblant particulièrement l'oxydation des lipides. L'amélioration des capacités oxydatives globales et du contenu mitochondrial participent à l'augmentation des capacités oxydatives des lipides. Cependant une sensibilité différente des complexes de la CRM et un découplage aux AG induit par l'entraînement pourrait participer aussi à une facilitation de l'oxydation des lipides au regard des glucides.

OBJECTIFS

La réponse de la balance glucido-lipidique à la chaleur, lors d'une exposition unique ou après acclimatation à la chaleur, est essentiellement envisagée, dans la littérature, du point de vue de l'utilisation des glucides. Si l'exposition aiguë à la chaleur induit une augmentation de l'utilisation des glucides, l'utilisation moindre des lipides, en miroir, qui ne paraît pas provenir d'une diminution de leur disponibilité, interroge sur le rôle éventuel d'une altération de l'oxydation des lipides. L'exposition aiguë à la chaleur pourrait induire un stress oxydatif et des altérations mitochondriales diminuant l'efficacité mitochondriale, dont il est logique de déduire que le métabolisme lipidique, plus complexe, puisse être prioritairement impacté. Les études *in vivo* ne permettent pas d'identifier une altération du métabolisme lipidique et les études *ex vivo* ont essentiellement été réalisées en condition standard à 22°C ou n'étaient pas conçues pour l'évaluation de l'oxydation des lipides.

D'autre part, si l'acclimatation à la chaleur permet de diminuer la dépendance du métabolisme énergétique aux glucides, le rôle des adaptations mitochondriales et leurs conséquences éventuelles sur une amélioration de l'oxydation des lipides n'ont pas été étudiés. Pourtant, il semble que l'entraînement en endurance et l'acclimatation à la chaleur induisent certaines réponses adaptatives similaires. L'acclimatation à la chaleur pourrait avoir un effet sur la biogenèse mitochondriale et le remodelage des mitochondries, avec un retentissement sur l'efficacité mitochondriale. Malgré le rôle majeur des lipides dans la fourniture d'énergie au cours de l'exercice prolongé, les effets de l'exposition à la chaleur sur l'oxydation des lipides demeurent peu étudiés.

Nous formulons l'hypothèse que lors de l'exposition aiguë à la chaleur, l'augmentation de l'utilisation des glucides serait au moins en partie liée à une altération de l'oxydation des lipides. De plus, l'acclimatation à la chaleur, tout comme l'entraînement en endurance, serait de nature à restaurer le niveau d'oxydation des lipides. Nous avons donc proposé un travail articulé en deux axes principaux d'étude pour répondre à cette hypothèse.

Objectif 1 : L'élévation de la température altère-t-elle de manière différenciée l'oxydation des substrats glucidiques et lipidiques par la mitochondrie ?

Nous nous sommes proposés d'étudier les effets de la chaleur sur la fonctionnalité mitochondriale au travers de trois objectifs secondaires.

Existe-t-il une altération de la respiration mitochondriale spécifique pour l'oxydation des acides gras à la chaleur, en comparaison de l'oxydation des glucides ?

L'exposition aiguë à la chaleur induit une transition du métabolisme énergétique à l'exercice vers l'utilisation des glucides aux dépens des lipides. Elle induirait également une augmentation de la concentration systémique des acides gras. De plus il n'existe pas d'argument pour une limitation de l'entrée des acides gras dans la fibre musculaire. Ainsi, la disponibilité en substrats lipidiques ne paraît pas limitante pour le métabolisme mitochondrial. Notre hypothèse est que l'exposition aiguë à la chaleur pourrait induire une altération de l'efficacité mitochondriale pour l'oxydation des lipides en particulier. Nous nous sommes proposés d'étudier, par une technique de respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées, l'effet de la température sur l'oxydation mitochondriale du pyruvate et du palmitoyl-CoA, deux substrats physiologiques représentatifs de la voie glucidique et lipidique.

L'altération de l'efficacité mitochondriale pour l'oxydation des lipides, induite par l'exposition aiguë à la chaleur, met-elle en jeu un découplage mitochondrial médié par les UCP ?

L'altération spécifique de l'oxydation des acides gras induite par l'exposition aiguë à la chaleur pourrait provenir d'un découplage de la phosphorylation oxydative. Parmi les hypothèses pouvant expliquer une telle altération, l'étude du rôle des *uncoupling proteins* (UCP), du fait de leur implication dans les situations de disponibilité accrue aux acides gras et de leur rôle putatif dans la régulation du métabolisme énergétique et la protection contre la lipotoxicité, nous a paru pertinente. Nous avons opté pour une approche originale du rôle de ces UCP en couplant les mesures de respiration mitochondriale à un inhibiteur des UCP, le GTP (guanosine triphosphate), permettant une analyse fonctionnelle de ce découplage.

L'altération de l'efficacité mitochondriale est-elle corrélée à la production d'un stress oxydatif induit par l'exposition aiguë à la chaleur ?

La réalité d'un stress oxydatif et d'altérations mitochondriales lors d'une exposition à des températures élevées physiologiques demeure controversée. L'originalité de cette approche a été de mesurer par spectrométrie la production d'espèces radicalaires de l'oxygène dans des conditions similaires en température et en substrat à celles retrouvées en respiration mitochondriale.

Objectif 2 : L'acclimatation à la chaleur induit-elle des réponses synergiques sur les adaptations mitochondriales induites par l'entraînement ?

Nous avons émis l'hypothèse que l'acclimatation à la chaleur pourrait potentialiser les adaptations mitochondriales induites par l'entraînement, sur la biogenèse et/ou sur les capacités d'oxydation des acides gras. Nous avons étudié les effets séparés et combinés d'une acclimatation à la chaleur et d'un entraînement en endurance sur les adaptations métaboliques et mitochondriales au sein d'un muscle squelettique oxydatif lent (*soleus*) de rats.

L'acclimatation à la chaleur permet-elle de favoriser les réponses mitochondriales induites par un entraînement aérobic sur l'oxydation des acides gras et des glucides ?

Certaines études ont montré que l'acclimatation à la chaleur avait des effets sur la fonction mitochondriale qui pourraient favoriser l'utilisation des lipides. Si les effets de l'entraînement sur la capacité d'oxydation des lipides sont bien connus, en revanche, les effets de l'exposition répétée ou prolongée à la chaleur n'ont été envisagés que du point de vue de l'utilisation des glucides. Comme montré précédemment, les effets de la chaleur pourraient affecter le couplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale différemment selon le substrat utilisé. Ainsi, parmi les réponses liées à l'entraînement en endurance, l'augmentation des capacités d'oxydation et de découplage pour les acides gras pose la question des conséquences de l'interaction avec une exposition répétée à la chaleur sur le métabolisme oxydatif des acides gras. Nous nous sommes proposés de comparer les effets séparés et combinés d'une exposition répétée à la chaleur et d'un entraînement aérobic sur la fonctionnalité mitochondriale. Nous avons comparé les capacités de respiration et le couplage pour l'oxydation d'un substrat glucidique et d'un substrat lipidique dans des muscles extraits d'animaux de quatre groupes (témoins, acclimatés à la chaleur, entraînés, acclimatés et entraînés), afin de mettre en évidence une éventuelle potentialisation des effets de l'entraînement par l'acclimatation à la chaleur sur les capacités oxydatives mitochondriales.

Les effets de l'acclimatation à la chaleur et leur interaction avec les effets d'un entraînement aérobic sont-ils sous-tendus par des mécanismes impliquant un remodelage mitochondrial et une adaptation du phénotype métabolique musculaire?

L'entraînement en endurance est connu pour induire une augmentation du contenu mitochondrial, voire des modifications qualitatives de nature à améliorer l'efficacité

mitochondriale, permettant d'augmenter les capacités oxydatives musculaires. Les processus de remodelage mitochondrial pourraient également constituer une cible des effets de l'acclimatation à la chaleur. L'acclimatation à la chaleur pourrait induire des réponses mitochondriales caractérisées par une augmentation de la biogenèse mitochondriale et des modifications de la chaîne respiratoire mitochondriale. En outre, des adaptations cellulaires permettent d'augmenter la résistance à la chaleur (thermotolérance) et pourraient préserver la fonctionnalité mitochondriale à la chaleur. Ainsi les réponses mitochondriales induites par l'acclimatation à la chaleur pourraient induire des adaptations similaires à un entraînement en endurance et donc se traduire par des améliorations de l'endurance à l'effort. L'exposition prolongée à la chaleur pourrait potentialiser les effets d'un entraînement en endurance sur le métabolisme oxydatif. Nous proposons donc d'étudier, en parallèle de la fonctionnalité mitochondriale, la plasticité musculaire et mitochondriale à ce double conditionnement (acclimatation à la chaleur et entraînement aérobie). Nous avons comparé le contenu protéique en différents acteurs impliqués dans les métabolismes glucidique et lipidique, la respiration mitochondriale et le renouvellement des mitochondries, afin de préciser les mécanismes sous-jacents des réponses mitochondriales à l'acclimatation, et identifier d'éventuels mécanismes d'action synergique entre entraînement en endurance et acclimatation à la chaleur.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. Méthode d'exploration commune aux deux études

1. Principes de la mesure de la respiration mitochondriale

a. Généralités

L'oxygraphie est une technique de mesure de la quantité d'oxygène dissous en milieux gazeux ou liquide. Elle permet d'évaluer la respiration cellulaire et peut être réalisée sur mitochondries isolées, culture cellulaire ou tissu.

L'oxygène dissous peut être mesurée par trois méthodes différentes : chimique, optique ou électrochimique.

La méthode chimique utilise le caractère réactif de l'oxygène. Une succession de réactions produit de l'iode, dosable avec précision. C'est la méthode de référence pour valider les mesures des sondes. Les mesures en continu ne sont pas possibles avec cette méthode.

La méthode optique utilise le phénomène de fluorescence. Sous l'effet d'une diode, les molécules d'oxygène ou une molécule fluorescente (photophore) sont excitées par des photons. La désexcitation de l'oxygène va libérer des photons rouges et entraîner une fluorescence proportionnelle à la concentration en oxygène dissous. Dans le cas du photophore, ce dernier cède les photons à l'oxygène. La fluorescence sera alors inversement proportionnelle à la concentration en O_2 (phénomène d'extinction). Ce type d'appareil ne nécessite pas de calibration et est indépendant de la salinité et de la température du milieu.

La méthode électrochimique utilisant la conversion en signal électrique de la teneur en O_2 via une électrode (polarographie) est la méthode utilisée dans notre travail.

b. Mesure par polarographie : Electrode Clark

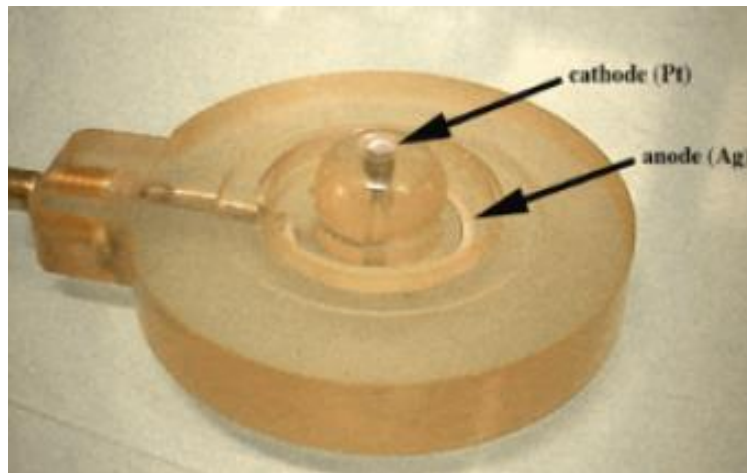
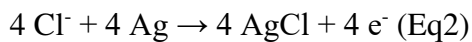
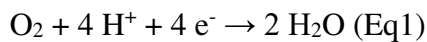


Figure 34. Electrode de Clark.

Cette électrode (Figure 34) mise au point par le Pr. Leland CLARK en 1953, est constituée d'une cathode de platine et d'une anode circulaire en argent, entre lesquelles circule un courant de 0,7 V. Elle utilise le potentiel d'oxydoréduction de l'O₂/H₂O ($\varepsilon = 0,81$ V). L'oxygène dissous est ionisé au niveau de la cathode (réaction 1) alors que l'anode en argent est oxydée.



L'oxygène est réduit en eau en captant les électrons émis à l'anode. Le courant créé par la circulation d'électrons entre les deux électrodes est proportionnel à la concentration en oxygène. L'électrode, dans le bain d'électrolytes, est séparée du milieu de mesure par une membrane perméable à l'O₂ mais imperméable à l'eau. La mesure dépend de la vitesse de diffusion de l'O₂ à travers la membrane. Cette électrode permet de mesurer en continu la concentration d'oxygène dissous. Elle présente l'inconvénient de consommer de l'oxygène, nécessitant de maintenir une agitation afin de générer un courant d'eau.

Afin de garantir une température d'expérimentation stable, l'échantillon est placé dans un puits entouré d'une double paroi permettant la circulation d'eau maintenue à température constante. Enfin, le puits doit pouvoir être fermé avec un bouchon afin de limiter les échanges de gaz entre l'échantillon et l'atmosphère. Un orifice étroit est souvent aménagé dans le bouchon afin de permettre l'injection de drogue(s) sans nécessiter l'ouverture de la cuve réactionnelle.

c. Intérêts de la mesure de la respiration sur tissus perméabilisés.

La mesure de la respiration mitochondriale permet une évaluation physiologique de la fonction mitochondriale (**Figure 35**). Contrairement aux mesures des activités d'enzymes de la matrice (citrate synthase) ou de la chaîne respiratoire (complexes) mitochondriales, cette approche permet d'évaluer l'interaction entre les complexes de la chaîne. Cette technique permet de mesurer la respiration de mitochondries intactes, isolées ou au sein de cellules perméabilisées telles que les fibres musculaires. Les techniques de respiration sur mitochondries isolées permettent de n'étudier que la réponse mitochondriale et présente des avantages certains à ce titre. Cependant, la perméabilisation de la membrane plasmique présente également des avantages. La mitochondrie interagit avec son environnement cellulaire. Le contrôle du flux oxydatif semble notamment dépendant d'interactions avec le cytosquelette ou de la mise en jeu de navettes liées la compartimentation comme la CK (Kay, Nicolay et al. 2000, Kunz, Kudin et al. 2000). La préservation de l'organite dans son environnement cellulaire garantit les interactions avec le cytosquelette, le noyau (important puisque la synthèse de la plupart des protéines mitochondriales en dépend), le réticulum endoplasmique et les systèmes de transfert d'énergie. D'ailleurs, le flux mitochondrial montre des propriétés différentes selon la préparation de mitochondries isolées ou l'utilisation de tissu perméabilisé, concernant l'affinité pour l'ADP ou le comportement du complexe IV notamment. De plus, la technique de perméabilisation permet d'étudier la population mitochondriale d'un tissu, indépendamment des différences de morphologie ou de qualité des mitochondries, contrairement à la technique d'isolement des mitochondries qui peut détériorer les mitochondries les plus fragiles mais également induire un biais en sélectionnant une certaine sous-population mitochondriale par rapport à une autre, par l'étape de centrifugation. Enfin, la respiration sur tissu perméabilisé nécessite moins de matériel biologique, les mitochondries proviennent d'un même tissu homogène quand les techniques d'isolement requièrent des quantités importantes de cellules ($> 200 \cdot 10^6$) ou de tissu (500 mg) conduisant à rassembler les mitochondries de tissus différents (par exemple de différents types de muscles). De plus, cette moindre taille d'échantillon rend possible d'étudier *ex vivo* des tissus issus de biopsie, y compris chez l'Homme.

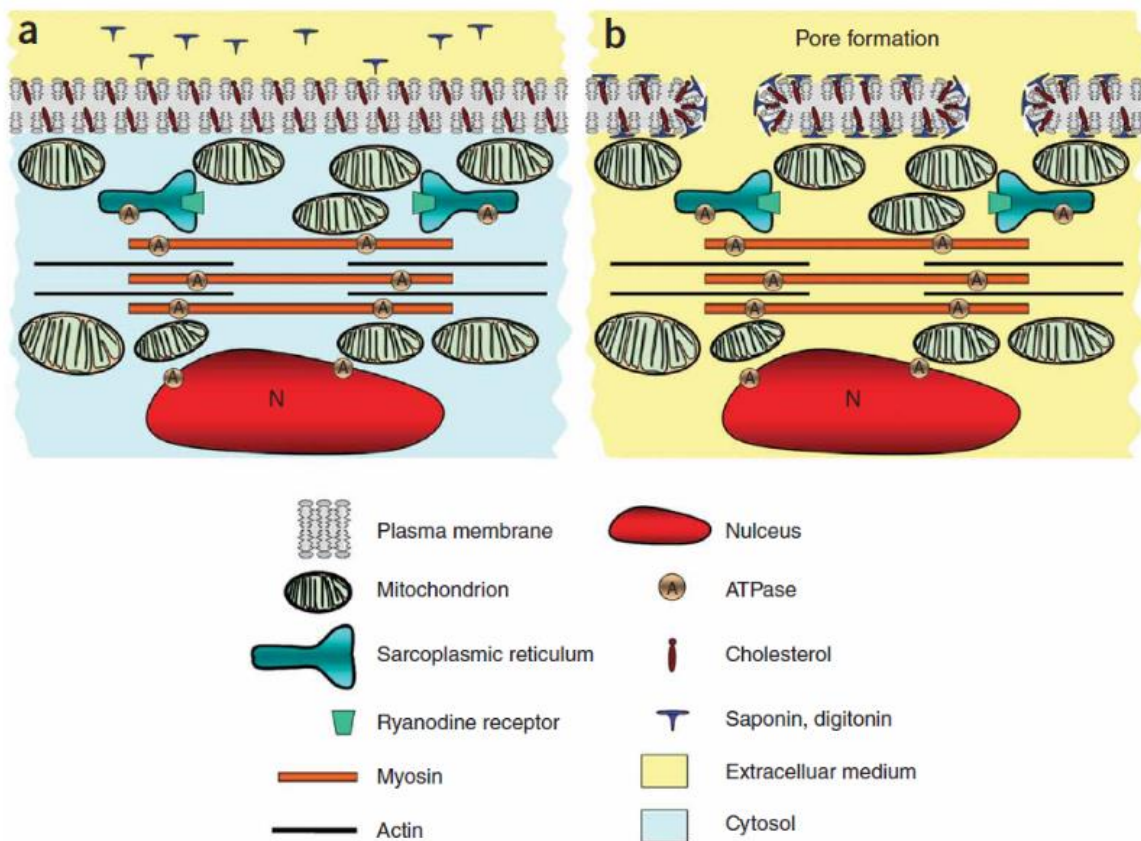


Figure 35. Principe de la perméabilisation. La cellule est représentée avant (a) et après (b) perméabilisation de la membrane plasmique. Le traitement utilise un agent chimique, tel que la saponine, capable de former des complexes avec le cholestérol, composant très abondant de la membrane plasmique. L'interaction avec le cholestérol induit une perte d'intégrité (perméabilisation) du sarcolemme. Le cytosol est vidé de ses éléments solubles. Un équilibre s'établit entre l'espace intracellulaire et le milieu environnant. Le contenu en cholestérol des organites et des membranes intracellulaires (telles que celles composant la mitochondrie) est moindre. A la concentration utilisée, seules les membranes cellulaires sont perméabilisées, permettant l'étude de la fonction mitochondriale au sein de son environnement d'organites.

2. L'exploration de la chaîne respiratoire mitochondriale

a. Validation de la mesure

Avant de débuter les mesures, une première étape de validation de la qualité des tissus perméabilisés est indiquée. Elle peut être réalisée par :

- Un test de qualité du couplage de la phosphorylation oxydative : un échantillon de bonne qualité présente un *respiratory control ratio* (RCR, rapport de la respiration sans et avec concentration saturante en ADP) suffisant (entre 6 et 10 selon le tissu utilisé).
- Un test au cytochrome C : cette protéine est faiblement intégrée à la membrane interne mitochondriale. L'ajout de cytochrome-C est donc sans effet si la membrane externe est intacte. En revanche, en cas de détérioration de cette dernière, la libération de cytochrome-C induit une diminution de la respiration mitochondriale. L'ajout de

concentration saturante de cytochrome-C permet de stimuler la respiration (restauration).

- Par le test de la créatine, uniquement utilisable pour les muscles oxydatifs : en effet, les muscles oxydatifs ont une affinité faible pour l'ADP en l'absence de navette créatine. Comme évoqué précédemment, la créatine-kinase, dans sa forme mitochondriale (mi-CK) joue un rôle important dans la phosphorylation oxydative, via son implication avec la translocation ADP/ATP. Elle peut être altérée dans différentes situations (pathologies, stress oxydatif ou nitré). Ce test évalue la réponse respiratoire mitochondriale à l'ajout de créatine.

b. Exemple de protocole classique utilisé pour explorer la respiration mitochondriale

Le protocole SUIIT (*substrate inhibitor titration*) permet une analyse fonctionnelle séquentielle des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, dont l'ordre des étapes doit être respecté s'il est prévu d'évaluer la fonctionnalité de chaque complexe (**Figure 36**) :

- Activité du complexe I : activé par glutamate/malate/ADP.
- Activité du complexe II : stimulé par le succinate après inhibition du complexe I par la roténone (évite le flux reverse d'électrons du complexe II vers le complexe I)
- Activité du complexe IV : après inhibition du complexe II par l'antimycine A, le complexe est activé par TMPD (N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) et ascorbate.

Pour évaluer les capacités de respiration mitochondriale en fonction des substrats, l'oxygraphie peut également mesurer la vitesse d'oxydation en différents états de respiration :

- $\dot{V}O$ traduit la respiration mitochondriale basale, non couplée à la phosphorylation. Elle permet d'évaluer la respiration résiduelle mitochondriale. Cet état est parfois défini comme celui de la chaîne de transfert d'électrons. Elle correspond à la fuite d'électrons, reflet de la qualité de la membrane mitochondriale ou de l'activité de protéines découplantes par exemple. Cette vitesse est mesurée en excès de substrats réducteurs mais en absence d'ADP ou en présence d'un excès de substrats et ADP associé à un inhibiteur du complexe V (Oligomycine) ou de l'ANT-1 (Atractyloside).
- V_{max} correspond à la respiration maximale mitochondriale pour le substrat considéré. Elle reflète la capacité maximale respiratoire mitochondriale (consommation en O_2 due aux fuites de protons et à l'oxydation des substrats couplée à la phosphorylation). Elle est obtenue en excès de substrats et d'ADP.
- *Respiratory control ratio* ($\dot{V}O_{max}/\dot{V}O$) traduit le niveau de couplage de la phosphorylation oxydative, reflet de l'efficacité mitochondriale. Par exemple, le RCR diminue si la part de découplage augmente ($\dot{V}O$ élevée)

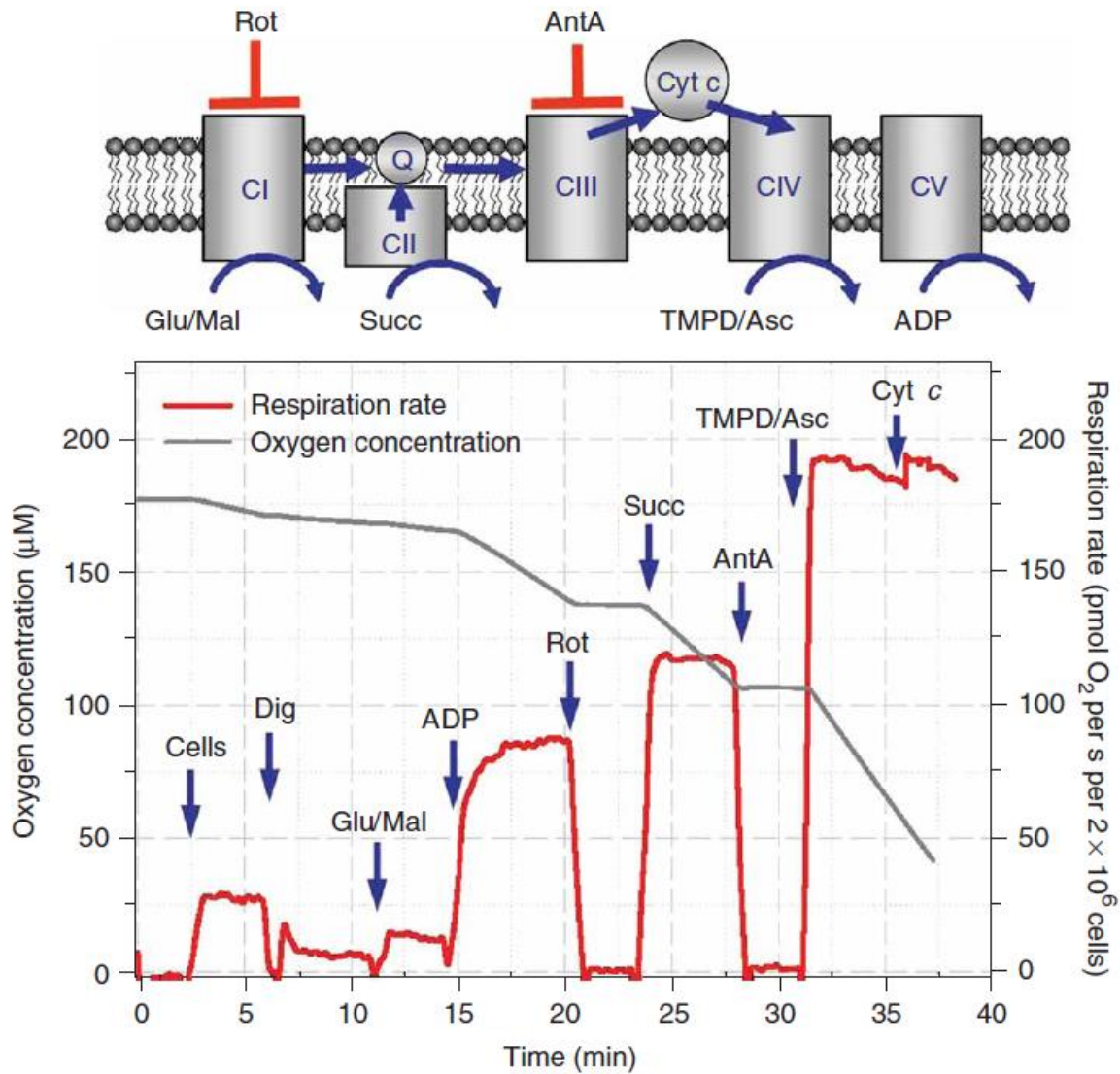


Figure 36. Exemple d'exploration de la chaîne respiratoire mitochondriale par un protocole SUI. Une analyse séquentielle des différents complexes de la chaîne respiratoire (CRM) est réalisée par étape. En haut, est reproduit le schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale, comportant les complexes I (CI, NDAH/CoQ oxidoreductase), II (CII, succinate/CoQ oxidoreductase), III (CIII, CoQH2/cytochrome C oxidoreductase), IV (CIV, cytochrome C oxidase) et V (CV, ATP synthase). Les inhibiteurs sont utilisés pour CI (rotenone, Rot) et CII (antimycine A, AntA). Les substrats réducteurs utilisés pour fournir les électrons à la CRM sont : glutamate + malate (Glu/Mal), le succinate (Succ), N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride/ cytochrome C + ascorbate (TMPD/ascorbate). La capacité de respiration maximale est obtenue après ajout d'ADP à concentration saturante (2mM). En bas, est représenté le tracé-type d'oxygraphie pour des cellules perméabilisées. (densité 2,106 cellules/ml. Ajouts : Dig, digitonine 15 µg.ml⁻¹ ; Glu/Mal, 10 mM glutamate + 5 mM malate; ADP, 1 mM ADP; Rot, 0.5 µM rotenone; Succ, 10 mM succinate; AntA, 5 µM antimycin A; TMPD/Asc, 0.5 mM TMPD + 2 mM ascorbate; Cyt c, 10 µM cytochrome c.

II. Etude 1

1. Protocole expérimental de l'étude

Nous avons émis l'hypothèse d'un effet de la chaleur différentié sur la respiration mitochondriale, selon le substrat utilisé, glucidique ou lipidique. Nous avons comparé l'effet de deux températures physiologiques (35°C, température d'un muscle au repos en neutralité thermique et 40°C, température d'un muscle exposé passivement à la chaleur) sur l'utilisation de deux substrats, l'un représentatif de la voie glucidique, le pyruvate, et l'autre de la voie lipidique, le palmitoyl-CoA, par la mitochondrie. Dix-huit rats mâles Wistar sont utilisés dans cette étude. Les mesures de respiration mitochondriale sont réalisées sur les muscles *soleus* de dix animaux. Les mesures de stress oxydatif et d'activité enzymatique sont faites sur les muscles soléaires des huit autres rats. La méthode de sacrifice choisie devait permettre d'obtenir des tissus les plus frais possibles. Nous avons opté pour une euthanasie chimique par pentobarbital (150 mg.kg⁻¹), cette molécule n'interférant pas avec le métabolisme énergétique.

a. Mesure de la respiration mitochondriale

Les mesures sont réalisées sur fibres perméabilisées de *soleus*, à deux températures d'exposition en parallèle (35°C et 40°C). La préparation des fibres débute par une étape de dissection sous loupe binoculaire. Le tissu conjonctif est retiré et les fibres prudemment séparées à la pince pour respecter leur intégrité tout en facilitant l'accès des substrats ultérieurement. L'étape de perméabilisation suivante consiste à faire tremper les fibres disséquées dans une solution de saponine à 50 µg.ml⁻¹ pendant 30 min puis à les rincer pendant 15 min. L'ensemble de ces étapes est réalisé à 4°C, en solution S ([Annexe 1](#)).

Avant les mesures de respiration, les fibres sont, de nouveau, rincées trois fois pendant 5 min mais cette fois dans la solution R ([Annexe 1](#)), ne contenant aucune source d'énergie et éliminant de la fibre les autres substrats énergétiques endogènes, tels que l'ADP ou la créatine phosphate (PCr). Un petit nombre de fibres est placé dans le puits d'un oxygraphe contenant 1,5 ml de solution R sous agitation continue. Les conditions de respiration sont optimisées pour chaque substrat : 2 mg / ml de BSA (albumine de serum bovin) et 4 mM de malate sont ajoutés pour les mesures d'oxydation du pyruvate ([Tableau 1A](#)), tandis que 6 mg / ml de BSA, 0,5 mM de malate et 2 mM de carnitine sont ajoutés pour les mesures d'oxydation du PCoA ([Tableau 1B](#)). Pour les mesures d'oxydation du PCoA, cette concentration de BSA résulte en un rapport AG / albumine 5, empêchant ainsi tout effet détersif des acides gras.

Tableau 1. Protocoles d'ajout de substrats utilisés pour les mesures de la respiration mitochondriale de l'étude 1. A : Pyruvate, B : PCoA

A

Réactifs	Ajout (µL)	Pyruvate		Vmax Pyr calculée sur la pente la plus élevée
		Chambres 1 et 2 Concentration (µM)	Chambre 3 Concentration (µM)	
GTP 191mM	78,5	-	10000	
Malate 750mM	8	4000	4000	
ADP 500mM	6	2000	2000	
Pyruvate 25mM	3	50	50	
Pyruvate 25mM	3	100	100	
Pyruvate 50mM	4,5	250	250	
Pyruvate 50mM	7,5	500	500	
Pyruvate 250mM	1,5	750	750	
Pyruvate 250mM	1,5	1000	1000	
Pyruvate 250mM	3	1500	1500	
Pyruvate 250mM	3	2000	2000	
Cytochrome-C 5mM*	3	10	-	
Atractylozide 50mM	5,1	170	170	V0 Pyr

* Ajout dans une seule chambre

B

Réactifs	Ajout (µL)	PCoA		Vmax PCoA calculée sur la pente la plus élevée
		Chambres 1 et 2 Concentration (µM)	Chambre 3 Concentration (µM)	
GTP 191mM	78,5	-	10000	
Malate 750mM	1	500	500	
Carnitine 1mM	3	2000	2000	
ADP 500mM	6	2000	2000	
Palmitoyl-CoA 15mM	1	10	10	
Palmitoyl-CoA 15mM	1,5	25	25	
Palmitoyl-CoA 15mM	5	75	75	
Palmitoyl-CoA 15mM	7,5	150	150	
Palmitoyl-CoA 15mM	15	300	300	
Palmitoyl-CoA 15mM	10	400	400	
Cytochrome-C* 5mM	3	10	-	
Atractylozide 50mM	5,1	170	170	V0PCoA

* Ajout dans une seule chambre

La concentration de malate était différente pour le pyruvate et le PCOA. En effet, le malate est nécessaire pour contrôler le flux d'acétyl-CoA et fournir des intermédiaires du cycle de Krebs. Pour la voie glucidique, une concentration optimale en malate (4mM) assure la disponibilité en oxaloacétate (issu du malate), empêchant l'inhibition du cycle par l'accumulation d'acétyl-

CoA. Le malate est également nécessaire au fonctionnement des transporteurs de dicarboxylates (DIC), essentiels pour la fourniture d'intermédiaires du cycle de Krebs tels que le citrate, et au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Pour la voie lipidique, le moindre ajout de malate se justifie par la double origine des équivalents réducteurs (NDAH + H⁺ et FADH₂) finalement oxydés dans la chaîne respiratoire (CRM). Un NADH + H⁺ et un FADH₂ sont fournis par la β-oxydation. Ainsi, il a été montré que la respiration due à la β-oxydation compte pour 2/3 de la respiration due à l'oxydation des acides gras (van Eunen, Simons et al. 2013). Ainsi, la moindre contribution du cycle de Krebs dans l'oxydation des lipides implique une moindre utilisation de malate que l'oxydation du pyruvate. La concentration en malate doit être suffisante pour éviter l'accumulation d'acétyl-CoA par inhibition du cycle de Krebs. En revanche une accumulation de malate inhibe le cycle de Krebs. Une accumulation de fumarate est induite par la concentration élevée de malate. L'accumulation de fumarate inhibe à son tour l'activité de la succinate déshydrogénase et entraîne une accumulation d'acétyl-CoA par blocage du cycle des acides tricarboxyliques. Une concentration trop élevée de malate entraîne une inhibition de la β-oxydation au niveau de la thiolase par l'accumulation d'acétyl-CoA. Dans une étude méthodologique, une concentration de 0,5 mM paraissait optimale pour l'oxydation des AG (Lanza and Nair 2009, Salabei, Gibb et al. 2014, Ojuka, Andrew et al. 2016). L'ajout de carnitine est nécessaire pour permettre le transport intra-mitochondrial des acides gras par la CPT. Le stock de carnitine cytosolique est dilué dans le milieu de respiration en raison de la perméabilisation membranaire.

b. Protocoles utilisés

Après une période de stabilisation, l'ADP était ajouté en concentration non limitante (2 mM).

Protocoles en fonction du substrat

La consommation en O₂ en réponse à l'augmentation de la concentration en Pyr ou PCoA était mesurée. La pente négative maximale de la courbe de respiration pendant cette phase correspondait à la respiration maximale pour le pyruvate (Pyr- \dot{V} max) ou le PCoA (PCoA- \dot{V} max). La respiration en condition non-phosphorylante était obtenue après ajout d'atractyloside, un inhibiteur de la translocase ADP/ATP (ANT-1), pour chaque substrat (PCoA- \dot{V} 0 et Pyr- \dot{V} 0). Les mesures étaient réalisées en duplicate pour chaque substrat et aux deux températures en parallèle. Les valeurs de respiration étaient rapportées à la masse sèche de fibres et exprimées en mol O₂.min⁻¹.g⁻¹. Les protocoles pour chaque substrat sont rappelés dans le **Tableau 1**.

Mesure du Km

L'affinité des mitochondries pour le substrat est évaluée par la constante de Michaelis (Km), qui correspond à la concentration en substrat pour laquelle la moitié de la consommation maximale en O₂ est observée. La mesure de la consommation en O₂ des mitochondries en réponse à une titration de la concentration en substrats permet de modéliser une courbe reflétant l'affinité mitochondriale pour le substrat considéré. Le Km est estimé à partir de cette modélisation.

Evaluation du couplage mitochondrial

Le RCR permet de caractériser l'efficacité de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Il a été calculé pour chaque substrat (Pyr-RCR et PCoA-RCR). Le GTP, connu pour inhiber la fuite de protons liée à la protéine découplante UCP3, a été utilisé pour préciser un mécanisme potentiel de découplage mitochondrial. Une mesure était réalisée en présence de GTP dans une troisième chambre, pour chaque condition de substrat et de température.

Validation de la qualité des mitochondries.

Un ajout de cytochrome-C était réalisé dans une des chambres pour valider la préservation de l'intégrité mitochondriale.

c. Les autres mesures

Les activités enzymatiques

Les dosages ont été réalisés sur des prélèvements de *soleus*, réalisés sur des prélèvements conservés à -80°C. Les activités enzymatiques étaient exprimées en μmoles par minute et rapportées à la masse de tissu (UI par gramme de tissu frais).

L'activité de la citrate synthase (CS).

L'originalité de notre approche a été de la mesurer aux deux températures (35°C et 40°C) utilisées en oxygraphie. Elle était utilisée, dans notre étude, afin d'identifier une éventuelle participation du cycle de Krebs aux effets de la chaleur observés sur la respiration mitochondriale. Une variation de son activité pourrait sous-tendre une partie des modifications de la respiration mitochondriale, par effet Q10 par exemple. Le protocole d'extraction des échantillons est rappelé en [Annexe 2](#). La méthodologie de mesure de l'activité de la citrate synthase, par spectrophotométrie, est en [Annexe 3](#) (Srere 1969).

L'activité de la 3-hydroxyl acyl coenzyme A déshydrogénase

La 3-HAD (3-hydroxyl acyl coenzyme A déshydrogénase) est une enzyme-clé de la β -oxydation. L'activité a été mesurée aux deux températures (35°C et 40°C) afin d'identifier une participation éventuelle de la β -oxydation dans les effets de la chaleur observés sur l'oxydation des acides gras. Les protocoles d'extraction et de mesures de l'activité sont rappelés dans les annexes ([Annexe 4](#) et [5](#)) (Seidemann 1973).

La production d'espèces radicalaires de l'oxygène

Le stress oxydatif a été étudié par le dosage de la concentration en H_2O_2 . L'approche originale a consisté à mesurer la survenue d'un stress oxydatif dans des conditions expérimentales similaires à celles de la respiration mitochondriale (2 mM pyruvate + 4 mM malate + 2 mg/ml BSA pour Pyr et avec 400 mM PCoA + 0.5 mM malate + 2 mM carnitine + 6 mg/ml BSA pour PCoA). De plus, nous avons optimisé la mesure de la production des ERO en ajoutant de la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD), enzyme catalysant la transformation de l'anion superoxyde en H_2O_2 , comme décrit par Kikusato. Le protocole, à partir de la méthode décrite par Anderson et Neuffer (Anderson and Neuffer 2006), est rappelé en [Annexe 6](#).

2. Article

RESEARCH ARTICLE

The effect of a physiological increase in temperature on mitochondrial fatty acid oxidation in rat myofibers

 Pierre-Emmanuel Tardo-Dino,^{1,2,3} Julianne Touron,¹ Stéphane Baugé,¹ Stéphanie Bourdon,¹ Nathalie Koulmann,^{1,2,3} and Alexandra Malgoyre¹

¹Unité de Physiologie de l'Exercice et des Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge, France; ²Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France; and ³EDISS 205, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

Submitted 20 July 2018; accepted in final form 25 May 2019

Tardo-Dino PE, Touron J, Baugé S, Bourdon S, Koulmann N, Malgoyre A. The effect of a physiological increase in temperature on mitochondrial fatty acid oxidation in rat myofibers. *J Appl Physiol* 127: 312–319, 2019. First published May 30, 2019; doi:10.1152/jappphysiol.00652.2018.—We investigated the effect of temperature increase on mitochondrial fatty acid (FA) and carbohydrate oxidation in the slow-oxidative skeletal muscles (soleus) of rats. We measured mitochondrial respiration at 35°C and 40°C with the physiological substrates pyruvate + 4 mM malate (Pyr) and palmitoyl-CoA (PCoA) + 0.5 mM malate + 2 mM carnitine in permeabilized myofibers under nonphosphorylating (\dot{V}_0) or phosphorylating (\dot{V}_{\max}) conditions. Mitochondrial efficiency was calculated by the respiratory control ratio ($\text{RCR} = \dot{V}_{\max}/\dot{V}_0$). We used guanosine triphosphate (GTP), an inhibitor of uncoupling protein (UCP), to study the mechanisms responsible for alterations of mitochondrial efficiency. We measured hydrogen peroxide (H_2O_2) production under nonphosphorylating and phosphorylating conditions at both temperatures and substrates. We studied citrate synthase (CS) and 3-hydroxyl acyl coenzyme A dehydrogenase (3-HAD) activities at both temperatures. Elevating the temperature from 35°C to 40°C increased PCoA- \dot{V}_0 and decreased PCoA-RCR, corresponding to the uncoupling of oxidative phosphorylation (OXPHOS). GTP blocked the heat-induced increase of PCoA- \dot{V}_0 . Raising temperature moved toward a Pyr- \dot{V}_0 increase, without significance. Heat did not alter H_2O_2 production, resulting from either PCoA or Pyr oxidation. Heat induced an increase in 3-HAD but not in CS activities. In conclusion, heat induced OXPHOS uncoupling for PCoA oxidation, which was at least partially mediated by UCP and independent of oxidative stress. The classically described heat-induced glucose shift may actually be mostly due to a less efficient FA oxidation. These findings raise questions concerning the consequences of heat-induced alterations in mitochondrial efficiency of FA metabolism on thermoregulation.

NEW & NOTEWORTHY Ex vivo exposure of skeletal myofibers to heat uncouples substrate oxidation from ADP phosphorylation, decreasing the efficiency of mitochondria to produce ATP. This heat effect alters fatty acids (FAs) more than carbohydrate oxidation. Alteration of FA oxidation involves uncoupling proteins without inducing oxidative stress. This alteration in lipid metabolism may underlie the preferential use of carbohydrates in the heat and could decrease aerobic endurance.

Address for reprint requests and other correspondence: P.-E. Tardo-Dino, Unité de Physiologie de l'Exercice et des Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge, France BP73, 91223 Brétigny-sur-Orge Cedex, France (e-mail: peirba@gmail.com).

fatty acid; heat; mitochondrial uncoupling; oxidative stress; skeletal muscle

INTRODUCTION

The performance of endurance activities can be altered when realized in the heat, largely due to increased core temperature and dehydration. Nevertheless, the energy supply can also be involved. In a well-fed state, it relies on mitochondrial oxidative phosphorylation of carbohydrates and lipids (14). The contribution of carbohydrates and lipids to energy production, depending on exercise intensity, has been modeled by Brooks and Mercier (4). This balance of glucidic-lipidic utilization during exercise can be shifted under certain conditions. Thus, endurance training is well known to increase fatty acid utilization for the same intensity of exercise.

Environmental factors can also alter this balance. Studies have shown that heat can increase energy dependence on carbohydrate (CHO) metabolism. Indeed, acute heat exposure has been shown to increase intramuscular glycogen utilization (7–9, 40) and the respiratory exchange ratio (8, 10). Both phenomena support systemic glucose dependence during exercise in the heat. A comparison of the heating of one leg and cooling of the contralateral leg showed that glycogen content decreased more in the warmed leg during the same exercise (40). Thus, local temperature had an influence per se on muscle substrate utilization. Until now, this was considered to be due to an increase in CHO metabolism at the expense of lipid oxidation. More recently, circulating free FA levels were shown to increase during exercise at high versus neutral temperatures (24). Thus, heat may specifically alter lipid metabolism, and this limitation would appear to be an increased reliance on CHO.

Moreover, the efficiency of substrate oxidation may also be involved, as the energy supply relies on oxidative phosphorylation (OXPHOS) by mitochondria. Indeed, functional or even morphological alterations of mitochondria due to heat have been suggested in the literature. The oxidation of substrates produces a protonmotive gradient, normally coupled to the phosphorylation of ADP into ATP. Indeed, a decrease in the ATP/O ratio has been observed for skeletal muscle and cardiomyocyte respiration when the temperature was increased ex vivo (3, 12, 42) or in vivo (32). Thus, heat may decrease the mitochondrial efficiency of ATP production and induce uncou-

pling of oxidation from phosphorylation. Such uncoupling may involve uncoupling proteins (UCPs), members of the anion carrier protein family located in the inner mitochondrial membrane. Nevertheless, the effect of heat stress upon uncoupling and UCPs is still unclear. Mujahid et al. (22) reported that UCP gene transcripts were downregulated in skeletal muscles of birds exposed to acute heat, whereas Jarmuszkiwicz et al. (12) suggested an increase of UCP-mediated uncoupling at high temperature.

The UCP3 isoform is particularly expressed in skeletal muscle (2), where it may control the regulation of lipids as fuel substrates. Thus, UCP3 mRNA levels increase in situations in which FA availability is high, such as exercise (34), training (38), high-fat diet (35), or fasting (41). In metabolic disease, UCP3 may be a way to protect mitochondria against fatty acid (FA) toxicity, resulting in additional oxidative stress, when the FA supply does not match the oxidation rate (5). The addition of FA has been shown to induce uncoupling of OXPHOS in isolated mitochondria (37, 43), and this FA-induced increase of uncoupling may be mediated by UCP (12).

Surprisingly, the effect of heat on lipid oxidation has been little studied, despite the publication of a small number of studies, suggesting that the complexes of the respiratory chain are differentially thermosensitive (6, 30). We hypothesized that mitochondrial respiration may be differently altered by heat for FAs and CHO. We addressed this issue and compared the effect of heat on CHO and lipid metabolism by studying pyruvate (Pyr) and palmitoyl-CoA (PCoA) oxidation through the measurement of mitochondrial respiration *in situ*, at 35°C (control temperature of resting skeletal muscle in a neutral thermic environment) and 40°C (physiological muscle temperature passively exposed to heat).

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design. This study was performed in accordance with both the Helsinki Declaration concerning the treatment of laboratory animals and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe no.129, Strasbourg, France, 1985). It was approved by the Institute's Animal Ethics Committee. We used 18 male Wistar rats (between mean body weight: 291.3 ± 10.3 g) obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Ten were used for oxygraphy, eight were used for enzymology and oxidative stress assessment. All animals were housed in individual cages in an artificial 12:12-h light-dark cycle. After quarantine, rats were euthanized by intraperitoneal injection of a lethal dose of pentobarbital sodium (150 mg/kg).

Both solei were excised immediately after respiratory arrest of the animals, but before cardiac arrest. Muscles were maintained in Solution S (see below for composition) for assessing mitochondrial respiration and reactive oxygen species (ROS) production and frozen in liquid nitrogen for later enzymatic activity measurements.

Measurement of *in situ* mitochondrial respiration. The procedure is shown in Fig. 1. Measurements were simultaneously performed at 35°C and 40°C in thermostatically controlled chambers. For each rat, respiration measurements were performed on the pool of permeabilized fibers from both solei.

For one substrate, measurements were performed simultaneously in duplicate in two chambers except for the GTP-containing condition, which was performed once in a third chamber. The mean values of respiration rates and the respiratory control ratio (RCR) were calculated for each condition and animal.

Mitochondrial respiration was studied *in situ* using a Clarke-electrode (Hansatech Oxygraphy Instruments, Norfolk, UK), as previously described (17). Freshly taken muscles were stored, and the fibers were separated, under a binocular microscope in solution S (see below for composition) at 4°C. Fibers were then permeabilized in solution S with saponin (50 µg/ml) for 30 min and then stored 15 min in solution S, always at 4°C. Before respiration measurements, some fibers were rinsed three times for 5 min in solution R (see below for composition), containing no energy source and washing out any remaining endogen energetic substrates, such as ADP or creatine phosphate (PCr). A small number of fibers were placed in the well of an oxygraph containing 1.5 ml solution R with continuous stirring. Respiration conditions were optimized for each substrate to obtain the maximal oxidation rate (18, 20, 33): 2 mg/ml BSA and 4 mM malate were added for pyruvate (Pyr + malate) oxidation measurements, whereas 6 mg/ml BSA, 0.5 mM malate, and 2 mM carnitine were added for PCoA (PCoA + malate + carnitine) oxidation measurements. For the PCoA oxidative measurements, this BSA concentration resulted in a FA/albumin ratio <5, thus preventing any detergent effects of the FAs (27, 28).

After a stabilization period, 2 mM ADP was added to obtain a nonlimiting concentration (21, 29, 31, 46). Then, successive additions of Pyr (50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, and 2000 µmol/l) or PCoA (10, 25, 75, 150, 300, and 400 µmol/l) were performed to increase the substrate concentration. Thus, the decrease in O₂ concentration in the well-reflecting fiber respiration, and the slope represented the rate of oxygen consumption. The slope was measured after each addition, once the reaction stabilized. The maximal negative slope of the respiration curve during this phase corresponds to the maximal respiration rate for Pyr + malate and PCoA + malate + carnitine ($\dot{V}_{\max}^{\text{Pyr}}$ and $\dot{V}_{\max}^{\text{PCoA}}$). The nonphosphorylating respiration rate (\dot{V}_0^{Pyr} and \dot{V}_0^{PCoA}) was determined at the end of the protocol by blockade of the ATP/ADP antiport with atractyloside. The relationship between respiration rate and increasing substrate concentration allows modeling of the Michaelis constant (K_m) for each substrate ($\text{Pyr-}K_m$ and $\text{PCoA-}K_m$). K_m represents the substrate concentration to yield the half-maximal respiration rate. The RCR was calculated from the \dot{V}_{\max}/\dot{V}_0 ratio and represented the respiratory efficiency of mitochondrial OXPHOS.

One measurement was performed in the presence of 10 mM GTP, added at the beginning of the protocol, for each condition of substrate and temperature. The concentration was previously determined during preliminary experiments. This nucleotide is known to inhibit the leaking of H⁺ related to uncoupling protein (UCP3) (44).

After completing the measurements, the fibers were dried and weighed to express the respiration results in µmol O₂·min⁻¹·g⁻¹ dry weight.

Data validation first consists of technical aspects. Cytochrome *c* (cyt *c*) was systematically added after the last addition of substrate and before that of the inhibitor to verify the preservation of the mitochondrial outer membrane. The results were not considered if cyt *c* induced an increase in the rate of respiration higher than 10% of the previous rate. Values were excluded if the oxygen concentration at the end of the assay was below 120 µM. Aberrant measurements due to artifacts were removed (steady state <1 min, stirring-induced instability of the curve).

Besides, physiological relevance was systematically checked. Thus, the lack of response to substrate addition or incongruent respiration rate compared with previous and following values were reasons to exclude the variables of interest. Finally, we only accepted values that were inside the confidence interval of the group.

Each variable presented (\dot{V}_0 , \dot{V}_{\max} , ACR, and ROS production) was either the mean of the duplicates or the sole remaining value after validation.

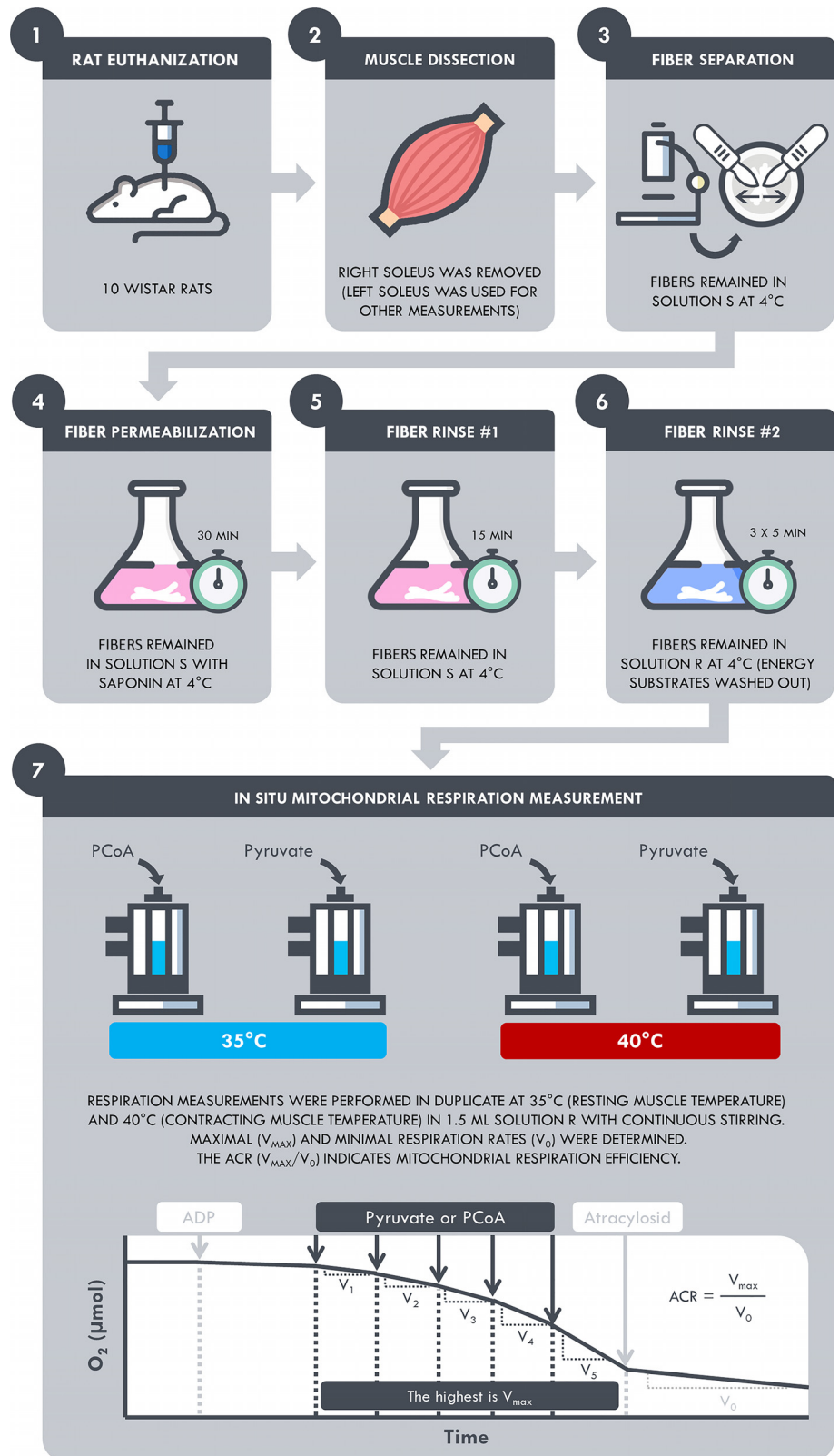


Fig. 1. Step-by-step procedure of in situ mitochondrial respiration measurement.

Solutions S and R (pH = 7.1) contained 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 6.56 mM MgCl₂ (1 mM free Mg²⁺), 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, and 50 mM K-methane sulfonate (160 mM ionic strength). Solution S also contained 3 mM phosphate and 2 mM

ADP (21, 31, 46). BSA was added freshly to solution R just before respiration.

Biochemical measurements. Enzyme activities were studied for citrate synthase (CS) and 3-hydroxyl acyl coenzyme A dehydrogenase

(3-HAD). CS is considered to be a marker of mitochondrial mass (19), and 3-HAD activity provides specific information about β -oxidation. For CS, frozen tissue samples were weighed, homogenized in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing 5 mM HEPES (pH 8.7), 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$, and 0.1% Triton X-100, and incubated for 60 min at 0°C to ensure complete enzyme extraction ($n = 8$ per group). CS activity was assessed at 35°C and 40°C (pH = 7.5), as previously described (39). For 3-HAD, the extraction was performed in ice-cold 300 mM phosphate buffer (50 mg/ml) containing KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (pH = 7.7), and 0.05% BSA, and enzyme activity was determined by a fluorometric measurement of NAD/NADH, at 35°C and 40°C, as described by Lowry and Passonneau (36). Enzyme activities are expressed in μ moles of substrate per minute (i.e., IU per gram wet weight).

H_2O_2 production. We wanted to study H_2O_2 production under conditions similar to those used for measuring O_2 consumption (2 mM pyruvate + 4 mM malate + 2 mg/ml BSA for Pyr and with 400 μ M PCoA + 0.5 mM malate + 2 mM carnitine + 6 mg/ml BSA for PCoA). Mitochondrial H_2O_2 production was measured in permeabilized fiber bundles with the fluorescent probe Amplex red (20 μ M; excitation-emission, 563–587 nm, kit A36006; Eugene, OR). Fiber bundles (0.3–1.0 mg dry weight) were incubated at 35°C or 40°C in a quartz microcuvette with continuous magnetic stirring in 2.25 ml of buffer Z (in mM: 110 K-MES, 35 KCl, 1 EGTA, 5 K_2HPO_4 , 3 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; pH = 7.3), supplemented with 1.2 UI/ml horseradish peroxidase, as described previously (1). Furthermore, 8.8 UI/ml superoxide dismutase (SOD; S 8409; Sigma-Aldrich, MO), which catalyzes superoxide ion transformation into hydrogen peroxide, was added to the media, as adapted from Kikusato et al. (15). The rate of H_2O_2 production was monitored before and after the addition of malate and Pyr (2 mM) or carnitine and PCoA (400 μ M), under nonphosphorylating conditions (without ADP), then under phosphorylating conditions (addition of 2 mM ADP). The rate of H_2O_2 production was calculated from standard curves established using 100 to 600 nM H_2O_2 (95299; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), obtained by dilution and freshly prepared each morning, under the same experimental conditions for both temperatures and BSA concentrations, except that fibers were absent.

Statistical analysis. Data are presented as the means \pm SE of values per animal, corresponding either to the mean of duplicates or one sole value after data validation. Comparisons were performed for each substrate between the two studied temperatures (35°C and 40°C). Nonpaired Student's *t*-tests were used to assess the effect of temperature on respiration measurements, ROS production, and enzymatic activity for each substrate. Differences were considered significant when $P < 0.05$, $P < 0.01$, or $P < 0.001$.

RESULTS

Mitochondrial substrate oxidation. The nonphosphorylating oxidation rate of PCoA + malate + carnitine (PCoA- \dot{V}_0) was 47% higher at 40°C than 35°C (1.59 ± 0.19 at 35°C vs. $2.33 \pm 0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 40°C, $P = 0.029$). The maximal oxidation rate of PCoA (PCoA- \dot{V}_{max}) was the same at 35°C and 40°C. Thus, the PCoA-RCR was 32% less at 40 than 35°C (3.05 ± 0.35 at 35°C vs. $2.06 \pm 0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 40°C, $P = 0.007$) (Fig. 2).

After GTP administration, the PCoA- \dot{V}_{max} was still similar at 35°C and 40°C (3.92 ± 0.40 vs. $3.68 \pm 0.35 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), and there was no longer a significant difference of PCoA- \dot{V}_0 between 35°C and 40°C (1.25 ± 0.24 vs. $1.70 \pm 0.18 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Surprisingly, the PCoA-RCR was still lower in the presence of GTP at 40°C (3.48 ± 0.49 at 35°C vs. $2.22 \pm 0.17 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 40°C, $P = 0.03$) (Fig. 2).

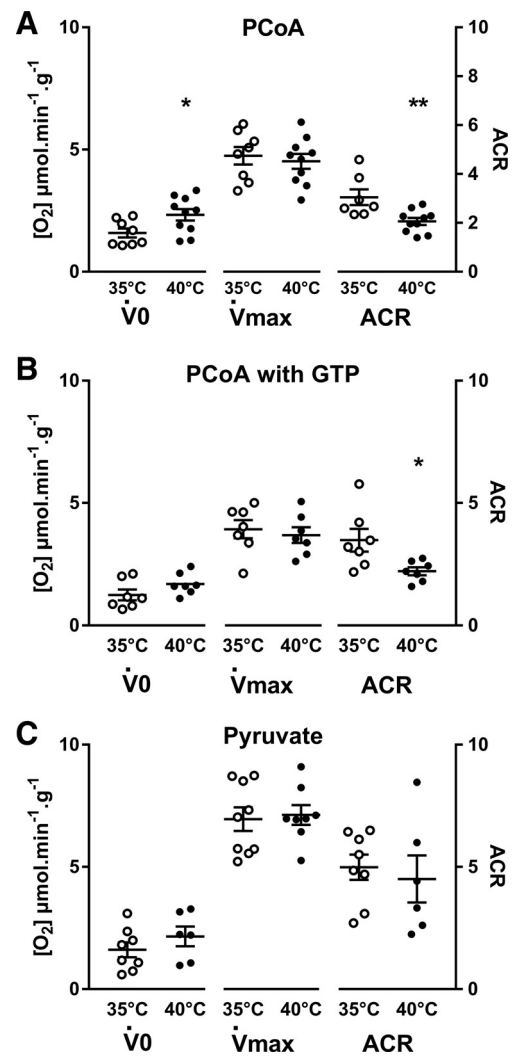


Fig. 2. The effect of temperature on in situ mitochondrial respiration in permeabilized soleus fibers of male rats. Respiration rates were measured in the absence (\dot{V}_0) or presence of Atractyloisid (\dot{V}_{max}) with 2 mM ADP, 0.5 mM malate, and 2 mM carnitine for palmitoyl-coenzyme A (PCoA) or 4 mM malate for pyruvate. Nonphosphorylating (\dot{V}_0) and phosphorylating (\dot{V}_{max}) rates and the respiratory control ratio (RCR), corresponding to the $\dot{V}_{\text{max}}/\dot{V}_0$ ratio at 35 (○) and 40°C (●), for PCoA in the absence (A) or presence (B) of GTP and for pyruvate without GTP (C) are presented. Every plot represents the value for one animal. The lines represent the means for all animals \pm SE. Student's *t*-tests were performed to compare the effect of both temperatures on respiration rate and RCR of both substrates, at each phosphorylating and GTP condition. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the value obtained at 35°C.

Neither maximal (Pyr- \dot{V}_{max} : 6.95 ± 0.51 at 35°C vs. $7.13 \pm 0.43 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 40°C) nor nonphosphorylating (Pyr- \dot{V}_0 : 1.61 ± 0.33 at 35°C vs. $2.16 \pm 0.44 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 40°C) oxidation rates of pyruvate + malate were statistically different between 35°C and 40°C. The Pyr-RCR (4.99 ± 0.55 at 35°C vs. $4.51 \pm 1.06 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 40°C) was unchanged after the increase in temperature (Fig. 2).

The Michaelis constant (K_m) was not influenced by temperature for either substrate (Table 1).

Enzymatic activities. CS activity was not different at 35°C and 40°C. However, 3-HAD activity was 22% higher at 40 than 35°C ($P = 0.00015$) (Table 2).

Table 1. Michaelis constant (K_m) calculated from the respiration rate kinetics for increasing Pyr (50 to 2000 $\mu\text{mol/l}$) and PCoA (10 to 400 $\mu\text{mol/l}$) concentrations measured in permeabilized soleus fibers from male rat

	K_m , $\mu\text{mol/l}$	
	35°C	40°C
Pyruvate	100 \pm 23 (10)	118 \pm 15 (9)
PCoA	30 \pm 6 (9)	49 \pm 13 (10)

Data are expressed as the means \pm SE (n). Measurements were performed in duplicate from at least nine specimens. Student's t -tests were performed to compare the effect of both temperatures for each substrate. PCoA, palmitoyl-CoA; Pyr, pyruvate.

ROS production. H_2O_2 production was not different at 35°C and 40°C, regardless of the substrate or conditions (phosphorylating or nonphosphorylating) (Table 3).

DISCUSSION

This study assessed the effect of an *ex vivo* increase in temperature on mitochondrial oxidation for two substrates—Pyr for the CHO pathway and PCoA for the lipid pathway—in oxidative skeletal muscle fibers of rats. In situ respiration measurements were performed at 35°C and 40°C, corresponding to the temperatures of resting muscle under conditions of neutral or passive heat exposure, respectively. We showed that heat induced uncoupling of oxidative phosphorylation, with a 30% decrease of the RCR for PCoA, whereas the RCR for Pyr remained unchanged. GTP, a UCP3 inhibitor, limited the PCoA- \dot{V}_0 increase at the higher temperature. We observed greater 3-HAD activity in the heat, whereas CS activity was the same at both 35°C and 40°C. Finally, the observed heat-induced uncoupling occurred without any modification of oxidative stress, estimated from measuring H_2O_2 production.

Validity and limits of in situ mitochondrial respiration measurements. Our respiratory conditions were carefully optimized for each substrate, such that factors other than temperature were not limiting. First, the successive addition of increasing concentrations of substrate (pyruvate or PCoA) removed any risk of an insufficient quantity of substrate. Second, each assay was monitored meticulously to guarantee a duration of less than 30 min and an oxygen concentration above 120 μM . Moreover, the addition of cytochrome *c*, performed to assess mitochondrial integrity, did not increase the respiration rate, either at 35°C or 40°C. These elements provide evidence that respiration in permeabilized fibers can be successfully

Table 2. Maximal activities of CS and HAD at 35 and 40°C of male rat soleus muscle

	Enzymatic Activity	
	35°C	40°C
CS	31.5 \pm 2.4	31.2 \pm 2.6
HAD	36.8 \pm 2.9	44.6 \pm 2.3***

Data are expressed as the means \pm SE. Enzymatic activities are expressed in UI/g wet weight. Measurements were performed in duplicate at each temperature on preparations from eight different specimens. CS, citrate synthase; HAD, 3-hydroxyl acyl coenzyme A dehydrogenase. Student's t -tests were performed to compare the effect of both temperatures on each enzyme activity. *** $P < 0.001$ statistically different from the values at 35°C.

Table 3. H_2O_2 production in permeabilized soleus fibers of male rat observed by fluorimetry at 35°C and 40°C with pyruvate or PCoA

	H_2O_2 Production	
	35°C	40°C
<i>PCoA + 0.5 mM Malate + 2 mM Carnitine</i>		
\dot{V}_0	1.03 \pm 0.18 (8)	0.93 \pm 0.30 (8)
\dot{V}_{max}	0.76 \pm 0.11 (8)	0.81 \pm 0.26 (8)
<i>Pyruvate + 4 mM Malate</i>		
\dot{V}_0	0.86 \pm 0.18 (8)	0.53 \pm 0.04 (8)
\dot{V}_{max}	0.35 \pm 0.08 (5)	0.20 \pm 0.03 (7)

Values are expressed as the means \pm SE (n). The H_2O_2 production measurements (given as $\text{nM H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ dry tissue) were performed under nonphosphorylating (without ADP) and phosphorylating conditions (with 2 mM ADP). Measurements were performed in duplicate per animal, for both substrates, at each temperature and phosphorylating condition. Student's t -tests were performed to compare the effect of both temperatures for each substrate and phosphorylating condition. PCoA, palmitoyl-CoA.

achieved at 40°C and that technical limitations were not responsible for the observed results.

Differences in malate concentration between pyruvate and PCoA protocol can be considered as a bias. Nevertheless this takes into account the specificity of β -oxidation, which supplies FADH_2 by soliciting both electron transfer flavoprotein and, to a lesser extent, succinate dehydrogenase complex via acetyl CoA from the Krebs cycle (25).

Substrate-dependent effect size of the increase in temperature on mitochondrial respiration. We studied FA oxidation using PCoA, the most widely FA stored in adipose tissue and muscle fibers. PCoA is a long-chain FA (LCFA), and its oxidation depends on mitochondrial transport and β -oxidation. Thus, this LCFA allowed us to study all steps of FA oxidation. The increase in temperature induced an increase of almost 50% in PCoA oxidation under nonphosphorylating conditions (PCoA- \dot{V}_0). As PCoA- \dot{V}_{max} was not altered (to the extent that values were not underestimated), the PCoA-RCR was lower at 40°C than 35°C, suggesting less coupling of phosphorylation and oxidation, mainly due to a heat-induced increase in PCoA- \dot{V}_0 .

Conversely, we observed the efficiency of OXPHOS coupling for Pyr respiration, reflected by the Pyr-ACR, was not altered by the increase in temperature. While Pyr- \dot{V}_{max} was not affected by increasing temperature from 35°C to 40°C, nevertheless we observed a trend of elevation of 30% of Pyr- \dot{V}_0 with heat (Pyr- $\dot{V}_0 + 34\%$, $P = 0.29$; $1-\beta = 0.16$). This low statistical power does not allow us to definitely conclude the lack of effect of elevating temperature on \dot{V}_0 -Pyr, with our data. Thus, we cannot rule out that the elevation of the temperature may induce a significant increase in Pyr- \dot{V}_0 with more samples. In any case, considering the respective effect sizes (Cohen's d), the effect of the elevation of the temperature on Pyr- \dot{V}_0 ($P = 0.29$, Cohen's $d = 0.58$), if existing, seems to be less important than on PCoA- \dot{V}_0 ($P = 0.029$, Cohen's $d = 1.16$). The effect size of the temperature for \dot{V}_0 -Pyr is in the same range of the remaining but nonsignificant elevation on PCoA- \dot{V}_0 with GTP

($P = 0.13$, Cohen's $d = 0.87$). Thus, if the heat-induced uncoupling effect cannot be ruled out, we can reasonably say that the range of effect is different depending on the substrate used for respiration, and the putative effect of the elevation of the temperature on Pyr oxidation is, anyway, of a minor magnitude compared with on PCoA oxidation.

We assume that the elevation of the temperature was here shown to induce higher uncoupling of FA OXPHOS, notwithstanding, in a lesser extent, a heat-induced uncoupling of pyruvate OXPHOS remaining to be clearly addressed.

There have been very few studies on the effect of heat on FA oxidation for comparison. In a recent study, elevating the temperature from 35°C to 42°C decreased the mitochondrial efficiency of glycerol-3-P oxidation (complex II, H⁺ donor), which is consistent with our results showing uncoupling with PCoA, which also provides FADH₂ (45). Unfortunately, in this study, \dot{V}_0 for fatty acid was not assessed, and contrary to our results, heat increased the \dot{V}_{\max} of palmitoyl carnitine. Aside from several differences in experimental conditions (in situ respiration vs. isolated mitochondria, the type of LCFA and the muscle phenotype), we consider this apparent discrepancy to be possibly due to an effect size. In our study, there was a trend toward increasing the maximal respiration rates for PCoA, whereas the assay was performed at a lower range of temperatures in comparison to that of the study of Zoladz et al. (45) (40°C vs. 42°C, respectively). We cannot rule out that the nonsignificant increase of PCoA- \dot{V}_{\max} at 40°C in our study would have been significant at 42°C.

In these two studies, ATP production was not recorded concomitantly with oxygen consumption. Qian et al. (32) reported that ATP/O decreased in isolated rat cardiomyocyte mitochondria between 37°C and 39°C, but whether Pyr, PCoA, or both were used for the respiration measurements was not clear. Only one study has assessed the effect of temperature on mitochondrial respiration coupling in the presence or absence of FAs. Jarmuszkiewicz et al. (12) reported that the addition of linoleic acid (LA) induced increased uncoupling of oxidation with Pyr + malate + succinate when the temperature rose from 35°C to 42°C. However, the authors used LA in extraphysiological condition as an activator of UCP3, and not as a substrate to be oxidized.

Concerning enzymatic activity, quite surprisingly, we did not observe any increase in CS activity at 40°C, contrary to the previously mentioned study (12). Nevertheless, this result is consistent with the unchanged Pyr- \dot{V}_{\max} at 40°C relative to 35°C. Conversely, at 40°C, we observed an increase of 3-HAD activity, a limiting enzyme of β -oxidation, which could theoretically favor FA oxidation. Nevertheless, we did not observe a similar increase of the PCoA- \dot{V}_{\max} . This discrepancy could suggest that the steps before β -oxidation may be adversely affected by heat, in particular, mitochondrial transport. It would be challenging to compare the effect of temperature on different types of FAs, for example, medium- or long-chain FAs.

Here, we showed that a physiological increase in temperature induces uncoupling of FA oxidation in permeabilized fibers. Our results also suggest that CHO metabolism could be altered by heat but in a minor range. The magnitude of heat-induced alteration of mitochondrial respiration depends

on the oxidized substrate. In the end, both substrates coexist, in vivo, in the mitochondria matrix, and this temperature-induced uncoupling effect in the presence of FA could also result in the alteration of pyruvate oxidation. It would have been informative to study the effect of temperature on combined CHO and FA oxidation.

The heat-induced uncoupling observed mostly with FA oxidation led us to investigate which mechanism could mediate this effect.

Potential UCP3-dependent heat uncoupling. We explored a potential mechanism for such uncoupling that involves UCP through its inhibition by GTP. In our study, the heat-induced increase of PCoA- \dot{V}_0 did not occur after GTP addition, suggesting that the inhibition of UCP3 may prevent heat-induced uncoupling of FA oxidation. The persistent decrease in the RCR with the increase in temperature, despite the addition of GTP, suggests that factors other than UCP3 may play a role in heat-induced FA-dependent uncoupling. Thus, the OXPHOS uncoupling of PCoA oxidation with the increase in temperature is partly mediated by a UCP3-dependent mechanism. Such heat-induced UCP-mediated uncoupling is consistent with the results of Jarmuszkiewicz et al. (12), who reported a role for LA, another fatty acid, in UCP-mediated uncoupling. Such substrate-specific uncoupling has already been described. Nabben et al. (23) showed that state 4 increased only for PCoA, whereas it was not altered for Pyr, in mitochondria isolated from UCP3-overexpressing skeletal muscle of mouse.

UCP has been proposed to be a scavenger of ROS. Thus, we explored ROS production under the same conditions of respiration to test this hypothesis.

Heat does not increase ROS production. In our study, we considered ROS production in the context of PCoA uncoupling. Our aim was to determine whether the conditions under which we showed FA uncoupling could also induce changes in ROS production.

We performed measurements with pyruvate to obtain reference values for ROS production at both temperatures. The addition of ADP logically decreased the level of ROS production for pyruvate and PCoA at both temperatures. However, the increase in temperature did not modify ROS production, regardless of the phosphorylating conditions (in particular, under nonphosphorylating conditions, for which oxidative stress is classically higher) for PCoA or Pyr oxidation. Although controversial, several studies have shown that heat can increase ROS production. Thus, Kikusato et al. (15, 16) showed that an increase in temperature from 37°C to 41°C can increase ROS production in avian muscle cells. Conversely, Jarmuszkiewicz et al. (12) found that LA decreased ROS production from 35°C to 42°C. However, in their study, ROS production was measured in isolated mitochondria and under conditions designed to maximize ROS production, which was estimated more than 10-fold higher than under our physiological conditions. Moreover, the cytosolic ROS-scavenging capacity is better preserved in permeabilized fibers, which may be sufficient to manage physiological ROS production.

Under our conditions, heat did not induce any oxidative stress in permeabilized fibers, regardless of the oxidized substrate. Nevertheless, it cannot be excluded that ROS production in these physiological conditions was not sufficient to observe the antioxidant action of UCP3.

Potential mechanisms of heat-induced uncoupling of FA oxidation. Here, we showed that heat impaired coupling for FA oxidation, suggesting a potential mechanism for the synergistic effect of heat and FA on uncoupling.

A flip-flop mechanism may be involved in the detrimental effects on FA oxidation (11, 13). LCFAs could cross the mitochondrial double membrane following a concentration gradient. In situations of high FA concentration, LCFA entry would occur independently from CPT1, without acetylation of CoA. As they cross the double membrane, FAs may capture protons from the inner membrane, reducing the proton gradient. Furthermore, nonacylated FA would accumulate in the anionic form inside the matrix, which while useless for β -oxidation, would provide for ROS generation. FA may then be exported by UCP3 to the cytosol, thus limiting ROS generation (11, 13). Heat is well known to increase membrane fluidity. Thus, FA entry would be enhanced by this flip-flop mechanism independently of FA availability. It would be necessary to measure the proton gradient and mitochondrial membrane fluidity to prove such an additive effect.

Another mechanism involving the combined action of UCP and thioesterase in FA efflux. Increased LCFA availability may increase the LCFA-CoA matrix concentration and decrease CoA availability, which could become limiting for key steps, such as FA entry, the Krebs cycle, and β -oxidation. Mitochondrial thioesterase 1 (MTE1) may enhance CoA availability by the hydrolysis of LCFA-CoA. By maintaining the CoA pool, MTE1 may preserve mitochondrial respiration rate. Free LCFA should then follow the UCP efflux (5). A very recent study showed mitochondrial thioesterase may be sensitive to thermic stress (26). In brown adipose tissue, a member of the thioesterase family (TEM1), activated by cold exposure, was shown to limit FA oxidation and the efficiency of thermogenesis induced by UCP-1. Such a family of heat-sensitive thioesterases may be present in skeletal muscle, working in association with UCP-3.

Other mechanisms independent of UCP could mediate uncoupling. Increased expression and activity of adenine nucleotide translocase 1 from Sparks et al. (38) (ANT1) are known to induce uncoupling in trained athletes (38). Under our conditions, $\text{PCoA} \cdot \dot{V}_0$ was obtained after the addition of atractyloside, a pharmacological inhibitor of ANT. Thus, our observations cannot be explained by ANT-dependent uncoupling. A deterrent effect of LCFA cannot be excluded, as $\text{PCoA} \cdot \dot{V}_0$ was measured at the end of the experiment after a lengthy contact time between the PCoA and fibers. However, this seems unlikely. Thus, we also measured the physiological $\text{PCoA} \cdot \dot{V}_0$ (assay performed with the same final PCoA concentration of 400 μM without ADP) at the beginning of some additional protocols. We observed the same difference of physiological $\text{PCoA} \cdot \dot{V}_0$ between 35°C and 40°C (data not shown, $1.44 \pm 0.17 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ vs. $3.30 \pm 0.13 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively) as that observed in the presence of atractyloside. Thus, the heat-induced uncoupling of PCoA oxidation that we observed is probably not related to a potential deterrent effect of FAs.

Conclusion. Exposure to a temperature of 40°C especially induced uncoupling of LCFA oxidative phosphorylation, whereas mitochondrial integrity was preserved. This heat-induced FA

uncoupling is at least partially mediated by UCP and appears to be independent of ROS production. Nevertheless, the mechanisms responsible for this phenomenon require further investigation. The effect of the elevation of the temperature on CHO metabolism remains unclear, and variation of heat-induced uncoupling effect size with substrate is largely not understood. Thus, the recognized fuel preference for CHO when skeletal muscle works under hot conditions may be related to less efficient oxidative phosphorylation of FAs. Even in vivo, both substrates coexist in the mitochondria matrix; the adaptation of nutrition in hot conditions could help to limit this uncoupling and preserve mitochondrial efficiency. Finally, this OXPHOS uncoupling may lead to heat production that is potentially deleterious for thermoregulatory responses in warm conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Keyne Charlot for having designed the infography of study procedure, Jérôme Piquereau for having sharing and accompanying in performing ROS measurements and Véronique Chastres for helpful advice in statistical discussion.

GRANTS

This work was supported by the Direction Générale de l'Armement (France), via contract DGA/PDH-1 SMO2-0604.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.-E.T.-D., N.K., and A.M. conceived and designed research; P.-E.T.-D., J.T., S. Bauge, S. Bourdon, and A.M. performed experiments; P.-E.T.-D., J.T., and A.M. analyzed data; P.-E.T.-D., J.T., N.K., and A.M. interpreted results of experiments; P.-E.T.-D. prepared figures; P.-E.T.-D. and A.M. drafted manuscript; P.-E.T.-D., N.K., and A.M. edited and revised manuscript; P.-E.T.-D., J.T., S. Bauge, S. Bourdon, N.K., and A.M. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H_2O_2 generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C844–C851, 2006. doi:10.1152/ajpcell.00402.2005.
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408: 39–42, 1997. doi:10.1016/S0014-5793(97)00384-0.
- Brooks GA, Hittelman KJ, Faulkner JA, Beyer RE. Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt. *Am J Physiol* 220: 1053–1059, 1971. doi:10.1152/ajplegacy.1971.220.4.1053.
- Brooks GA, Mercier J. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the “crossover” concept. *J Appl Physiol* (1985) 76: 2253–2261, 1994. doi:10.1152/jappl.1994.76.6.2253.
- MacLellan JD, Gerrits MF, Gowing A, Smith PJS, Wheeler MB, Harper ME. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes* 54: 2343–2350, 2005. doi:10.2337/diabetes.54.8.2343.
- Downs CA, Heckathorn SA. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett* 430: 246–250, 1998. doi:10.1016/S0014-5793(98)00669-3.
- Febbraio MA. Does muscle function and metabolism affect exercise performance in the heat? *Exerc Sport Sci Rev* 28: 171–176, 2000.
- Febbraio MA, Snow RJ, Stathis CG, Hargreaves M, Carey MF. Effect of heat stress on muscle energy metabolism during exercise. *J Appl Physiol* (1985) 77: 2827–2831, 1994. doi:10.1152/jappl.1994.77.6.2827.
- Fink WJ, Costill DL, Van Handel PJ. Leg muscle metabolism during exercise in the heat and cold. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 34: 183–190, 1975. doi:10.1007/BF00999931.

10. Hargreaves M, Angus D, Howlett K, Conus NM, Febbraio M. Effect of heat stress on glucose kinetics during exercise. *J Appl Physiol* (1985) 81: 1594–1597, 1996. doi:10.1152/jappl.1996.81.4.1594.
11. Hoeks J, Hesselink MK, Schrauwen P. Involvement of UCP3 in mild uncoupling and lipotoxicity. *Exp Gerontol* 41: 658–662, 2006. doi:10.1016/j.exger.2006.02.005.
12. Jarmuszkiewicz W, Woyda-Ploszczyca A, Koziel A, Majerczak J, Zoladz JA. Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med* 83: 12–20, 2015. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.012.
13. Ježek P, Engstová H, Záčková M, Vercesi AE, Costa ADT, Arruda P, Garlid KD. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1365: 319–327, 1998. doi:10.1016/S0005-2728(98)00084-X.
14. Karlsson J, Saltin B. Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J Appl Physiol* 31: 203–206, 1971. doi:10.1152/jappl.1971.31.2.203.
15. Kikusato M, Toyomizu M. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. *PLoS One* 8: e64412, 2013. [Erratum in *PLoS One* 8: 2013.] doi:10.1371/journal.pone.0064412.
16. Kikusato M, Yoshida H, Furukawa K, Toyomizu M. Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells. *J Therm Biol* 52: 8–13, 2015. doi:10.1016/j.jtherbio.2015.04.005.
17. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3: 965–976, 2008. doi:10.1038/nprot.2008.61.
18. Lanza IR, Nair KS. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods Enzymol* 457: 349–372, 2009. doi:10.1016/S0076-6879(09)05020-4.
19. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F, Hey-Mogensen M. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol* 590: 3349–3360, 2012. doi:10.1113/jphysiol.2012.230185.
20. Malgoyre A, Chabert C, Tonini J, Koulmann N, Bigard X, Sanchez H. Alterations to mitochondrial fatty-acid use in skeletal muscle after chronic exposure to hypoxia depend on metabolic phenotype. *J Appl Physiol* (1985) 122: 666–674, 2017. doi:10.1152/jappphysiol.00090.2016.
21. Martins EL, Ricardo JC, de-Souza-Ferreira E, Camacho-Pereira J, Ramos-Filho D, Galina A. Rapid regulation of substrate use for oxidative phosphorylation during a single session of high-intensity interval or aerobic exercises in different rat skeletal muscles. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 217: 40–50, 2018. doi:10.1016/j.cbpb.2017.11.013.
22. Mujahid A, Akiba Y, Warden CH, Toyomizu M. Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens. *FEBS Lett* 581: 3461–3467, 2007. doi:10.1016/j.febslet.2007.06.051.
23. Nabben M, Hoeks J, Briedé JJ, Glatz JF, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Schrauwen P. The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice. *FEBS Lett* 582: 4147–4152, 2008. doi:10.1016/j.febslet.2008.11.016.
24. O'Hearn K, Tingelstad HC, Blondin D, Tang V, Filion LG, Haman F. Heat exposure increases circulating fatty acids but not lipid oxidation at rest and during exercise. *J Therm Biol* 55: 39–46, 2016. doi:10.1016/j.jtherbio.2015.11.002.
25. Ojuka E, Andrew B, Bezuidenhout N, George S, Maarman G, Madlala HP, Mendham A, Osiki PO. Measurement of β -oxidation capacity of biological samples by respirometry: a review of principles and substrates. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310: E715–E723, 2016. doi:10.1152/ajpendo.00475.2015.
26. Okada K, LeClair KB, Zhang Y, Li Y, Ozdemir C, Krisko TI, Hagen SJ, Betensky RA, Banks AS, Cohen DE. Thioesterase superfamily member 1 suppresses cold thermogenesis by limiting the oxidation of lipid droplet-derived fatty acids in brown adipose tissue. *Mol Metab* 5: 340–351, 2016. doi:10.1016/j.molmet.2016.02.002.
27. Oliveira AF, Cunha DA, Ladiere L, Igoillo-Esteve M, Bugliani M, Marchetti P, Cnop M. In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols. *Biotechniques* 58: 228–233, 2015. doi:10.2144/000114285.
28. Ou LC, Leiter JC. Effects of exposure to a simulated altitude of 5500 m on energy metabolic pathways in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 141: 59–71, 2004. doi:10.1016/j.resp.2004.04.001.
29. Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* 810: 25–58, 2012. doi:10.1007/978-1-61779-382-0_3.
30. Pobezhimova TP, Voinikov VK, Varakina NN. Inactivation of complex I of the respiratory chain of maize mitochondria incubated in vitro by elevated temperature. *J Thermal Biol* 21: 283–288, 1996. doi:10.1016/S0306-4565(96)00010-1.
31. Ponsot E, Dufour SP, Zoll J, Doutrelau S, N'Guessan B, Geny B, Hoppeler H, Lampert E, Mettauer B, Ventura-Clapier R, Richard R. Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. II. Improvement of mitochondrial properties in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 100: 1249–1257, 2006. doi:10.1152/jappphysiol.00361.2005.
32. Qian L, Song X, Ren H, Gong J, Cheng S. Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones* 9: 281–293, 2004. doi:10.1379/CSC-20R.1.
33. Salabei JK, Gibb AA, Hill BG. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. *Nat Protoc* 9: 421–438, 2014. doi:10.1038/nprot.2014.018.
34. Schrauwen P, Hesselink MK, Vaartjes I, Kornips E, Saris WH, Giacobino JP, Russell A. Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolism-mediated effect. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E11–E17, 2002. doi:10.1152/ajpendo.2002.282.1.E11.
35. Schrauwen P, Hoppeler H, Billeter R, Bakker AH, Pendergast DR. Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 449–456, 2001. doi:10.1038/sj.ijo.0801566.
36. Seidemann J, Lowry OH, Passonneau JV. A flexible system of enzymatic analysis. *Starch* 25: 322, 1973. doi:10.1002/star.19730250914.
37. Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 294: 158–162, 1991. doi:10.1016/0014-5793(91)80658-P.
38. Sparks LM, Gemmink A, Phielix E, Bosma M, Schaart G, Moonen-Kornips E, Jörgensen JA, Nascimento EB, Hesselink MK, Schrauwen P, Hoeks J. ANT1-mediated fatty acid-induced uncoupling as a target for improving myocellular insulin sensitivity. *Diabetologia* 59: 1030–1039, 2016. doi:10.1007/s00125-016-3885-8.
39. Srere PA. Citrate synthase [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In: *Methods in Enzymology*. San Diego, CA: Academic, 1969, p. 3–11.
40. Starkie RL, Hargreaves M, Lambert DL, Proietto J, Febbraio MA. Effect of temperature on muscle metabolism during submaximal exercise in humans. *Exp Physiol* 84: 775–784, 1999. doi:10.1111/j.1469-445X.1999.01815.x.
41. Weigle DS, Selfridge LE, Schwartz MW, Seeley RJ, Cummings DE, Havel PJ, Kuijper JL, Beltran del Rio H. Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* 47: 298–302, 1998. doi:10.2337/diab.47.2.298.
42. Willis WT, Jackman MR. Mitochondrial function during heavy exercise. *Med Sci Sports Exerc* 26: 1347–1353, 1994. doi:10.1249/00005768-199411000-00009.
43. Wojtczak L, Schönfeld P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1183: 41–57, 1993. doi:10.1016/0005-2728(93)90004-Y.
44. Woyda-Ploszczyca AM, Jarmuszkiewicz W. Different effects of guanine nucleotides (GDP and GTP) on protein-mediated mitochondrial proton leak. *PLoS One* 9: e98969, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0098969.
45. Zoladz JA, Koziel A, Broniarek I, Woyda-Ploszczyca AM, Ogrodna K, Majerczak J, Celichowski J, Szukutnik Z, Jarmuszkiewicz W. Effect of temperature on fatty acid metabolism in skeletal muscle mitochondria of untrained and endurance-trained rats. *PLoS One* 12: e0189456, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0189456.
46. Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, Mettauer B. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543: 191–200, 2002. doi:10.1113/jphysiol.2002.019661.

III. Étude 2

1. Rappel du protocole expérimental

Nous avons émis l'hypothèse que l'acclimatation à la chaleur pourrait potentialiser les adaptations mitochondriales induites par l'entraînement, sur la biogenèse et/ou sur les capacités d'oxydation des acides gras. Nous avons comparé l'effet séparé et combiné d'une acclimatation à la chaleur et d'un entraînement aérobie sur le métabolisme énergétique musculaire.

a. Conditionnement

Un conditionnement de six semaines prévoyait la réalisation d'un entraînement en endurance et/ou d'une acclimatation à la chaleur sur un effectif de 32 rats mâles (poids moyen $276 \pm 5\text{g}$) répartis en quatre groupes définis par le conditionnement appliqué. Les animaux étaient maintenus à deux par cage, en ambiance thermique neutre, avec un cycle artificiel de 12h de jour et 12h de nuit. Les différents conditionnements (C : *control* pour le groupe témoin, HA : *heat acclimatization* pour le groupe exposé à la chaleur, ET : *endurance training* pour le groupe entraîné, HAET : pour le groupe exposé à la chaleur et entraîné) étaient attribués aléatoirement sans modifier la répartition initiale des rats dans leur cage.

Acclimatation à la chaleur

L'acclimatation à la chaleur (pour les seize animaux des groupes HA et HAET) consistait en une exposition répétée à une température comprise entre 35 et 39°C, pendant 45 minutes, 5 jours par semaine, l'après-midi, à un horaire fixe. La température moyenne de l'enceinte (**Figure 37**), sur le temps d'exposition, était de 37,3°C. Une expérimentation-pilote préalable avait permis de valider les conditions d'induction de l'hyperthermie passive. Un dispositif de mesure de la température profonde (gélule Anipill de la société Bodycaps®, Caen, France) avait été préalablement implanté dans l'abdomen de sept rats. Les animaux avaient été soumis aux conditions de température définies pour l'étude. La température profonde des sept animaux avait augmenté de $1,6^\circ\text{C} \pm 0,23$ (Température \pm SEM) en moyenne. En outre, la température profonde de l'ensemble des animaux était supérieure à 38°C pendant 55 min et supérieure à 39°C pendant 45 minutes.



Figure 37. Dispositif utilisé pour l'exposition passive à la chaleur.

Entraînement aérobic

L'entraînement aérobic (pour les seize animaux des groupes ET et HAET) a consisté en des séances de course sur tapis roulant (Figure 38), d'intensité et de durée progressivement croissantes, réalisées le matin à horaire fixe. Les animaux débutaient la première semaine d'entraînement à un rythme de $11,4 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 45 min pour terminer à la sixième semaine à un rythme de $28,2 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 55 min (Annexe 7).



Figure 38. Tapis de course utilisé pour l'entraînement des rats.

b. Mesures *in vivo* et anthropométriques

Les animaux ont été pesés en début d'expérimentation, au moment de la répartition des groupes et en fin d'expérimentation, le jour du sacrifice. Après euthanasie, les différents tissus prélevés (deux soléi, deux plantaris, tissu adipeux rétropéritonéal) étaient pesés avant d'être conditionnés (congélation ou en solution S).

Métabolisme de repos

Dans l'hypothèse d'une modification des capacités oxydatives liée aux substrats, nous avons supposé que les adaptations mitochondriales induites par le conditionnement pouvaient avoir des conséquences sur le quotient respiratoire du métabolisme basal. A l'issue du conditionnement de 6 semaines, les animaux étaient placés, 24 heures après le test à l'effort et 24h avant, dans une cage à métabolisme. Les animaux étaient placés individuellement dans des cages de métabolisme pendant une durée de 6 heures minimum, à jeun et avec hydratation ad libitum. Le métabolisme de repos était mesuré par calorimétrie indirecte. La cage était ventilée à un débit de 0,9 à 0,12 l/min (LE400 Air Supply and Switching, Panlab Harvard Apparatus) et connectée à un analyseur de gaz (LE405 O₂/CO₂ analyzer, Panlab Harvard Apparatus) pour mesurer les concentrations en O₂ et de en CO₂. Les débits étaient calculés avec le logiciel METABOLISM (BIOSEB, USA), durant un état stable, chez un animal au repos. Les mesures étaient réalisées dans une pièce à 22°C, entre 09 et 16h (période de repos chez les rongeurs) afin de limiter les activités spontanées. La période de repos était déterminée par la stabilité de la consommation en O₂ (variation inférieure à 10%), en excluant la première heure et la dernière heure d'enregistrement pour tenir compte des périodes stressantes que peuvent présenter l'installation et la présence de personnels. Les mesures de débit sont rapportées au poids de l'animal et exprimées en ml.min⁻¹.kg^{0,75}. Le QR correspond au rapport VO₂/VCO₂ et permet de préciser la contribution relative des substrats lipidiques (QR = 0,7) et glucidiques (QR = 1) dans la fourniture en énergie.

Mesure de la vitesse maximale aérobie

L'aptitude aérobie des animaux a été évaluée au cours d'un test incrémental progressivement maximal sur tapis roulant. La vitesse de course était augmentée par palier de 2 minutes puis de 1,5 minute jusqu'à ce que l'animal ne parvienne plus à maintenir l'allure. Le test était arrêté lorsque l'animal ne reprenait pas la course malgré trois stimulations électriques. La vitesse maximale aérobie correspond à la vitesse au dernier palier accompli en intégralité (**Annexe 8**)

c. Mesures de la respiration mitochondriale

Nous avons suggéré que les réponses mitochondriales à la chaleur pouvaient induire une amélioration de la fonctionnalité mitochondriale maximale mais également de son efficacité dans l'utilisation des lipides, participant ainsi à l'amélioration de l'endurance à l'exercice à la chaleur. La fonction mitochondriale a été mesurée à 35°C afin de comparer les effets de l'entraînement et de l'acclimatation à la chaleur. Nous avons étudié l'effet des différents

conditionnements sur les capacités oxydatives mitochondriales des fibres perméabilisées de soleus de rats mâles Wistar, selon la technique d'oxygraphie employée au cours de la première étude. Contrairement à la première étude, la mesure de la vitesse de respiration mitochondriale minimale ($\dot{V}O$) était mesurée après ajout d'ADP en excès (2mM) et avant l'ajout du substrat glucidique (Pyruvate 2mM) ou lipidique (PCoA 400nM). N'ayant pas l'intention d'étudier les mécanismes de découplage, le blocage de l'ANT-1 n'était donc pas nécessaire. Les protocoles ont donc été simplifiés afin de pouvoir étudier deux animaux par jour (**Tableau 2**).

Tableau 2 Protocoles d'ajout de substrats utilisés pour les mesures de la respiration mitochondriale de l'étude 2.

Voie glucidique			
Réactifs	Ajout (μ L)	Concentration (μ M)	
Malate 750mM	8	4000	
Fibres			
Pyruvate 250mM	12	2000	V_0 Pyr
ADP 500mM	6	2000	V_{max} Pyr
Glutamate 2000 mM	7,5	10000	
Succinate 2500mM	15	25000	
Cytochrome-C 5mM	3	10	
Voie lipidique			
Réactifs	Ajout (μ L)	Concentration (μ M)	
Malate 750mM	1	4000	
Carnitine 1000mM	3	2000	
Fibres			
Palmitoyl-CoA 15mM	40	400	V_0 PCOA
ADP 500mM		2000	V_{max} PCOA
Cytochrome-C 5mM	3	10	

d. Mesures biochimiques

Le sang total était prélevé afin de mesurer la concentration en glucose, acides gras libres et glycérol. Par la méthode de colorimétrie enzymatique, le substrat était dégradé en un produit dont il était possible de mesurer l'absorbance avec un automate (ADIVA 18000, Siemens). La concentration en glucose a été mesurée avec le kit GLUO (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA), celle en acides gras libres avec le RX MONZA FA 115 (Randox laboratories, Crumlin, UK) et celle du glycerol avec le kit RX MONZA GY 105 (Randox laboratories, Crumlin, UK).

Le contenu en glycogène était mesuré sur un échantillon prélevé sur le soleus congelé. Après extraction (2N NaOH, 1/50, 2h à 37°C), l'échantillon était hydrolysé par une amyloglucosidase pour pouvoir doser les unités glycosyls. Le glucose libéré était dosé par spectrophotométrie mesurant la production de NADH en présence d'hexokinase et glucose-6-phosphate dehydrogenase (**Annexe 9**).

Les activités de la citrate synthase et de la HAD ont été mesurées à 40°C, selon le même protocole que la première étude. Les activités de l'hexokinase (HK), enzyme de la glycolyse, la pyruvate déshydrogénase, étape de régulation de l'entrée du glucose dans la cellule, et de la lactate déshydrogénase (LDH), catalysant la dégradation du pyruvate en anaérobiose ont été mesurées par colorimétrie enzymatique (**Annexes 10, 11 et 12** respectivement).

e. Mesure de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et le remodelage mitochondrial

Afin d'étudier la réponse protéique en relation avec les adaptations mitochondriales induites, nous avons mesuré par Western Blot, la quantité de plusieurs protéines du métabolisme glucidique cytosolique et matriciel, de l'oxydation des lipides, de la chaîne respiratoire mitochondriale, de la dynamique mitochondriale et de la signalisation de la réponse à la chaleur (**Tableau 3** et **Annexe 13**).

Tableau 3. Listes des protéines étudiées en Western-Blot (étude 2)

Nom	Voie
Pyruvate Dehydrogenase E1- α subunit (phospho S293)	Forme phosphorylée de la PDH (inactive)
Pyruvate Dehydrogenase E1- α subunit	Forme non phosphorylée de la PDH
Phospho-GSK- α/β (Ser21/9)	Forme phosphorylée de la GSK (inactive)
GSK-3 β	Forme non phosphorylée de la GSK
FABP4	Transport membranaire des acides gras
CPT1A	Transport mitochondrial des acides gras
CPT2	Transport mitochondrial des acides gras
Complexes de la chaîne de transfert d'électrons I à IV	Chaîne respiratoire mitochondriale
Adenine Nucleotide Translocase 1 / ANT 1	Antiport ATP/ADP
Uncoupling Protein 3	Protéine découplante
HSP70	Protéine de la réponse au stress thermique chaud

2. ARTICLE

De : jappl@msubmit.net

Envoyé le : mercredi 22 janvier 2020 19:26

À : peirba@gmail.com

Objet : JAPPL-00050-2020 Receipt of New Paper by the Journal of Applied Physiology

Dear Dr. TARDO-DINO:

The manuscript entitled "Effect of heat acclimation on metabolic adaptations induced by endurance training in soleus rat muscle" was submitted on 22nd Jan 2020. The record has been assigned manuscript number JAPPL-00050-2020, a Research Article.

Authors are listed as PIERRE-EMMANUEL TARDO-DINO, CINDY TAVERNY, JULIEN SIRACUSA, STEPHANE BAUGE, STEPHANIE BOURDON, NATHALIE KOULMANN, and Alexandra Malgoyre.

If any author has not seen this work, or was not aware of the submission, please contact Iliana Torres in the APS office, itorres@the-aps.org.

At this time, ALL authors on this paper should log in to the manuscript submission site to review his or her profile. Upon logging in, verify your full name (including middle initial if applicable), email address, institution at the time of the study, and department, and make any changes necessary. This will ensure that if your paper is accepted, all information will be correct at publication.

Please use this link to access your profile:

<https://jappl.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2Dk5wyA6A4DGty2a5A9ftdoOxsjqg0vLYNiAvDDThrYgZ>

Thank you for submitting your work to the Journal of Applied Physiology.

Regards,

Iliana Torres

Peer Review Coordinator & Editorial Assistant

Journal of Applied Physiology

Please note: we are committed to protecting your privacy and developing technology that gives you a secure and valuable online experience. We have updated our privacy policy so it's easy for our members and constituents to understand the data we collect and how it's used. Log in to your account now to continue receiving news from us.

Confidentiality Notice: This e-mail message, including any attachments, is for the sole use of the intended recipient(s) and may contain confidential and privileged information. Any unauthorized review, copy, use, disclosure, or distribution is prohibited. If you are not the intended recipient, please contact the sender by reply e-mail and destroy all copies of the original message.

Effect of heat acclimation on metabolic adaptations induced by endurance training in soleus rat muscle

Heat acclimation did not enhance mitochondrial adaptations induced by endurance training but increases muscular glycogen content

Pierre-Emmanuel Tardo-Dino^{1,2,3*}, Cindy Taverny¹, Julien Siracusa¹, Stéphanie Bourdon¹, Stéphane Baugé¹, Nathalie Koulmann^{1,2,3}, and Alexandra Malgoyre¹

¹Unité de Physiologie de l'Exercice et des Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge, France

²Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France

³EDISS 205, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

AUTHORS CONTRIBUTIONS

PETD and AM conceived and designed the research. PETD, AM, CT, JS, SBo, and SBa performed the experiments. PETD, AM, CT and JS, analysed the data and interpreted the results of the experiments. PETD and AM wrote the first draft of the manuscript. PETD, NK, and AM edited and revised the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Running head: Heat acclimation did not alter endurance training-induced muscle metabolic adaptations

***Corresponding author:** Unité de Physiologie de l'Exercice et des Activités en Conditions Extrêmes, Département Environnements Opérationnels, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge, France BP73, 91223 Brétigny-sur-Orge Cedex, France, Phone : (+331) 78 65 13 20, E-mail : peirba@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8746-8778>

ABSTRACT

Tardo-Dino PE, Taverny C, Siracusa J, Bourdon S, Baugé S, Koulmann N, Malgoyre A.

Aerobic training leads to well-known systemic metabolic and muscular alterations. Heat acclimation could also increase mitochondrial muscle mass. This study addresses the issue of the effects of heat acclimation combined to endurance training on metabolic adaptations in skeletal muscle. **Methods:** 32 rats were divided in 4 groups: control (C), trained (T), heat-acclimated (H) and trained with heat acclimation (H+T) for 6 weeks. Soleus muscle metabolism

was studied notably by *in situ* measurement of mitochondrial respiration with pyruvate (Pyr) or palmitoyl-coenzyme A (PCoA), in phosphorylating conditions (\dot{V}_{\max}) or not (\dot{V}_0). **Results:** Aerobic performance increased and retroperitoneal fat mass decreased with training, independently of heat exposure ($p < 0.001$ and $p < 0.001$ respectively). Citrate synthase and hydroxyl-acyl-dehydrogenase increased with endurance training ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively) without any effect of heat acclimation. Training induced the increase of \dot{V}_0 and \dot{V}_{\max} for PCoA ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively) without interference with heat acclimation. For pyruvate oxidation, the training-induced increase of \dot{V}_0 ($p < 0.01$) was limited when combined to heat acclimation (-23%, $p < 0.01$). Training and heat acclimation independently increased \dot{V}_{\max} for pyruvate (+ 60% $p < 0.001$ and + 50% $p = 0.01$ respectively) without additive effect of the combination. Heat acclimation doubled training effect on muscle glycogen storage ($p < 0.001$). **Conclusion:** Heat acclimation did not improve mitochondrial adaptations induced by endurance training in soleus muscle possibly limiting carbohydrates oxidation alteration while not facilitating fatty acid utilization. Furthermore, the increase in glycogen storage observed after HA combined exposition to endurance training without improvement of pyruvate oxidation looks like a hypoxic metabolic phenotype.

NEW FINDINGS and NOTEWORTHY

Heat acclimation did not improve mitochondrial adaptations induced by endurance training in soleus muscle neither mitochondrial content nor coupling. Heat acclimation seems specifically interfere with carbohydrate metabolism and not lipid pathway. These metabolic alterations evoke a hypoxic-like phenotype consistent with the increase of muscle glycogen content found and not associated with a concomitant increase of oxidation of pyruvate.

KEYWORDS: heat acclimation, endurance training, mitochondrial respiration, skeletal muscle metabolism cross-tolerance

INTRODUCTION

Heat acclimation (H) and endurance training (T), allow to increase endurance performance in heat by improving thermoregulatory response (Periard, Racinais et al. 2015). Others physiological adaptations required for aerobic performance as cardiovascular function are also improved by heat acclimation (Periard, Travers et al. 2016). At cellular level, Heat Shock Proteins (HSP) have been implicated in certain benefits related to endurance training

(Henstridge, Febbraio et al. 2016). In addition, both strain factors also involve their own signalling pathway. As described in heart muscle, H and T induce different alterations of myosin isoforms (Horowitz, Peyser et al. 1986, Diffie, Seversen et al. 2001) and intracellular calcium handling (Mirit, Palmon et al. 1999, Diffie, Seversen et al. 2001, Wisløff, Loennechen et al. 2001, Cohen, Kanana et al. 2007) with potentially different consequences on contraction and relaxation. Concerning metabolic alterations most studies have been interested in acute effect of heat exposure during exercise (Young, Sawka et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994, Hargreaves, Angus et al. 1996, Gagnon, Perrier et al. 2019, Maunder, Plews et al. 2019). When effect of heat acclimation was studied, time course was very short (8 days) and not long enough to observe the combined effect with endurance training on muscle metabolism (King, Costill et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994). Thus metabolic adaptations induced by heat acclimation and endurance training (H+T) could interfere and proceed in a new phenotype remaining to be specified (Kodesh, Neshet et al. 2011).

Skeletal muscle adaptations induced by aerobic training are well known. Muscle mitochondria content was shown to increase after endurance training (Holloszy 1967, Holloszy and Coyle 1984, Zoll, Koulmann et al. 2003, Zoladz and Grassi 2015), involving both size and number of mitochondria (Morgan, Cobb et al. 1971, Hoppeler, Luthi et al. 1973). The increase of some mitochondrial enzymes content enhances both carbohydrate and fatty acids oxidation. Consistently, endurance training increase intramuscular glycogen and triglycerides stores (Jeukendrup, Saris et al. 1998, Greiwe, Hickner et al. 1999). Moreover, levels of fatty acids oxidation enzymes were specifically increased (Saltin, Astrand et al. 1993, Brooks and Mercier 1994) participating to the enhancement of fatty acids oxidation which allows to spare carbohydrate stores, known as a limiting factor of performance (Molé, Oscai et al. 1971, Lundby and Jacobs 2016). Thus, endurance training induces quantitative mitochondrial adaptations which improve mitochondrial oxidative capacities and also qualitative adaptations which alter carbohydrate-lipid balance (Brooks and Mercier 1994).

Several studies showed that chronic heat exposure could improve endurance performance at room temperature (Scoon, Hopkins et al. 2007, Lorenzo and Minson 2010) suggesting adaptations other than thermoregulation *per se* can occur. Heat has been shown to stimulate Akt pathway, responsible for proteosynthesis (Liu and Brooks 2012) and could prevent muscle atrophy induced by ageing, immobilization or injury (Tamura, Kitaoka et al. 2015, Tamura and Hatta 2017, Hafen, Preece et al. 2018, Ihsan, Périard et al. 2019). Very recently, heat appeared to protect soleus muscle force by enhancing myogenic factors in a model of ischemia-induced

muscle damage (Kim, Reid et al. 2019). Overexpression of HSP 72 has been shown to reduce muscle age-related oxidative stress (Broome, Kayani et al. 2006). Besides, heat acclimation could also induce endurance-like mitochondrial adaptations. If an acute heat exposure induces an increase carbohydrate utilization, interpreted as higher reliance on CHO oxidation (Fink, Costill et al. 1975, Young, Sawka et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Carey et al. 1996, Hargreaves, Angus et al. 1996, Febbraio 2000, O'Hearn, Tingelstad et al. 2016, Gagnon, Perrier et al. 2019, Maunder, Plews et al. 2019), few studies observed that repeated heat exposition could restore lipids oxidation and limit CHO oxidation reliance as observed with training (King, Costill et al. 1985, Kirwan, Costill et al. 1987). Consistently, some studies suggested that chronic heat exposure could improve oxidative metabolism. In mice daily 30-min exposed to 40°C, 5d/w, 3weeks, Tamura *et al.* showed that skeletal muscle citrate synthase (CS) activity and mitochondrial respiratory chain complex content had increased. When compared to each solely effect, combined endurance and heat effects were increased in a higher range (Tamura, Matsunaga et al. 2014). Besides, daily heat exposure prevented skeletal muscle insulin resistance induced by high fat diet in rats, restoring glucose uptake, CS and cytochrome oxidase activities (Gupte, Bomhoff et al. 2009). However, to our knowledge, these results are not confirmed by study of mitochondrial respiration function after heat acclimation combined to endurance training. Moreover, quite surprisingly, while heat exposure was reported to increase carbohydrate utilization, capacity of skeletal muscle mitochondria to oxidize fatty acids was poorly studied and never after prolonged exposure. And yet, Kodesh et al. described an upregulation of fatty acid genes in soleus muscle after heat acclimation and training (Kodesh and Horowitz 2010).

Thus, we hypothesized that metabolic adaptations based on mitochondrial alterations induced by endurance training could be improved by combination with heat acclimation. In this work, we propose to study the respective and combined effect of endurance training and heat acclimation on aerobic performance, muscle metabolism and mitochondrial oxidation of different substrates. In this purpose, we measured the effect of H and T on carbohydrates and fatty acids utilization in permeabilised fibres of soleus muscle, a slow-twitch phenotype, well recruited during treadmill running and sensitive to heat stress (Oishi, Taniguchi et al. 2002, Montilla, Johnson et al. 2014, Ganesan, Reynolds et al. 2016, Brownstein, Ganesan et al. 2017, Ganesan, Brownstein et al. 2018).

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

This study was performed in accordance with both the Helsinki Declaration concerning the treatment of laboratory animals and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe no.129, Strasbourg, France, 1985 and Directive 2010/63/UE). It was approved by the animal ethics committee of our Biomedical Research Institute and authorized by Veterinarian Inspection of Health Service for Armed Forces.

Study consisted in a 6-week conditioning, including training and heat acclimation. Several measurements (resting metabolism RM and maximal aerobic speed MAS) were performed at the end of the conditioning. Animals were then sacrificed. Were taken both solei (SOL), blood and retroperitoneal adipose tissue (RPAT). Measurements of *in situ* mitochondrial respiration measurements were performed on soleus. Enzymatic activities and biochemical measurements were performed on soleus and plasma.

We previously used 8 animals implanted with temperature monitoring device to test the protocol of heat acclimation. For this experiment, we used 32 male Wistar rats (between mean body weight: 276 ± 5 g) obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Animals were housed 2 per cage in an artificial 12-12 light-dark cycle. After quarantine, all rats followed 1 week-habituation to treadmill. Then, they were randomly assigned to a condition, without changing previous cage repartition. Thus, four groups of 8 specimen, were constituted: control (C), heat acclimated (H), trained (T) and heat acclimated+ trained (H+T). The animals were weekly weighed and at the end of the conditioning. After lethal dose of pentobarbital (150 mg.kg^{-1}), the 2 solei were excised immediately after respiratory arrest of the animals, but before cardiac arrest then weighed. The left was immediately plunged in solution S (composition see below) to preserve vitality for mitochondrial respiration experiments and the right was frozen in liquid nitrogen for afterwards measurements (enzymology, glycogen and western blot measurements). Then, total exsanguination was realised by catheterism of abdominal aorta. Finally, retroperitoneal adipose tissue was taken, weighed and frozen in nitrogen.

Experimental conditions (figure 1)

Heat acclimation was studied on sixteen animals (H and H+T). They were exposed to 1 hour-heating, 5 days per week, during 6 weeks. They were placed in thermostated box where mean ambient temperature was maintained at 37 ± 3 °C. Exposure was always performed at the same moment in the afternoon. Previous tests, with implanted temperature monitoring device,

allowed to ensure that this heat exposure procedure warranted an increase in core temperature above 39 °C for 45 minutes.

Sixteen animals (T and H+T) followed a daily 1-hour endurance training session, 5 days per week, during 6 weeks, on treadmill. Intensity and duration progressively increased from 11.4 m.min⁻¹ for 45 min to 28.2 m.min⁻¹ for 55 min. Sessions were performed in the morning, at the same moment.

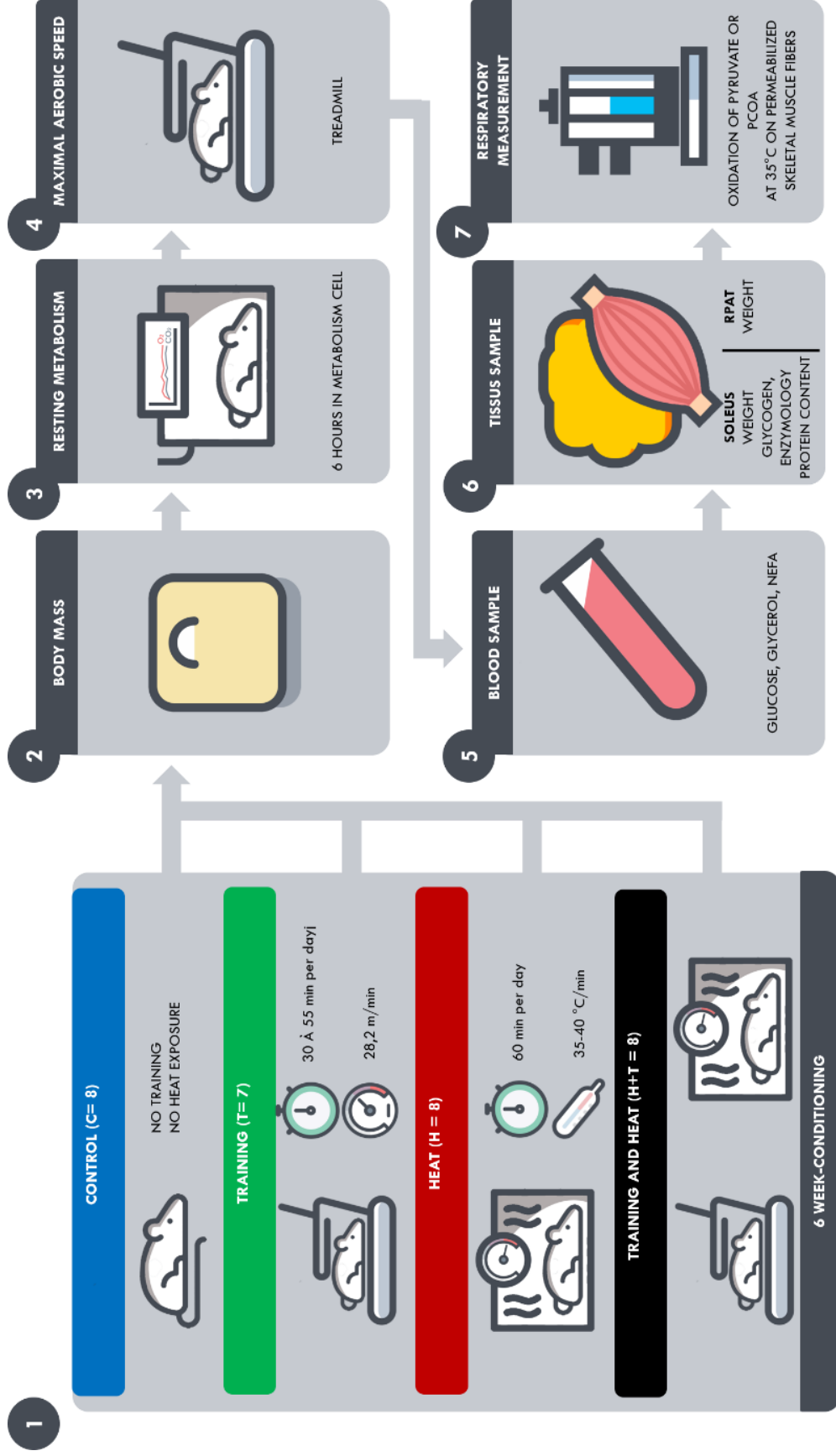
Aerobic performance measurement

Maximal aerobic running speed was assessed using incremental test. Tests were performed the last day of conditioning and 48h before animals sacrifice to prevent interference of acute exercise with respiratory measurement. Protocol consisted in increase of speed by steps of 3.5 m.min⁻¹ each 2 min up to 30 m.min⁻¹, then steps of 1.5 m.min⁻¹ each 1.5 min until rats were no longer able to run. Exhaustion was determined when animals remained near to the electric grid despite three shocks. MAS corresponded to the running speed at the last accomplished stage.

Resting metabolic rate

Rest metabolism was assayed with an open-circuit indirect calorimetry device (Metabolism Software, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) the day after the performance test, and the day before the sacrifice. Animals were placed in a metabolic chamber that was regularly flushed with fresh air at a flow rate between 0.9 and 1.2 l/min (LE400 Air Supply and Switching, Panlab Harvard Apparatus) and connected to gas analyzers for oxygen and carbon dioxide measurements (LE405 O₂/CO₂ analyzer, Panlab Harvard Apparatus). Measurements were performed on animals at distance from the last night meal, at room temperature of 22°C. They had free water access but no food access during measurements. Habituation was performed during days before to limit transfer-induced stress on the animals. To limit spontaneous activity and based on a previous study (Malgoyre, Chabert et al. 2017),

Figure 1. Design of experiment conditioning and steps



measurements were performed during diurnal time (the resting period for rodents), between 9 am and 4 pm. Data of first hour and last 30 minutes were systematically excluded to avoid artefact induced by manipulation or human presence. Moreover, period of steady-test was defined the longer consecutive time when O₂ consumption vary less than 10% variation. O₂ consumption was normalized with body weight raised to a power of 0.75 (Keesey and Powley 2008).

Biochemical Measurements

Blood chemistry. Concentrations were performed using colorimetric method. Absorbance was measured by automate (Advia 1800, Siemens). Glucose concentration was measured after glucose oxidation by glucose oxidase, using GLUO kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA). NEFA concentration was determined using RX MONZA FA 115 kit (Randox laboratories, Crumlin, UK). Glycerol concentration was measured using RX MONZA GY 105, (Randox laboratories, Crumlin, UK).

Enzyme activities were studied for citrate synthase (CS), 3-hydroxyl acyl coenzyme A dehydrogenase (3-HAD), hexokinase (HK) and lactate-deshydrogenase (LDH). For each activities, around 10 mg of frozen tissue samples were weighed and shaken in Precellys® (Precellys 24 Dual, Bertin, Montigny le Bretonneaux, France) at 5000 rpm, 2x8 sec in different extraction buffers and kept on ice at each step. For CS, extraction was performed in a buffer (50 mg.ml⁻¹) containing 5 mM HEPES (pH 8.7), 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, and 0.1% Triton X-100, and incubated for 60 min at 0°C to ensure complete enzyme extraction. CS activity was assessed at 40°C (pH = 7.5) by spectrophotometry measurement of mercaptid anion apparition before and after addition of oxoloacetate (50mM) (O4126 Sigma), as previously described by Srere (Srere 1969). For 3-HAD, the extraction was performed in a 300 mM phosphate buffer (50 mg.ml⁻¹) containing KH₂PO₄, K₂HPO₄ (pH=7.7), and 0.05% BSA. Enzyme activity was determined at 40°C by a spectrophotometric measurement of NADH disappearance, before and after addition of aceto-acetyl CoA (Sigma) in a mix of phosphate buffer (pH 7,5), containing imidazole 40mM and EDTA 200 mM as described by Lowry and Passonneau (Seidemann 1973).

For HK, extraction was performed in a phosphate buffer 300mM pH 7.7 containing 5% BSA. Enzyme activity was assessed at 25°C by a spectrophotometric measurement of NADH appearance, in a mix containing 100mM Tris HCl (pH=8), 8mM MgCl₂, 0.4mM NADP, 0.01%

DTT, 2mM glucose, 3.5UI/ml G6PDH before and after addition of ATP, as described by Lowry and Passonneau (12).

For LDH, extraction was the same as CS. Enzyme activity was assessed by transformation of pyruvate in lactate with concomitant oxidation of NADH. Disappearance of NADH was measured by spectrophotometry at 25°C in a mix phosphate buffer (pH 7.5) containing pyruvate sodium 0.63M (P2256, Sigma).

Enzyme activities are all expressed in μ moles of substrate per minute (*i.e.*, IU per gram wet weight).

Glycogen soleus content

5mg of frozen soleus samples, was homogenized (1/50) in 2N NaOH during 2 h at 37°C and 1h at 4°C and added in HCl 7.5M for 5 volumes of NaOH 2N. Samples of 50 μ L were submitted to glycogen hydrolysis by amyloglucosidase (10mg/ml) (A7420, Sigma-Aldrich) in acetate buffer (0.3M) for 2h at 37°C. Released glucose was quantified by spectrophotometric measurement of NADH production in the presence of hexokinase (H4502 Sigma) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6378 Sigma) according to Bergmeyer's method (Passonneau and Lauderdale 1974, Bergmeyer and Grassl 1983) and as previously described in (Banzet, Koulmann et al. 2009). Glycosyl units were quantified by comparison to a standard curve of known glycogen concentration.

Analysis of proteins content by Western blotting

Muscle samples from soleus were homogenized in a 1/100 dilution using an extraction buffer containing 0.05M Tris-HCl (T 5941), 0.1M NaCl, 2mM EDTA (E5134), 2mM EGTA (E4378), 1mM DTT (D0632), 0.05M NaF (S7920), 0.12 μ M okadaic acid (O9381, 3mM Benzamidine (B5606), 0.05M Glycerophosphate (G5422) and 1mM PMSF (P7626, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), added with anti-protease cocktail at 1/200, anti-phosphatase cocktail at 1/200 (respectively 539134-1S, 524625-1S, Merck chemicals, Fontenay sous Bois, France), and shaken with Precellys® as described above for enzymatic activity.

Samples were cooled in ice for 12 h and then centrifugated at 12000 g for twenty minutes at 4°C. Whole protein concentrations was quantified by bicinchoninic acid method (kit BCA Protein Assay 23252 Thermo Pierce) according to the manufacturer's protocols. Equal amounts of protein (25 μ g) were loaded and separated using SDS-PAGE procedures (7.5-12% polyacrilamid gels) and then transferred to a nitrocellulose membrane using a transfer apparatus

according to the manufacturer's protocols (Bio-Rad). Membranes were blocked with incubation in 5% nonfat milk in TBST (25 mM Tris, pH 7.5, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.5% Tween 20) for 2 hours. Membranes were incubated overnight with primary antibodies (Table 1) at 4 °C. For phosphorylated protein, NaF (S7920 Sigma) at 50 mM was added at each step. Membranes were washed three times for 10 min in TBST, incubated with a 1:10000 dilution of secondary antibodies (horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies) for 1 h. Blots were washed with TBST three times for 10 min in TBST and developed with the ECL system (Bio-Rad, Saint Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's protocols. Blots were scanned using Chemidoc XRS+ (Biorad, Saint Quentin en Yvelines, France). For each gel, a molecular weight ladder (Precision Plus All Blue Prestained Protein Standards from Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, Netherlands; no.1610373) and an internal control (mix of all control group specimen) were also loaded. Dosimetry of bands of molecular weight interest corresponding to each antibody were quantified with Quantity One (version Windows, Bio-Rad) and normalized to the internal control (software ImageLab).

Measurement of *in Situ* Mitochondrial Respiration

Measurements were performed at 35°C in chambers the temperature of which was tightly controlled by thermostats. Mitochondrial respiration was studied *in situ* using a Clarke-electrode (Hansatech Oxygraph Instruments, Norfolk, UK), as previously described (Kuznetsov, Veksler et al. 2008). Freshly taken muscles were stored and the fibres separated under a binocular microscope in solution S (see below for composition) at 4°C. Fibres were then permeabilized in solution S with saponin (50 µg.ml⁻¹) for 30 min and then stored 15 min in solution S, always at 4°C. Before respiration measurements, some fibres were rinsed three times for 5 min in solution R (see below for composition), containing no energy source for respiration and washing out any remaining energetic substrates, such as adenosine diphosphate (ADP) or creatine phosphate (PCr). A few quantity of fibres were placed in the well of an oxygraph containing 1.5 ml solution R with continuous stirring. The decrease in O₂ concentration in the well reflected fibre respiration and the slope represented the rate of oxygen consumption. In respiration media were added for pyruvate oxidation measurements 2mM pyruvate and 4 mM malate and, for PCoA 0.4mM palmitoyl-CoA, 0.5mM malate and 2 mM carnitine. Thus, we measured the non-phosphorylating respiration rate (Pyr- \dot{V}_0 and PCoA- \dot{V}_0) in the absence of ADP. Then, 2 mM ADP was added to get non-limiting concentration for mitochondrial respiration (Zoll, Sanchez et al. 2002, Ponsot, Dufour et al. 2006, Pesta and Gnaiger 2012, Ojuka, Andrew et al. 2016, Martins, Ricardo et al. 2018). The negative slope of

the respiration curve during this phase corresponded to the maximal respiration rate for Pyr and PCoA ($\text{Pyr-}\dot{V}_{\max}$ and $\text{PCoA-}\dot{V}_{\max}$). The slope was measured once the reaction was stabilized, after substrate addition and then after ADP addition.

After completing the measurements, the fibres were dried and weighed to express the respiration results in $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ dry weight. Cytochrome C (cyt C) was systematically added after the last addition of substrate and before that of the inhibitor to verify the preservation of mitochondrial outer membrane. The results were not considered if cyt C induced an increase in the rate of respiration higher than 10% of the previous rate. Measurements were performed in duplicate for each sample.

Solutions S and R, $\text{pH} = 7.1$, contained 2.77 mM CaK_2EGTA , 7.23 mM K_2EGTA , 6.56 mM MgCl_2 (1 mM free Mg^{2+}), 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, and 50 mM K-methane sulfonate (160 mM ionic strength). Solution S also contained 3 mM phosphate and 2 mM ADP (Zoll, Sanchez et al. 2002, Ponsot, Dufour et al. 2006, Martins, Ricardo et al. 2018). Bovine Serum Albumin (BSA) was added to solution R just before respiration (Ou and Leiter 2004, Oliveira, Cunha et al. 2015). For the Pyr media, the BSA concentration was $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. For the PCoA media, the BSA concentration in R was $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (ratio 4.4) to obtain a FA/albumin ratio < 5 and to prevent any detergent effects of the FAs. This concentration was determined in a pilot study in which various BSA concentrations (2, 4, and $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) were tested.

Statistical analysis

Data are presented as the means \pm SEM of values per animal, from either the mean of duplicates or one sole value after data validation. Two-way ANOVA was performed to assess the effect of heat acclimation and training. When appropriate, between groups comparison was performed by Newman-Keuls test. Differences were considered significant when $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, or $p < 0.001$ *** for HA and $p < 0.05$ \$, $p < 0.01$ \$\$, or $p < 0.001$ \$\$\$ for training.

Table 1. Reference and conditions of utilization of primary antibodies

	Antibodies reference	% acrylamide in gel	Dilution antibody	HRP-conjugated secondary antibody	ECL substrate
Anti-FABP4 antibody	ab66682 Abcam	15%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity Max WB ECL Bio Rad
Anti-Pyruvate Dehydrogenase E1-alpha subunit (phospho S293) antibody [EPR12200]	ab177461 Abcam	10%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
Anti-Pyruvate Dehydrogenase E1-alpha subunit antibody [EPR11098]	ab168379 Abcam	10%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail	ab110411 Abcam	15%	1/500	HRP anti-mouse antibodies ab205719_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
Anti-Adenine Nucleotide Translocase 1 / ANT 1 antibody	ab110322 Abcam	10%	1/1000	HRP anti-mouse antibodies ab205719_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
Anti-CPT1A antibody	ab128568 Abcam	10%	1/500	HRP anti-mouse antibodies ab205719_Abcam	Clarity Max WB ECL Bio Rad
Anti-CPT2 Antibody	ABS85 Abcam	10%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
Anti-Uncoupling Protein 3 Antibody	AB3046 Abcam	10%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
HSP70 Antibody	4872S Cell signaling	10%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
Anticorps AATM (E-7)	sc-271702 Santa cruz	10%	1/500	HRP anti-mouse antibodies ab205719_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
Phospho-GSK-3alpha/beta (Ser21/9) Antibody	9331S Ozyme	10%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad
GSK-3beta (27C10) Rabbit mAb	9315S Ozyme	10%	1/1000	HRP anti-rabbit antibodies ab6721_Abcam	Clarity WB ECL Bio Rad

RESULTS

Anthropometrics and metabolic rest data

After 6 weeks, body weight and adipose tissue mass of trained groups were decreased compared to sedentary groups independently of heat acclimation (-43% of fat retroperitoneal fat mass, $p < 0.001$) while no difference existed for soleus mass (Table 2).

Glycerol and free fatty acids concentrations in plasma are similar but rest glycemia was significantly lower in trained groups (-22%, $p < 0.001$) compared to sedentary animals. (Table 4) Nevertheless, resting metabolic rate (O_2 consumption) and fuel utilization (assessed through RQ) were not different (Table 3).

Performances and heat acclimation data

As expected, maximal aerobic speed (MAS) was increased by endurance training (+80%, $p < 0.001$) but without any interaction with heat acclimation. (Table 3).

More surprisingly, HSP70 protein content in soleus muscle was not increased neither by training nor by heat exposure (Table 6).

Muscle oxidative capacities, mitochondrial content and dynamic

Not surprisingly, citrate synthase activity considered as a good marker of mitochondrial mass was increased of 54% ($p < 0.001$) in soleus muscle by training with no effect of/or interaction with heat acclimation (Table 5).

Protein content of the different respiratory chain complexes (electron transport chain: complex I, III, IV and ATP synthase: complex V) did not significantly increase with training. We noticed an interaction between heat acclimation and training for Cytochrome C oxidase content (complex IV) with an elevation in the group trained and heat exposed compared to the group only trained (five times higher, $p < 0.05$) (Table 6).

Cellular Parkin ($p < 0.01$) and DRP-1 ($p < 0.05$) proteins, respectively markers of mitophagy and mitochondrial fission were decreased in trained groups compared with untrained without any interference with heat acclimation. No change was found for mitofusin, a marker of mitochondrial fusion and PINK, a marker linked to autophagy activation by damaged mitochondria (Table 7).

Table 2. Morphological data in male rats: effect of 6-week conditioning by endurance training and heat acclimation.

	C (8)	H (8)	T (7)	H+T (8)
Initial body weight	277.88 ± 11.20	286.25 ± 12.27	269.14 ± 8.89	270.50 ± 11.79
Final body weight	395.25 ± 6.86	386.75 ± 10.52	361.71 ± 6.90	364.25 ± 6.81
Soleus weight	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01
Adipose tissue weight	8.19 ± 0.68	7.86 ± 0.85	4.22 ± 0.34	4.97 ± 0.52

Data are expressed as the means ± SEM. per group (n). C: control. H: heat-acclimated. T: trained. H+T: heat-acclimated and trained. Analyses of variance (ANOVA) were performed to compare the effect of two factors (training, heat acclimation) for each weight. Training effect was observed without interaction with heat acclimation.

Table 3. Maximal aerobic speed (MAS) and rest indirect calorimetry measurements in male rats at the end of 6-week conditioning by endurance training and heat acclimation.

	C (8)	H (8)	T (7)	H+T (8)
MAS (m/min)	25.26 ± 1.59	28.30 ± 1.08	49.10 ± 1.35	47.16 ± 2.23
RQ	0.85 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.85 ± 0.01
VO2 (ml/min/kg ^{0.75})	13.88 ± 0.46	14.24 ± 0.26	14.81 ± 0.22	14.53 ± 0.33
VCO2 (ml/min/kg ^{0.75})	11.84 ± 0.47	12.39 ± 0.28	12.75 ± 0.15	12.35 ± 0.31

Data are expressed as the means ± SEM. per group (n). C: control. H: heat-acclimated. T: trained. H+T: heat-acclimated and trained. ANOVA were performed to compare the effect of two factors (training, heat acclimation) for each variable. Training effect was observed without interaction with heat acclimation.

Table 4. Blood parameters at rest in male rats after 6-week conditioning by endurance training and heat acclimation.

	C	H	T	H+T
Glucose (g/l)	2.12 ± 0.07 (7)	2.14 ± 0.16 (8)	1.58 ± 0.07 (7)	1.77 ± 0.14 (8) Training effect (p=0.001)
Glycerol (µmol/l)	65.92 ± 4.48 (7)	104.97 ± 20.35 (8)	60.03 ± 5.49 (7)	62.45 ± 10.48 (8)
NEFA (mmol/l)	0.14 ± 0.02 (7)	0.21 ± 0.06 (7)	0.12 ± 0.02 (6)	0.09 ± 0.01 (6)

Data are expressed as the means ± SEM. per group (n). C: control. H: heat-acclimated. T: trained. H+T: heat-acclimated and trained. ANOVA were performed to compare the effect of two factors (training, heat acclimation) for each concentration. Training effect was observed without interaction with heat acclimation.

Table 5. Maximal activities of citrate synthase (CS), 3-hydroxyl acyl coenzyme A dehydrogenase (3-HAD), hexokinase (HK) and lactico-dehydrogenase (LDH) of male rat soleus muscle.

	C	H	T	H+T
CS	22.20 ± 1.28 (7)	26.82 ± 1.67 (8)	37.64 ± 1.85 (6)	37.61 ± 2.68 (8) Training effect p<0.001
HAD	24.40 ± 0.58 (8)	24.50 ± 1.23 (7)	27.10 ± 1.38 (7)	28.32 ± 1.38 (8) Training effect p<0.05
HK	0.89 ± 0.19 (7)	0.84 ± 0.14 (8)	1.03 ± 0.07 (6)	0.87 ± 0.17 (7)
LDH	135.50 ± 16.97 (8)	144.16 ± 6.64 (8)	111.44 ± 11.71 (7)	129.30 ± 5.80 (8) Training effect p<0.05

Data are expressed as means ± SEM. UI per g of fresh tissue. Two-factor ANOVA was performed to compare the effect of heat and training on protein content. There was no interaction between heat-acclimation and training effects

Table 6. Proteins expression of complexes I, II, III and V of mitochondrial respiratory chain in soleus of male rats.

	C	H	T	H+T
CI	0.91 ± 0.21 (8)	1.10 ± 0.16 (7)	1.27 ± 0.18 (6)	1.20 ± 0.08 (8)
CII	0.84 ± 0.23 (8)	0.99 ± 0.15 (7)	1.30 ± 0.20 (6)	1.13 ± 0.11 (8)
CIII	1.16 ± 0.09 (7)	1.12 ± 0.12 (7)	1.27 ± 0.06 (7)	1.10 ± 0.05 (8)
CV	1.70 ± 0.53 (6)	2.19 ± 0.48 (8)	2.14 ± 0.44 (7)	1.44 ± 0.27 (8)

Data are expressed as means ±SEM, in fold standard. Control (C), heat-acclimated (H), trained (T) and heat + trained (H+T) animals. Two-factor ANOVA was performed to compare the effect of heat and training on protein content. There was no interaction between heat-acclimation and training effects.

Table 7. Expression of proteins involved in mitochondria remodeling in soleus of male rats.

	C	H	T	H+T
MF	0.63 ± 0.15 (7)	0.38 ± 0.04 (6)	0.77 ± 0.19 (7)	0.86 ± 0.26 (8)
PRK	1.55 ± 0.20 (8)	1.33 ± 0.25 (8)	0.85 ± 0.10 (7)	0.84 ± 0.22 (8) Training effect (p<0.001)
DRP	0.73 ± 0.14 (8)	0.60 ± 0.14 (8)	0.43 ± 0.12 (7)	0.34 ± 0.11 (8) Training effect (p<0.05)
PINK	0.66 ± 0.12 (7)	0.68 ± 0.16 (7)	0.47 ± 0.10 (7)	0.47 ± 0.12 (8)

Data are expressed as means ±SEM, in fold standard. Control (C), heat-acclimated (H), trained (T) and heat + trained (H+T) animals. Two-factor ANOVA was performed to compare the effect of heat and training on protein content. There was no interaction between heat-acclimation and training effects. MF : mitofusin, PRK: parkin, DRP-1: dynamin-related protein 1, and PINK-1: PTEN-induced putative kinase 1.

Table 8. Expression of proteins involved in carbohydrates metabolism and fatty acids mitochondrial in soleus of male rats.

	C	H	T	H+T	
PDH	0.82 ± 0.15 (8)	0.64 ± 0.14 (8)	1.08 ± 0.24 (7)	1.01 ± 0.16 (8)	Training effect (p=0.057)
P-PDH	1.01 ± 0.15 (8)	1.07 ± 0.15 (8)	1.25 ± 0.19 (7)	1.22 ± 0.18 (8)	
GSK	1.12 ± 0.18 (8)	1.20 ± 0.20 (8)	1.20 ± 0.15 (7)	0.89 ± 0.22 (8)	
P-GSK	0.25 ± 0.10 (6)	0.22 ± 0.04 (7)	0.36 ± 0.11 (7)	0.22 ± 0.04 (8)	
CPT1	0.77 ± 0.16 (8)	0.67 ± 0.19 (8)	0.90 ± 0.07 (7)	0.96 ± 0.26 (8)	
CPT2	0.89 ± 0.08 (8)	0.75 ± 0.05 (7)	0.90 ± 0.07 (7)	0.74 ± 0.06 (7)	Heat acclimation effect (p<0.05)

Data are expressed as means ±SEM, in fold standard. Control (C), heat-acclimated (H), trained (T) and heat + trained (H+T) animals. Two-factor ANOVA was performed to compare the effect of heat and training on protein content. There was no interaction between heat-acclimation and training effects. PDH: pyruvate dehydrogenase, P-PDH: phosphorylated PDH (E1 subunit), GSK: glycogen synthase kinase, P-GSK: phosphorylated GSK, CPT: carnitine palmitoyl transferase

Table 9. Expression of putative protective proteins for oxidative phosphorylation, in soleus of male rats.

	C	H	T	H+T
HSP-70	1,00 ± 0,10 (8)	0,93 ± 0,03 (6)	1,25 ± 0,15 (7)	1,14 ± 0,17 (7)
UCP-3	1,01 ± 0,13 (8)	0,96 ± 0,16 (8)	1,07 ± 0,12 (7)	1,04 ± 0,18 (7)
ANT-1	0,50 ± 0,07 (8)	0,65 ± 0,18 (8)	0,66 ± 0,14 (7)	0,56 ± 0,06 (8)

Data are expressed as means ±SEM, in fold standard. Control (C), heat-acclimated (H), trained (T) and heat + trained (H+T) animals. Two-factor ANOVA was performed to compare the effect of heat and training on protein content. There was no interaction between heat-acclimation and training effects. UCP-3: uncoupling protein 3; ANT-1: adenine nucleotide translocase 1.

Glycolytic flux and carbohydrate oxidation

As expected, elevation of respiration with Pyruvate was found in soleus with training for \dot{V}_0 and \dot{V}_{\max} (respectively $p < 0.005$ and $p < 0.05$). Nevertheless, we found an interaction of training with heat acclimation (interaction $p < 0.01$ for Pyr- \dot{V}_0 and $p < 0.001$ for Pyr- \dot{V}_{\max}), thus the effect of training on pyruvate oxidation was only observed in the group not exposed to heat condition. Increase of Pyr- \dot{V}_0 with endurance training is limited by combination with heat acclimation, +80% in heat unacclimated groups vs + 4% in the heat acclimated groups resulting in a 23% less increase of Pyr- \dot{V}_0 in H+T vs T group ($p < 0.05$). Pyr- \dot{V}_{\max} in the H group and in the H+T group are significantly increased compared with the control group (respectively +50%; $p < 0.005$ and +30%; $p < 0.05$) but with absolutely no synergetic effect of heat acclimation and endurance training (Figure 3).

As usual, we showed a global effect of training in soleus glycogen ($p < 0.05$) content but interestingly we also found an independent effect of heat acclimation ($p = 0.01$) with no interaction). This is obvious when considering glycogen content in the H+T group which is twice than in the others groups. Nevertheless, we did not observe either alteration of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) protein or, of the ratio between the phosphorylated form (that inactivate glycogen synthase) and the total protein content. HK activity was not different between groups and the ratio of CS/HK activities only found the training effect existing with CS ($p = 0.01$). Total LDH activity was slightly decreased of 15% with training independently of heat exposure ($P < 0.05$) (Figure 4).

If pyruvate deshydrogenase (PDH) content trend to be increased by training ($p = 0.057$), no alteration was found in the Ser-phosphorylated form of this protein and the functional ratio of PDH total/ phosphorylated form was unchanged with training or acclimation. (Table 8).

Fatty acids flux and oxidation

We found an increase of mitochondrial oxidation of PCoA with training (+ 18%; $p = 0.01$ for PCoA- \dot{V}_{\max}) with no effect of heat acclimation *per se* or even interaction. (Figure 3).

Samely, HAD activity increased with training + 13 %; $p = 0.01$ and the ratio of CS/HAD activity was unchanged (Table 5).

CPT-1 and complex II of respiratory chain protein content were unaltered with conditioning while CPT-2 content was decreased with heat acclimation (- 17%; $p < 0.05$) (Table 8).

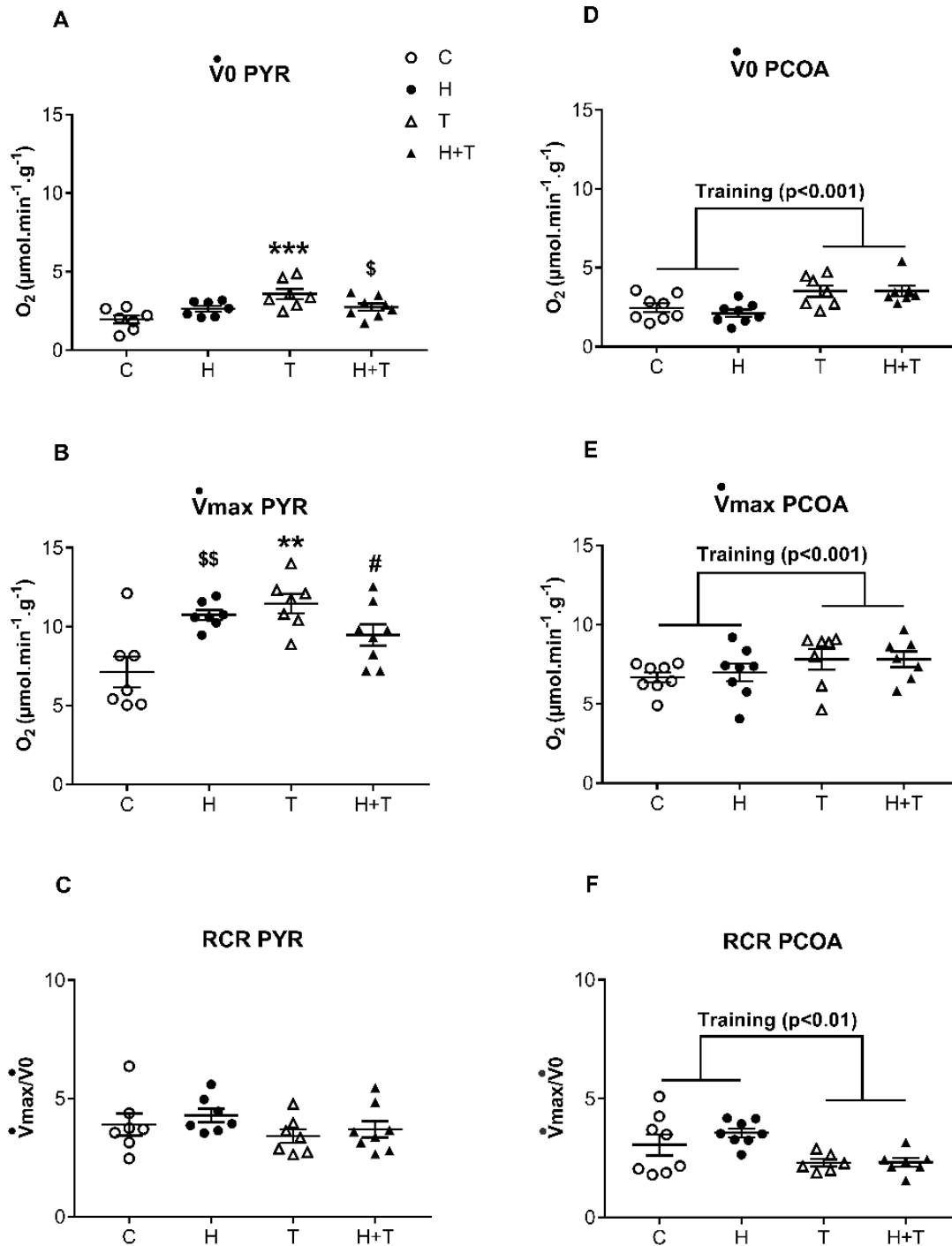


Figure 3. The effect of heat acclimatization and endurance training on *in situ* mitochondrial respiration in permeabilised soleus fibres of male rats. Respiration rates were measured in the absence (\dot{V}_0) or in presence of ADP (\dot{V}_{max}), for palmitoyl-coenzyme A + carnitine and for pyruvate substrates. Non-phosphorylating (\dot{V}_0) and phosphorylating (\dot{V}_{max}) rates and the respiratory control ratio (RCR) corresponding to the $\dot{V}_{max} / \dot{V}_0$ ratio in control group (open circles), heat-acclimated group (closed circles), trained group (open triangles) and heat-acclimated and trained group (closed triangles) for pyruvate (A,B,C) and for PCoA (D,E,F) are presented. Every plot represents the value for

one animal. The lines represent the means for all animals \pm SEM. Analysis by 2 factor- ANOVA was performed to compare the effect of heat and training on respiration parameters of both substrates. Post-hoc analysis was performed with Newman-Keuls. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$: different from heat exposition-matched group. \$ $p < 0.05$. \$\$ $p < 0.01$: different from training-matched group. # Different from control group

Mitochondrial quality and coupling (Figure 3, Table 9)

Pyr-ACR was unchanged whatever the condition while PCoA-ACR decreased of 30% with training ($p < 0.005$) (Figure 3). Neither UCP3 or ANT-1 protein expression were altered with training or heat exposure and there was no more difference between group in the ratio between complex I content and ATP synthase content (Table 9).

We found an impairment of the ratio $\text{Pyr-}\dot{V}_{\text{max}} / \text{CS}$ with training ($P < 0.05$) without effect of heat acclimation *per se* but a trend for interaction with training ($p = 0.08$).

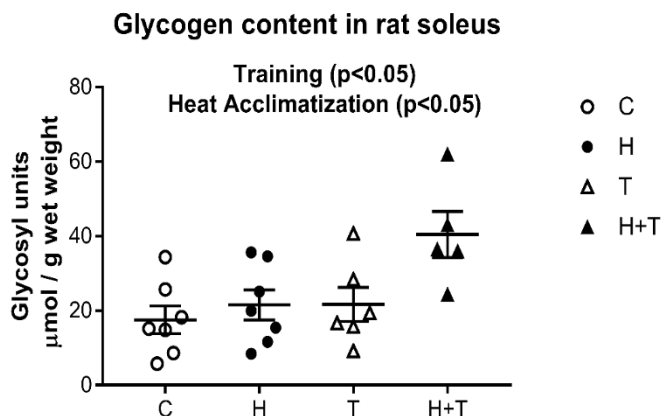


Figure 4. Effect of heat acclimation and aerobic training on soleus

glycogen content of male rats.

Measurements were performed on control (open circle), heat-acclimated (closed circle), trained (open triangle) and heat + trained (closed triangle) animals. Each plot represents the value for one animal. Glycogen concentration is expressed in micromoles of glycosyl units per gram of muscle (wet weight). The lines represent the means for all animals \pm SEM. Two-factor ANOVA was performed to compare the effect of heat and training on respiration parameters of both substrates. There was no interaction between heat-acclimatization and aerobic training.

DISCUSSION

In this study, we were for the first time interested in the effect of endurance training combined to heat acclimation on mitochondrial adaptations taking into account quantitative and qualitative alterations for carbohydrates and fatty acids.

First of all, we found classical effect of endurance training on anthropometry, performance and skeletal muscle mitochondrial adaptations. Thus fat mass and rest glycaemia were decreased. MAS was increased as well as mitochondrial content and maximal oxidation for pyruvate or PCoA.

Whatever the substrate, heat acclimation and endurance training have no additive effect on mitochondrial oxidation. Nevertheless, while absolutely no interaction was found between endurance training and heat acclimation with PCoA, training and heat exposure seem interfere with pyruvate oxidation and carbohydrates pathway. Thus, effect of training on $\text{Pyr-}\dot{V}_0$ and $\text{Pyr-}\dot{V}_{\max}$ were only found in the group trained but not when heat acclimation is combined. However even if no *per se* heat acclimation effect was found, $\text{Pyr-}\dot{V}_{\max}$ in the H group is higher than in the C group and not different from the H+T group.

Moreover, muscle glycogen content was increased by training but also by heat exposure with a storage doubled in the group trained and heat acclimatized. If no molecular explanation of this adaptation can be given, this could evoke a metabolic phenotype previously described in hypoxia: increased of glycogen content while no correlated elevation of pyruvate oxidation is observed. Interestingly, we also observed an interaction between heat acclimation and training in the complex IV of respiratory chain protein content as already described in response to hypoxia. Nevertheless, this isolated increased protein expression is not associated with improvement of mitochondrial respiration or efficiency.

Finally, this metabolic phenotype of skeletal muscle after heat acclimation combined to endurance training do not improve substrate oxidation more than training effect *per se* but could facilitate glycolytic flux.

No additive effect of heat acclimation on quantitative mitochondrial adaptations induced by endurance training.

As expected, endurance training induced an increase of mitochondrial oxidative capacities as well for pyruvate or for PCoA oxidation. Consistently, CS activity, which is known to assess the mitochondrial mass (Larsen, Nielsen et al. 2012), increased in trained groups.

Surprisingly we did not find significant elevation of HSP 70 protein in soleus muscle after heat acclimation. Nevertheless, the longer period of heat acclimation used in our study compared to others protocols can be an explanation (Tamura, Matsunaga et al. 2014). Moreover, it was well established that if slow-twitch muscle have a higher basal level of HSP, this pool is less inducible by heat, and lasts less long than in fast-twitch muscles (Oishi, Taniguchi et al. 2002, Brownstein, Ganesan et al. 2017, Tamura, Matsunaga et al. 2017). Other authors failed to find increase of HSP70 mRNA in soleus (Kodesh 2010) after the last exposure of heat acclimation.

Our results argue for training-induced mitochondrial biogenesis independently of any heat acclimation effect. Tamura & al. (Tamura, Matsunaga et al. 2014) were already interested in this combination of endurance training and heat acclimation. Conversely to us, they reported synergistic effect of heat acclimation and training on respiratory complexes proteins content and CS activity. Nevertheless, oxidation rate and mitochondrial function were not assessed in their study. Despite potential differences between animal species (rats here vs mice for Tamura & al), endurance training and heat acclimation protocol, our results did not confirm this synergistic effect of heat acclimation on mitochondrial biogenesis. Our results are consistent with those found at cellular level where PGC-1 α nuclear protein content, the main effective factor of mitochondrial biogenesis is similar after exercise at room temperature or in hot condition (Heesch, Shute et al. 2016).

This lack of additive effect of heat and training effect on mitochondrial biogenesis must be distinguished from combination of heat with situations where impairment of mitochondrial functionality exists like in age-dependent sarcopenia, high fat diet or atrophy induced by immobilization. In these situations responsible for loss of mitochondrial function, endoplasmic reticulum stress, and increased mitophagy, several studies showed that heat exposure was able to prevent negative effect on mitochondria (Gupte, Bomhoff et al. 2009, Tamura, Kitaoka et al. 2015, Tamura, Matsunaga et al. 2017, Hafen, Preece et al. 2018).

Thus, we assume that heat acclimation did not enhance or prevent training-induced adaptations on mitochondrial content.

Mitochondrial efficiency, quality and dynamic observed with endurance training are not altered by heat acclimation.

We observed a significant 30% decrease of RCR for PCoA with training consistent with an alteration of oxidative phosphorylation coupling. Indeed, several studies reported training-induced uncoupling for fatty acid oxidation. Sparks & al. showed that the training-induced

increase of insulino-sensitivity was associated with the increase of FA-induced uncoupling (Sparks, Gemmink et al. 2016). Nevertheless, this putative training induced uncoupling for fatty acid was not increased by heat acclimation as we expected because of the acute effect of heat on fatty acids uncoupling previously found (Tardo-Dino, Tournon et al. 2019). Kodesh et al. suggested that heat acclimation could improve contractility efficiency of skeletal muscle and heart in order to limit heat production during contraction (Kodesh and Horowitz 2010, Kodesh, Nesher et al. 2011). Our data on RCR do not support that improvement of oxidative phosphorylation with heat acclimation could participate to this better efficiency which is probably more related to calcium signalling rather than to mitochondrial adaptations.

Here, neither alteration of UCP-3 or ANT-1 protein expression can explain this decrease of RCR. This rather evokes a functional alteration which is consistent with the specific effect found with fatty acids and not existing with CHO.

Concerning qualitative adaptations, we found a decrease of the ratio $\text{Pyr-}\dot{V}_{\text{max}}/\text{CS}$ ($p=0.02$) with training without significant interaction with heat acclimation. At least, addition of heat acclimation did not prevent the decrease of $\text{Pyr-}\dot{V}_{\text{max}}/\text{CS}$ observed with endurance training. Our results did not argue for alteration of mitochondria quality with heat acclimation.

Nevertheless, an impairment of the autophagosome complex has been suggested with heat exposure (Brownstein, Ganesan et al. 2017). Even mitochondrial dynamics was not our main purpose, we measured the content of key proteins and observed a decrease of DRP1, involved in mitochondria fission and PRK, a key enzyme of the mitophagy pathway, induced by training but independent of heat acclimation. Based on current scientific knowledge, DRP-1 decrease appears consistent with preventing mitochondrial fission training-induced (Drake, Wilson et al. 2016, Tanaka, Nishimura et al. 2019). Nevertheless, taking into account post translational regulation of DRP1 (Tanaka, Nishimura et al. 2019) and subcellular compartmentation, our results, only measuring total DRP1 protein content in whole muscle must be interpreted very cautiously. PINK1/PRK pathway allows to maintain quality of mitochondria by recycling parts of senescent organelles and the decrease of PRK content, meaning a decrease in turn-over could seem paradoxical. However, if several studies showed acute aerobic exercise could increase mitophagy (Drake, Wilson et al. 2016, Tanaka, Nishimura et al. 2019), the effect of endurance training is more controversial and mitophagy sometimes described reduced (Chen, Erlich et al. 2018). Here, we have no argument to confirm this failure of mitophagy induced by heat and its consequences on mitochondria functionality.

Nevertheless, mitochondrial function seems to have been differently affected by training, depending on heat acclimation state, considering the nature of the substrate used.

Effect of heat acclimation combined to endurance training on mitochondrial oxidation depends on the nature of the substrate oxidized

Alterations of PCoA- \dot{V}_0 and PCoA- \dot{V}_{\max} in the H+T group is similar to the T group (barely -7 and -5%, ns respectively). Thus, PCoA oxidation rates increased in both trained groups, heat acclimated or not. HAD activity was increased by endurance training with similar size effect as V_{\max} PCoA (respectively +13% and +18%). Even if CPT-1 protein content was not increased and CPT-2 decreased by 17% by heat acclimation, we could interpret this result as CPT-1 and CPT-2 content are not limiting factor in soleus muscle for this range of increase of PCoA oxidation.

Conversely, Pyr- \dot{V}_0 and Pyr- \dot{V}_{\max} in the H+T group are respectively 23% lower ($p < 0.05$) and 17% (ns) lower compared to the T group. While, we measured a 40% increased of CS activity in the H+T group compared to the H group, Pyr- \dot{V}_{\max} was not increased and even decreased of 12% (ns), resulting in a 36% decrease of Pyr- \dot{V}_{\max} /CS ($p < 0.01$ in T test). Compared to the C group, the 65% increase of CS activity in the T group is consistent with the increase of Pyr- \dot{V}_{\max} of 60% whereas for the same increase of CS in the H+T group, Pyr- \dot{V}_{\max} increased of an half. These argue in favour of a specific limiting factor of heat acclimation regard of pyruvate oxidation independent of mitochondrial mass and biogenesis. Even we did not notice any alteration of PDH protein content and phosphorylated form in T+H group, we can't absolutely turn down the hypothesis that pyruvate entrance into mitochondria could be a limiting factor. This would have been very interesting to add dichloroacetate in the respiratory medium with pyruvate to assess the functionality of this step.

A putative specific heat effect on CHO metabolism in skeletal muscle

Even if we found no global heat acclimation effect on pyruvate oxidation, Pyr- \dot{V}_0 and Pyr- \dot{V}_{\max} in the H group respectively increased by 33% ($p = 0.07$) and 50% ($p < 0.05$) vs the control group with no further enhancement when combined to training. Heat exposure may induce mitochondrial biogenesis as suggest in previous studies *in vitro* as well as *in vivo* (Liu and Brooks 2012, Tamura, Matsunaga et al. 2014). Nevertheless, this effect remains controversial in human skeletal muscle (Zak, Shute et al. 2017). In our data, this putative heat effect was only found for pyruvate oxidation (significant for Pyr- \dot{V}_{\max}), did not exist for PCoA and is stronger

that the concomitant increase of CS activity observed (+20%, ns). For all these reasons, a real mitochondrial biogenic effect of heat is quite uncertain in our study.

Here, we noticed that glycogen storage was increased in the H+T group and reached about 2-fold level of the groups only trained or heat acclimated. Acute heat stress is well known to inflate glycogen use at exercise (Fink, Costill et al. 1975, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994, Hargreaves, Angus et al. 1996). Several studies (Young, Sawka et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994, Hargreaves, Angus et al. 1996, O'Hearn, Tingelstad et al. 2016) have suggested, an exercise performed at heat, results in CHO oxidation to a greater extent compared to the same exercise performed at room temperature while the elevation of blood lactate levels conveyed a glycolysis increased (Young, Sawka et al. 1985, Febbraio, Snow et al. 1994, Febbraio, Snow et al. 1994, Hargreaves, Dillo et al. 1996, Gonzalez-Alonso, Calbet et al. 1999, Parkin, Carey et al. 1999). But to the best of our knowledge, our results are the first to prove an increase of glycogen content after a chronic exposure combining endurance training and heat acclimation. This increase of glycogen content was not associated with a concomitant elevation of pyruvate oxidation capacities in H+T, which is in favour of a facilitation of glycolysis without the same alteration downstream (that is for pyruvate oxidation). Kodesh et al. already described an upregulation of genes encoding for glycolysis rate-limiting enzymes in soleus muscle of trained and heat exposed rats (Kodesh 2010) but we were unable to show any alteration of HK or total LDH activity specifically heat-induced. Unfortunately, we failed to measure other markers of glycolysis pathway: LDH isoforms or phosphofructokinase activity. It was not possible to measure directly glycogen storage before and after the aerobic speed trial but it would have been interesting to assess lactate concentration at the end of this trial even the very different level of performance and absolute intensity reached in the trained and untrained groups would have made complicated its interpretation.

In our experiment, heat acclimation was applied few hours after exercise. A recent study showed that passive muscle heating during recovery could improve glycogen resynthesis rate (Cheng, Willis et al. 2017). Exercise glycogen synthesis is mediated in part by dephosphorylation and activation of glycogen synthase. Even if a downregulation of the activity of Glycogen Synthase Kinase (GSK-3) was already described with heat (Moon, Duddy et al. 2003), we found no alteration of GSK-3 phosphorylated-Ser (inactive form) protein content in the group T+H. Some other explanations can yet be proposed. It's likely that the systemic hormonal effects of heat as the hyperadrenergic phasis during exercise increased glucose availability in recovery period. Added to an increase of insulin sensitivity described after heat

acclimation in skeletal muscle (Gupte, Bomhoff et al. 2009), glycogenogenesis could be facilitated. Besides, part of improvement of insulin sensitivity induced by endurance training in rats with type 2 diabetes is blunted by a cold exposure (Tsuzuki, Kobayashi et al. 2017). Moreover, independently of insulin action, heat could *per se* activate PI3K/Akt pathway (Moon, Duddy et al. 2003, Liu and Brooks 2012), the main anabolic pathway for proteosynthesis but also for glycogen resynthesis (GSK-3 is a target of Akt) and consistent with the increase of glucose uptake in skeletal muscle shown with heat exposure (Koshinaka, Kawamoto et al. 2013). Even if mechanisms must be specified, we assume that heating may potentiate post-exercise signalling on CHO pathway.

Heat induced hypoxia-like adaptations on metabolism

The increase of muscle glycogen content not associated with a proportional elevation of pyruvate oxidation seems like a metabolic phenotype previously described with hypoxia stimulus.

A link between cellular protection induced by heat via HSP signalling and hypoxia-inducible factor (HIF) has already been suggested *in vitro*. O₂-independent degradation of HIF-1 is regulated by the competition of RACK1 and HSP90 for binding to HIF-1 α . RACK1 binding results in the recruitment of the ubiquitin ligase, leading to Von Hippel Lindau-independent ubiquitination and degradation of HIF-1 α . HSP 90, by preventing RACK-1 binding, limit HIF-1 α degradation (Liu, Baek et al. 2007, Liu and Semenza 2007).

This fed the current concept of cross tolerance induced by heat acclimation and hypoxia and the use of heat as a mean of hypoxia preconditioning against ischemic injuries (Maloyan, Eli-Berchoer et al. 2005, Ely, Lovering et al. 2014, Horowitz 2017). It exists only few experiments to support this interesting hypothesis, all performed in model of heart ischemia-reperfusion (Eynan, Knubuvetz et al. 2002). Shani et al. (Alexander-Shani, Mreisat et al. 2017) found an increase of glycogen content, activation of glycolysis pathway and pyruvate dehydrogenase kinase-1 in heart after heat acclimation and proved this metabolic phenotype required HIF pathway and was independent of HSP, which was not sufficient to induce this protective phenotype (Shani 2017). The interaction between heat acclimation and endurance training in the expression of complex IV protein content, we found, is an argument to this cross-tolerance between heat and hypoxia. Indeed, this respiratory complex is particularly sensitive to hypoxia and change in its isoforms has been well described through the activation of HIF dependant pathway (Fukuda, Zhang et al. 2007, Desplanches, Amami et al. 2014).

If we hypothesized that HIF pathway is additively stimulated by heat acclimation and endurance training,(Lindholm and Rundqvist 2016), this could partly explain why we did not observe greater increase of mitochondrial content and oxidative capacities induced by endurance training. Indeed, HIF-1 has been shown to be a suppressor of skeletal muscle mitochondrial biogenesis (Mason and Johnson 2007, Favier, Britto et al. 2015). Moreover, this could explain the synergistic activation of glycogen content in the H+T group, similar as the glycolytic phenotype described after high intensity interval training and which relies on HIF pathway (Abe, Kitaoka et al. 2015).

CONCLUSION :

Our results show for the first time that contrary to our hypothesis heat acclimation did not improve mitochondrial adaptations induced by endurance training in slow-twitch skeletal muscle. Heat acclimation combined with endurance training have no benefit on mitochondrial content, substrates oxidation or coupling. Nevertheless, the interaction found here between endurance training and heat acclimation concerning CHO metabolism suggest that this association could be benefit for the activation of glycolytic pathway. This addresses the issue of management of such an association with high intensity interval training and/or repeated sprint in hypoxia training as a specific training strategy to improve high intensity performance via improvement of glycolytic pathway.

REFERENCES

- Abe, T., Y. Kitaoka, D. M. Kikuchi, K. Takeda, O. Numata and T. Takemasa (2015). "High-intensity interval training-induced metabolic adaptation coupled with an increase in Hif-1 α and glycolytic protein expression." J Appl Physiol (1985) **119**(11): 1297-1302.
- Alexander-Shani, R., A. Mreizat, E. Smeir, G. Gerstenblith, M. D. Stern and M. Horowitz (2017). "Long-term HIF-1 α transcriptional activation is essential for heat-acclimation-mediated cross tolerance: Mitochondrial target genes." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **312**(5): R753-R762.
- Banzet, S., N. Koulmann, N. Simler, H. Sanchez, R. Chapot, B. Serrurier, A. Peinnequin and X. Bigard (2009). "Control of gluconeogenic genes during intense/prolonged exercise: hormone-independent effect of muscle-derived IL-6 on hepatic tissue and PEPCK mRNA." J Appl Physiol (1985) **107**(6): 1830-1839.
- Bergmeyer, H. and M. Grassl (1983). "Methods of Enzymatic Analysis, 3rd edn., vol. 2." Verlag Chemie, Weinheim: 267-268.
- Brooks, G. A. and J. Mercier (1994). "Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: The 'crossover' concept." Journal of Applied Physiology **76**(6): 2253-2261.
- Broome, C. S., A. C. Kayani, J. Palomero, W. H. Dillmann, R. Mestril, M. J. Jackson and A. McArdle (2006). "Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity." The FASEB Journal **20**(9): 1549-1551.
- Brownstein, A. J., S. Ganesan, C. M. Summers, S. Pearce, B. J. Hale, J. W. Ross, N. Gabler, J. T. Seibert, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard and J. T. Selsby (2017). "Heat stress causes dysfunctional autophagy in oxidative skeletal muscle." Physiol Rep **5**(12).
- Chen, C. C. W., A. T. Erlich and D. A. Hood (2018). "Role of Parkin and endurance training on mitochondrial turnover in skeletal muscle." Skeletal Muscle **8**(1): 10.
- Cheng, A. J., S. J. Willis, C. Zinner, T. Chaillou, N. Ivarsson, N. Ørtenblad, J. T. Lanner, H. C. Holmberg and H. Westerblad (2017). "Post-exercise recovery of contractile function and endurance in humans and mice is accelerated by heating and slowed by cooling skeletal muscle." Journal of Physiology **595**(24): 7413-7426.
- Cohen, O., H. Kanana, R. Zoizner, C. Gross, U. Meiri, M. D. Stern, G. Gerstenblith and M. Horowitz (2007). "Altered Ca²⁺ handling and myofilament desensitization underlie cardiomyocyte performance in normothermic and hyperthermic heat-acclimated rat hearts." Journal of Applied Physiology **103**(1): 266-275.
- Desplanches, D., M. Amami, S. Dupre-Aucouturier, P. Valdivieso, S. Schmutz, M. Mueller, H. Hoppeler, R. Kreis and M. Fluck (2014). "Hypoxia refines plasticity of mitochondrial respiration to repeated muscle work." Eur J Appl Physiol **114**(2): 405-417.
- Diffie, G. M., E. A. Seversen and M. M. Titus (2001). "Exercise training increases the Ca²⁺ sensitivity of tension in rat cardiac myocytes." Journal of Applied Physiology **91**(1): 309-315.
- Drake, J. C., R. J. Wilson and Z. Yan (2016). "Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle." FASEB Journal **30**(1): 13-22.
- Ely, B. R., A. T. Lovering, M. Horowitz and C. T. Minson (2014). "Heat acclimation and cross tolerance to hypoxia: Bridging the gap between cellular and systemic responses." Temperature (Austin) **1**(2): 107-114.
- Eynan, M., T. Knubuvetz, U. Meiri, G. Navon, G. Gerstenblith, Z. Bromberg, Y. Hasin and M. Horowitz (2002). "Heat acclimation-induced elevated glycogen, glycolysis, and low thyroxine improve heart ischemic tolerance." J Appl Physiol (1985) **93**(6): 2095-2104.
- Favier, F. B., F. A. Britto, D. G. Freyssenet, X. A. Bigard and H. Benoit (2015). "HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology." Cell Mol Life Sci **72**(24): 4681-4696.
- Febbraio, M. A. (2000). "Does muscle function and metabolism affect exercise performance in the heat?" Exerc Sport Sci Rev **28**(4): 171-176.

Febbraio, M. A., M. F. Carey, R. J. Snow, C. G. Stathis and M. Hargreaves (1996). "Influence of elevated muscle temperature on metabolism during intense, dynamic exercise." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **271**(5 40-5): R1251-R1255.

Febbraio, M. A., R. J. Snow, M. Hargreaves, C. G. Stathis, I. K. Martin and M. F. Carey (1994). "Muscle metabolism during exercise and heat stress in trained men: effect of acclimation." Journal of Applied Physiology **76**(2): 589-597.

Febbraio, M. A., R. J. Snow, C. G. Stathis, M. Hargreaves and M. F. Carey (1994). "Effect of heat stress on muscle energy metabolism during exercise." J Appl Physiol (1985) **77**(6): 2827-2831.

Fink, W. J., D. L. Costill and P. J. Van Handel (1975). "Leg muscle metabolism during exercise in the heat and cold." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **34**(3): 183-190.

Fukuda, R., H. Zhang, J. W. Kim, L. Shimoda, C. V. Dang and G. L. Semenza (2007). "HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells." Cell **129**(1): 111-122.

Gagnon, D. D., L. Perrier, S. C. Dorman, B. Oddson, C. Larivière and O. Serresse (2019). "Ambient temperature influences metabolic substrate oxidation curves during running and cycling in healthy men." European Journal of Sport Science: 1-10.

Ganesan, S., A. J. Brownstein, S. C. Pearce, M. B. Hudson, N. K. Gabler, L. H. Baumgard, R. P. Rhoads and J. T. Selsby (2018). "Prolonged environment-induced hyperthermia alters autophagy in oxidative skeletal muscle in *Sus scrofa*." J Therm Biol **74**: 160-169.

Ganesan, S., C. Reynolds, K. Hollinger, S. C. Pearce, N. K. Gabler, L. H. Baumgard, R. P. Rhoads and J. T. Selsby (2016). "Twelve hours of heat stress induces inflammatory signaling in porcine skeletal muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **310**(11): R1288-1296.

Gonzalez-Alonso, J., J. A. Calbet and B. Nielsen (1999). "Metabolic and thermodynamic responses to dehydration-induced reductions in muscle blood flow in exercising humans." J Physiol **520 Pt 2**: 577-589.

Greiwe, J. S., R. C. Hickner, P. A. Hansen, S. B. Racette, M. M. Chen and J. O. Holloszy (1999). "Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans." Journal of Applied Physiology **87**(1): 222-226.

Gupte, A. A., G. L. Bomhoff, R. H. Swerdlow and P. C. Geiger (2009). "Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet." Diabetes **58**(3): 567-578.

Hafen, P. S., C. N. Preece, J. R. Sorensen, C. R. Hancock and R. D. Hyldahl (2018). "Repeated exposure to heat stress induces mitochondrial adaptation in human skeletal muscle." Journal of Applied Physiology **125**(5): 1447-1455.

Hargreaves, M., D. Angus, K. Howlett, N. M. Conus and M. Febbraio (1996). "Effect of heat stress on glucose kinetics during exercise." Journal of Applied Physiology **81**(4): 1594-1597.

Hargreaves, M., P. Dillo, D. Angus and M. Febbraio (1996). "Effect of fluid ingestion on muscle metabolism during prolonged exercise." Journal of Applied Physiology **80**(1): 363-366.

Heesch, M. W., R. J. Shute, J. L. Kreiling and D. R. Slivka (2016). Transcriptional control, but not subcellular location, of PGC-1 α is altered following exercise in a hot environment. Journal of Applied Physiology. **121**: 741-749.

Henstridge, D. C., M. A. Febbraio and M. Hargreaves (2016). "Heat shock proteins and exercise adaptations. Our knowledge thus far and the road still ahead." J Appl Physiol (1985) **120**(6): 683-691.

Holloszy, J. O. (1967). "Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle." The Journal of biological chemistry **242**(9): 2278-2282.

Holloszy, J. O. and E. F. Coyle (1984). "Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences." Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology **56**(4): 831-838.

Hoppeler, H., P. Luthi and H. Claassen (1973). "The ultrastructure of the normal human skeletal muscle: A morphometric analysis on untrained men, women and well trained orienteers." Pflugers Archiv European Journal of Physiology **344**(3): 217-232.

Horowitz, M. (2017). "Heat Acclimation-Mediated Cross-Tolerance: Origins in within-Life Epigenetics?" Front Physiol **8**: 548.

Horowitz, M., Y. M. Peyser and A. Muhlrud (1986). "Alterations in cardiac myosin isoenzymes distribution as an adaptation to chronic environmental heat stress in the rat." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **18**(5): 511-515.

Ihsan, M., J. Périard and S. Racinais (2019). "Integrating Heat Training in the Rehabilitation Toolbox for the Injured Athlete." Frontiers in Physiology **10**.

Jeukendrup, A. E., W. H. M. Saris and A. J. M. Wagenmakers (1998). "Fat metabolism during exercise: A review - Part II: Regulation of metabolism and the effects of training." International Journal of Sports Medicine **19**(5): 293-302.

Keeseey, R. E. and T. L. Powley (2008). "Body energy homeostasis." Appetite **51**(3): 442-445.

Kim, K., B. Reid, B. Ro, C. Casey, Q. Song, S. Kuang and B. Roseguini (2019). "Heat therapy improves soleus muscle force in a model of ischemia-induced muscle damage." Journal of Applied Physiology **127**.

King, D. S., D. L. Costill and W. J. Fink (1985). "Muscle metabolism during exercise in the heat in unacclimatized and acclimatized humans." Journal of Applied Physiology **59**(5): 1350-1354.

Kirwan, J. P., D. L. Costill, H. Kuipers, M. J. Burrell, W. J. Fink, J. E. Kovaleski and R. A. Fielding (1987). "Substrate utilization in leg muscle of men after heat acclimation." J Appl Physiol (1985) **63**(1): 31-35.

Kodesh, E. and M. Horowitz (2010). "Soleus adaptation to combined exercise and heat acclimation: Physiogenomic aspects." Medicine and Science in Sports and Exercise **42**(5): 943-952.

Kodesh, E., N. Neshet, A. Simaan, B. Hochner, R. Beerli, D. Gilon, M. D. Stern, G. Gerstenblith and M. Horowitz (2011). "Heat acclimation and exercise training interact when combined in an overriding and trade-off manner: Physiologic-genomic linkage." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **301**(6): R1786-R1797.

Koshinaka, K., E. Kawamoto, N. Abe, K. Toshinai, M. Nakazato and K. Kawanaka (2013). "Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro." J Physiol Sci **63**(6): 409-418.

Kuznetsov, A. V., V. Veksler, F. N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter and W. S. Kunz (2008). "Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells." Nat Protoc **3**(6): 965-976.

Larsen, S., J. Nielsen, C. N. Hansen, L. B. Nielsen, F. Wibrand, N. Stride, H. D. Schroder, R. Boushel, J. W. Helge, F. Dela and M. Hey-Mogensen (2012). "Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects." J Physiol **590**(14): 3349-3360.

Lindholm, M. E. and H. Rundqvist (2016). "Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise." Exp Physiol **101**(1): 28-32.

Liu, C. T. and G. A. Brooks (2012). "Mild heat stress induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes." J Appl Physiol (1985) **112**(3): 354-361.

Liu, Y. V., J. H. Baek, H. Zhang, R. Diez, R. N. Cole and G. L. Semenza (2007). "RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha." Mol Cell **25**(2): 207-217.

Liu, Y. V. and G. L. Semenza (2007). "RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization." Cell Cycle **6**(6): 656-659.

Lorenzo, S. and C. T. Minson (2010). "Heat acclimation improves cutaneous vascular function and sweating in trained cyclists." Journal of Applied Physiology **109**(6): 1736-1743.

Lundby, C. and R. A. Jacobs (2016). "Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training." Experimental Physiology **101**(1): 17-22.

Malgoyre, A., C. Chabert, J. Tonini, N. Koulmann, X. Bigard and H. Sanchez (2017). "Alterations to mitochondrial fatty-acid use in skeletal muscle after chronic exposure to hypoxia depend on metabolic phenotype." Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985) **122**(3): 666-674.

Maloyan, A., L. Eli-Berchoer, G. L. Semenza, G. Gerstenblith, M. D. Stern and M. Horowitz (2005). "HIF-1alpha-targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart." Physiol Genomics **23**(1): 79-88.

Martins, E. L., J. C. Ricardo, E. de-Souza-Ferreira, J. Camacho-Pereira, D. Ramos-Filho and A. Galina (2018). "Rapid regulation of substrate use for oxidative phosphorylation during a single session of high intensity interval or aerobic exercises in different rat skeletal muscles." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **217**: 40-50.

Mason, S. and R. S. Johnson (2007). "The role of HIF-1 in hypoxic response in the skeletal muscle." Adv Exp Med Biol **618**: 229-244.

Maunder, E., D. J. Plews, F. Merien and A. E. Kilding (2019). "Exercise intensity regulates the effect of heat stress on substrate oxidation rates during exercise." Eur J Sport Sci: 1-23.

Mirit, E., A. Palmon, Y. Hasin and M. Horowitz (1999). "Heat acclimation induces changes in cardiac mechanical performance: The role of thyroid hormone." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **276**(2 45-2): R550-R558.

Molé, P. A., L. B. Oscari and J. O. Holloszy (1971). "Adaptation of muscle to exercise. Increase in levels of palmityl Coa synthetase, carnitine palmityltransferase, and palmityl Coa dehydrogenase, and in the capacity to oxidize fatty acids." The Journal of clinical investigation **50**(11): 2323-2330.

Montilla, S. I., T. P. Johnson, S. C. Pearce, D. Gardan-Salmon, N. K. Gabler, J. W. Ross, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard, S. M. Lonergan and J. T. Selsby (2014). "Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle." Temperature (Austin) **1**(1): 42-50.

Moon, B., N. Duddy, L. Ragolia and N. Begum (2003). "Stimulation of glycogen synthesis by heat shock in L6 skeletal-muscle cells: regulatory role of site-specific phosphorylation of glycogen-associated protein phosphatase 1." Biochem J **371**(Pt 3): 857-866.

Morgan, T. E., L. A. Cobb, F. A. Short, R. Ross and D. R. Gunn (1971). Effects of Long-Term Exercise on Human Muscle Mitochondria. Muscle Metabolism During Exercise: Proceedings of a Karolinska Institutet Symposium held in Stockholm, Sweden, September 6-9, 1970 Honorary guest: E Hohwü Christensen. B. Pernow and B. Saltin. Boston, MA, Springer US: 87-95.

O'Hearn, K., H. C. Tingelstad, D. Blondin, V. Tang, L. G. Filion and F. Haman (2016). "Heat exposure increases circulating fatty acids but not lipid oxidation at rest and during exercise." Journal of Thermal Biology **55**: 39-46.

Oishi, Y., K. Taniguchi, H. Matsumoto, A. Ishihara, Y. Ohira and R. R. Roy (2002). "Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature." J Appl Physiol (1985) **92**(3): 1097-1103.

Ojuka, E., B. Andrew, N. Bezuidenhout, S. George, G. Maarman, H. P. Madlala, A. Mendham and P. O. Osiki (2016). "Measurement of β -oxidation capacity of biological samples by respirometry: A review of principles and substrates." American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism **310**(9): E715-E723.

Oliveira, A. F., D. A. Cunha, L. Ladriere, M. Igoillo-Esteve, M. Bugliani, P. Marchetti and M. Cnop (2015). "In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols." BioTechniques **58**(5): 228-233.

Ou, L. C. and J. C. Leiter (2004). "Effects of exposure to a simulated altitude of 5500 m on energy metabolic pathways in rats." Respir Physiol Neurobiol **141**(1): 59-71.

Parkin, J. M., M. F. Carey, S. Zhao and M. A. Febbraio (1999). "Effect of ambient temperature on human skeletal muscle metabolism during fatiguing submaximal exercise." J Appl Physiol (1985) **86**(3): 902-908.

Passonneau, J. V. and V. R. Lauderale (1974). "A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues." Analytical Biochemistry **60**(2): 405-412.

Periard, J. D., S. Racinais and M. N. Sawka (2015). "Adaptations and mechanisms of human heat acclimation: Applications for competitive athletes and sports." Scand J Med Sci Sports **25 Suppl 1**: 20-38.

Periard, J. D., G. J. S. Travers, S. Racinais and M. N. Sawka (2016). "Cardiovascular adaptations supporting human exercise-heat acclimation." Auton Neurosci **196**: 52-62.

Pesta, D. and E. Gnaiger (2012). "High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle." Methods Mol Biol **810**: 25-58.

Ponsot, E., S. P. Dufour, J. Zoll, S. Doutrelau, B. N'Guessan, B. Geny, H. Hoppeler, E. Lampert, B. Mettauer, R. Ventura-Clapier and R. Richard (2006). "Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. II. Improvement of mitochondrial properties in skeletal muscle." Journal of Applied Physiology **100**(4): 1249-1257.

Saltin, B., P. O. Astrand, M. A. Crawford and B. Saltin (1993). "Free fatty acids and exercise." American Journal of Clinical Nutrition **57**(5 SUPPL.): 752S-758S.

Scoon, G. S. M., W. G. Hopkins, S. Mayhew and J. D. Cotter (2007). "Effect of post-exercise sauna bathing on the endurance performance of competitive male runners." Journal of Science and Medicine in Sport **10**(4): 259-262.

Seidemann, J. (1973). "Lowry, O. H., und J. V. Passonneau: A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York, 1972. 291 S., 32 Abb., 15 Tab., Preis \$ 14.00." Starch - Stärke **25**(9): 322-322.

Sparks, L. M., A. Gemmink, E. Phielix, M. Bosma, G. Schaart, E. Moonen-Kornips, J. A. Jorgensen, E. B. Nascimento, M. K. Hesselink, P. Schrauwen and J. Hoeks (2016). "ANT1-mediated fatty acid-induced uncoupling as a target for improving myocellular insulin sensitivity." Diabetologia **59**(5): 1030-1039.

Srere, P. A. (1969). [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. Methods in Enzymology, Academic Press. **13**: 3-11.

Tamura, Y. and H. Hatta (2017). "Heat stress induces mitochondrial adaptations in skeletal muscle." The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine **6**(3): 151-158.

Tamura, Y., Y. Kitaoka, Y. Matsunaga, D. Hoshino and H. Hatta (2015). "Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle." J Physiol **593**(12): 2707-2720.

Tamura, Y., Y. Matsunaga, Y. Kitaoka and H. Hatta (2017). "Effects of Heat Stress Treatment on Age-dependent Unfolded Protein Response in Different Types of Skeletal Muscle." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **72**(3): 299-308.

Tamura, Y., Y. Matsunaga, H. Masuda, Y. Takahashi, Y. Takahashi, S. Terada, D. Hoshino and H. Hatta (2014). "Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **307**(7): R931-R943.

Tanaka, T., A. Nishimura, K. Nishiyama, T. Goto, T. Numaga-Tomita and M. Nishida (2019). "Mitochondrial dynamics in exercise physiology." Pflugers Archiv European Journal of Physiology.

Tardo-Dino, P. E., J. Touron, S. Bauge, S. Bourdon, N. Koulmann and A. Malgoire (2019). "The effect of a physiological increase in temperature on mitochondrial fatty acid oxidation in rat myofibers." J Appl Physiol (1985) **127**(2): 312-319.

Tsuzuki, T., H. Kobayashi, T. Yoshihara, R. Kakigi, N. Ichinoseki-Sekine and H. Naito (2017). "Attenuation of exercise-induced heat shock protein 72 expression blunts improvements in whole-body insulin resistance in rats with type 2 diabetes." Cell Stress and Chaperones **22**(2): 263-269.

Wisløff, U., J. P. Loennechen, G. Falck, V. Beisvag, S. Currie, G. Smith and O. Ellingsen (2001). "Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats." Cardiovascular Research **50**(3): 495-508.

Young, A. J., M. N. Sawka, L. Levine, B. S. Cadarette and K. B. Pandolf (1985). "Skeletal muscle metabolism during exercise is influenced by heat acclimation." J Appl Physiol (1985) **59**(6): 1929-1935.

Zak, R. B., R. J. Shute, M. W. Heesch, D. T. La Salle, M. P. Bubak, N. E. Dinan, T. L. Laursen and D. R. Slivka (2017). "Impact of hot and cold exposure on human skeletal muscle gene expression." Appl Physiol Nutr Metab **42**(3): 319-325.

Zoladz, J. A. and B. Grassi (2015). "Training: Functional improvements of skeletal muscle oxidative metabolism can occur earlier than the enhancement of mitochondrial biogenesis." Experimental Physiology **100**(11): 1229-1230.

Zoll, J., N. Koulmann, L. Bahi, R. Ventura-Clapier and A. X. Bigard (2003). "Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity." J Cell Physiol **194**(2): 186-193.

Zoll, J., H. Sanchez, B. N'Guessan, F. Ribera, E. Lampert, X. Bigard, B. Serrurier, D. Fortin, B. Geny, V. Veksler, R. Ventura-Clapier and B. Mettauer (2002). "Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle." The Journal of Physiology **543**(1): 191-200.

DISCUSSION GENERALE

I. Originalité et limites de la mesure de la respiration mitochondriale *in situ* dans cette étude

1. Conséquences de l'élévation de la température dans la technique de mesure de respiration mitochondriale

La mesure de la respiration mitochondriale *in situ* a été initialement mise au point à une température standard de laboratoire, 22°C. Dans notre étude, nous avons utilisé cette technique de mesure à des températures plus élevées afin de correspondre à des conditions plus proches de la physiologie musculaire.

Nous avons observé que l'élévation de la température expérimentale affectait de manière différente le niveau de respiration des substrats glucidiques et lipidiques. Dans une étude précédente de notre laboratoire, le niveau de respiration en conditions phosphorylantes avait été mesuré à 22°C dans le muscle soléaire pour le pyruvate et le CoA, nous fournissant un élément de comparaison avec les mesures réalisées au cours de cette étude. Lorsque nous nous intéressons à la variation du niveau de ces V_{max} entre 22°C et 35°C, l'augmentation des vitesses de respiration pour le PCoA se caractérise par une amplitude plus importante que pour le pyruvate (**Tableau 4**).

Tableau 4. Comparaison des vitesses de respiration maximales (V_{max}) en présence de pyruvate et PCoA mesurées à 22°C lors d'une étude précédente, réalisée sur des rats d'âge similaire, et à 35°C au cours de notre étude n° 1.

	22°C	35°C	Augmentation % V_{max} à 22°C
V_{max} Pyr	6,3	7,7	22
V_{max} PCoA	2,1	4,8	129

La différence d'effet de l'élévation de la température entre ces deux substrats suggère l'existence d'un frein de l'utilisation des substrats bien plus prégnant pour les acides gras que pour les glucides à la température de 22°C. Si l'effet de la chaleur sur l'accélération des activités enzymatiques est connu, l'élévation de la température de 22 à 35°C ne semble pas influencer

de manière homogène les vitesses maximales de respiration du pyruvate et du PCoA. De plus, dans notre étude, l'absence de modification des V_{max} de 35 à 40°C suggère que le fonctionnement mitochondrial atteindrait un maximum à ces températures, pour l'oxydation de ces deux substrats physiologiques. Ainsi, les mesures de vitesses d'oxydation de différents substrats à 22°C justifient, selon nous, une certaine prudence dans les conclusions qui peuvent être proposées quant au niveau d'utilisation absolu et relatif des substrats énergétiques d'un muscle dont la température habituelle de fonctionnement est voisine de 35°C, au repos au moins. Des expérimentations complémentaires pourraient permettre de préciser la réalité de ces effets différenciés de l'élévation de la température entre 22 et 35°C sur les niveaux d'oxydation des glucides et des lipides. De plus, la comparaison de l'utilisation d'un acide gras à chaîne courte (octanoate par exemple) et d'un acide gras à chaîne longue (AGLC) (palmitoyl-CoA) permettrait de distinguer l'effet de la température sur les 2 freins possibles à l'oxydation des AGLC : le transport mitochondrial (CPT1) et la β -oxydation.

Les conséquences physico-chimiques de l'élévation de la température. L'élévation de la température modifie la composition chimique des solutions par la modification du coefficient de dissociation. Cet aspect aurait pu interférer avec nos résultats, notamment par la concentration du milieu en calcium (Ca^{2+}) et en O_2 . Nous avons en effet utilisé les mêmes solutions que celles utilisées pour les mesures de respiration mitochondriale à 22°C.

- Les valeurs de concentration en Ca^{2+} libre (calculées avec le *Ca-EGTA calculator*, Department of pharmacology, UC Davis School of medicine <https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/CaEGTA-NIST.htm>) montraient une diminution du Ca^{2+} libre de 18% entre 22 et 35°C et de 6% entre 35 et 40°C. La diminution de concentration en Ca^{2+} entre 35°C et 40°C demeure donc limitée. Si une augmentation des concentrations en Ca^{2+} libre aurait pu induire des altérations mitochondriales voire des processus d'apoptose par activation des caspases et de la signalisation mitochondriale impliquées dans ces processus, la baisse du calcium libre est moins problématique puisque certaines équipes travaillent sans calcium dans leur solution de respiration. De plus, la variation de la concentration en Ca^{2+} , dans l'hypothèse où elle pourrait avoir un effet réel, aurait influencé de la même manière l'oxydation de nos deux substrats à une température donnée. Ces variations de concentration peuvent également interférer dans les processus contractiles des fibres perméabilisées. Il est difficile de quantifier une éventuelle activité contractile des fibres perméabilisées, qui aurait été consommatrice d'ATP et aurait donc pu influencer sur les

mesures de respiration mitochondriale. La diminution de concentration en Ca^{2+} orienterait davantage vers une diminution de l'activité contractile qui, si elle a pu avoir une influence, aurait eu tendance à diminuer les valeurs de respiration mesurées à 40°C par rapport à 35°C. Compte tenu des augmentations observées à 40°C, il est donc peu probable que les fluctuations du Ca^{2+} aient pu modifier le sens de nos observations.

- La concentration en O_2 est également influencée par la température. Comme nous avons pu le constater, la concentration en O_2 dissous diminue quand la température augmente. En ajoutant à cela l'accélération de la respiration avec la chaleur, les mesures de respiration à 40°C se sont révélées plus délicates. Il était difficile de garantir à chaque palier de substrat, un niveau d'oxygène aussi élevé que lors d'expérimentations à 35°. A ces températures élevées, la durée des protocoles doit être autant que possible limitée. Néanmoins compte tenu des concentrations en O_2 physiologiques mitochondriales basses, les niveaux de concentration en O_2 permettaient de garantir l'absence de conditions hypoxiques. Enfin, dans la construction d'études nécessitant la comparaison de températures différentes, l'utilisation d'autres outils que l'électrode de Clarke pourrait s'avérer utile. En effet, ce système est sensible aux variations de température et nécessite une calibration pour chaque température. L'utilisation de sondes utilisant la luminescence permettrait de s'affranchir de certaines contraintes dans ce type d'expérimentations.

2. Méthodologie dans la deuxième étude : importance de la température de mesure et du choix du muscle

L'étude des effets d'un entraînement sur la respiration mitochondriale paraît plus appropriée à 35°C. Compte tenu des implications évoquées plus haut mais également de la pertinence de cette température pour réaliser des études sur le fonctionnement physiologique mitochondrial, il apparaît logique que la température de mesure de la respiration mitochondriale soit 35°C plutôt que 22°C. En outre, pour des raisons pratiques mais également de validité expérimentale, l'utilisation de températures supérieures n'est pas non plus indiquée. Une étude récente, à comparer avant et après entraînement l'évolution des vitesses de respiration mesurées à trois températures (25, 35, et 42°C), montrant que l'effet de l'élévation de température sur la vitesse de respiration est proportionnel à la différence de température (Zoladz, Koziel et al. 2017). Si la pertinence physiologique de mesure à des températures atteignant 41 ou 42°C pourrait être discutée, du fait de la température musculaire lorsque le muscle travaille (Saltin, Gagge et al. 1968, Segal, Faulkner et al. 1986, Febbraio, Carey et al. 1996), ces températures

plus élevées se situent aux confins de la physiologie, et pourraient induire des altérations mitochondriales comme cela a été observé dans certaines autres études (Qian, Song et al. 2004, Kikusato and Toyomizu 2013, Kikusato, Yoshida et al. 2015).

La question du choix du muscle dans l'étude des effets de la chaleur sur l'utilisation des lipides. Au cours de cette étude, nous avons été amenés à discuter du choix du muscle à analyser. Initialement, nous avons opté pour le muscle *soleus* de rat pour ses caractéristiques de muscle lent oxydatif. Le choix de ce muscle pourrait avoir minoré les effets de l'entraînement sur les adaptations mitochondriales dans la seconde étude. En raison de notre hypothèse de départ, l'utilisation d'un muscle à fort potentiel d'oxydation des lipides devait permettre de renforcer l'amplitude de l'effet escompté de l'élévation de la température sur une possible limitation de l'utilisation mitochondriale des lipides. Il est néanmoins difficile de dire, e, si l'élévation de la température aurait eu un effet plus ou moins marqué sur des fibres dont la capacité d'utilisation des lipides est plus faible.

Validité du conditionnement de la seconde étude et réponse à la chaleur tissu-spécifique. Dans la seconde étude, se pose la question de la vulnérabilité tissulaire à l'exposition à la chaleur. Nous avons pu observer qu'un conditionnement de six semaines n'avait pas induit d'augmentation du contenu total en HSP, malgré des réponses phénotypiques présentes dans les groupes acclimatés. La validité de notre conditionnement à la chaleur avait été préalablement vérifiée. Nous avons implanté des dispositifs de mesure de la température profonde (gélules Anipill, Bodycaps, France) dans l'abdomen de quatre rats. Les animaux étaient exposés à une température comprise entre 35 et 39°C pendant 1 heure. L'ensemble des animaux présentait une hyperthermie supérieure à 38°C pendant 55 minutes et à 39°C pendant 45 minutes. L'élévation moyenne de la température profonde était de 1,6°C. Nous ne disposons pas, des températures profondes des animaux dans la plupart des autres études mais dans une étude de Tamura, par exemple, l'exposition à 40°C durait 30 minutes. Ce niveau de stress thermique avait permis l'induction de HSP au cours d'un conditionnement de trois semaines (Tamura, Matsunaga et al. 2014).

La réponse à la chaleur diffère selon le type du muscle et demeure mal connue. La spécificité tissulaire de la réponse à la chaleur pourrait contribuer à l'absence d'élévation de HSP72 dans notre étude. Plusieurs études montrent que les muscles oxydatifs et glycolytiques développent des réponses HSP différentes à l'exposition à la chaleur (Oishi, Taniguchi et al. 2002, Gupte, Bomhoff et al. 2009, Tamura and Hatta 2017, Tamura, Matsunaga et al. 2017). Ainsi, Tamura a étudié l'effet d'une acclimatation à la chaleur sur des souris âgées (20 mois) en comparant

leur réponse à des souris jeunes (8 semaines) et à des souris âgées non exposées à la chaleur. Il a ainsi montré que le *soleus* ne présentait pas d'élévation de HSP 72 contrairement au *plantaris* et au gastrocnémien qui montraient tous deux une augmentation de HSP 72 dans le groupe âgé exposé à la chaleur par rapport aux deux autres groupes non exposés à la chaleur. Oishi montre une élévation rapide mais transitoire du contenu en HSP70 dans les muscles oxydatifs alors que l'augmentation est plus ample et prolongée pour un muscle glycolytique (Oishi, Taniguchi et al. 2002). Une étude de Naito montre également un contenu basal augmenté mais une réponse moindre de HSP72 dans un muscle oxydatif en comparaison d'un muscle glycolytique. Même si le niveau basal d'HSP est plus important dans un muscle oxydatif que glycolytique, l'induction à la chaleur ou à l'exercice semble plus marquée dans les muscles glycolytiques.

En outre, l'absence de réponse HSP ne signifie pas une absence de réponse à l'acclimatation à la chaleur. Ainsi, le *soleus* pourrait présenter une vulnérabilité plus importante à la chaleur comme le suggèrent l'élévation de la production d'ERO, de la réponse inflammatoire ou des altérations mitochondriales dans certaines études. (Montilla, Johnson et al. 2014, Brownstein, Ganesan et al. 2017, Tamura and Hatta 2017).

La durée de conditionnement pourrait également expliquer cette absence d'augmentation d'HSP. Particulièrement longue par rapport aux études habituelles sur l'acclimatation (4 semaines le plus souvent), il est difficile d'établir la comparaison avec les cinétiques connues. Il est possible que le nouvel état homéostatique obtenu se caractérise par une diminution des réponses anticipatrices par suite de l'acquisition d'un nouveau phénotype cellulaire plus résistant.

II. Effet découplant substrat-dépendant de la chaleur sur la phosphorylation oxydative sans altération mitochondriale

1. Altération du couplage de l'oxydation des acides gras par la chaleur.

Nous avons montré, au cours de notre première étude, que l'exposition des fibres perméabilisées de *soleus* à une élévation de température de 35°C à 40°C avait altéré l'oxydation des lipides. La chaleur a induit une augmentation de la vitesse de respiration $\dot{V}O$ du PCoA en conditions de blocage de la phosphorylation de l'ADP (, sans augmentation de la capacité maximale d'oxydation $\dot{V}max$. Cette situation traduit une consommation du gradient de protons accrue à la chaleur non liée à une production d'ATP. Cette diminution d'efficacité de la phosphorylation oxydative est reflétée par la diminution du RCR-PCoA. L'effet de la chaleur

sur la $\dot{V}O$ a été prévenu par l'ajout de GTP, utilisé pour sa capacité d'inhibition des UCP. Ainsi, l'élévation de la respiration en condition de consommation d' O_2 résiduelle peut être rapportée à un découplage de la phosphorylation oxydative pour les acides gras. Cette propriété d'induction du découplage des acides gras est retrouvée dans la littérature. Les acides gras, tels que l'acide linoléique ou le laurate, sont utilisés comme agent découplant naturel dans certaines études (Korshunov, Korkina et al. 1998, Jarmuszkiewicz, Woyda-Ploszczyca et al. 2015).

Prise en compte du rôle détersif des acides gras. L'absence d'augmentation, en regard, de la respiration en conditions phosphorylantes ($\dot{V}max$) interpelle quant à l'augmentation observée dans d'autres études. Dans une étude sur mitochondries isolées de rat, Ventura & al. mettaient en évidence une altération de la respiration mitochondriale pour l'oxydation du succinate par le PCoA. Dans cette étude, les mesures étaient réalisées avec des concentrations de 0,1% en BSA. L'effet inhibiteur de l'acide gras était probablement en lien avec les propriétés de détersion des acides gras, d'autant plus que des mitochondries ballonnées étaient également observées. Afin de limiter les interactions des substrats lipidiques utilisés pour la mesure de la respiration mitochondriale avec les membranes phospholipidiques, d'autres équipes travaillent avec des concentrations supérieures en BSA. A la suite de quelques expérimentations de mise au point, nous avons donc opté pour une concentration de BSA à 6% pour les protocoles avec des acides gras. Ainsi, conformément à certaines préconisations, le maintien d'un ratio BSA/AG supérieur à 5 nous a paru pertinent afin de limiter les risques d'altération des membranes aux concentrations de PCoA utilisées. En outre, nous avons également étudié l'effet de l'ajout de PCoA (400mM) sur l'oxydation du pyruvate. Contrairement à l'étude de Ventura, aucune limitation des niveaux d'oxydation du substrat glucidique n'était observée. De même, afin d'éliminer un effet temps de contact, nous avons ajouté du pyruvate en fin de protocole d'oxydation du PCoA. Les niveaux de respiration du pyruvate n'était pas différent des protocoles réalisés en pyruvate seul. Il est peu probable que nos observations avec le PCoA puissent être imputées à un effet détersif de l'acide gras.

Thermosensibilité du découplage des acides gras. Par ailleurs, plusieurs hypothèses peuvent étayer les effets découplants thermo-dépendants des acides gras. Les UCP pourraient jouer un rôle d'efflux des acides gras. Ces protéines permettraient en effet d'extruder les acides gras, sans nécessité d'activation de l'acide gras en acyl-CoA, permettant de limiter l'accumulation mitochondriale des acides gras (Ježek, Engstová et al. 1998, Hoeks, Hesselink et al. 2006). La thermosensibilité de ce processus pourrait procéder de la modification de la fluidité membranaire induite par la chaleur. En outre, elle pourrait également faire intervenir des

thioestérases. En effet, la *mitochondrial Thioesterase-1* (MTE-1) favoriserait la disponibilité en Coenzyme A par l'hydrolyse des acyl-CoA. La préservation du pool de CoA permettrait le maintien des processus d'oxydation mitochondriale alors que l'accumulation des acides gras activerait l'extrusion de ces acides gras par UCP. La thermosensibilité du complexe II) de la chaîne respiratoire mitochondriale pourrait également participer à la thermo-dépendance du découplage de l'oxydation des acides gras. Le complexe II fonctionne avec des équivalents d'origines différentes. Les FADH₂ peuvent provenir de l'activité du cycle de Krebs qui fait intervenir la succinate déshydrogénase localisée dans le complexe II. Le FADH₂ peut aussi provenir de la βoxydation. Produit au niveau de l'acyl-CoA déshydrogénase, un transporteur (ETF2) permet d'apporter le proton au FAD⁺ fixé au complexe II. Enfin, la navette glycerol-3-P (G3P) fait intervenir le complexe II pour le transfert des protons du NADH cytosolique vers le FADH₂. Dans une étude sur les effets de la température sur l'utilisation des acides gras avant et après entraînement, Zoladz et al. (2016) montrent que l'élévation de la température induisait une altération du couplage de la phosphorylation oxydative au niveau du complexe II par la mesure de la vitesse de respiration du G3P. Ainsi, la vulnérabilité particulière du complexe II au stress thermique pourrait participer à l'effet découplant des acides gras avec la chaleur

Autres mécanismes dans le découplage des acides gras à la chaleur. L'utilisation de l'atractyloside couplée au GTP a permis d'isoler un mécanisme de découplage médié par les UCP. En effet, l'ANT1 pourrait être impliquée dans les processus de découplage de l'oxydation des acides gras induits par l'entraînement aérobie. Dans la conception de notre étude, l'utilisation de l'atractyloside permettait d'obtenir des conditions non-phosphorylantes par le blocage de l'ANT-1. Il a également permis de s'affranchir de l'influence d'ANT1 dans l'étude du découplage. Compte tenu de la persistance d'une diminution du RCR à 40°C en présence de GTP, d'autres mécanismes d'altération du couplage doivent être recherchés.

Rôle de l'étape de transport des acides gras. Non explorée dans notre étude, des expérimentations complémentaires pourraient être réalisées afin de déterminer l'effet d'une élévation de température sur les différentes étapes de l'oxydation des acides gras. En comparant les niveaux d'oxydation d'un acide gras à chaîne courte (octanoate), et un acide gras à chaîne longue nécessitant le recours à la carnitine-palmitoyl transférase, il est possible de faire la part des choses entre une l'étape de transport par CPT-1 et la β-oxxydation. La comparaison avec un acide gras à chaîne longue couplé à la carnitine (palmitoyl-carnitine) pourrait permettre également de séparer les rôles de CPT-1 et CPT-2 dans le transport mitochondrial des AGLC.

2. Possible altération fonctionnelle de la chaîne respiratoire

L'élévation de la température pourrait altérer le fonctionnement du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il existe une tendance à l'augmentation de la $\dot{V}O$ pour le pyruvate à 40°C. De plus, les observations concernant le pyruvate ont été limitées par la puissance statistique faible de la comparaison de la vitesse de respiration du pyruvate en conditions non-phosphorylantes (V_0) aux deux températures. Un effet moindre de l'élévation de la température sur l'utilisation mitochondriale des glucides ne peut donc pas être éliminé. Comme évoqué précédemment pour le découplage des acides gras, la chaleur pourrait induire une altération du complexe II. Or de par la proportion de FADH₂ et NADH,H⁺ issus l'oxydation du pyruvate, la sollicitation du complexe II par le pyruvate est moindre que pour le PCoA ce qui pourrait se traduire par une taille différente de l'effet découplant en présence de l'un ou l'autre des substrat.

De plus, compte tenu d'une concentration importante de malate utilisée pour soutenir la respiration avec le pyruvate, l'étape de la succinate déshydrogénase pourrait être partiellement court-circuité, sous-estimant encore la contribution du complexe II dans l'oxydation du pyruvate dans ces conditions particulières de malate.

. Altération potentielle de la chaîne de transport par un effet physico-chimique de la chaleur. Une altération de la chaîne de transport des électrons a pu être induite par des effets directs de la chaleur sur la fluidité de la membrane mitochondriale. L'efficacité du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire pourrait ainsi avoir été perturbée, induisant des fuites d'électrons. Nous avons tenté de mesurer des modifications de la fluidité membranaire dans nos conditions expérimentales de fibres perméabilisées et de températures. Au moyen de la résonance paramagnétique électronique (mesurant des variations de spin), nous avons cherché à mettre en évidence des modifications de fluidité au travers des changements d'interaction de la membrane avec les protéines et leurs conséquences sur le positionnement des lipides membranaires. Néanmoins, ces mesures ne se sont pas révélées concluantes. D'autre part, les mesures de stress oxydant réalisées dans des conditions similaires à la respiration mitochondriale n'ont pas permis de mettre en évidence de stress oxydatif inductible par la chaleur. L'hypothèse d'ERO réagissant avec les phospholipides membranaires est donc peu probable.

3. Limites de l'évaluation des niveaux d'oxydation des substrats par l'oxygraphie mitochondriale in situ

Evaluation de l'efficacité mitochondriale. La détermination du RCR permet de refléter la fonctionnalité mitochondriale mais de manière indirecte. Il met en parallèle la consommation résiduelle en oxygène de la CRM (reflet de « l'étanchéité » de la chaîne de transport d'électrons) avec une capacité maximale de respiration mitochondriale. Cependant il demeure possible qu'une part des protons « inutilement » consommée en conditions non phosphorylantes soit finalement couplée à la phosphorylation de l'ADP en conditions maximales de respiration (\dot{V}_{\max}). La part du découplage observé pour une mitochondrie en fonctionnement minimal pourrait être différente lorsque la CRM est débloquée par la phosphorylation de l'ADP et fonctionne de manière maximale. La participation d'UCP notamment semble dépendre du potentiel de membrane, qui diminue lorsque la production du gradient électrochimique est couplée à la phosphorylation. En absence de dosage de l'ATP, il n'est pas possible de déterminer objectivement le niveau d'efficacité mitochondriale. Dans nos conditions expérimentales, le suivi de la production d'ATP aurait impliqué des prélèvements itératifs du milieu de respiration. La procédure aurait alourdi une expérimentation déjà rendue difficile par les contraintes de température sur les niveaux de concentration en O_2 et de respiration des tissus.

Place de la balance glucido-lipidique au sein de cette technique. Enfin, la mesure fonctionnelle de la respiration mitochondriale nécessite d'étudier séparément chacun des substrats afin de déterminer les capacités oxydatives mitochondriales pour chaque substrat. Cette méthode ne permet pas d'évaluer la balance glucido-lipidique et la compétition entre les substrats. En outre, la préparation des fibres permet de préserver l'intégrité du cytosquelette mais dilue les métabolites cytosoliques impliqués dans les régulations et la communication entre cytosol et matrice mitochondriale. Au sein de la fibre, la mitochondrie est notamment au contact de carnitine qui peut influencer sur l'activité de la pyruvate déshydrogénase via la disponibilité en CoASH par exemple. Dans cette volonté d'approcher le fonctionnement intégré de la mitochondrie dans son environnement cellulaire, il pourrait s'avérer intéressant d'évaluer l'effet d'une titration de pyruvate sur le niveau d'utilisation des acides gras par les mitochondries. Une difficulté serait de déterminer la contribution de ces substrats à la respiration. Dans l'hypothèse de sa faisabilité, une approche pourrait combiner cette technique au concept utilisé en calorimétrie indirecte. La détermination du rapport ATP/O et la mesure de la production de CO_2 en parallèle de la consommation en O_2 pourraient être associées à la mesure de l'oxydation de l'acide gras pour différentes concentrations de pyruvate.

4. Maintien de l'intégrité mitochondriale et de la fonctionnalité mitochondriale à la chaleur aiguë

Au terme de cette étude, si des altérations fonctionnelles peuvent être observées à la chaleur, en fonction du substrat étudié, l'élévation de la température appliquée ne montre pas d'altération de l'intégrité mitochondriale. Si l'efficacité mitochondriale n'a pas été directement évaluée par le dosage de la production d'ATP, les tests de validité au cytochrome C n'ont pas montré d'altération de la respiration mitochondriale. De plus, l'affinité pour les substrats glucidiques et lipidiques n'a pas été modifiée par la chaleur. La sensibilité mitochondriale au substrat est un reflet global de la fonctionnalité mitochondriale pour le substrat considéré. Si une augmentation du K_m avait été mise en évidence à la chaleur, elle pourrait être évocatrice d'une perturbation du métabolisme des glucides ou des lipides (telle que leur transport) ou même du fonctionnement de la phosphorylation oxydative en lien avec une augmentation du coût en oxygène de l'oxydation des substrats. En outre, les capacités oxydatives maximales du pyruvate et du PCoA n'étaient pas diminuées, de même que les valeurs d'oxydation du glutamate et succinate (résultats non montrés). Les mesures de production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour l'oxydation des deux substrats ne montrent pas de stress oxydatif au sein de fibres perméabilisées, exposées à une température de 40°C.

5. Lipotoxicité et effets potentiellement bénéfiques de la chaleur sur le syndrome métabolique.

L'observation d'une altération spécifique de l'utilisation des lipides à la chaleur dans cette étude pose la question des conséquences de ce découplage sur la lipotoxicité notamment incriminée dans la genèse du syndrome métabolique. L'accumulation d'acides gras joue un rôle majeur dans la genèse du syndrome métabolique en favorisant l'insulino-résistance. Modélisée au travers du cycle de Randle, l'augmentation de l'Acétyl-CoA et du citrate liée à l'utilisation accrue des AG inhibe la PDH et l'utilisation du glucose. Par ailleurs, il existerait également une altération de l'oxydation mitochondriale des lipides orientant le métabolisme vers le stockage sous forme de triglycérides. Ainsi, l'augmentation de l'accumulation des lipides altérerait les capacités d'oxydation des glucides et des lipides (Delarue and Magnan 2007). Plusieurs études retrouvent une amélioration de l'insulinorésistance après exposition à la chaleur (Gupte, Bomhoff et al. 2009, Gerazova-Efremova, Dinevska-Kjovkarovska et al. 2019). Gupte montre notamment qu'une exposition répétée à la chaleur a permis d'améliorer la tolérance au glucose et la réponse à un régime enrichi en lipides chez des rats. Le conditionnement avait également induit une augmentation du contenu en UCP3 dans *l'extensor digitorul longus* (EDL) mais pas dans le *soleus*, cependant. Dans cette même étude, l'exposition aiguë à la chaleur avait induit

une augmentation de l'oxydation des acides gras et de la consommation mitochondriale en O₂ au sein de cultures de cellules myoblastiques (L6). Par ailleurs un lien existe entre l'expression d'UCP3 et le diabète. La diminution de l'expression d'UCP3 (transcrit et protéine) était retrouvée dans le muscle squelettique de patients diabétiques de type 2 (Liu, Li et al. 2013). Ces éléments tendent à montrer un lien entre les capacités d'oxydation mitochondriale, la mise en jeu des UCP et l'augmentation de l'oxydation des acides gras dans la protection contre l'insulinorésistance et la survenue du diabète. L'oxydation accrue des acides gras permise par la mise en jeu des UCP à la chaleur permettrait de lutter contre la lipotoxicité induite par l'accumulation des acides gras. Dans ce contexte, la diminution du couplage des acides gras par une exposition à la chaleur pourrait s'avérer être un moyen de diminuer les effets délétères de l'augmentation de la concentration en acides gras. Ainsi de façon un peu contre-intuitive si l'on s'arrête aux études ayant montré une élévation de la glycémie et un certain degré d'insulinorésistance lors d'une exposition aigüe à la chaleur, l'exposition répétée à la chaleur pourrait en fait constituer un adjuvant thérapeutique dans la prise en charge de lipotoxicité concourant au diabète de type 2.

III. L'acclimatation à la chaleur n'induit pas d'adaptations mitochondriales de nature à potentialiser les effets d'un entraînement en endurance

1. Pas d'effet additif sur l'augmentation de contenu mitochondrial induite par entraînement

Les données de notre seconde étude ne montrent pas d'effet synergique de l'entraînement et de l'acclimatation à la chaleur sur l'augmentation du contenu mitochondrial. Le protocole d'entraînement aérobie de six semaines a induit une augmentation des performances maximales aérobies objectivées par une augmentation de la vitesse maximale aérobie indépendamment de tout effet de l'acclimatation. De même si l'augmentation des performances maximales aérobies s'est accompagnée d'une augmentation des capacités oxydatives musculaires, l'acclimatation à la chaleur n'a pas modifié l'effet propre de l'entraînement. Nos résultats sont en contradiction avec ceux de l'étude de Tamura. Cette dernière montrait, chez la souris, une augmentation du contenu musculaire mitochondrial après entraînement en endurance (25m/min, 5jours/sem) qui pouvait être accrue par une exposition répétée à la chaleur (40°C – 30 min, 5 jours/semaine) pendant 3 semaines. L'augmentation de l'activité de la citrate synthase et de l'hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase montrait un effet synergique de l'entraînement et de l'acclimatation dans le *soleus* et le *plantaris*. L'induction d'une acclimatation à la chaleur n'a pas favorisé les effets de l'entraînement en endurance sur les performances aérobies maximales et la biogenèse,

demeurées similaires dans le groupe entraîné et acclimaté. L'acclimatation à la chaleur a modifié différemment les adaptations métaboliques et mitochondriales induites par l'entraînement en fonction du substrat considéré.

2. Pas d'effet de l'acclimatation à la chaleur sur les adaptations de l'oxydation des lipides à l'entraînement

Les adaptations du métabolisme oxydatif lipidique traduisent l'augmentation du contenu mitochondrial en réponse à l'entraînement. Les effets classiques de l'entraînement ont donc été retrouvés sur le métabolisme oxydatif lipidique. L'entraînement en endurance a augmenté les capacités oxydatives maximales pour les lipides dans tous les groupes entraînés, mais il n'existe pas de modulation spécifique ni liée à l'entraînement ni liée à l'acclimatation comme en atteste l'absence de modulation du ratio CS/3-HAD en fonction des groupes.

Un découplage pour les lipides a également été observé dans les groupes entraînés sans influence de l'acclimatation à la chaleur. Les effets de l'exposition aiguë *ex vivo* à la chaleur sur le découplage des AG retrouvés dans la première étude n'ont apparemment pas de retentissement sur l'oxydation des lipides après acclimatation à la chaleur. Le contenu protéique en UCP n'a pas été modifié par l'entraînement ou l'acclimatation à la chaleur, de même que le contenu en ANT-1. L'absence d'altération du couplage pour l'oxydation des glucides oriente néanmoins vers une origine fonctionnelle de ce découplage dont l'effecteur ne peut être identifié dans cette étude.

A contrario, les effets de l'entraînement sur l'oxydation des glucides sont altérés par l'acclimatation à la chaleur. En cohérence avec l'oxydation des lipides, l'entraînement a induit une augmentation des capacités d'oxydation des glucides. Cependant, l'acclimatation à la chaleur a limité les adaptations mitochondriales pour l'utilisation des glucides induites par l'entraînement. L'analyse post-hoc de l'interaction entre acclimatation et entraînement pour les vitesses de respiration du pyruvate montre une absence de différence entre le groupe entraîné et acclimaté et les autres groupes sauf le groupe témoin. Il paraît clair que l'effet de l'entraînement est diminué par l'acclimatation à la chaleur, pour l'oxydation des glucides. Cette moindre augmentation de l'utilisation des glucides interpelle par rapport aux observations d'épargne glucidique à l'exercice à la chaleur couramment rapportées après acclimatation à la chaleur. Cette modulation des effets de l'entraînement sur l'oxydation maximal du pyruvate par l'acclimatation à la chaleur n'est pas liée à une altération du couplage de la phosphorylation oxydative ou du contenu mitochondrial. Il semble plus pertinent qu'un frein à l'utilisation mitochondriale des glucides, puisse avoir été induit par l'acclimatation à la chaleur. Un frein

sur la PDH pourrait exister mais qui n'a pas pu être mis en évidence dans notre étude. Il n'y a pas eu de modification du contenu protéique en PDH totale ou du rapport entre PDH et PDH phosphorylée. L'induction chimique par le dichloroacétate qui lève le frein sur la PDH aurait été informative pour évaluer les effets de l'acclimatation à la chaleur sur le flux entrant de pyruvate dans la mitochondrie.

3. Acclimatation à la chaleur et entraînement en endurance n'ont pas eu d'effet synergique sur l'efficacité et la qualité mitochondriales

Notre étude met en évidence quelques altérations des processus de remodelage mitochondriale en réponse à l'entraînement aérobie mais sans aucune interaction avec l'exposition répétée à la chaleur ni effet propre de la chaleur. Avec toutes les limites liées à l'interprétation que nous pouvons faire de ces marqueurs dont nous n'avons mesuré que l'expression protéique des formes totales et sans fractionnement cellulaire, nous n'avons pas d'argument pour confirmer les altérations de la mitophagie lors de l'exposition à la chaleur retrouvées dans d'autres études (Tamura et al. 2015, Ganesan et al. 2018 ; Bownstein et al. 2017).

IV. Effet spécifique substrat-dépendant de l'acclimatation à la chaleur

1. L'acclimatation à la chaleur ne semble pas induire de biogénèse mitochondriale.

Même s'il n'existe pas d'effet global de l'acclimatation sur l'oxydation du pyruvate, l'analyse post-hoc de l'interaction avec l'entraînement retrouve une élévation de la $V_{max-Pyr}$ dans le groupe acclimaté par rapport au groupe contrôle qui conduit à s'interroger sur la signification et les mécanismes d'une augmentation de la vitesse maximale d'oxydation des glucides. Cette élévation isolée de la $V_{max-Pyr}$ sans modification de la V_0 et avec une faible élévation de l'activité de la CS (ns), n'est pas en faveur d'un effet de la chaleur sur la biogénèse. Il est néanmoins intéressant de considérer ce résultat à la lumière de la sensibilité du *soleus* à la chaleur. Comme évoquée précédemment, la réponse des muscles squelettiques à la chaleur n'est pas clairement connue. Les muscles oxydatifs comme le *soleus* pourraient être vulnérables au stress oxydatif ou aux altérations induites par la chaleur. Des expérimentations complémentaires pourraient s'avérer intéressantes afin de préciser les effets de l'acclimatation à la chaleur sur la biogénèse au sein d'un muscle glycolytique tel que le *plantaris*. Il demeure que nous n'avons pas mis en évidence d'effet stimulant de l'acclimatation à la chaleur sur la biogénèse mitochondriale contrairement à Tamura (Tamura, 2014) mais en accord avec une

autre étude ne montrant pas de modification de la translocation de PGC-1 α , acteur majeur de l'initiation de la biogenèse à l'exercice lorsqu'il est réalisé à la chaleur (Heesch, Shute et al. 2016).

Néanmoins, dans des situations qui s'accompagnent d'une altération de la biogenèse mitochondriale (immobilisation, diabète, blessures), l'acclimatation à la chaleur pourrait limiter l'amplitude de perte de la masse mitochondriale et ainsi participer à une moindre altération de la fonction musculaire et notamment de la masse musculaire (Ihsan et al. 2019, Hafen et al. 2018).

2. Acclimatation à la chaleur et entraînement en endurance ont une action synergique sur les réserves en glycogène

Les réserves en glycogène dans le groupe entraîné et acclimaté représentent le double des réserves en glycogène dans les groupes entraîné ou acclimaté alors que la respiration maximale pour le pyruvate augmente uniquement dans le groupe acclimaté à la chaleur.) Il est possible que cette synergie entre les effets de l'entraînement et ceux de l'acclimatation à la chaleur sur le contenu en glycogène musculaire résultent de l'addition des mécanismes différents induits à l'exercice et lors l'exposition à la chaleur. Néanmoins, nous n'avons pas pu corrélérer l'évolution des stocks en glycogène à une augmentation de l'état de phosphorylation de la protéine GSK-3 qui reste le premier régulateur de la glycogène synthase.

Même si les mécanismes demeurent inconnus, la potentialisation de ces conditionnements pourraient s'avérer intéressante dans des situations de fatigue musculaire induite par l'épuisement des réserves en glycogène ou nécessitant une récupération rapide (Cheison and Kulozik 2017). (Versey, Halson et al. 2013, Cheng, Willis et al. 2017). Les exercices prolongés sous-maximaux nécessitent une à la fois une épargne de l'utilisation des glucides et des réserves en glycogènes optimales. Afin de pouvoir maintenir l'exercice plus longtemps et à des intensités plus importantes, l'optimisation de l'utilisation des lipides par l'entraînement permet d'accroître le recours aux lipides pour des exercices d'intensité plus importante. Il est parfois nécessaire d'augmenter l'intensité en fin d'exercice (*finish*). En pratique sportive, mais également en milieu militaire, la capacité à produire un effort plus intense au décours d'un effort sous-maximal prolongé (phase d'approche) peut s'avérer déterminante. Cette acutisation de l'effort implique notamment un recours qui peut être exclusif aux réserves glucidiques, au premier rang desquelles le glycogène musculaire. L'augmentation de ces réserves peut permettre de diminuer l'impact d'un effort prolongé mais également de prolonger un effort plus intense en retardant la survenue de la fatigue par épuisement des réserves glycogéniques

musculaires. L'augmentation des réserves en glycogène est au même titre intéressante dans des disciplines nécessitant la répétition d'efforts intenses ou plusieurs sessions d'exercices intenses (compétition de sport de combat...) qui sollicitent préférentiellement le glycogène. Par ailleurs, la préservation des réserves en glycogène peut avoir des conséquences autres que sur le métabolisme énergétique *per se*. En phase de récupération, les stratégies de refroidissement sont largement employées notamment afin de favoriser la régénération musculaire et lutter contre la survenue de blessures. Il a été montré l'importance de stocks glycogéniques non déplétés dans le bénéfice apporté par ces stratégies de refroidissement (Allan, Sharples et al. 2019).

3. Renforcement du flux glycolytique

L'acclimatation à la chaleur pourrait favoriser des adaptations du métabolisme glycolytique. Le doublement des réserves en glycogène dans le groupe entraîné et acclimaté par rapport au groupe seulement entraîné n'est pas corrélé à l'augmentation des capacités oxydatives mitochondriales, que l'on considère la CS ou la $\dot{V}_{\text{max-Pyr}}$. Ces données montrent indirectement que l'acclimatation pourrait avoir induit des sollicitations et adaptations du métabolisme glycolytique. Nous avons échoué à documenter cette hypothèse par les dosages de l'activité de l'hexokinase, de la phosphofructokinase ou de la LDH. Pour cette dernière, nous n'avons pu réaliser le dosage des isoformes, dont on sait que la composition du tétramère varie selon le potentiel glycolytique du muscle. En outre, l'augmentation isolée du complexe IV dans le groupe acclimaté et entraîné fournit un élément d'orientation vers un renforcement du flux glycolytique par l'acclimatation à la chaleur. L'association de réserves glycogéniques augmentées à des adaptations de la cytochrome oxydase (Complexe IV) correspondent à des adaptations phénotypiques qui peuvent être induites par l'hypoxie. L'implication de HIF dans les adaptations induites par l'acclimatation à la chaleur a déjà été montrée. En outre, ces adaptations mitochondriales qualitatives pourraient participer à l'amélioration de la réactivité de la consommation en O_2 à l'exercice. Elles diminueraient le temps d'inadéquation entre consommation en O_2 et intensité de l'exercice permettant un accrochage plus rapide lors des variations d'intensité et limitant la dette d' O_2 en récupération.

4. Exposition à la chaleur en période de récupération

Dans notre étude, l'exposition à la chaleur était réalisée plusieurs heures après l'entraînement dans le groupe acclimaté et entraîné. Cette période est le moment privilégié pour la reconstitution des réserves glycogéniques, plus rapides dans la demi-heure qui suit l'effort.

Comme évoqué précédemment, la chaleur augmenterait la captation musculaire du glucose. Il est possible que l'effet de la chaleur sur la glycogénogenèse puisse être encore plus prégnant.

Cette période post-effort correspond également au moment de la synthèse protéique permettant la mise en place des adaptations induites par l'exercice préalable. Il n'est pas impossible que le stress thermique ait pu interférer avec le processus de signalisation en récupération. En outre, dans l'étude de Tamura, les effets sur la biogenèse ont été observés pour une exposition à la chaleur réalisée dans la continuité de l'exercice. Il est possible qu'une exposition en période de récupération immédiate post-effort représentant une prolongation des effets hyperthermiques de l'exercice aboutisse à un phénotype distinct au nôtre. La chronologie de l'application du stimulus chaleur par rapport à l'exercice est probablement un élément important à prendre en compte.

Figure 39. Hypothèses des effets aigus de la chaleur sur le métabolisme musculaire.

L'exposition aiguë à la chaleur induit une augmentation de la **stimulation adrénérgique** et de la **température locale** des tissus. Ces mécanismes participeraient à une dépendance accrue du métabolisme énergétique aux glucides à la chaleur, caractérisée par une augmentation de la glycémie et de l'utilisation des réserves en glycogène musculaire et hépatique. Plusieurs étapes connues pour être stimulées à l'exercice pourraient expliquer une augmentation de l'utilisation des glucides à l'exercice à la chaleur, soit par **l'hyperstimulation adrénérgique**, soit par **l'effet de l'élévation de température** (Q10). L'adrénaline stimule la glycogène phosphorylase activant ainsi la **glycogénolyse**. La **captation du glucose circulant** est augmentée par la mise en jeu des GLUT-4 à l'exercice sans qu'un effet de la chaleur sur cette étape ne soit connu. S'il n'est pas décrit de stimulation de l'étape de la **glycolyse cytosolique** par la chaleur elle-même, la PFK est stimulée par l'adrénaline. L'exercice est connu pour stimuler la PDH et **l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie**. Par ailleurs, l'adrénaline est un activateur de la PDH. En parallèle, la chaleur augmente **la concentration en lactate plasmatique**. L'induction vers l'isoforme musculaire de la LDH observée en hypoxie (Py 2005) pourrait, par un mécanisme d'adaptation croisée impliquant HIF-1, participer aux effets de la chaleur sur l'augmentation des lactates. L'augmentation des réserves en glycogène que nous observons après combinaison d'une acclimatation à la chaleur et d'un entraînement en endurance sont compatibles avec ces effets aigus de la chaleur sur la stimulation du métabolisme glucidique. La question d'une altération du métabolisme lipidique à la chaleur reste ouverte. Dans ce contexte adrénérgique, il existe une stimulation de la LHS et une augmentation des AGL qui laissent penser que, **la mobilisation des lipides** n'est pas limitée par la chaleur voire augmentée. En revanche **le transport mitochondrial des AG**, déjà identifié comme limitant à l'exercice, pourrait l'être à la chaleur mais reste à explorer. **L'étape de β -oxydation**, par la complexité qu'elle représente pourrait aussi participer à la moindre utilisation des lipides. Néanmoins, nos travaux ne montrent pas de diminution de la V_{max} PCoA à 40°C vs 35°C, ne permettant pas d'attester d'un effet limitant de la chaleur sur l'oxydation des AGLC. Indépendamment de la nature du substrat, les **capacités d'oxydation mitochondriale** peuvent être modifiées par la chaleur. Les enzymes du cycle de Krebs peuvent être exposées à un effet Q10 pouvant expliquer l'augmentation de la consommation en O₂ rapportée dans certaines études. En revanche, la chaîne respiratoire peut voir son efficacité diminuée par une altération des complexes directement liée à la thermosensibilité ou indirectement par la production d'ERO, favorisant les fuites membranaires de protons. Enfin l'altération du **rendement de la contraction musculaire** pourrait participer aux effets de la chaleur sur le métabolisme musculaire. En effet, le couplage excitation-contraction pourrait être augmenté, induisant une plus grande consommation d'ATP et donc d'oxygène. Par ailleurs, nous avons montré, à la chaleur, un découplage de la phosphorylation oxydative en présence de substrat lipidique. Les UCP semblent participer à ce découplage à la chaleur spécifique des acides gras.

CONCLUSION

Au terme de ce travail nous avons montré que l'exposition aigue à la chaleur entraîne une altération de l'utilisation des lipides à la chaleur par les mitochondries, principalement en conditions de respiration mitochondriale découplée de la phosphorylation de l'ADP. Cette augmentation de la consommation résiduelle de l'oxygène reflète un découplage des oxydations. Le gradient de protons est court circuité par l'activation d'UCP, dans des conditions associant une disponibilité importante en acides gras et une élévation de la température. Cependant les UCP n'expliquent pas la totalité du découplage de l'oxydation des lipides, et il existe aussi une tendance à un moins bon couplage à la chaleur lors de l'oxydation des glucides. D'autres mécanismes pourraient donc être impliqués dans les effets de la chaleur sur le métabolisme mitochondrial. Les étapes de transport des acides gras, la régulation du métabolisme oxydatif glucidique par la pyruvate déshydrogénase ou des altérations directes de la CRM par la chaleur constituent des hypothèses que nous n'avons pu tester au cours de ce travail. L'exposition répétée à la chaleur *in vivo* n'a pas modifié les adaptations à l'entraînement sur la quantité ou la qualité ou des mitochondries. Les effets de l'entraînement sur l'utilisation des lipides n'ont pas été modifiés par l'acclimatation à la chaleur. Il semble que le découplage observé à l'exposition aigue ne constitue pas un facteur d'adaptation mitochondriale à l'acclimatation à la chaleur et ne potentialise pas les effets par ailleurs bénéfiques de l'entraînement sur le découplage.

L'acclimatation à la chaleur pourrait altérer différemment le métabolisme aérobie et anaérobie des glucides. Elle interférerait avec les effets bénéfiques de l'entraînement sur l'oxydation des glucides. L'absence d'altération de la fonction oxydative et phosphorylante observée pour les lipides, oriente vers une possible limitation de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie. A contrario, le doublement des réserves en glycogène observé en combinant l'acclimatation et l'entraînement, suggère que les capacités glycolytiques pourraient être augmentées, mimant un phénotype métabolique « hypoxia-like ». Cependant, notre travail n'a pas pu étayer ce mécanisme d'action au niveau de la voie glycolytique. Seule, une adaptation de l'expression du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, connu pour sa sensibilité au stimulus hypoxique argumente en faveur.

PERSPECTIVES

Nous projetons de prolonger et transposer chez l'Homme les questions émergeant de ce travail, avec une étude en deux phases : effet aigu de la chaleur à l'exercice sur l'utilisation de substrats et optimisation de l'acclimatation.

Tout récemment, Gagnon a comparé les effets d'une exposition aiguë au froid (4°C) et au chaud (37°C) sur l'utilisation des substrats énergétiques à différentes intensités d'exercice. L'objectif de l'étude était de préciser l'effet de la température sur les capacités maximales d'utilisation des lipides (MFO : *maximal fat oxidation*) et la puissance correspondant à ce point (LIPOXMAX). Il a ainsi montré que le froid augmentait les capacités d'utilisation des lipides et que la chaleur avait un effet inverse.

S'il a été montré une augmentation de la concentration en acides gras circulants à l'exercice à la chaleur, aucune de ces études ne se sont pas intéressées à la mobilisation des lipides, ne permettant pas de savoir s'il existe une véritable augmentation de la disponibilité en lipides ou s'il s'agit d'une conséquence d'une moindre utilisation périphérique des acides gras.

Nous proposons une première étude pour mieux comprendre l'impact de l'hyperthermie et du statut nutritionnel sur la mobilisation et l'utilisation des lipides à l'exercice. En écho à l'absence d'observation de ce travail, un objectif est de déterminer s'il existe un défaut d'utilisation des lipides au regard de leur disponibilité. Contrairement à la plupart des travaux où une température d'exposition est appliquée, nous proposons ici d'induire une hyperthermie calibrée par un niveau d'élévation de température profonde, reflétant un niveau de stockage thermique. Un exercice de durée prolongée (45min-1h) sera réalisé à même intensité absolue (celle mesurée pour le lipoxmax) en ambiance thermique neutre et après induction d'une hyperthermie. Le niveau d'oxydation des lipides et glucides sera mesuré par calorimétrie indirecte. Des prélèvements réguliers du liquide extracellulaire adipocytaire réalisés par l'intermédiaire d'un dispositif de microdialyse du tissu adipeux sous cutané abdominal permettront de suivre la concentration en glycérol et donc le niveau de lipolyse. Un contrôle nutritionnel pourra également être associé, comprenant des sessions à jeun ou après un régime riche en glucides. Il permettra d'évaluer l'impact de la disponibilité en substrats sur les effets de la chaleur sur le métabolisme énergétique à l'exercice. L'intérêt serait de fournir des stratégies nutritionnelles afin de limiter, les altérations métaboliques induites par un exercice aigu à la chaleur.

Par ailleurs les observations faites concernant l'acclimatation à la chaleur nous conduisent à nous interroger *a posteriori* sur les conséquences de ce conditionnement sur la filière anaérobie et l'intérêt possible comme modalité de préparation pour le demi-fond et d'optimisation de la récupération métabolique entre des répétitions d'exercice.

Une seconde étude est envisagée pour étudier l'impact de l'acclimatation à la chaleur couplées à une stratégie nutritionnelle sur la filière anaérobie lactique

L'objectif est d'évaluer l'impact sur la performance à un exercice de haute intensité et sa répétition d'une stratégie associant acclimatation à la chaleur, augmentation des apports en glucides avec un entraînement par intervalles à haute intensité (HIIT).

Enfin à plus long terme mais dans l'idée de poursuivre la connaissance sur les effets métaboliques des contraintes combinées d'un environnement climatique avec l'entraînement, compte tenu de la majoration de l'oxydation des lipides observée par Gagnon lors d'un exercice à 4°C, de l'induction de PGC1- α par l'environnement froid, il nous semble intéressant d'explorer les effets d'un entraînement au froid associé à une restriction des apports en glucides sur les adaptations mitochondriales et la capacités à utiliser les lipides ce qui pourrait présenter un intérêt dans la préparation pour les épreuves de longue distance.

TRAVAUX REALISES DURANT CE TRAVAIL DE THESE

I. En rapport avec le sujet de thèse

1. Participation à une étude en vue d'optimiser le protocole d'acclimatation des militaires projetés en milieu chaud

Dans le cadre d'une demande de l'état-major de l'armée de terre, nous avons été mandatés afin d'optimiser la période d'acclimatation des troupes projetées aux Emirats Arabes Unis. La particularité de cette base est de comporter des personnels permanents, affectés pour une durée de deux à trois ans, et des personnels en mission de courte durée, projetés pour quatre mois. Les militaires proviennent de tout le territoire, avec un statut et un historique d'acclimatation qui diffèrent selon la région de provenance et des missions déjà effectuées à l'étranger. L'optimisation de leur période d'acclimatation à la chaleur est donc primordiale pour la santé de ces militaires mais également pour le bon déroulement de leur mission. Jusqu'à présent, la consigne était de ne soumettre les personnels à aucune activité physique durant les quinze premiers jours sur le théâtre, excepté les activités requises pour l'accomplissement de leur service. Compte tenu des bénéfices de l'exercice physique sur l'acclimatation à la chaleur, il a été proposé d'évaluer l'apport d'une activité physique modérée sur la qualité et la cinétique d'adaptation à la chaleur.

Nous avons pour cela réalisé deux études à un an d'intervalle, sur une base militaire près d'Abu Dhabi, aux Emirats Arabes Unis. La première étude portait sur une durée de 5 jours, et a consisté à comparer des marqueurs physiologiques d'adaptation à la chaleur (température rectale, fréquence cardiaque de repos et d'exercice, indice de perception de la pénibilité de l'effort et du confort thermique) entre un groupe témoin, réalisant les activités courantes, et un groupe entraîné pour lequel était associée une séance d'entraînement d'intensité modérée et progressive. Nous avons montré une accélération de la réponse de certains marqueurs (moindre élévation de la fréquence cardiaque, amélioration de l'indice de confort thermique et de perception de la pénibilité de l'effort (RPE) et diminution de l'osmolalité de la sueur) dans le groupe entraîné. Dans la seconde étude, le même entraînement a été réalisé sur 15 jours. Nous avons montré un asynchronisme entre l'évolution de la perception du confort thermique, qui était nettement améliorée à 15 jours, et le niveau des adaptations physiologiques, encore incomplet. Dans le contexte militaire où les activités opérationnelles étaient réalisées en parallèle, l'exercice modéré a probablement induit une charge thermique supplémentaire pouvant expliquer la discordance entre les adaptations psychologiques et physiologiques,

notamment via une température cutanée abaissée dans le groupe entraîné dont on connaît l'importance sur la perception de l'environnement climatique.

Les observations de ces deux études conduisent à proposer un exercice physique modéré et encadré (horaires adaptés, hydratation, intensité modérée) afin d'accélérer certaines adaptations physiologiques et psychologiques permettant d'améliorer précocement la tolérance à la chaleur. Cette étude a donné lieu à la publication de deux articles et la rédaction d'un troisième article en cours de soumission (Charlot, Tardo-Dino et al. 2017, Malgoyre, Tardo-Dino et al. 2018).

2. Communications orales

Intervention au profit des entraîneurs de la Fédération Française d'Athlétisme au cours d'une journée sur le thème « compétition et milieu chaud », le 14 décembre 2018, à Clermont-Ferrand.

J'ai réalisé trois présentations au cours de cette journée :

- Physiologie de la thermorégulation et mécanismes d'acclimatation à la chaleur
- Présentation d'un protocole rénové d'acclimatation à la chaleur à partir de l'expérimentation réalisée à Abu Dhabi
- Coup de chaleur d'exercice et les principales situations à risque.

Journée de l'Ecole Doctorale

Dans le cadre des journées de l'école doctorale interdisciplinaire sciences et santé (journée de l'EDISS 205, Lyon, 11 octobre 2018), j'ai présenté les résultats principaux de la première étude : « Effet du stress thermique chaud sur l'utilisation des lipides ».

Communications flash en congrès nationaux:

- Congrès Meetochondrie 2018, Pornichet. Du 27 au 30 mai 2018: " Heat induces Palmitoyl-CoA OXPHOS uncoupling in rat permeabilized skeletal muscle fibers"
- 19^{ème} Congrès du Groupe Français de Bioénergétique à Lacanau. Du 20 au 24/09/2017 : « Palmitoyl-CoA induces mitochondrial uncoupling in rat myofibers exposed to heat stress »

3. Communications affichées

Communications concernant les résultats des deux expérimentations sur la respiration mitochondriale.

Communications internationales

- Cell symposia Exercise Metabolism, Sitges, Espagne. Du 05 au 07/05/2019: « Effect of heat acclimatization on muscle metabolic adaptations induced by endurance training in rats » Communication affichée.
- Integrative Biology of Exercise VII Phoenix, Arizona. Du 02 au 04 novembre 2016
- « Palmitoyl-CoA induces mitochondrial uncoupling in rat myofibers exposed to heat stress ». Communication internationale affichée

II. En parallèle du travail de thèse

1. Communication écrite

Communications concernant les résultats obtenus dans le cadre d'une étude réalisée durant le master II – Congrès ICSPP 2017

J'ai présenté au cours de l'ICSPP 2017 (International Congress for Soldier's Physical Performance, Melbourne, Australie du 29 novembre au 4 décembre 2017) les résultats concernant une étude sur l'effet de l'entraînement sur les altérations de la fonction endothéliale induites par la privation totale de sommeil. "Protective effects of exercise training on endothelial dysfunction induced by total sleep deprivation in healthy subjects". J'ai notamment suivi le conditionnement des sujets, qui a consisté en un entraînement par intervalles à haute intensité de 4 semaines. Ce conditionnement faisait partie de mon travail de MASTER II qui s'intéressait aux effets d'un entraînement en endurance sur la réponse microvasculaire cutanée lors d'un exercice à puissance constante.

2. Participation à d'autres études.

Dermosquelette : notre unité a été mandatée pour évaluer un dispositif d'assistance à la marche, de type dermosquelette. J'ai été sollicité pour assurer la surveillance médicale durant cette étude.

PERCAF. Une étude actuellement en cours au sein de l'unité fatigue et vigilance a pour but d'étudier les polymorphismes pouvant participer à la vulnérabilité à la dette de sommeil et à la susceptibilité de la réponse à la caféine. Je participe à la surveillance médicale de cette étude, notamment pour les épreuves de charge-vitesse qui sont réalisées.

HAKATON « smart clothes connected object »

3. Elaboration de l'outil de recherche à l'IRBA

Je participe à la mise en place de plateformes destinées à l'étude des effets de la chaleur chez l'Homme et l'animal. Une chambre bioclimatique Homme est en cours de construction au sein de notre unité. En tant que futur utilisateur, j'ai participé à la définition des systèmes de pilotage de la chambre et des mesures qui seront réalisées. Un ensemble de capteurs élaborés par une entreprise française va permettre d'enregistrer les variables d'intérêt telles que la fréquence cardiaque ou les températures profondes et cutanées (Captiv, France). Ils seront intégrés au sein d'un environnement logiciel permettant de suivre et enregistrer les variables physiologiques durant l'expérimentation.

En parallèle, une chambre bioclimatique rongeurs est en cours de construction. J'ai participé à l'élaboration du cahier des charges et spécificités techniques de la chambre. J'ai également été impliqué dans la mise en place de l'outil informatique destiné à piloter la chambre. Enfin, nous sommes en cours d'acquisition d'outils de mesures de variables physiologiques chez l'animal qui seront employés dans ces chambres. Nous avons notamment opté pour une jeune société grenobloise, dont les systèmes sont en cours de développement et demandent un suivi régulier afin d'obtenir un outil innovant et adapté à notre usage, notamment en matière d'actimétrie couplée à la mesure des variables physiologiques telles que la fréquence cardiaque ou la température profonde, par téléométrie.

4. Participation à un enseignement

Participation 1 fois par trimestre à l'Instruction Aéromédicale en centrifugeuse. Enseignement des conséquences physiologiques des accélérations et des contre-mesure à mettre en œuvre. Surveillance médicale des élèves-pilotes durant les lancements.

En tant que médecin-physiologiste, j'ai été sollicité par l'Ecole Nationale de Kinésithérapie-Rééducation (ENKRE) de Saint Maurice (Val de Marne). Je suis chargé des cours concernant l'appareil cardio-vasculaire, sa régulation, ses réponses à l'exercice et la physiologie rénale.

5. Formation continue

Stage Conception et Réalisation d'une procédure expérimentale chez l'animal (2016)

Diplôme Inter universitaire de Physiopathologie de l'exercice et Exploration Fonctionnelle à l'Effort (2018-2019).

BIBLIOGRAPHIE

- Acin, A., M. Rodriguez, H. Rique, E. Canet, J. A. Boutin and J. P. Galizzi (1999). "Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene." Biochem Biophys Res Commun **258**(2): 278-283.
- Adams, S. H. (2000). "Uncoupling protein homologs: emerging views of physiological function." J Nutr **130**(4): 711-714.
- Agarwal, A. and S. A. Prabakaran (2005). "Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology." Indian J Exp Biol **43**(11): 963-974.
- Akanji, A. O., M. Bruce and K. Frayn (1987). "Oral glucose tolerance and ambient temperature in non-diabetic subjects." Diabetologia **30**(6): 431-433.
- Akanji, A. O. and R. N. Oputa (1991). "The effect of ambient temperature on glucose tolerance." Diabetic Medicine **8**(10): 946-948.
- Akimoto, T., S. C. Pohnert, P. Li, M. Zhang, C. Gumbs, P. B. Rosenberg, R. S. Williams and Z. Yan (2005). "Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway." J Biol Chem **280**(20): 19587-19593.
- Alexander-Shani, R., A. Mreizat, E. Smeir, G. Gerstenblith, M. D. Stern and M. Horowitz (2017). "Long-term HIF-1 α transcriptional activation is essential for heat-acclimation-mediated cross tolerance: Mitochondrial target genes." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **312**(5): R753-R762.
- Almudehki, F., O. Girard, J. Grantham and S. Racinais (2012). "Hot ambient conditions do not alter intermittent cycling sprint performance." J Sci Med Sport **15**(2): 148-152.
- Andreyev, A., T. O. Bondareva, V. I. Dedukhova, E. N. Mokhova, V. P. Skulachev, L. M. Tsofina, N. I. Volkov and T. V. Vygodina (1989). "The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria." Eur J Biochem **182**(3): 585-592.
- Aoyagi, Y., T. M. McLellan and R. J. Shephard (1994). "Effects of training and acclimation on heat tolerance in exercising men wearing protective clothing." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **68**(3): 234-245.
- Arieli, Y., M. Eynan, H. Gancz, R. Arieli and Y. Kashi (2003). "Heat acclimation prolongs the time to central nervous system oxygen toxicity in the rat. Possible involvement of HSP72." Brain Res **962**(1-2): 15-20.
- Arrondo, J. L. R., J. Castresana, J. M. Valpuesta and F. M. Goni (1994). "Structure and thermal denaturation of crystalline and noncrystalline cytochrome oxidase as studied by infrared spectroscopy." Biochemistry **33**(38): 11650-11655.
- Assayag, M., G. Gerstenblith, M. D. Stern and M. Horowitz (2010). "Long- but not short-term heat acclimation produces an apoptosis-resistant cardiac phenotype: a lesson from heat stress and ischemic/reperfusion insults." Cell Stress Chaperones **15**(5): 651-664.
- Assayag, M., A. Saada, G. Gerstenblith, H. Canaana, R. Shlomai and M. Horowitz (2012). "Mitochondrial performance in heat acclimation--a lesson from ischemia/reperfusion and calcium overload insults in the heart." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **303**(8): R870-881.
- Baar, K., A. R. Wende, T. E. Jones, M. Marison, L. A. Nolte, M. Chen, D. P. Kelly and J. O. Holloszy (2002). "Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1." Faseb j **16**(14): 1879-1886.
- Backx, K., L. McNaughton, L. Crickmore, G. Palmer and A. Carlisle (2000). "Effects of differing heat and humidity on the performance and recovery from multiple high intensity, intermittent exercise bouts." Int J Sports Med **21**(6): 400-405.
- Baker, P. T. (1965). "Handbook of physiology, section 4: Adaptation to the environment. Editors, D. B. Dill, E. F. Adolph and C. G. Wilber. American Physiological Society, Washington, D. C. 1964. 1056 pp. \$32.00." American Journal of Physical Anthropology **23**(4): 445-447.
- Ball, D., C. Burrows and A. J. Sargeant (1999). "Human power output during repeated sprint cycle exercise: the influence of thermal stress." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **79**(4): 360-366.
- Balsom, P. D., J. Y. Seger, B. Sjodin and B. Ekblom (1992). "Physiological responses to maximal intensity intermittent exercise." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **65**(2): 144-149.
- Bass, D. E., C. R. Kleeman, M. Quinn, A. Henschel and A. H. Hegnauer (1955). "Mechanisms of acclimatization to heat in man." Medicine (Baltimore) **34**(3): 323-380.
- Bastie, C. C., Z. Nahle, T. McLoughlin, K. Esser, W. Zhang, T. Unterman and N. A. Abumrad (2005). "FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms." J Biol Chem **280**(14): 14222-14229.
- Beaudin, A. E., M. E. Clegg, M. L. Walsh and M. D. White (2009). "Adaptation of exercise ventilation during an actively-induced hyperthermia following passive heat acclimation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **297**(3): R605-614.

Befroy, D. E., K. F. Petersen, S. Dufour, G. F. Mason, D. L. Rothman and G. I. Shulman (2008). "Increased substrate oxidation and mitochondrial uncoupling in skeletal muscle of endurance-trained individuals." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16701-16706.

Bell, A. W., J. R. Hales, R. B. King and A. A. Fawcett (1983). "Influence of heat stress on exercise-induced changes in regional blood flow in sheep." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **55**(6): 1916-1923.

Bergström, J. and E. Hultman (1966). "Muscle Glycogen Synthesis after Exercise : an Enhancing Factor localized to the Muscle Cells in Man." Nature **210**(5033): 309-310.

Bezair, V., C. R. Bruce, G. J. Heigenhauser, N. N. Tandon, J. F. Glatz, J. J. Luiken, A. Bonen and L. L. Spriet (2006). "Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E509-515.

Binzoni, T., L. Ngo, E. Hiltbrand, R. Springett and D. Delpy (2002). "Non-standard O₂ consumption-temperature curves during rest and isometric exercise in human skeletal muscle." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **132**(1): 27-32.

Birgisdottir, A. B., T. Lamark and T. Johansen (2013). "The LIR motif - crucial for selective autophagy." J Cell Sci **126**(Pt 15): 3237-3247.

Bonaldo, P. and M. Sandri (2013). "Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy." Dis Model Mech **6**(1): 25-39.

Bonen, A., S. E. Campbell, C. R. Benton, A. Chabowski, S. L. Coort, X. X. Han, D. P. Koonen, J. F. Glatz and J. J. Luiken (2004). "Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36." Proc Nutr Soc **63**(2): 245-249.

Bonen, A., A. Chabowski, J. J. Luiken and J. F. Glatz (2007). "Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence." Physiology (Bethesda) **22**: 15-29.

Bonen, A., J. J. Luiken and J. F. Glatz (2002). "Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease." Mol Cell Biochem **239**(1-2): 181-192.

Bonnefont, J. P., F. Djouadi, C. Prip-Buus, S. Gobin, A. Munnich and J. Bastin (2004). "Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects." Mol Aspects Med **25**(5-6): 495-520.

Booth, F. W. and D. B. Thomason (1991). "Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models." Physiol Rev **71**(2): 541-585.

Boss, O., T. Hagen and B. B. Lowell (2000). "Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism." Diabetes **49**(2): 143-156.

Boss, O., S. Samec, A. Paoloni-Giacobino, C. Rossier, A. Dulloo, J. Seydoux, P. Muzzin and J. P. Giacobino (1997). "Uncoupling protein-3: A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression." FEBS Letters **408**(1): 39-42.

Bottinelli, R., M. Canepari, M. A. Pellegrino and C. Reggiani (1996). "Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence." J Physiol **495** (Pt 2): 573-586.

Boushel, R., E. Gnaiger, J. A. Calbet, J. Gonzalez-Alonso, C. Wright-Paradis, H. Sondergaard, I. Ara, J. W. Helge and B. Saltin (2011). "Muscle mitochondrial capacity exceeds maximal oxygen delivery in humans." Mitochondrion **11**(2): 303-307.

Boyd, A. E., 3rd, S. R. Giamber, M. Mager and H. E. Lebovitz (1974). "Lactate inhibition of lipolysis in exercising man." Metabolism **23**(6): 531-542.

Brand, M. D. (2000). "Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing." Exp Gerontol **35**(6-7): 811-820.

Brand, M. D. (2005). "The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 897-904.

Brand, M. D., J. L. Pakay, A. Ocloo, J. Kokoszka, D. C. Wallace, P. S. Brookes and E. J. Cornwall (2005). "The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content." Biochem J **392**(Pt 2): 353-362.

Brdiczka, D. (1991). "Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer." Biochim Biophys Acta **1071**(3): 291-312.

Brooks, G. A. (1987). "Amino acid and protein metabolism during exercise and recovery." Med Sci Sports Exerc **19**(5 Suppl): S150-156.

Brooks, G. A. (2009). "Cell-cell and intracellular lactate shuttles." J Physiol **587**(Pt 23): 5591-5600.

Brooks, G. A., K. J. Hittelman, J. A. Faulkner and R. E. Beyer (1971). "Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt." The American journal of physiology **220**(4): 1053-1059.

Brooks, G. A. and J. Mercier (1994). "Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: The 'crossover' concept." Journal of Applied Physiology **76**(6): 2253-2261.

Brouha, L., P. E. Smith, R. De Lanne and M. E. Maxfield (1961). "Physiological reactions of men and women during muscular activity and recovery in various environments." Journal of Applied Physiology **16**(1): 133-140.

Brown, J. M., J. Henriksson and S. Salmons (1989). "Restoration of fast muscle characteristics following cessation of chronic stimulation: physiological, histochemical and metabolic changes during slow-to-fast transformation." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **235**(1281): 321-346.

Brownstein, A. J., S. Ganesan, C. M. Summers, S. Pearce, B. J. Hale, J. W. Ross, N. Gabler, J. T. Seibert, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard and J. T. Selsby (2017). "Heat stress causes dysfunctional autophagy in oxidative skeletal muscle." *Physiol Rep* **5**(12).

Calvani, R., A. M. Joseph, P. J. Adhihetty, A. Miccheli, M. Bossola, C. Leeuwenburgh, R. Bernabei and E. Marzetti (2013). "Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy." *Biol Chem* **394**(3): 393-414.

Calvo, J. A., T. G. Daniels, X. Wang, A. Paul, J. Lin, B. M. Spiegelman, S. C. Stevenson and S. M. Rangwala (2008). "Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake." *J Appl Physiol* (1985) **104**(5): 1304-1312.

Carey, A. L., G. R. Steinberg, S. L. Macaulay, W. G. Thomas, A. G. Holmes, G. Ramm, O. Prelovsek, C. Hohnen-Behrens, M. J. Watt, D. E. James, B. E. Kemp, B. K. Pedersen and M. A. Febbraio (2006). "Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase." *Diabetes* **55**(10): 2688-2697.

Cartoni, R., B. Leger, M. B. Hock, M. Praz, A. Crettenand, S. Pich, J. L. Ziltener, F. Luthi, O. Deriaz, A. Zorzano, C. Gobelet, A. Kralli and A. P. Russell (2005). "Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise." *J Physiol* **567**(Pt 1): 349-358.

Cassuto, Y. (1968). "Metabolic adaptations to chronic heat exposure in the golden hamster." *Am J Physiol* **214**(5): 1147-1151.

Casteilla, L., M. Rigoulet and L. Penicaud (2001). "Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins." *IUBMB Life* **52**(3-5): 181-188.

Chance, B. and G. R. Williams (1956). "The respiratory chain and oxidative phosphorylation." *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **17**: 65-134.

Chen, H., A. Chomyn and D. C. Chan (2005). "Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction." *J Biol Chem* **280**(28): 26185-26192.

Chen, Y. and G. W. Dorn, 2nd (2013). "PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria." *Science* **340**(6131): 471-475.

Chesley, A., E. Hultman and L. L. Spriet (1995). "Effects of epinephrine infusion on muscle glycogenolysis during intense aerobic exercise." *Am J Physiol* **268**(1 Pt 1): E127-134.

Chien, K. R. (2000). "Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases." *Nature* **407**(6801): 227-232.

Chrétien, D., P. Bénit, H.-H. Ha, S. Keipert, R. El-Khoury, Y.-T. Chang, M. Jastroch, H. T. Jacobs, P. Rustin and M. Rak (2018). "Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C." *PLoS Biology* **16**(1): e2003992.

Chweih, H., R. F. Castilho and T. R. Figueira (2015). "Tissue and sex specificities in Ca²⁺ handling by isolated mitochondria in conditions avoiding the permeability transition." *Exp Physiol* **100**(9): 1073-1092.

Cogliati, S., J. A. Enriquez and L. Scorrano (2016). "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." *Trends Biochem Sci* **41**(3): 261-273.

Cogliati, S., C. Frezza, M. E. Soriano, T. Varanita, R. Quintana-Cabrera, M. Corrado, S. Cipolat, V. Costa, A. Casarin, L. C. Gomes, E. Perales-Clemente, L. Salvati, P. Fernandez-Silva, J. A. Enriquez and L. Scorrano (2013). "Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency." *Cell* **155**(1): 160-171.

Conley, K. E., C. E. Amara, S. Bajpeyi, S. R. Costford, K. Murray, S. A. Jubrias, L. Arakaki, D. J. Marcinek and S. R. Smith (2013). "Higher Mitochondrial Respiration and Uncoupling with Reduced Electron Transport Chain Content in Vivo in Muscle of Sedentary Versus Active Subjects." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **98**(1): 129-136.

Conley, K. E., S. A. Jubrias, M. E. Cress and P. Esselman (2013). "Exercise efficiency is reduced by mitochondrial uncoupling in the elderly." *Exp Physiol* **98**(3): 768-777.

Conley, K. E., S. A. Jubrias, M. E. Cress and P. C. Esselman (2013). "Elevated energy coupling and aerobic capacity improves exercise performance in endurance-trained elderly subjects." *Exp Physiol* **98**(4): 899-907.

Conley, K. E., S. A. Jubrias and P. C. Esselman (2000). "Oxidative capacity and ageing in human muscle." *J Physiol* **526 Pt 1**: 203-210.

Conley, K. E., W. F. Kemper and G. J. Crowther (2001). "Limits to sustainable muscle performance: interaction between glycolysis and oxidative phosphorylation." *J Exp Biol* **204**(Pt 18): 3189-3194.

Consolazio, C. F., L. R. Matoush, R. A. Nelson, J. B. Torres and G. J. Isaac (1963). "Environmental temperature and energy expenditures." *J Appl Physiol* **18**: 65-68.

Consolazio, C. F., R. Shapiro, J. E. Masterson and P. S. L. McKinzie (1961). "Energy Requirements of Men in Extreme Heat." *The Journal of Nutrition* **73**(2): 126-134.

Constantin-Teodosiu, D., J. I. Carlin, G. Cederblad, R. C. Harris and E. Hultman (1991). "Acetyl group accumulation and pyruvate dehydrogenase activity in human muscle during incremental exercise." *Acta Physiol Scand* **143**(4): 367-372.

Convertino, V. A. (1991). "Blood volume: its adaptation to endurance training." *Med Sci Sports Exerc* **23**(12): 1338-1348.

Convertino, V. A., J. E. Greenleaf and E. M. Bernauer (1980). "Role of thermal and exercise factors in the mechanism of hypervolemia." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **48**(4): 657-664.

Coyle, E. F. (1999). "Physiological determinants of endurance exercise performance." *J Sci Med Sport* **2**(3): 181-189.

Coyle, E. F., A. E. Jeukendrup, A. J. Wagenmakers and W. H. Saris (1997). "Fatty acid oxidation is directly regulated by carbohydrate metabolism during exercise." *Am J Physiol* **273**(2 Pt 1): E268-275.

Criscuolo, F., M. Gonzalez-Barroso Mdel, Y. Le Maho, D. Ricquier and F. Bouillaud (2005). "Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage." *Proc Biol Sci* **272**(1565): 803-810.

Daussin, F. N., J. Zoll, S. P. Dufour, E. Ponsot, E. Lonsdorfer-Wolf, S. Doutreleau, B. Mettauer, F. Piquard, B. Geny and R. Richard (2008). "Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to aerobic performance improvements in sedentary subjects." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**(1): R264-272.

Davidson, J. F. and R. H. Schiestl (2001). "Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8483-8489.

De Ruiter, C. J. and A. De Haan (2000). "Temperature effect on the force/velocity relationship of the fresh and fatigued human adductor pollicis muscle." *Pflugers Arch* **440**(1): 163-170.

Dimri, G. P., M. S. Malhotra, J. Sen Gupta, T. S. Kumar and B. S. Arora (1980). "Alterations in aerobic-anaerobic proportions of metabolism during work in heat." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **45**(1): 43-50.

Ding, H., N. Jiang, H. Liu, X. Liu, D. Liu, F. Zhao, L. Wen, S. Liu, L. L. Ji and Y. Zhang (2010). "Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle." *Biochim Biophys Acta* **1800**(3): 250-256.

Doerge, H. and A. Stahl (2006). "Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models." *Physiology (Bethesda)* **21**: 259-268.

Dolny, D. G. and P. W. Lemon (1988). "Effect of ambient temperature on protein breakdown during prolonged exercise." *J Appl Physiol* (1985) **64**(2): 550-555.

Dotan, R. and O. Bar-Or (1980). "Climatic heat stress and performance in the Wingate Anaerobic Test." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **44**(3): 237-243.

Downs, C. A. and S. A. Heckathorn (1998). "The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants." *FEBS Lett* **430**(3): 246-250.

Drew, B. G., V. Ribas, J. A. Le, D. C. Henstridge, J. Phun, Z. Zhou, T. Soleymani, P. Daraei, D. Sitz, L. Vergnes, J. Wanagat, K. Reue, M. A. Febbraio and A. L. Hevener (2014). "HSP72 is a mitochondrial stress sensor critical for Parkin action, oxidative metabolism, and insulin sensitivity in skeletal muscle." *Diabetes* **63**(5): 1488-1505.

Drust, B., P. Rasmussen, M. Mohr, B. Nielsen and L. Nybo (2005). "Elevations in core and muscle temperature impairs repeated sprint performance." *Acta Physiol Scand* **183**(2): 181-190.

Dufour, S., N. Rousse, P. Canioni and P. Diollez (1996). "Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation." *Biochem J* **314** (Pt 3): 743-751.

Dulloo, A. G. and S. Samec (2001). "Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered." *Br J Nutr* **86**(2): 123-139.

Eaton, S. (2002). "Control of mitochondrial beta-oxidation flux." *Prog Lipid Res* **41**(3): 197-239.

Echtay, K. S., T. C. Esteves, J. L. Pakay, M. B. Jekabsons, A. J. Lambert, M. Portero-Otin, R. Pamplona, A. J. Vidal-Puig, S. Wang, S. J. Roebuck and M. D. Brand (2003). "A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling." *Embo j* **22**(16): 4103-4110.

Eddy, D. O., K. E. Sparks and C. L. Turner (1976). "The adipokinetic effect of hyperthermic stress in man." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **35**(2): 103-110.

Edwards, R. H., R. C. Harris, E. Hultman, L. Kaijser, D. Koh and L. O. Nordesjo (1972). "Effect of temperature on muscle energy metabolism and endurance during successive isometric contractions, sustained to fatigue, of the quadriceps muscle in man." *J Physiol* **220**(2): 335-352.

Egan, D. F., D. B. Shackelford, M. M. Mihaylova, S. Gelino, R. A. Kohnz, W. Mair, D. S. Vasquez, A. Joshi, D. M. Gwinn, R. Taylor, J. M. Asara, J. Fitzpatrick, A. Dillin, B. Viollet, M. Kundu, M. Hansen and R. J. Shaw (2011). "Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy." *Science* **331**(6016): 456-461.

Eisner, V., G. Lenaers and G. Hajnoczky (2014). "Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling." *J Cell Biol* **205**(2): 179-195.

El-Orabi, N. F., C. B. Rogers, H. Gray Edwards and D. D. Schwartz (2011). "Heat-induced inhibition of superoxide dismutase and accumulation of reactive oxygen species leads to HT-22 neuronal cell death." Journal of Thermal Biology **36**(1): 49-56.

Eynan, M., T. Knubuvetz, U. Meiri, G. Navon, G. Gerstenblith, Z. Bromberg, Y. Hasin and M. Horowitz (2002). "Heat acclimation-induced elevated glycogen, glycolysis, and low thyroxine improve heart ischemic tolerance." J Appl Physiol (1985) **93**(6): 2095-2104.

Falk, B., S. Radom-Isaac, J. R. Hoffmann, Y. Wang, Y. Yarom, A. Magazanik and Y. Weinstein (1998). "The effect of heat exposure on performance of and recovery from high-intensity, intermittent exercise." Int J Sports Med **19**(1): 1-6.

Faure, C., K. Charlot, S. Henri, M. D. Hardy-Dessources, O. Hue and S. Antoine-Jonville (2016). "Impaired glucose tolerance after brief heat exposure: a randomized crossover study in healthy young men." Clin Sci (Lond) **130**(12): 1017-1025.

Faye, A., K. Borthwick, C. Esnous, N. T. Price, S. Gobin, V. N. Jackson, V. A. Zammit, J. Girard and C. Prip-Buus (2005). "Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity." Biochem J **387**(Pt 1): 67-76.

Febbraio, M. A. (2000). "Does muscle function and metabolism affect exercise performance in the heat?" Exerc Sport Sci Rev **28**(4): 171-176.

Febbraio, M. A. (2001). "Alterations in energy metabolism during exercise and heat stress." Sports Med **31**(1): 47-59.

Febbraio, M. A., M. F. Carey, R. J. Snow, C. G. Stathis and M. Hargreaves (1996). "Influence of elevated muscle temperature on metabolism during intense, dynamic exercise." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **271**(5 40-5): R1251-R1255.

Febbraio, M. A., D. L. Lambert, R. L. Starkie, J. Proietto and M. Hargreaves (1998). "Effect of epinephrine on muscle glycogenolysis during exercise in trained men." J Appl Physiol (1985) **84**(2): 465-470.

Febbraio, M. A., R. J. Snow, M. Hargreaves, C. G. Stathis, I. K. Martin and M. F. Carey (1994). "Muscle metabolism during exercise and heat stress in trained men: effect of acclimation." Journal of Applied Physiology **76**(2): 589-597.

Febbraio, M. A., R. J. Snow, C. G. Stathis, M. Hargreaves and M. F. Carey (1994). "Effect of heat stress on muscle energy metabolism during exercise." J Appl Physiol (1985) **77**(6): 2827-2831.

Febbraio, M. A., R. J. Snow, C. G. Stathis, M. Hargreaves and M. F. Carey (1996). "Blunting the rise in body temperature reduces muscle glycogenolysis during exercise in humans." Experimental Physiology **81**(4): 685-693.

Ferguson, R. A., P. Krstrup, M. Kjaer, M. Mohr, D. Ball and J. Bangsbo (2006). "Effect of temperature on skeletal muscle energy turnover during dynamic knee-extensor exercise in humans." J Appl Physiol (1985) **101**(1): 47-52.

Fernstrom, M., M. Tonkonogi and K. Sahlin (2004). "Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle." J Physiol **554**(Pt 3): 755-763.

Fink, W. J., D. L. Costill and P. J. Van Handel (1975). "Leg muscle metabolism during exercise in the heat and cold." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **34**(3): 183-190.

Flanagan, S. W., A. J. Ryan, C. V. Gisolfi and P. L. Moseley (1995). "Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress." Am J Physiol **268**(1 Pt 2): R28-32.

Fraser, F. and V. A. Zammit (1998). "Enrichment of carnitine palmitoyltransferases I and II in the contact sites of rat liver mitochondria." Biochem J **329** (Pt 2): 225-229.

Frayn, K. N., P. L. Whyte, H. A. Benson, D. J. Earl and H. A. Smith (1989). "Changes in forearm blood flow at elevated ambient temperature and their role in the apparent impairment of glucose tolerance." Clin Sci (Lond) **76**(3): 323-328.

Friedman, S. and G. Fraenkel (1955). "Reversible enzymatic acetylation of carnitine." Arch Biochem Biophys **59**(2): 491-501.

Fritzen, A. M., A. M. Lundsgaard, J. Jeppesen, M. L. Christiansen, R. Bienso, J. R. Dyck, H. Pilegaard and B. Kiens (2015). "5'-AMP activated protein kinase alpha2 controls substrate metabolism during post-exercise recovery via regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4." J Physiol **593**(21): 4765-4780.

Fujii, N., Y. Honda, T. Ogawa, B. Tsuji, N. Kondo, S. Koga and T. Nishiyasu (2012). "Short-term exercise-heat acclimation enhances skin vasodilation but not hyperthermic hyperpnea in humans exercising in a hot environment." Eur J Appl Physiol **112**(1): 295-307.

Fukuda, R., H. Zhang, J. W. Kim, L. Shimoda, C. V. Dang and G. L. Semenza (2007). "HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells." Cell **129**(1): 111-122.

G. Morris, J., M. E. Nevill, H. K. A. Lakomy, C. Nicholas and C. Williams (1998). "Effect of a hot environment on performance of prolonged, intermittent, high-intensity shuttle running." Journal of Sports Sciences **16**(7): 677-686.

Gagnon, D. D., L. Perrier, S. C. Dorman, B. Oddson, C. Larivière and O. Serresse (2019). "Ambient temperature influences metabolic substrate oxidation curves during running and cycling in healthy men." European Journal of Sport Science: 1-10.

Galbo, H., M. E. Houston, N. J. Christensen, J. J. Holst, B. Nielsen, E. Nygaard and J. Suzuki (1979). "The effect of water temperature on the hormonal response to prolonged swimming." *Acta Physiol Scand* **105**(3): 326-337.

Galster, A. D., W. E. Clutter, P. E. Cryer, J. A. Collins and D. M. Bier (1981). "Epinephrine plasma thresholds for lipolytic effects in man: measurements of fatty acid transport with [^{13}C]palmitic acid." *J Clin Invest* **67**(6): 1729-1738.

Geisler, S., K. M. Holmstrom, D. Skujat, F. C. Fiesel, O. C. Rothfuss, P. J. Kahle and W. Springer (2010). "PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1." *Nat Cell Biol* **12**(2): 119-131.

Genova, M. L., M. M. Pich, A. Biondi, A. Bernacchia, A. Falasca, C. Bovina, G. Formiggini, G. Parenti Castelli and G. Lenaz (2003). "Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant." *Exp Biol Med (Maywood)* **228**(5): 506-513.

Gerich, J. E., C. Meyer, H. J. Woerle and M. Stumvoll (2001). "Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis." *Diabetes Care* **24**(2): 382-391.

Gibson, O. R., G. Turner, J. A. Tuttle, L. Taylor, P. W. Watt and N. S. Maxwell (2015). "Heat acclimation attenuates physiological strain and the HSP72, but not HSP90alpha, mRNA response to acute normobaric hypoxia." *J Appl Physiol* (1985) **119**(8): 889-899.

Girard, O., D. J. Bishop and S. Racinais (2013). "Hot conditions improve power output during repeated cycling sprints without modifying neuromuscular fatigue characteristics." *Eur J Appl Physiol* **113**(2): 359-369.

Girard, O., F. Brocherie and D. J. Bishop (2015). "Sprint performance under heat stress: A review." *Scand J Med Sci Sports* **25 Suppl 1**: 79-89.

Girotti, A. W. (1998). "Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems." *J Lipid Res* **39**(8): 1529-1542.

Gisolfi, C. and S. Robinson (1969). "Relations between physical training, acclimatization, and heat tolerance." *J Appl Physiol* **26**(5): 530-534.

Glatz, J. F., J. J. Luiken and A. Bonen (2010). "Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease." *Physiol Rev* **90**(1): 367-417.

Gollnick, P. D., R. B. Armstrong, C. W. t. Saubert, W. L. Sembrowich, R. E. Shepherd and B. Saltin (1973). "Glycogen depletion patterns in human skeletal muscle fibers during prolonged work." *Pflugers Arch* **344**(1): 1-12.

Gollnick, P. D. and B. Saltin (1982). "Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training." *Clin Physiol* **2**(1): 1-12.

Gonzalez-Alonso, J., J. A. Calbet and B. Nielsen (1999). "Metabolic and thermodynamic responses to dehydration-induced reductions in muscle blood flow in exercising humans." *J Physiol* **520 Pt 2**: 577-589.

Gonzalez-Alonso, J., R. Mora-Rodriguez, P. R. Below and E. F. Coyle (1997). "Dehydration markedly impairs cardiovascular function in hyperthermic endurance athletes during exercise." *J Appl Physiol* (1985) **82**(4): 1229-1236.

Granata, C., N. A. Jamnick and D. J. Bishop (2018). "Training-Induced Changes in Mitochondrial Content and Respiratory Function in Human Skeletal Muscle." *Sports Med* **48**(8): 1809-1828.

Granata, C., R. S. Oliveira, J. P. Little, K. Renner and D. J. Bishop (2016). "Mitochondrial adaptations to high-volume exercise training are rapidly reversed after a reduction in training volume in human skeletal muscle." *Faseb j* **30**(10): 3413-3423.

Granata, C., R. S. Oliveira, J. P. Little, K. Renner and D. J. Bishop (2016). "Training intensity modulates changes in PGC-1alpha and p53 protein content and mitochondrial respiration, but not markers of mitochondrial content in human skeletal muscle." *Faseb j* **30**(2): 959-970.

Gray, S. R., G. De Vito, M. A. Nimmo, D. Farina and R. A. Ferguson (2006). "Skeletal muscle ATP turnover and muscle fiber conduction velocity are elevated at higher muscle temperatures during maximal power output development in humans." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**(2): R376-382.

Gray, S. R., K. Soderlund and R. A. Ferguson (2008). "ATP and phosphocreatine utilization in single human muscle fibres during the development of maximal power output at elevated muscle temperatures." *J Sports Sci* **26**(7): 701-707.

Gredilla, R., S. Phaneuf, C. Selman, S. Kendaiah, C. Leeuwenburgh and G. Barja (2004). "Short-term caloric restriction and sites of oxygen radical generation in kidney and skeletal muscle mitochondria." *Ann N Y Acad Sci* **1019**: 333-342.

Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-1312.

Gregson, W. A., B. Drust, A. Batterham and N. T. Cable (2002). "The effects of pre-warming on the metabolic and thermoregulatory responses to prolonged submaximal exercise in moderate ambient temperatures." *Eur J Appl Physiol* **86**(6): 526-533.

Gwak, S.-H., L. Yu and C.-A. Yu (1985). "Studies of protein-phospholipid interaction in isolated mitochondrial ubiquinone-cytochrome c reductase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **809**(2): 187-198.

Haak, J. L., G. R. Buettner, D. R. Spitz and K. C. Kregel (2009). "Aging augments mitochondrial susceptibility to heat stress." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**(3): R812-820.

Hafen, P. S., C. N. Preece, J. R. Sorensen, C. R. Hancock and R. D. Hyldahl (2018). "Repeated exposure to heat stress induces mitochondrial adaptation in human skeletal muscle." Journal of Applied Physiology **125**(5): 1447-1455.

Hagen, J. L., D. J. Krause, D. J. Baker, M. H. Fu, M. A. Tarnopolsky and R. T. Hepple (2004). "Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: I. Mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in VO_{2max} ." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(11): 1099-1110.

Haida, A., F. Dor, M. Guillaume, L. Quinquis, A. Marc, L. A. Marquet, J. Antero-Jacquemin, C. Tourny-Chollet, F. Desgorges, G. Berthelot and J. F. Toussaint (2013). "Environment and scheduling effects on sprint and middle distance running performances." PLoS One **8**(11): e79548.

Haines, T. H. (2001). "Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers?" Prog Lipid Res **40**(4): 299-324.

Haman, F., F. Peronnet, G. P. Kenny, E. Doucet, D. Massicotte, C. Lavoie and J. M. Weber (2004). "Effects of carbohydrate availability on sustained shivering I. Oxidation of plasma glucose, muscle glycogen, and proteins." J Appl Physiol (1985) **96**(1): 32-40.

Hargreaves, M., D. Angus, K. Howlett, N. M. Conus and M. Febbraio (1996). "Effect of heat stress on glucose kinetics during exercise." Journal of Applied Physiology **81**(4): 1594-1597.

Hargreaves, M., P. Dillo, D. Angus and M. Febbraio (1996). "Effect of fluid ingestion on muscle metabolism during prolonged exercise." Journal of Applied Physiology **80**(1): 363-366.

Harper, M. E., L. Bevilacqua, K. Hagopian, R. Weindruch and J. J. Ramsey (2004). "Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling." Acta Physiol Scand **182**(4): 321-331.

Harris, R. A., M. M. Bowker-Kinley, B. Huang and P. Wu (2002). "Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex." Advances in Enzyme Regulation **42**: 249-259.

Harris, R. A., M. M. Bowker-Kinley, B. Huang and P. Wu (2002). "Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex." Adv Enzyme Regul **42**: 249-259.

Harris, R. C., C. V. Foster and E. Hultman (1987). "Acetylcarnitine formation during intense muscular contraction in humans." J Appl Physiol (1985) **63**(1): 440-442.

Harrison, M. H. (1985). "Effects on thermal stress and exercise on blood volume in humans." Physiol Rev **65**(1): 149-209.

Hashimoto, I., M. B. Knudson, E. G. Noble, G. A. Klug and P. D. Gollnick (1982). "Exercise-induced glycogenolysis in sympathectomized rats." Jpn J Physiol **32**(2): 153-160.

Hatade, T., K. Takeuchi, N. Fujita, T. Arakawa and A. Miki (2014). "Effect of heat stress soon after muscle injury on the expression of MyoD and myogenin during regeneration process." J Musculoskelet Neuronal Interact **14**(3): 325-333.

Hayes, M., P. C. Castle, E. Z. Ross and N. S. Maxwell (2014). "The influence of hot humid and hot dry environments on intermittent-sprint exercise performance." Int J Sports Physiol Perform **9**(3): 387-396.

He, C., M. C. Bassik, V. Moresi, K. Sun, Y. Wei, Z. Zou, Z. An, J. Loh, J. Fisher, Q. Sun, S. Korsmeyer, M. Packer, H. I. May, J. A. Hill, H. W. Virgin, C. Gilpin, G. Xiao, R. Bassel-Duby, P. E. Scherer and B. Levine (2012). "Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis." Nature **481**(7382): 511-515.

Heled, Y., A. Peled, R. Yanovich, E. Shargal, R. Pilz-Burstein, Y. Epstein and D. S. Moran (2012). "Heat acclimation and performance in hypoxic conditions." Aviat Space Environ Med **83**(7): 649-653.

Henderson, S. A., A. L. Black and G. A. Brooks (1985). "Leucine turnover and oxidation in trained rats during exercise." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **249**(2): E137-E144.

Herbst, E. A., S. Pagliarunga, C. Gerling, J. Whitfield, K. Mukai, A. Chabowski, G. J. Heigenhauser, L. L. Spriet and G. P. Holloway (2014). "Omega-3 supplementation alters mitochondrial membrane composition and respiration kinetics in human skeletal muscle." J Physiol **592**(6): 1341-1352.

Holloszy, J. O. and F. W. Booth (1976). "Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle." Annu Rev Physiol **38**: 273-291.

Holloszy, J. O., W. M. Kohrt and P. A. Hansen (1998). "The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise." Front Biosci **3**: D1011-1027.

Holloway, G. P., S. S. Jain, V. Bezaire, X. X. Han, J. F. Glatz, J. J. Luiken, M. E. Harper and A. Bonen (2009). "FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **297**(4): R960-967.

Holness, M. J. and M. C. Sugden (2003). "Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1143-1151.

Hoppeler, H., H. Howald, K. Conley, S. L. Lindstedt, H. Claassen, P. Vock and E. R. Weibel (1985). "Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle." J Appl Physiol (1985) **59**(2): 320-327.

Hoppeler, H., P. Luthi and H. Claassen (1973). "The ultrastructure of the normal human skeletal muscle: A morphometric analysis on untrained men, women and well trained orienteers." Pflugers Archiv European Journal of Physiology **344**(3): 217-232.

Hori, S. (1995). "Adaptation to heat." Jpn J Physiol **45**(6): 921-946.

Horowitz, M. (1998). "Do Cellular Heat Acclimation Responses Modulate Central Thermoregulatory Activity?" News Physiol Sci **13**: 218-225.

Horowitz, M. (2002). "From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **131**(3): 475-483.

Horowitz, M. (2014). "Heat acclimation, epigenetics, and cytoprotection memory." Compr Physiol **4**(1): 199-230.

Horowitz, M. (2016). "Epigenetics and cytoprotection with heat acclimation." J Appl Physiol (1985) **120**(6): 702-710.

Horowitz, M., A. Maloyan and J. Schlaier (1997). "HSP 70 kDa dynamics in animals undergoing heat stress superimposed on heat acclimation." Ann N Y Acad Sci **813**: 617-619.

Horowitz, M., Y. Shimoni, S. Parnes, M. S. Gotsman and Y. Hasin (1986). "Heat acclimation: cardiac performance of isolated rat heart." J Appl Physiol (1985) **60**(1): 9-13.

Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. L. Guan, N. Oshiro and N. Mizushima (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy." Mol Biol Cell **20**(7): 1981-1991.

Houmar, J. A., D. L. Costill, J. A. Davis, J. B. Mitchell, D. D. Pascoe and R. A. Robergs (1990). "The influence of exercise intensity on heat acclimation in trained subjects." Med Sci Sports Exerc **22**(5): 615-620.

Howlett, K., M. Febbraio and M. Hargreaves (1999). "Glucose production during strenuous exercise in humans: role of epinephrine." Am J Physiol **276**(6): E1130-1135.

Howlett, K., H. Galbo, J. Lorentsen, R. Bergeron, T. Zimmerman-Belsing, J. Bulow, U. Feldt-Rasmussen and M. Kjaer (1999). "Effect of adrenaline on glucose kinetics during exercise in adrenalectomised humans." J Physiol **519 Pt 3**: 911-921.

Iguchi, M., A. E. Littmann, S. H. Chang, L. A. Wester, J. S. Knipper and R. K. Shields (2012). "Heat stress and cardiovascular, hormonal, and heat shock proteins in humans." J Athl Train **47**(2): 184-190.

Institute of Medicine Committee on Military Nutrition, R. (1993). Nutritional Needs in Hot Environments: Applications for Military Personnel in Field Operations. B. M. Marriott. Washington (DC), National Academies Press (US)

Copyright 1993 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.

Issekutz, B., Jr. (1984). "Effect of beta-adrenergic blockade on lactate turnover in exercising dogs." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **57**(6): 1754-1759.

Issekutz, B., Jr. (1985). "Effect of epinephrine on carbohydrate metabolism in exercising dogs." Metabolism **34**(5): 457-464.

Jacobs, I., M. Esbjornsson, C. Sylven, I. Holm and E. Jansson (1987). "Sprint training effects on muscle myoglobin, enzymes, fiber types, and blood lactate." Med Sci Sports Exerc **19**(4): 368-374.

Jacobs, R. A., D. Fluck, T. C. Bonne, S. Burgi, P. M. Christensen, M. Toigo and C. Lundby (2013). "Improvements in exercise performance with high-intensity interval training coincide with an increase in skeletal muscle mitochondrial content and function." J Appl Physiol (1985) **115**(6): 785-793.

Jacobs, R. A. and C. Lundby (2013). "Mitochondria express enhanced quality as well as quantity in association with aerobic fitness across recreationally active individuals up to elite athletes." J Appl Physiol (1985) **114**(3): 344-350.

Jacobs, R. A., C. Siebenmann, M. Hug, M. Toigo, A. K. Meinild and C. Lundby (2012). "Twenty-eight days at 3454-m altitude diminishes respiratory capacity but enhances efficiency in human skeletal muscle mitochondria." Faseb j **26**(12): 5192-5200.

James, D. I., P. A. Parone, Y. Mattenberger and J. C. Martinou (2003). "hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery." J Biol Chem **278**(38): 36373-36379.

Janssen, I., S. B. Heymsfield, R. N. Baumgartner and R. Ross (2000). "Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis." J Appl Physiol (1985) **89**(2): 465-471.

Jansson, E., P. Hjemdahl and L. Kaijser (1986). "Epinephrine-induced changes in muscle carbohydrate metabolism during exercise in male subjects." J Appl Physiol (1985) **60**(5): 1466-1470.

Jarmuszkiewicz, W., A. Woyda-Ploszczyca, A. Koziel, J. Majerczak and J. A. Zoladz (2015). "Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria." Free Radic Biol Med **83**: 12-20.

Jenerson, J. A., J. P. Schmitz, N. M. van den Broek, N. A. van Riel, P. A. Hilbers, K. Nicolay and J. J. Prompers (2009). "Magnitude and control of mitochondrial sensitivity to ADP." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(3): E774-784.

Jentjens, R. L., A. J. Wagenmakers and A. E. Jeukendrup (2002). "Heat stress increases muscle glycogen use but reduces the oxidation of ingested carbohydrates during exercise." J Appl Physiol (1985) **92**(4): 1562-1572.

Jin, S. M., M. Lazarou, C. Wang, L. A. Kane, D. P. Narendra and R. J. Youle (2010). "Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL." J Cell Biol **191**(5): 933-942.

Jones, A. M. (2014). "Influence of dietary nitrate on the physiological determinants of exercise performance: a critical review." *Appl Physiol Nutr Metab* **39**(9): 1019-1028.

Jorgensen, S. B., J. F. Wojtaszewski, B. Viollet, F. Andreelli, J. B. Birk, Y. Hellsten, P. Schjerling, S. Vaulont, P. D. Neuffer, E. A. Richter and H. Pilegaard (2005). "Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle." *Faseb j* **19**(9): 1146-1148.

Jubrias, S. A., P. C. Esselman, L. B. Price, M. E. Cress and K. E. Conley (2001). "Large energetic adaptations of elderly muscle to resistance and endurance training." *J Appl Physiol* (1985) **90**(5): 1663-1670.

Justo, R., J. Boada, M. Frontera, J. Oliver, J. Bermudez and M. Gianotti (2005). "Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(2): C372-378.

Kahlhofer, J., M. Lagerpusch, J. Enderle, B. Eggeling, W. Braun, D. Pape, M. J. Muller and A. Bosy-Westphal (2014). "Carbohydrate intake and glycemic index affect substrate oxidation during a controlled weight cycle in healthy men." *Eur J Clin Nutr* **68**(9): 1060-1066.

Kakigi, R., H. Naito, Y. Ogura, H. Kobayashi, N. Saga, N. Ichinoseki-Sekine, T. Yoshihara and S. Katamoto (2011). "Heat stress enhances mTOR signaling after resistance exercise in human skeletal muscle." *Journal of Physiological Sciences* **61**(2): 131-140.

Karatzafiri, C., M. K. Chinn and R. Cooke (2004). "The force exerted by a muscle cross-bridge depends directly on the strength of the actomyosin bond." *Biophys J* **87**(4): 2532-2544.

Karbowski, M., D. Arnoult, H. Chen, D. C. Chan, C. L. Smith and R. J. Youle (2004). "Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis." *J Cell Biol* **164**(4): 493-499.

Kasperek, G. J., G. R. Conway, D. S. Krayeski and J. J. Lohne (1992). "A reexamination of the effect of exercise on rate of muscle protein degradation." *Am J Physiol* **263**(6): E1144-1150.

Kiens, B. (2006). "Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance." *Physiol Rev* **86**(1): 205-243.

Kiens, B., B. Essen-Gustavsson, N. J. Christensen and B. Saltin (1993). "Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training." *J Physiol* **469**: 459-478.

Kikusato, M., J. J. Ramsey, T. Amo and M. Toyomizu (2010). "Application of modular kinetic analysis to mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of birds exposed to acute heat stress." *FEBS Lett* **584**(14): 3143-3148.

Kikusato, M. and M. Toyomizu (2013). "Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria." *PLoS One* **8**(5): e64412.

Kikusato, M., H. Yoshida, K. Furukawa and M. Toyomizu (2015). "Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells." *J Therm Biol* **52**: 8-13.

Kim, J. W., I. Tchernyshyov, G. L. Semenza and C. V. Dang (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia." *Cell Metab* **3**(3): 177-185.

King, D. S., D. L. Costill and W. J. Fink (1985). "Muscle metabolism during exercise in the heat in unacclimatized and acclimatized humans." *Journal of Applied Physiology* **59**(5): 1350-1354.

Kirwan, J. P., D. L. Costill and H. Kuipers (1987). "Substrate utilization in leg muscle of men after heat acclimation." *Journal of Applied Physiology* **63**(1): 31-35.

Kjaer, M., K. Engfred, A. Fernandes, N. H. Secher and H. Galbo (1993). "Regulation of hepatic glucose production during exercise in humans: role of sympathoadrenergic activity." *Am J Physiol* **265**(2 Pt 1): E275-283.

Kjaer, M., S. Keiding, K. Engfred, K. Rasmussen, B. Sonne, P. Kirkegaard and H. Galbo (1995). "Glucose homeostasis during exercise in humans with a liver or kidney transplant." *Am J Physiol* **268**(4 Pt 1): E636-644.

Klausen, K., D. B. Dill, E. E. Phillips, Jr. and D. McGregor (1967). "Metabolic reactions to work in the desert." *J Appl Physiol* **22**(2): 292-296.

Kodesh, E., N. Neshet, A. Simaan, B. Hochner, R. Beerli, D. Gilon, M. D. Stern, G. Gerstenblith and M. Horowitz (2011). "Heat acclimation and exercise training interact when combined in an overriding and trade-off manner: Physiologic-genomic linkage." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **301**(6): R1786-R1797.

Kojima, A., K. Goto, S. Morioka, T. Naito, T. Akema, H. Fujiya, T. Sugiura, Y. Ohira, M. Beppu, H. Aoki and T. Yoshioka (2007). "Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats." *J Orthop Sci* **12**(1): 74-82.

Kolodziej, M. P. and V. A. Zammit (1990). "Re-evaluation of the interaction of malonyl-CoA with the rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system by using purified outer membranes." *Biochemical Journal* **267**(1): 85-90.

Koshinaka, K., E. Kawamoto, N. Abe, K. Toshinai, M. Nakazato and K. Kawanaka (2013). "Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro." *J Physiol Sci* **63**(6): 409-418.

Koulmann, N. and A. X. Bigard (2006). "Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise." *Pflugers Arch* **452**(2): 125-139.

Kozlowski, S., Z. Brzezinska, B. Kruk, H. Kaciuba-Uscilko, J. E. Greenleaf and K. Nazar (1985). "Exercise hyperthermia as a factor limiting physical performance: temperature effect on muscle metabolism." *J Appl Physiol* (1985) **59**(3): 766-773.

Kuennen, M., T. Gillum, K. Dokladny, E. Bedrick, S. Schneider and P. Moseley (2011). "Thermotolerance and heat acclimation may share a common mechanism in humans." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**(2): R524-533.

Kuninaka, S., Y. Ichinose, K. Koja and Y. Toh (2000). "Suppression of manganese superoxide dismutase augments sensitivity to radiation, hyperthermia and doxorubicin in colon cancer cell lines by inducing apoptosis." *Br J Cancer* **83**(7): 928-934.

Laker, R. C., P. Xu, K. A. Ryall, A. Sujkowski, B. M. Kenwood, K. H. Chain, M. Zhang, M. A. Royal, K. L. Hoehn, M. Driscoll, P. N. Adler, R. J. Wessells, J. J. Saucerman and Z. Yan (2014). "A novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial content, structure, stress, and damage in vivo." *J Biol Chem* **289**(17): 12005-12015.

Larsen, F. J., E. Weitzberg, J. O. Lundberg and B. Ekblom (2007). "Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise." *Acta Physiol (Oxf)* **191**(1): 59-66.

Lee, B. J., A. Miller, R. S. James and C. D. Thake (2016). "Cross Acclimation between Heat and Hypoxia: Heat Acclimation Improves Cellular Tolerance and Exercise Performance in Acute Normobaric Hypoxia." *Front Physiol* **7**: 78.

Lehman, J. J., P. M. Barger, A. Kovacs, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros and D. P. Kelly (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis." *J Clin Invest* **106**(7): 847-856.

Leick, L., J. F. Wojtaszewski, S. T. Johansen, K. Kiilerich, G. Comes, Y. Hellsten, J. Hidalgo and H. Pilegaard (2008). "PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(2): E463-474.

Lemmer, J. T. (2000). "Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine Volume 12: The Metabolic Basis of Performance in Exercise and Sport." *Nutrition in Clinical Care* **3**(4): 247-248.

Lenaz, G., A. Baracca, R. Fato, M. L. Genova and G. Solaini (2006). "New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease." *Antioxid Redox Signal* **8**(3-4): 417-437.

Leone, T. C., J. J. Lehman, B. N. Finck, P. J. Schaeffer, A. R. Wende, S. Boudina, M. Courtois, D. F. Wozniak, N. Sambandam, C. Bernal-Mizrachi, Z. Chen, J. O. Holloszy, D. M. Medeiros, R. E. Schmidt, J. E. Saffitz, E. D. Abel, C. F. Semenkovich and D. P. Kelly (2005). "PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis." *PLoS Biol* **3**(4): e101.

Lepock, J. R., K. H. Cheng, H. Al-Qysi, I. Sim, C. J. Koch and J. Kruuv (1987). "Hyperthermia-induced inhibition of respiration and mitochondrial protein denaturation in CHL cells." *Int J Hyperthermia* **3**(2): 123-132.

Li, J. J. and L. W. Oberley (1997). "Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia." *Cancer Res* **57**(10): 1991-1998.

Lim, C. L., K. K. Chung and L. L. Hock (1997). "The effects of prolonged passive heat exposure and basic military training on thermoregulatory and cardiovascular responses in recruits from a tropical country." *Mil Med* **162**(9): 623-627.

Lin, J., C. Handschin and B. M. Spiegelman (2005). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." *Cell Metab* **1**(6): 361-370.

Lin, J., H. Wu, P. T. Tarr, C. Y. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L. F. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E. N. Olson, B. B. Lowell, R. Bassel-Duby and B. M. Spiegelman (2002). "Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres." *Nature* **418**(6899): 797-801.

Linnane, D. M., R. M. Bracken, S. Brooks, V. M. Cox and D. Ball (2004). "Effects of hyperthermia on the metabolic responses to repeated high-intensity exercise." *Eur J Appl Physiol* **93**(1-2): 159-166.

Lira, V. A., M. Okutsu, M. Zhang, N. P. Greene, R. C. Laker, D. S. Breen, K. L. Hoehn and Z. Yan (2013). "Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance." *Faseb j* **27**(10): 4184-4193.

Liu, C. T. and G. A. Brooks (2012). "Mild heat stress induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes." *J Appl Physiol* (1985) **112**(3): 354-361.

Liu, Q., P. D'Silva, W. Walter, J. Marszalek and E. A. Craig (2003). "Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel." *Science* **300**(5616): 139-141.

Livesey, G. and M. Elia (1988). "Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels." *The American Journal of Clinical Nutrition* **47**(4): 608-628.

Lo Verso, F., S. Carnio, A. Vainshtein and M. Sandri (2014). "Autophagy is not required to sustain exercise and PRKAA1/AMPK activity but is important to prevent mitochondrial damage during physical activity." *Autophagy* **10**(11): 1883-1894.

Locke, M. (1997). "The cellular stress response to exercise: role of stress proteins." *Exerc Sport Sci Rev* **25**: 105-136.

Lorenzo, S., J. R. Halliwill, M. N. Sawka and C. T. Minson (2010). "Heat acclimation improves exercise performance." *J Appl Physiol* (1985) **109**(4): 1140-1147.

Lorenzo, S. and C. T. Minson (2010). "Heat acclimation improves cutaneous vascular function and sweating in trained cyclists." *Journal of Applied Physiology* **109**(6): 1736-1743.

Luiken, J. J., D. J. Dyck, X. X. Han, N. N. Tandon, Y. Arumugam, J. F. Glatz and A. Bonen (2002). "Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(2): E491-495.

Luiken, J. J., F. G. Schaap, F. A. van Nieuwenhoven, G. J. van der Vusse, A. Bonen and J. F. Glatz (1999). "Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins." *Lipids* **34** Suppl: S169-175.

Lund, S., G. D. Holman, O. Schmitz and O. Pedersen (1995). "Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13): 5817-5821.

Lundsgaard, A. M., A. M. Fritzen and B. Kiens (2018). "Molecular Regulation of Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle during Aerobic Exercise." *Trends Endocrinol Metab* **29**(1): 18-30.

Mahoney, D. J., G. Parise, S. Melov, A. Safdar and M. A. Tarnopolsky (2005). "Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise." *Faseb j* **19**(11): 1498-1500.

Mai, S., B. Muster, J. Bereiter-Hahn and M. Jendrach (2012). "Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan." *Autophagy* **8**(1): 47-62.

Malgoyre, A., P. E. Tardo-Dino, N. Koulmann, B. Lepetit, L. Jousseume and K. Charlot (2018). "Uncoupling psychological from physiological markers of heat acclimatization in a military context." *J Therm Biol* **77**: 145-156.

Maloyan, A., L. Eli-Berchoer, G. L. Semenza, G. Gerstenblith, M. D. Stern and M. Horowitz (2005). "HIF-1alpha-targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart." *Physiol Genomics* **23**(1): 79-88.

Maloyan, A. and M. Horowitz (2002). "beta-Adrenergic signaling and thyroid hormones affect HSP72 expression during heat acclimation." *J Appl Physiol* (1985) **93**(1): 107-115.

Maloyan, A., A. Palmon and M. Horowitz (1999). "Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress." *Am J Physiol* **276**(5): R1506-1515.

Marcinek, D. J., K. A. Schenkman, W. A. Ciesielski and K. E. Conley (2004). "Mitochondrial coupling in vivo in mouse skeletal muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(2): C457-463.

Maunder, E., D. J. Plews, F. Merien and A. E. Kilding (2019). "Exercise intensity regulates the effect of heat stress on substrate oxidation rates during exercise." *Eur J Sport Sci*: 1-23.

Maxwell, N. S., T. C. Aitchison and M. A. Nimmo (1996). "The effect of climatic heat stress on intermittent supramaximal running performance in humans." *Exp Physiol* **81**(5): 833-845.

Maxwell, N. S., F. Gardner and M. A. Nimmo (1999). "Intermittent running: muscle metabolism in the heat and effect of hypohydration." *Med Sci Sports Exerc* **31**(5): 675-683.

McArdle, A., W. H. Dillmann, R. Mestril, J. A. Faulkner and M. J. Jackson (2004). "Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction." *Faseb j* **18**(2): 355-357.

McClung, J. P., J. D. Hasday, J. R. He, S. J. Montain, S. N. Cheuvront, M. N. Sawka and I. S. Singh (2008). "Exercise-heat acclimation in humans alters baseline levels and ex vivo heat inducibility of HSP72 and HSP90 in peripheral blood mononuclear cells." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(1): R185-191.

McGarry, J. D. (1998). "Glucose-fatty acid interactions in health and disease." *Am J Clin Nutr* **67**(3 Suppl): 500S-504S.

McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." *Eur J Biochem* **244**(1): 1-14.

McGarry, J. D., G. P. Mannaerts and D. W. Foster (1977). "A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis." *J Clin Invest* **60**(1): 265-270.

McGarry, J. D., S. E. Mills, C. S. Long and D. W. Foster (1983). "Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat." *Biochemical Journal* **214**(1): 21-28.

McLennan, H. R. and M. Degli Esposti (2000). "The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species." *J Bioenerg Biomembr* **32**(2): 153-162.

Meex, R. C., V. B. Schrauwen-Hinderling, E. Moonen-Kornips, G. Schaart, M. Mensink, E. Phielix, T. van de Weijer, J. P. Sels, P. Schrauwen and M. K. Hesselink (2010). "Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity." *Diabetes* **59**(3): 572-579.

Meinild Lundby, A. K., R. A. Jacobs, S. Gehrig, J. de Leur, M. Hauser, T. C. Bonne, D. Fluck, S. Dandanell, N. Kirk, A. Kaeck, U. Ziegler, S. Larsen and C. Lundby (2018). "Exercise training increases skeletal muscle

mitochondrial volume density by enlargement of existing mitochondria and not de novo biogenesis." *Acta Physiol (Oxf)* **222**(1).

Melegh, B., I. Bock, I. Gati and K. Mehes (1996). "Multiple mitochondrial DNA deletions and persistent hyperthermia in a patient with Brachmann-de Lange phenotype." *Am J Med Genet* **65**(1): 82-88.

Mignotte, B. and J. L. Vayssiere (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Eur J Biochem* **252**(1): 1-15.

Minson, C. T. and J. D. Cotter (2016). "CrossTalk proposal: Heat acclimatization does improve performance in a cool condition." *J Physiol* **594**(2): 241-243.

Miotto, P. M., G. R. Steinberg and G. P. Holloway (2017). "Controlling skeletal muscle CPT-I malonyl-CoA sensitivity: the importance of AMPK-independent regulation of intermediate filaments during exercise." *Biochem J* **474**(4): 557-569.

Miura, S., Y. Kai, Y. Kamei, C. R. Bruce, N. Kubota, M. A. Febbraio, T. Kadowaki and O. Ezaki (2009). " α 2-AMPK activity is not essential for an increase in fatty acid oxidation during low-intensity exercise." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **296**(1): E47-E55.

Mogensen, M., K. Sahlin, M. Fernstrom, D. Glintborg, B. F. Vind, H. Beck-Nielsen and K. Hojlund (2007). "Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **56**(6): 1592-1599.

Monaco, C., J. Whitfield, S. S. Jain, L. L. Spriet, A. Bonen and G. P. Holloway (2015). "Activation of AMPK α 2 Is Not Required for Mitochondrial FAT/CD36 Accumulation during Exercise." *PLoS One* **10**(5): e0126122.

Montero, D., A. Cathomen, R. A. Jacobs, D. Fluck, J. de Leur, S. Keiser, T. Bonne, N. Kirk, A. K. Lundby and C. Lundby (2015). "Haematological rather than skeletal muscle adaptations contribute to the increase in peak oxygen uptake induced by moderate endurance training." *J Physiol* **593**(20): 4677-4688.

Montero, D. and C. Lundby (2017). "Refuting the myth of non-response to exercise training: 'non-responders' do respond to higher dose of training." *J Physiol* **595**(11): 3377-3387.

Monti, E., R. Supino, M. Colleoni, B. Costa, R. Ravizza and M. B. Gariboldi (2001). "Nitroxide TEMPOL impairs mitochondrial function and induces apoptosis in HL60 cells." *J Cell Biochem* **82**(2): 271-276.

Montilla, S. I., T. P. Johnson, S. C. Pearce, D. Gardan-Salmon, N. K. Gabler, J. W. Ross, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard, S. M. Lonergan and J. T. Selsby (2014). "Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle." *Temperature (Austin)* **1**(1): 42-50.

Moriyama-Gonda, N., M. Igawa, H. Shiina, S. Urakami, K. Shigeno and M. Terashima (2002). "Modulation of heat-induced cell death in PC-3 prostate cancer cells by the antioxidant inhibitor diethyldithiocarbamate." *BJU Int* **90**(3): 317-325.

Morris, J. G., M. E. Nevill, L. H. Boobis, I. A. Macdonald and C. Williams (2005). "Muscle metabolism, temperature, and function during prolonged, intermittent, high-intensity running in air temperatures of 33 degrees and 17 degrees C." *Int J Sports Med* **26**(10): 805-814.

Morris, J. G., M. E. Nevill and C. Williams (2000). "Physiological and metabolic responses of female games and endurance athletes to prolonged, intermittent, high-intensity running at 30 degrees and 16 degrees C ambient temperatures." *Eur J Appl Physiol* **81**(1-2): 84-92.

Morrison, J. P., M. C. Coleman, E. S. Aunan, S. A. Walsh, D. R. Spitz and K. C. Kregel (2005). "Aging reduces responsiveness to BSO- and heat stress-induced perturbations of glutathione and antioxidant enzymes." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(4): R1035-1041.

Moseley, P. L. (1997). "Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism." *J Appl Physiol* (1985) **83**(5): 1413-1417.

Moses, R. G., M. J. Patterson, J. M. Regan, R. Chaunчайyakul, N. A. Taylor and A. B. Jenkins (1997). "A non-linear effect of ambient temperature on apparent glucose tolerance." *Diabetes Res Clin Pract* **36**(1): 35-40.

Mozdy, A. D., J. M. McCaffery and J. M. Shaw (2000). "Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p." *J Cell Biol* **151**(2): 367-380.

Mujahid, A., Y. Akiba, C. H. Warden and M. Toyomizu (2007). "Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens." *FEBS Lett* **581**(18): 3461-3467.

Mujahid, A., N. R. Pumford, W. Bottje, K. Nakagawa, T. Miyazawa, Y. Akiba and M. Toyomizu (2007). "Mitochondrial Oxidative Damage in Chicken Skeletal Muscle Induced by Acute Heat Stress." *The Journal of Poultry Science* **44**(4): 439-445.

Mujahid, A., K. Sato, Y. Akiba and M. Toyomizu (2006). "Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content." *Poult Sci* **85**(7): 1259-1265.

Nadal-Casellas, A., E. Amengual-Cladera, A. M. Proenza, I. Llado and M. Gianotti (2010). "Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats." *Cell Physiol Biochem* **26**(3): 291-302.

Nadel, E. R., K. B. Pandolf, M. F. Roberts and J. A. Stolwijk (1974). "Mechanisms of thermal acclimation to exercise and heat." *J Appl Physiol* **37**(4): 515-520.

Nahle, Z., M. Hsieh, T. Pietka, C. T. Coburn, P. A. Grimaldi, M. Q. Zhang, D. Das and N. A. Abumrad (2008). "CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR delta/beta-mediated adaptation to metabolic stress." *J Biol Chem* **283**(21): 14317-14326.

Naito, H., S. K. Powers, H. A. Demirel, T. Sugiura, S. L. Dodd and J. Aoki (2000). "Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats." *Journal of Applied Physiology* **88**(1): 359-363.

Nicholls, D. G., V. M. Darley-Usmar, M. Wu, P. B. Jensen, G. W. Rogers and D. A. Ferrick (2010). "Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells." *J Vis Exp*(46).

Nicholls, D. G. and R. M. Locke (1984). "Thermogenic mechanisms in brown fat." *Physiol Rev* **64**(1): 1-64.

Nielsen, B., J. R. Hales, S. Strange, N. J. Christensen, J. Warberg and B. Saltin (1993). "Human circulatory and thermoregulatory adaptations with heat acclimation and exercise in a hot, dry environment." *J Physiol* **460**: 467-485.

Nielsen, B., G. Savard, E. A. Richter, M. Hargreaves and B. Saltin (1990). "Muscle blood flow and muscle metabolism during exercise and heat stress." *J Appl Physiol* (1985) **69**(3): 1040-1046.

Nybo, L., P. Rasmussen and M. N. Sawka (2014). "Performance in the heat-physiological factors of importance for hyperthermia-induced fatigue." *Compr Physiol* **4**(2): 657-689.

O'Hearn, K., H. C. Tingelstad, D. Blondin, V. Tang, L. G. Fillion and F. Haman (2016). "Heat exposure increases circulating fatty acids but not lipid oxidation at rest and during exercise." *Journal of Thermal Biology* **55**: 39-46.

Odland, L. M., G. J. Heigenhauser, G. D. Lopaschuk and L. L. Spriet (1996). "Human skeletal muscle malonyl-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise." *Am J Physiol* **270**(3 Pt 1): E541-544.

Odland, L. M., R. A. Howlett, G. J. Heigenhauser, E. Hultman and L. L. Spriet (1998). "Skeletal muscle malonyl-CoA content at the onset of exercise at varying power outputs in humans." *Am J Physiol* **274**(6): E1080-1085.

Ohno, Y., S. Yamada, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka and K. Goto (2010). "A possible role of NF-kappaB and HSP72 in skeletal muscle hypertrophy induced by heat stress in rats." *Gen Physiol Biophys* **29**(3): 234-242.

Oishi, Y., M. Hayashida, S. Tsukiashi, K. Taniguchi, K. Kami, R. R. Roy and Y. Ohira (2009). "Heat stress increases myonuclear number and fiber size via satellite cell activation in rat regenerating soleus fibers." *Journal of Applied Physiology* **107**(5): 1612-1621.

Omar, R. A., S. Yano and Y. Kikkawa (1987). "Antioxidant enzymes and survival of normal and simian virus 40-transformed mouse embryo cells after hyperthermia." *Cancer Res* **47**(13): 3473-3476.

Pagano, A. F., G. Py, H. Bernardi, R. B. Candau and A. M. Sanchez (2014). "Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise." *Med Sci Sports Exerc* **46**(7): 1314-1325.

Palmieri, F. (1994). "Mitochondrial carrier proteins." *FEBS Lett* **346**(1): 48-54.

Pandolf, K. B. (1979). "Effects of physical training and cardiorespiratory physical fitness on exercise-heat tolerance: recent observations." *Med Sci Sports* **11**(1): 60-65.

Pandolf, K. B. and A. Young (1992). *Environmental extremes and performance. Endurance in Sport*. R. J. Shephard and P. O. Astrand, Oxford: Blackwell: 270-282.

Papa, S. and V. P. Skulachev (1997). "Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging." *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 305-319.

Parkin, J. M., M. F. Carey, S. Zhao and M. A. Febbraio (1999). "Effect of ambient temperature on human skeletal muscle metabolism during fatiguing submaximal exercise." *J Appl Physiol* (1985) **86**(3): 902-908.

Patterson, M. J., J. M. Stocks and N. A. Taylor (2004). "Humid heat acclimation does not elicit a preferential sweat redistribution toward the limbs." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**(3): R512-518.

Periard, J. D. (2013). "Cardiovascular determinants involved in pacing under heat stress." *Sports Med* **43**(7): 643-645.

Periard, J. D., M. N. Cramer, P. G. Chapman, C. Caillaud and M. W. Thompson (2011). "Cardiovascular strain impairs prolonged self-paced exercise in the heat." *Exp Physiol* **96**(2): 134-144.

Periard, J. D., S. Racinais and M. N. Sawka (2015). "Adaptations and mechanisms of human heat acclimation: Applications for competitive athletes and sports." *Scand J Med Sci Sports* **25 Suppl 1**: 20-38.

Peronnet, F. and D. Massicotte (1991). "Table of nonprotein respiratory quotient: an update." *Can J Sport Sci* **16**(1): 23-29.

Perry, C. G., D. A. Kane, E. A. Herbst, K. Mukai, D. S. Lark, D. C. Wright, G. J. Heigenhauser, P. D. Neuffer, L. L. Spriet and G. P. Holloway (2012). "Mitochondrial creatine kinase activity and phosphate shuttling are acutely regulated by exercise in human skeletal muscle." *J Physiol* **590**(21): 5475-5486.

Perry, C. G., J. Lally, G. P. Holloway, G. J. Heigenhauser, A. Bonen and L. L. Spriet (2010). "Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle." *J Physiol* **588**(Pt 23): 4795-4810.

Pescador, N., D. Villar, D. Cifuentes, M. Garcia-Rocha, A. Ortiz-Barahona, S. Vazquez, A. Ordonez, Y. Cuevas, D. Saez-Morales, M. L. Garcia-Bermejo, M. O. Landazuri, J. Guinovart and L. del Peso (2010). "Hypoxia

promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1." *PLoS One* **5**(3): e9644.

Pesta, D. and E. Gnaiger (2012). "High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle." *Methods Mol Biol* **810**: 25-58.

Pesta, D., F. Hoppel, C. Macek, H. Messner, M. Faulhaber, C. Kobel, W. Parson, M. Burtcher, M. Schocke and E. Gnaiger (2011). "Similar qualitative and quantitative changes of mitochondrial respiration following strength and endurance training in normoxia and hypoxia in sedentary humans." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**(4): R1078-1087.

Petersen, E. S. and H. Vejby-Christensen (1973). "Effect of body temperature on steady state ventilation and metabolism in exercise." *Acta Physiol Scand* **89**(3): 342-351.

Petrofsky, J. S., C. A. Phillips, M. N. Sawka, D. Hanpeter and D. Stafford (1981). "Blood flow and metabolism during isometric contractions in cat skeletal muscle." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **50**(3): 493-502.

Phielix, E., R. Meex, D. M. Ouwens, L. Sparks, J. Hoeks, G. Schaart, E. Moonen-Kornips, M. K. Hesselink and P. Schrauwen (2012). "High oxidative capacity due to chronic exercise training attenuates lipid-induced insulin resistance." *Diabetes* **61**(10): 2472-2478.

Pikosky, M. A., P. C. Gaine, W. F. Martin, K. C. Grabarz, A. A. Ferrando, R. R. Wolfe and N. R. Rodriguez (2006). "Aerobic exercise training increases skeletal muscle protein turnover in healthy adults at rest." *J Nutr* **136**(2): 379-383.

Pilegaard, H., J. B. Birk, M. Sacchetti, M. Mourtzakis, D. G. Hardie, G. Stewart, P. D. Neuffer, B. Saltin, G. van Hall and J. F. Wojtaszewski (2006). "PDH-E1alpha dephosphorylation and activation in human skeletal muscle during exercise: effect of intralipid infusion." *Diabetes* **55**(11): 3020-3027.

Pilegaard, H., G. A. Ordway, B. Saltin and P. D. Neuffer (2000). "Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**(4): E806-814.

Pilegaard, H., B. Saltin and P. D. Neuffer (2003). "Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle." *J Physiol* **546**(Pt 3): 851-858.

Porter, C., P. T. Reidy, N. Bhattarai, L. S. Sidossis and B. B. Rasmussen (2015). "Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle." *Med Sci Sports Exerc* **47**(9): 1922-1931.

Powers, S. K., E. T. Howley and R. Cox (1982). "A differential catecholamine response during prolonged exercise and passive heating." *Med Sci Sports Exerc* **14**(6): 435-439.

Powers, S. K., J. Lawler, J. A. Dempsey, S. Dodd and G. Landry (1989). "Effects of incomplete pulmonary gas exchange on VO₂ max." *J Appl Physiol* (1985) **66**(6): 2491-2495.

Powers, S. K., M. P. Wiggs, J. A. Duarte, A. M. Zergeroglu and H. A. Demirel (2012). "Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**(1): E31-39.

Qian, L., X. Song, H. Ren, J. Gong and S. Cheng (2004). "Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte." *Cell Stress and Chaperones* **9**(3): 281-293.

Racinais, S., J. D. Periard, A. Karlens and L. Nybo (2015). "Effect of heat and heat acclimatization on cycling time trial performance and pacing." *Med Sci Sports Exerc* **47**(3): 601-606.

Rahimi, G. R. M., A. L. Albanagi, T. Van der Touw and N. A. Smart (2019). "Physiological Responses to Heat Acclimation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *J Sports Sci Med* **18**(2): 316-326.

Randle, P. J. (1995). "Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level." *Proc Nutr Soc* **54**(1): 317-327.

Randle, P. J. (1998). "Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years." *Diabetes Metab Rev* **14**(4): 263-283.

Randle, P. J., P. B. Garland, C. N. Hales and E. A. Newsholme (1963). "The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus." *Lancet* **1**(7285): 785-789.

Randle, P. J., A. L. Kerbey and J. Espinal (1988). "Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones." *Diabetes Metab Rev* **4**(7): 623-638.

Randle, P. J., E. A. Newsholme and P. B. Garland (1964). "Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles." *The Biochemical journal* **93**(3): 652-665.

Rhoads, D. M., A. L. Umbach, C. C. Subbaiah and J. N. Siedow (2006). "Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling." *Plant Physiol* **141**(2): 357-366.

Richardson, R. S., B. Grassi, T. P. Gavin, L. J. Haseler, K. Tagore, J. Roca and P. D. Wagner (1999). "Evidence of O₂ supply-dependent VO₂ max in the exercise-trained human quadriceps." *J Appl Physiol* (1985) **86**(3): 1048-1053.

Richardson, R. S., S. C. Newcomer and E. A. Noyszewski (2001). "Skeletal muscle intracellular PO₂ assessed by myoglobin desaturation: response to graded exercise." *J Appl Physiol* (1985) **91**(6): 2679-2685.

Richardson, R. S., E. A. Noyszewski, K. F. Kendrick, J. S. Leigh and P. D. Wagner (1995). "Myoglobin O₂ desaturation during exercise. Evidence of limited O₂ transport." *J Clin Invest* **96**(4): 1916-1926.

Richter, E. A., N. B. Ruderman, H. Gavras, E. R. Belur and H. Galbo (1982). "Muscle glycogenolysis during exercise: dual control by epinephrine and contractions." *Am J Physiol* **242**(1): E25-32.

Richter, E. A., B. Sonne, N. J. Christensen and H. Galbo (1981). "Role of epinephrine for muscular glycogenolysis and pancreatic hormonal secretion in running rats." *Am J Physiol* **240**(5): E526-532.

Rigell, C. W. and E. Freire (1987). "Differential detergent solubility investigation of thermally induced transitions in cytochrome c oxidase." *Biochemistry* **26**(14): 4366-4371.

Ritossa, F. (1962). "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila." *Experientia* **18**(12): 571-573.

Robinson, S., D. B. Dill, J. W. Wilson and M. Nielsen (1941). "Adaptations of White Men and Negroes to Prolonged Work in Humid Heat." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **s1-21**(2): 261-287.

Robinson, S., E. S. Turrell, H. S. Belding and S. M. Horvath (1943). "RAPID ACCLIMATIZATION TO WORK IN HOT CLIMATES." *American Journal of Physiology-Legacy Content* **140**(2): 168-176.

Roepstorff, C., N. Halberg, T. Hillig, A. K. Saha, N. B. Ruderman, J. F. Wojtaszewski, E. A. Richter and B. Kiens (2005). "Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**(1): E133-142.

Romijn, J. A., E. F. Coyle, L. S. Sidossis, A. Gastaldelli, J. F. Horowitz, E. Endert and R. R. Wolfe (1993). "Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration." *Am J Physiol* **265**(3 Pt 1): E380-391.

Rossignol, R., T. Letellier, M. Malgat, C. Rocher and J. P. Mazat (2000). "Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases." *Biochem J* **347 Pt 1**: 45-53.

Rowell, L. B., G. L. Brengelmann, J. R. Blackmon, R. D. Twiss and F. Kusumi (1968). "Splanchnic blood flow and metabolism in heat-stressed man." *J Appl Physiol* **24**(4): 475-484.

Rowell, L. B., G. L. Brengelmann, J. A. Murray, K. K. Kraning, 2nd and F. Kusumi (1969). "Human metabolic responses to hyperthermia during mild to maximal exercise." *J Appl Physiol* **26**(4): 395-402.

Russell, A. P., M. K. Hesselink, S. K. Lo and P. Schrauwen (2005). "Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise." *Faseb j* **19**(8): 986-988.

Russell, L. K., C. M. Mansfield, J. J. Lehman, A. Kovacs, M. Courtois, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros, M. L. Valencik, J. A. McDonald and D. P. Kelly (2004). "Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner." *Circ Res* **94**(4): 525-533.

Ryan, M. T. and N. J. Hoogenraad (2007). "Mitochondrial-nuclear communications." *Annu Rev Biochem* **76**: 701-722.

Sahlin, K. (1990). "Muscle carnitine metabolism during incremental dynamic exercise in humans." *Acta Physiol Scand* **138**(3): 259-262.

Sahlin, K., M. Mogensen, M. Bagger, M. Fernstrom and P. K. Pedersen (2007). "The potential for mitochondrial fat oxidation in human skeletal muscle influences whole body fat oxidation during low-intensity exercise." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(1): E223-230.

Sakamoto, A., S. Tsukamoto, H. Yamamoto, M. Ueda-Hashimoto, M. Takahashi, H. Suzuki and H. Morikawa (2003). "Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species." *Plant J* **33**(5): 841-851.

Sakamoto, K. and L. J. Goodyear (2002). "Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle." *J Appl Physiol (1985)* **93**(1): 369-383.

Saltin, B., A. P. Gagge, U. Bergh and J. A. Stolwijk (1972). "Body temperatures and sweating during exhaustive exercise." *J Appl Physiol* **32**(5): 635-643.

Saltin, B., A. P. Gagge and J. A. Stolwijk (1968). "Muscle temperature during submaximal exercise in man." *J Appl Physiol* **25**(6): 679-688.

Saltin, B. and J. Karlsson (1971). *Muscle Glycogen Utilization During Work of Different Intensities*, Springer, Boston, MA.

Sammur, I. A. and J. C. Harrison (2003). "Cardiac mitochondrial complex activity is enhanced by heat shock proteins." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**(1-2): 110-115.

Sammur, I. A., J. Jayakumar, N. Latif, S. Rothery, N. J. Severs, R. T. Smolenski, T. E. Bates and M. H. Yacoub (2001). "Heat stress contributes to the enhancement of cardiac mitochondrial complex activity." *Am J Pathol* **158**(5): 1821-1831.

Sargeant, A. J. (1987). "Effect of muscle temperature on leg extension force and short-term power output in humans." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **56**(6): 693-698.

Sawka, M., C. Bruce Wenger and K. B. Pandolf (2011). *Thermoregulatory Responses to Acute Exercise-Heat Stress and Heat Acclimation*.

Sawka, M. N., K. B. Pandolf, B. A. Avellini and Y. Shapiro (1983). "Does heat acclimation lower the rate of metabolism elicited by muscular exercise?" Aviat Space Environ Med **54**(1): 27-31.

Sawka, M. N., A. J. Young, B. S. Cadarette, L. Levine and K. B. Pandolf (1985). "Influence of heat stress and acclimation on maximal aerobic power." European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology **53**(4): 294-298.

Schmidt, M. I., M. C. Matos, L. Branchtein, A. J. Reichelt, S. S. Mengue, L. C. Iochida and B. B. Duncan (1994). "Variation in glucose tolerance with ambient temperature." Lancet **344**(8929): 1054-1055.

Schrauwen, P., M. K. Hesselink, I. Vaartjes, E. Kornips, W. H. Saris, J. P. Giacobino and A. Russell (2002). "Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolism-mediated effect." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(1): E11-17.

Schrauwen, P., H. Hoppeler, R. Billeter, A. H. Bakker and D. R. Pendergast (2001). "Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet." Int J Obes Relat Metab Disord **25**(4): 449-456.

Schrauwen, P., W. H. Saris and M. K. Hesselink (2001). "An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix." Faseb j **15**(13): 2497-2502.

Seebacher, F. (2009). "Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates." J Exp Biol **212**(18): 2885-2891.

Seebacher, F., S. A. Murray and P. L. Else (2009). "Thermal acclimation and regulation of metabolism in a reptile (*Crocodylus porosus*): the importance of transcriptional mechanisms and membrane composition." Physiol Biochem Zool **82**(6): 766-775.

Seiler, S. E., T. R. Koves, J. R. Gooding, K. E. Wong, R. D. Stevens, O. R. Ilkayeva, A. H. Wittmann, K. L. DeBalsi, M. N. Davies, L. Lindeboom, P. Schrauwen, V. B. Schrauwen-Hinderling and D. M. Muoio (2015). "Carnitine Acetyltransferase Mitigates Metabolic Inertia and Muscle Fatigue during Exercise." Cell Metab **22**(1): 65-76.

Semenza, G. L. (2011). "Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning." Biochim Biophys Acta **1813**(7): 1263-1268.

Sen Gupta, J., G. P. Dimri and M. S. Malhotra (1977). "Metabolic responses of Indians during sub-maximal and maximal work in dry and humid heat." Ergonomics **20**(1): 33-40.

Shein, N. A., M. Horowitz, A. G. Alexandrovich, J. Tsender and E. Shohami (2005). "Heat acclimation increases hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin receptor expression: implication for neuroprotection after closed head injury in mice." J Cereb Blood Flow Metab **25**(11): 1456-1465.

Shein, N. A., M. Horowitz and E. Shohami (2007). "Heat acclimation: a unique model of physiologically mediated global preconditioning against traumatic brain injury." Prog Brain Res **161**: 353-363.

Shi, X., A. Takamizawa, Y. Nishimura, K. Hiraoka and S. Akashi (2008). "Thermal unfolding of proteins probed by laser spray mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **22**(9): 1430-1436.

Shmeeda, H., P. Kaspler, J. Shleyer, R. Honen, M. Horowitz and Y. Barenholz (2002). "Heat acclimation in rats: modulation via lipid polyunsaturation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(2): R389-399.

Short, K. R., J. L. Vittone, M. L. Bigelow, D. N. Proctor and K. S. Nair (2004). "Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(1): E92-101.

Shrieve, D. C., G. C. Li, A. Astromoff and J. W. Harris (1986). "Cellular glutathione, thermal sensitivity, and thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts and their heat-resistant variants." Cancer Res **46**(4 Pt 1): 1684-1687.

Shvartz, E., Y. Shapiro, A. Magazanik, A. Meroz, H. Birnfeld, A. Mechtering and S. Shibolet (1977). "Heat acclimation, physical fitness, and responses to exercise in temperate and hot environments." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **43**(4): 678-683.

Siegel, M. P., S. E. Kruse, J. M. Percival, J. Goh, C. C. White, H. C. Hopkins, T. J. Kavanagh, H. H. Szeto, P. S. Rabinovitch and D. J. Marcinek (2013). "Mitochondrial-targeted peptide rapidly improves mitochondrial energetics and skeletal muscle performance in aged mice." Aging Cell **12**(5): 763-771.

Siegel, M. P., T. Wilbur, M. Mathis, E. G. Shankland, A. Trieu, M. E. Harper and D. J. Marcinek (2012). "Impaired adaptability of in vivo mitochondrial energetics to acute oxidative insult in aged skeletal muscle." Mech Ageing Dev **133**(9-10): 620-628.

Silkuniene, G., R. Zukiene, Z. Nauciene, L. Degutyte-Fomins and V. Mildaziene (2018). "Impact of Gender and Age on Hyperthermia-Induced Changes in Respiration of Liver Mitochondria." Medicina (Kaunas) **54**(4).

Simonyan, R. A. and V. P. Skulachev (1998). "Thermoregulatory uncoupling in heart muscle mitochondria: involvement of the ATP/ADP antiporter and uncoupling protein." FEBS Lett **436**(1): 81-84.

Sjöström, M., K.-A. Ångquist, A.-C. Bylund, J. Fridén, L. Gustavsson and T. Scherstén (1982). "Morphometric analyses of human muscle fiber types." Muscle & Nerve **5**(7): 538-553.

Skulachev, V. P. (1991). "Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation." FEBS Letters **294**(3): 158-162.

Skulachev, V. P. (1998). "Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics." *Biochim Biophys Acta* **1363**(2): 100-124.

Slimen, I. B., T. Najjar, A. Ghram, H. Dabbebi, M. Ben Mrad and M. Abdrabbah (2014). "Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review." *Int J Hyperthermia* **30**(7): 513-523.

Smirnova, E., D. L. Shurland, S. N. Ryazantsev and A. M. van der Blik (1998). "A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria." *J Cell Biol* **143**(2): 351-358.

Smith, B. K., C. G. R. Perry, T. R. Koves, D. C. Wright, J. C. Smith, P. D. Neuffer, D. M. Muoio and G. P. Holloway (2012). "Identification of a novel malonyl-CoA IC(50) for CPT-I: implications for predicting in vivo fatty acid oxidation rates." *The Biochemical journal* **448**(1): 13-20.

Sonna, L. A., S. L. Gaffin, R. E. Pratt, M. L. Cullivan, K. C. Angel and C. M. Lilly (2002). "Selected Contribution: Effect of acute heat shock on gene expression by human peripheral blood mononuclear cells." *Journal of Applied Physiology* **92**(5): 2208-2220.

Sonne, B., K. J. Mikines, E. A. Richter, N. J. Christensen and H. Galbo (1985). "Role of liver nerves and adrenal medulla in glucose turnover of running rats." *J Appl Physiol* (1985) **59**(5): 1640-1646.

Sparks, L. M., A. Gemmink, E. Phielix, M. Bosma, G. Schaart, E. Moonen-Kornips, J. A. Jorgensen, E. B. Nascimento, M. K. Hesselink, P. Schrauwen and J. Hoeks (2016). "ANT1-mediated fatty acid-induced uncoupling as a target for improving myocellular insulin sensitivity." *Diabetologia* **59**(5): 1030-1039.

Spina, R. J., M. M. Chi, M. G. Hopkins, P. M. Nemeth, O. H. Lowry and J. O. Holloszy (1996). "Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise." *J Appl Physiol* (1985) **80**(6): 2250-2254.

Spriet, L. L. (2014). "Exercise and sport performance with low doses of caffeine." *Sports Med* **44 Suppl 2**: S175-184.

Spriet, L. L., J. M. Ren and E. Hultman (1988). "Epinephrine infusion enhances muscle glycogenolysis during prolonged electrical stimulation." *J Appl Physiol* (1985) **64**(4): 1439-1444.

Starkie, R. L., M. Hargreaves, D. L. Lambert, J. Proietto and M. A. Febbraio (1999). "Effect of temperature on muscle metabolism during submaximal exercise in humans." *Exp Physiol* **84**(4): 775-784.

Starritt, E. C., R. A. Howlett, G. J. Heigenhauser and L. L. Spriet (2000). "Sensitivity of CPT I to malonyl-CoA in trained and untrained human skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**(3): E462-468.

Stienen, G. J., J. L. Kiers, R. Bottinelli and C. Reggiani (1996). "Myofibrillar ATPase activity in skinned human skeletal muscle fibres: fibre type and temperature dependence." *J Physiol* **493 (Pt 2)**: 299-307.

Sunderland, C., J. G. Morris and M. E. Nevill (2008). "A heat acclimation protocol for team sports." *Br J Sports Med* **42**(5): 327-333.

Sunderland, C. and M. E. Nevill (2005). "High-intensity intermittent running and field hockey skill performance in the heat." *J Sports Sci* **23**(5): 531-540.

Svedenhag, J., J. Henriksson and C. Sylven (1983). "Dissociation of training effects on skeletal muscle mitochondrial enzymes and myoglobin in man." *Acta Physiol Scand* **117**(2): 213-218.

Tabata, I., K. Irisawa, M. Kozaki, K. Nishimura, F. Ogita and M. Miyachi (1997). "Metabolic profile of high intensity intermittent exercises." *Med Sci Sports Exerc* **29**(3): 390-395.

Tamura, Y., Y. Kitaoka, Y. Matsunaga, D. Hoshino and H. Hatta (2015). "Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle." *J Physiol* **593**(12): 2707-2720.

Tamura, Y., Y. Matsunaga, Y. Kitaoka and H. Hatta (2017). "Effects of Heat Stress Treatment on Age-dependent Unfolded Protein Response in Different Types of Skeletal Muscle." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **72**(3): 299-308.

Tamura, Y., Y. Matsunaga, H. Masuda, Y. Takahashi, Y. Takahashi, S. Terada, D. Hoshino and H. Hatta (2014). "Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **307**(7): R931-R943.

Thomas, C. D., J. C. Peters, G. W. Reed, N. N. Abumrad, M. Sun and J. O. Hill (1992). "Nutrient balance and energy expenditure during ad libitum feeding of high-fat and high-carbohydrate diets in humans." *Am J Clin Nutr* **55**(5): 934-942.

Thyfault, J. P., R. S. Rector and R. C. Noland (2006). "Metabolic inflexibility in skeletal muscle: a prelude to the cardiometabolic syndrome?" *J Cardiometab Syndr* **1**(3): 184-189.

Tonkonogi, M., A. Krook, B. Walsh and K. Sahlin (2000). "Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-esterified fatty acids: an uncoupling-protein-mediated effect?" *Biochem J* **351 Pt 3**: 805-810.

Tonkonogi, M., B. Walsh, M. Svensson and K. Sahlin (2000). "Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress." *J Physiol* **528 Pt 2**: 379-388.

Trounce, I., E. Byrne and S. Marzuki (1989). "Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing." *Lancet* **1**(8639): 637-639.

Turner, D. L., H. Hoppeler, C. Noti, H. P. Gurtner, H. Gerber, F. Schena, B. Kayser and G. Ferretti (1993). "Limitations to $\dot{V}O_{2max}$ in humans after blood retransfusion." *Respir Physiol* **92**(3): 329-341.

Tyler, C. J., T. Reeve, G. J. Hodges and S. S. Cheung (2016). "The Effects of Heat Adaptation on Physiology, Perception and Exercise Performance in the Heat: A Meta-Analysis." Sports Med **46**(11): 1699-1724.

Uehara, K., K. Goto, T. Kobayashi, A. Kojima, T. Akema, T. Sugiura, S. Yamada, Y. Ohira, T. Yoshioka and H. Aoki (2004). "Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle." Japanese Journal of Physiology **54**(3): 263-271.

Valle, A., R. Guevara, F. J. Garcia-Palmer, P. Roca and J. Oliver (2007). "Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions." Am J Physiol Cell Physiol **293**(4): C1302-1308.

van Hall, G., A. Steensberg, M. Sacchetti, C. Fischer, C. Keller, P. Schjerling, N. Hiscock, K. Moller, B. Saltin, M. A. Febbraio and B. K. Pedersen (2003). "Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans." J Clin Endocrinol Metab **88**(7): 3005-3010.

van Loon, L. J., P. L. Greenhaff, D. Constantin-Teodosiu, W. H. Saris and A. J. Wagenmakers (2001). "The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans." J Physiol **536**(Pt 1): 295-304.

Vollestad, N. K. and P. C. Blom (1985). "Effect of varying exercise intensity on glycogen depletion in human muscle fibres." Acta Physiol Scand **125**(3): 395-405.

Walczyk, T. and J. Y. Wick (2017). "The Ketogenic Diet: Making a Comeback." Consult Pharm **32**(7): 388-396.

Walsh, B., M. Tonkonogi and K. Sahlin (2001). "Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres." Pflugers Arch **442**(3): 420-425.

Wang, S. B., C. I. Murray, H. S. Chung and J. E. Van Eyk (2013). "Redox regulation of mitochondrial ATP synthase." Trends Cardiovasc Med **23**(1): 14-18.

Wang, Z. Y., E. Freire and R. E. McCarty (1993). "Influence of nucleotide binding site occupancy on the thermal stability of the F1 portion of the chloroplast ATP synthase." J Biol Chem **268**(28): 20785-20790.

Watt, M. J., G. J. F. Heigenhauser, D. J. Dyck and L. L. Spriet (2002). "Intramuscular triacylglycerol, glycogen and acetyl group metabolism during 4 h of moderate exercise in man." The Journal of physiology **541**(Pt 3): 969-978.

Weibel, E. R., C. R. Taylor and H. Hoppeler (1991). "The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(22): 10357-10361.

Weigle, D. S., L. E. Selfridge, M. W. Schwartz, R. J. Seeley, D. E. Cummings, P. J. Havel, J. L. Kuijper and H. BeltrandelRio (1998). "Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: A potential explanation for the effect of fasting." Diabetes **47**(2): 298-302.

Weinman, K. P., Z. Slabochova, E. M. Bernauer, T. Morimoto and F. Sargent, 2nd (1967). "Reactions of men and women to repeated exposure to humid heat." J Appl Physiol **22**(3): 533-538.

Wendling, P. S., S. J. Peters, G. J. Heigenhauser and L. L. Spriet (1996). "Epinephrine infusion does not enhance net muscle glycogenolysis during prolonged aerobic exercise." Can J Appl Physiol **21**(4): 271-284.

White, A. C., R. M. Salgado, S. Schneider, J. A. Loeppky, T. A. Astorino and C. M. Mermier (2014). "Does heat acclimation improve exercise capacity at altitude? A cross-tolerance model." Int J Sports Med **35**(12): 975-981.

Williams, C. G., G. A. Bredell, C. H. Wyndham, N. B. Strydom, J. F. Morrison, J. Peter, P. W. Fleming and J. S. Ward (1962). "Circulatory and metabolic reactions to work in heat." J Appl Physiol **17**: 625-638.

Willis, W. T. and M. R. Jackman (1994). "Mitochondrial function during heavy exercise." Medicine and Science in Sports and Exercise **26**(11): 1347-1353.

Willis, W. T., M. R. Jackman, M. E. Bizeau, M. J. Pagliassotti and J. R. Hazel (2000). "Hyperthermia impairs liver mitochondrial function in vitro." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(5): R1240-1246.

Winger, A. M., A. H. Millar and D. A. Day (2005). "Sensitivity of plant mitochondrial terminal oxidases to the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)." Biochem J **387**(Pt 3): 865-870.

Wojtczak, L. and P. Schonfeld (1993). "Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria." Biochim Biophys Acta **1183**(1): 41-57.

Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-124.

Wyndham, C. H., A. J. Benade, C. G. Williams, N. B. Strydom, A. Goldin and A. J. Heyns (1968). "Changes in central circulation and body fluid spaces during acclimatization to heat." J Appl Physiol **25**(5): 586-593.

Wyndham, C. H., G. G. Rogers, L. C. Senay and D. Mitchell (1976). "Acclimatization in a hot, humid environment: cardiovascular adjustments." J Appl Physiol **40**(5): 779-785.

Yaicharoen, P., K. Wallman, A. Morton, D. Bishop and R. J. Grove (2012). "The effects of warm-up on intermittent sprint performance in a hot and humid environment." J Sports Sci **30**(10): 967-974.

Yaicharoen, P., K. Wallman, A. Morton, D. J. Bishop and R. Grove (2012). "The effects of warm-up on intermittent sprint performance in a hot and humid environment." Journal of sports sciences **30**: 967-974.

Yakes, F. M. and B. Van Houten (1997). "Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 514-519.

Yamaguchi, T., T. Suzuki, H. Arai, S. Tanabe and Y. Atomi (2010). "Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow." Am J Physiol Cell Physiol **298**(1): C140-148.

Yamamoto, H., K. C. Zheng and M. Ariizumi (2003). "Influence of heat exposure on serum lipid and lipoprotein cholesterol in young male subjects." Ind Health **41**(1): 1-7.

Yang, C. Y. and M. T. Lin (2002). "Oxidative stress in rats with heatstroke-induced cerebral ischemia." Stroke **33**(3): 790-794.

Yaspelkis, B. B., 3rd, G. C. Scroop, K. M. Wilmore and J. L. Ivy (1993). "Carbohydrate metabolism during exercise in hot and thermoneutral environments." Int J Sports Med **14**(1): 13-19.

Yeh, E. T. H. (1997). "Life and Death in the Cardiovascular System." Circulation **95**(4): 782-786.

Yoshida, Y., S. S. Jain, J. T. McFarlan, L. A. Snook, A. Chabowski and A. Bonen (2013). "Exercise- and training-induced upregulation of skeletal muscle fatty acid oxidation are not solely dependent on mitochondrial machinery and biogenesis." J Physiol **591**(18): 4415-4426.

Youle, R. J. and A. M. Van Der Blik (2012). "Mitochondrial fission, fusion, and stress." Science **337**(6098): 1062-1065.

Young, A. J. (1990). "Energy substrate utilization during exercise in extreme environments." Exerc Sport Sci Rev **18**: 65-117.

Young, A. J., M. N. Sawka, L. Levine, P. W. Burgoon, W. A. Latzka, R. R. Gonzalez and K. B. Pandolf (1995). "Metabolic and thermal adaptations from endurance training in hot or cold water." J Appl Physiol (1985) **78**(3): 793-801.

Young, A. J., M. N. Sawka, L. Levine, B. S. Cadarette and K. B. Pandolf (1985). "Skeletal muscle metabolism during exercise is influenced by heat acclimation." J Appl Physiol (1985) **59**(6): 1929-1935.

Yu, X. and Y. C. Long (2015). "Autophagy modulates amino acid signaling network in myotubes: differential effects on mTORC1 pathway and the integrated stress response." Faseb j **29**(2): 394-407.

Zeng, L., J. Tan, W. Lu, T. Lu and Z. Hu (2013). "The potential role of small heat shock proteins in mitochondria." Cell Signal **25**(11): 2312-2319.

Zhang, H., M. Bosch-Marce, L. A. Shimoda, Y. S. Tan, J. H. Baek, J. B. Wesley, F. J. Gonzalez and G. L. Semenza (2008). "Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia." J Biol Chem **283**(16): 10892-10903.

Zhao, Q. L., Y. Fujiwara and T. Kondo (2006). "Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia." Free Radic Biol Med **40**(7): 1131-1143.

Zoladz, J. A., A. Koziel, I. Broniarek, A. M. Woyda-Ploszczyca, K. Ogrodna, J. Majerczak, J. Celichowski, Z. Szkutnik and W. Jarmuszkiewicz (2017). "Effect of temperature on fatty acid metabolism in skeletal muscle mitochondria of untrained and endurance-trained rats." PLoS ONE **12**(12).

Zoll, J., N. Koulmann, L. Bahi, R. Ventura-Clapier and A. X. Bigard (2003). "Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity." J Cell Physiol **194**(2): 186-193.

Zoll, J., H. Sanchez, B. N'Guessan, F. Ribera, E. Lampert, X. Bigard, B. Serrurier, D. Fortin, B. Geny, V. Veksler, R. Ventura-Clapier and B. Mettauer (2002). "Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle." The Journal of Physiology **543**(1): 191-200.

ANNEXES

Annexe 1

Protocole de mesure de la respiration mitochondriale in situ sur fibres perméabilisées

Préparation des solutions

Solutions S et R et substrats selon tableaux de composition.

Les solutions R sont complétées par 2 mg.ml^{-1} de BSA.

Les solutions R pour les protocoles de respiration utilisant des acides gras sont complétées pour atteindre une concentration de BSA à 6 mg.ml^{-1} .

Préparation des fibres

10 min : Après prélèvement des *solei*, les placer sur une boîte de Pétri en plastique avec de la solution S dans la glace (Fig. 3a).

5 min : Enlevez soigneusement tous les tissus adipeux et conjonctifs. Isoler des bandes de muscle squelettique (Fig. 3b).

30 min : À l'aide d'une pince très coupante, disséquer les bandes musculaires immergées pour former des faisceaux minces de fibres musculaires (Fig. 3c).

20 min : Transférer les faisceaux de fibres dans un flacon contenant $1,5 \text{ ml}$ milieu d'isolation S et $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de saponine et mélanger doucement (vortex réglé à la vitesse minimale) à 4° C pendant 30 min.

5 min : Transférer les fibres perméabilisées dans un tube contenant le milieu respiratoire S (vortex réglé sur vitesse minimale) à 4° C pendant 5 min pour éliminer la saponine).

15 min : Répétez l'étape précédente 2 fois pour éliminer complètement la saponine. Avant de débiter les mesures, élimination des sources d'énergie présentes dans les fibres.

Avant réalisation des mesures, après calibration des chambres Hansatech.

5 min : Transférer les fibres perméabilisées dans un tube contenant le milieu respiratoire R et 2 mg.ml^{-1} de BSA et mélanger doucement (vortex réglé sur vitesse minimale) à 4° C pendant 5 min.

5 min : Répétez l'étape précédente 2 fois pour éliminer complètement les sources d'énergie.

15 min : Ajoutez $1,5 \text{ ml}$ de milieu de respiration R dans les chambres d'oxygraphie et attendre l'équilibre avec l'oxygène atmosphérique et la température d'expérimentation (bain-marie)

2 min : Transférer les fibres lavées dans des chambres à oxygraphie. Fermez la chambre.

Les échantillons sont maintenant prêts pour le test de validation ou l'application du protocole expérimental

Temps total: ~ 115 min

Réalisation du protocole

Les différents ajouts sont réalisés au moyen de seringues Hamilton (10 ou $25 \mu\text{l}$).

Le temps entre deux ajouts doit être suffisant pour permettre la stabilisation de la pente de variation de la concentration en O_2 .

Les substances injectées doivent être conservées dans la glace et agitées doucement avant emploi.

En fin de protocole, les fibres doivent être récupérées puis séchées (80°C, 1h en bain sec) pour être ensuite pesées afin de rapporter les vitesses mesurées au poids sec de tissu.


Tableau 1. Composition des solutions de respiration S et R utilisées pour la mesure de la respiration mitochondriale *in situ*.

	Composition des solutions (mM)	
	R	S
CaK ₂ EGTA	2,77	2,77
K ₂ EGTA	7,23	7,23
MgCl ₂	6,56	6,56
dont Mg ²⁺ libre	1	1
Taurine	20	20
DTT	0,5	0,5
K-méthane sulfonate	160	160
Phosphate		3
ADP		2

Le pH des solutions était ajusté à 7,1

Annexe 2

Extraction pour dosage des activité citrate synthase, lactate déshydrogénase, cyclooxygénase et créatine kinase

	Code : 211.M.0015		Version : 1.0	Date
	Mode opératoire			
	EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE CS, LDH, COX ET CK			
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 09/03/2017 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : Fonction(s) : Médecin	Valideur Qualité Date : Fonction(s) : Chef bureau qualité	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef du département ENOP
<u>Liste de diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCN BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : MCS KOULMANN Nathalie Visa : Signature

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création		

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
32.M.0001	Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur-20°C et -80°C de l'IRBA
32.E.0001	Fiche utilisateur salle des congélateurs
211.M.0016	Dosage Activité CS, LDH, COX et CK
211.M.0020	Utilisation du Précellys
211.M.0019	Utilisation du pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS
211.E.0005	FDV G7841 pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS
211.E.0008	Enregistrement poids tissu/ Tp

Mots-clés :

Extraction, dosage, activité, CS, LDH, COX, CK, citrate synthase, lactate deshydrogenase, cyclooxygenase, creatine kinase, Précellys, ENOP, PEACE

**EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE CS, LDH, COX ET CK****1. OBJET**

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'extraction dans le but de réaliser un dosage de l'activité de la citrate synthase, de la lactate deshydrogenase, de la cyclooxygenase ou de la creatine kinase

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent des extractions dans le but de réaliser un dosage de l'activité de la citrate synthase, de la lactate deshydrogenase, de la cyclooxygenase ou de la creatine kinase

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

CS : citrate synthase

LDH : lactate deshydrogenase

COX : cyclooxygenase

CK : Créatine Kinase

EUP : Eau Ultrapure

Tp : tampon

DTT : Dithiothréitol

EGTA : Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetic acid

SN : surnageant

Sec : seconde

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

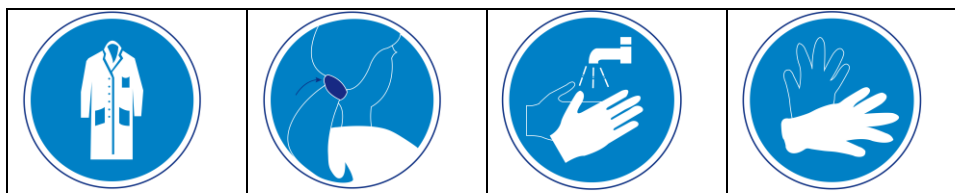
EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE CS, LDH, COX ET CK

5. DESCRIPTION DES ETAPES

5.1 Matériel

Etapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
Préparation du tampon	HEPES	H3375 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	EGTA	E4378 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	triton X100	X-100 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	DTT	D0632 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl ou NaOH		Salle IM-AB-RC-22
	pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS	SEVEN EASY S20KS METTLER TOLEDO	
Extraction	Precellys	BERTIN Ozyme	Salle IM-AB-RC-09

5.1 Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards

5.2.1 Préparation du tampon

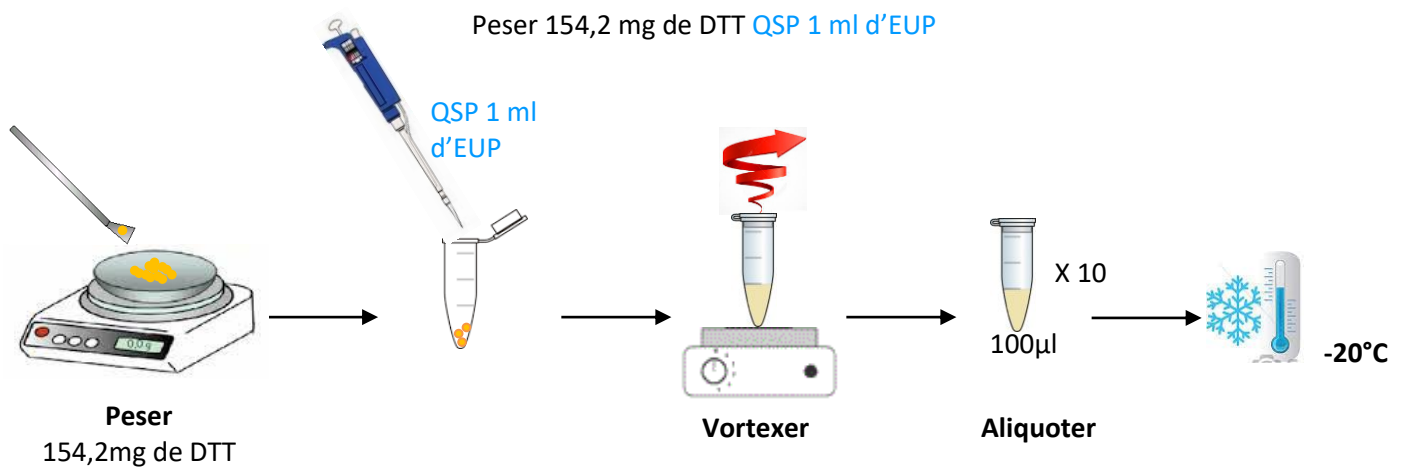
Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}	[finale] _g	faire 500mL
DTT	D0632, sigma	154,2	1mM	*	500µL
HEPES	H3375, sigma	238,3	5mM	1,191mg/mL	595,7mg
EGTA	E4378, sigma	380,4	1mM	0,3804mg/mL	190,2mg
triton X100		pur	0,10%	0,1mL/100mL	0,5mL
HCl ou NaOH					pH=8,7

*solution mère (1M) à congeler

EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE CS, LDH, COX ET CK

 ➤ Solution mère DTT :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois -20°C


 ➤ Tp d'extraction CS :

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C

Peser 595.7mg d'HEPES QSP 400 ml d'EUP

↓
Ajuster le pH à 8.5 environ

↓
Ajouter 190.2mg d'EGTA et 0.5mL de tritonX100 QSP 500 ml d'EUP

↓
Ajuster le pH à 8.7 (cette solution se conserve à 4°C)

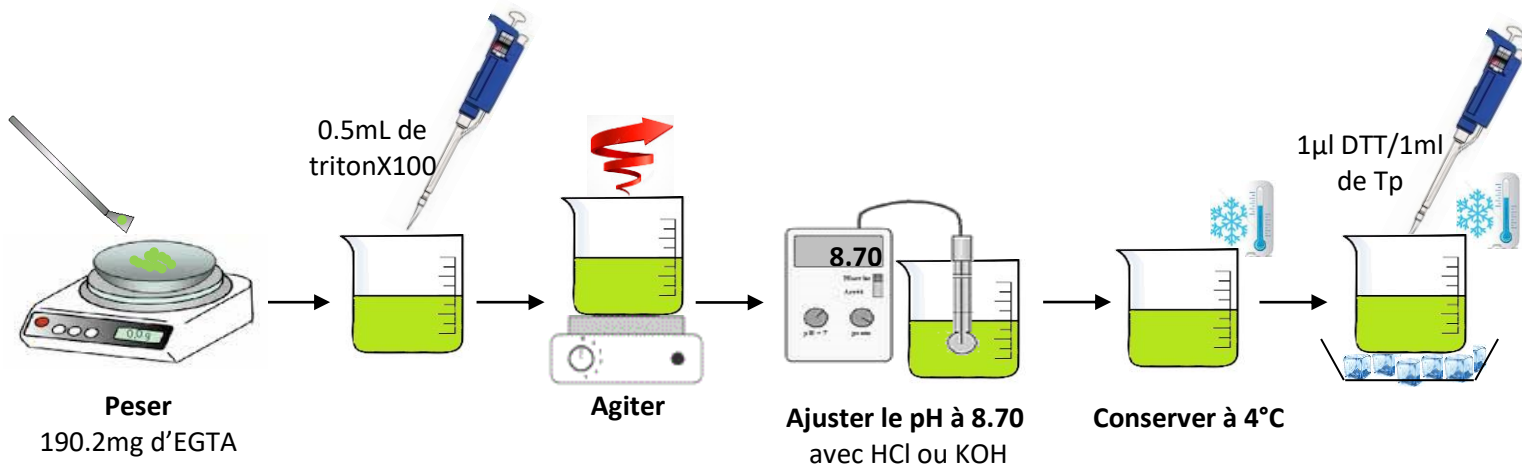
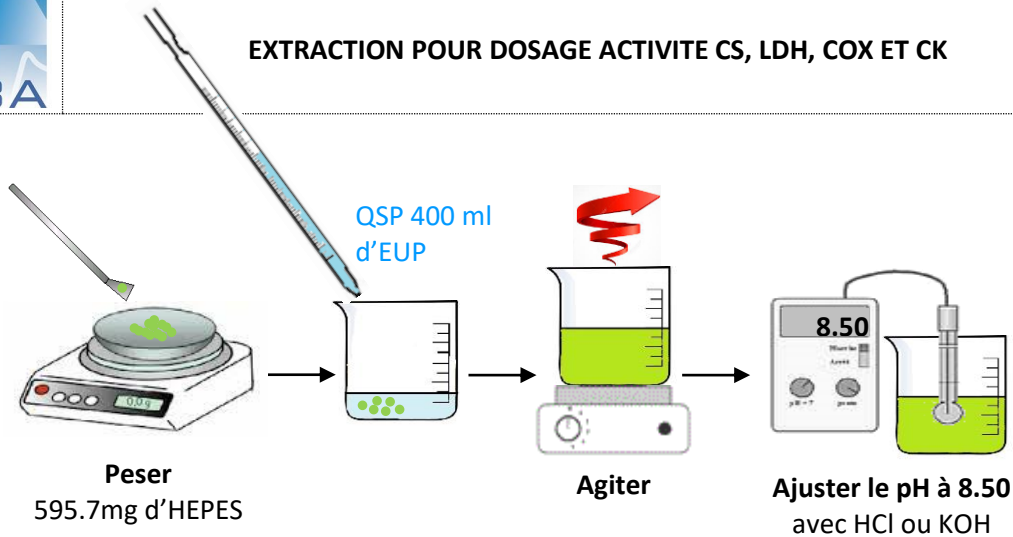
!!! NE PAS STOCKER avec le DTT

Extemporaneément ajouter 1µl/ml de DTT

Le tampon se garde dans la glace après ajout du DTT.



EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE CS, LDH, COX ET CK



5.2.2 Extraction

On travaille dans la glace pour toute l'extraction.



- Prélever un morceau d' ≈ 5 mg du muscle et le peser. Noter le poids sur la fiche 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp



- Mettre le morceau de tissu dans un tube Precellys CK14 contenant des billes en céramique de 1.4mm de diamètre.



- Ajouter un volume de 100µL de Tp avec DTT/5 mg de muscle (cf: 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp)



- Broyer au Precellys avec le programme : 2x 8 sec avec 5 sec de pause
- Vortexer et laisser incuber 1 heure dans la glace

!!! NE PAS CENTRIFUGER (la centrifugation fait sédimenter spécifiquement la mi-CK)



- Récupérer le SN et le placer dans un eppendorf de 1.5ml.
- Stocker les extraits à -80°C (maximum 1 mois)

(cf : 32.M.0001 Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur- -20°C et -80°C de l'IRBA)



EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE CS, LDH, COX ET CK

6. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004

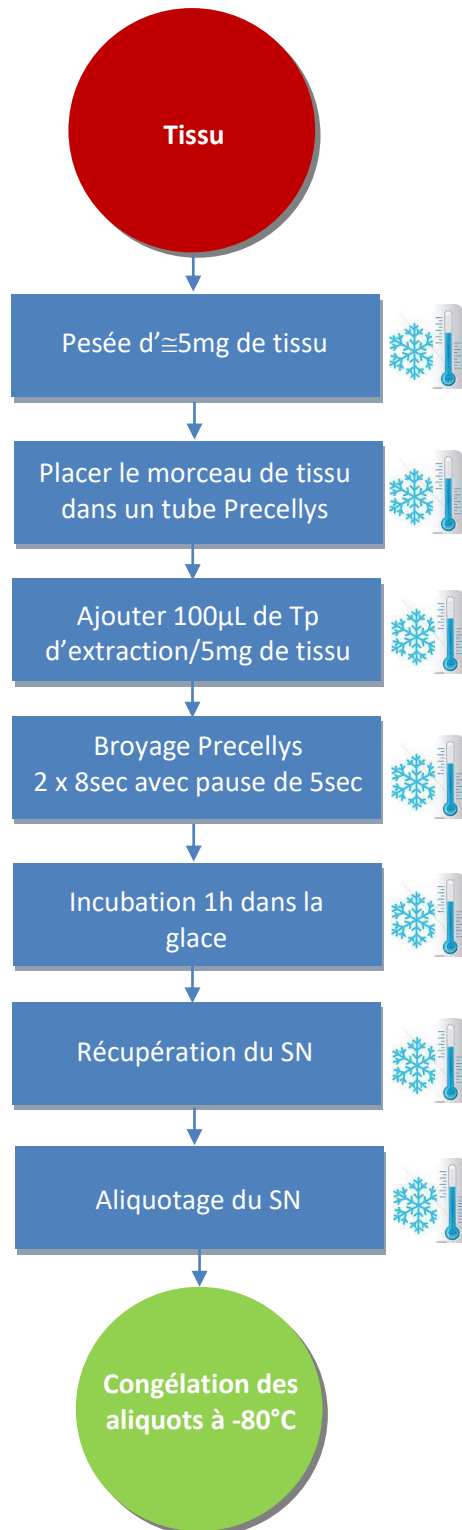
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, évènements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE CS, LDH, COX ET CK

Médecin
Infirmier
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards

211.E.0008
Enregistrement poids tissu/ Tp

211.E.00020
Utilisation du Precellys 24


11.P.0002 Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA

32.M.0001 Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur-20°C et -80°C de l'IRBA

32.E.0001 Fiche utilisateur salle des congélateurs

Annexe 3

Dosage de l'activité de la citrate synthase

	Code : 211.M.0016		Version : 1.0		Date
	Mode opératoire				
	DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE				
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 09/03/2017 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : Fonction(s) : Médecin	Valideur Qualité Date : Fonction(s) :	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef du département ENOP	
<u>Liste de diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCN BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : MCS KOULMANN Nathalie Visa : Signature	

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création	<u>9</u>	09/03/2017
1.1	Ajout calculs	<u>9</u>	03/07/2019

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
211.M.0015	Extraction pour Dosage CS, LDH, COX ET CK
211.M.0021	Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique
211.M.0020	
211.E.0005	Utilisation du pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS FDV G7841 pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS

Mots-clés :

Extraction, dosage, activité, CS, citrate synthase , spectromètre, ENOP, PEACE



DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE

1. OBJET

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'un dosage de l'activité de la Citrate synthase.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent un dosage de l'activité de la Citrate synthase.

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

Tp : tampon

CS : citrate synthase

LDH : lactate deshydrogenase

COX : cyclooxygenase

CK : Créatine Kinase

EUP : Eau Ultrapure

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

DO : densité optique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

RT : Room température = température ambiante

ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

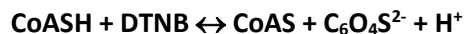
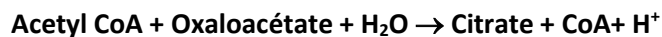


DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE

5. DESCRIPTION DES ETAPES

5.1 Principe

Le principe de la réaction enzymatique est le suivant :

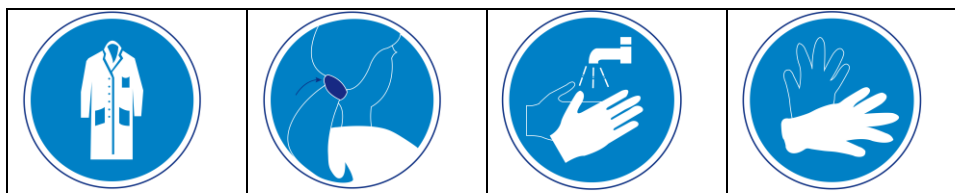


C'est la cinétique d'apparition de l'ion mercaptide ($\text{C}_6\text{O}_4\text{S}^{2-}$), qui absorbe à 412 nm, que l'on mesure.

5.2 Matériel

Etapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
Préparation du milieu réactionnel	Tris	T1503 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl		
	Tris HCl pH8	T2694 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	DTNB Ellman's	D8130 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS	SEVEN EASY S20KS METTLER TOLEDO	Salle IM-AB-RC-23
	AcétylCoA lithium salt	A2181 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	Acide oxaloacétate	O4126 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Lecture	BECKMAN COULTER DU 800	BECKMAN COULTER DU 800	Salle IM-AB-01-30

5.3 Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards

DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE

5.3.1 Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons dans le tampon d'extraction CS, LDH, COX ET CK (cf : 211.M.0015 Extraction pour Dosage CS, LDH, COX ET CK)

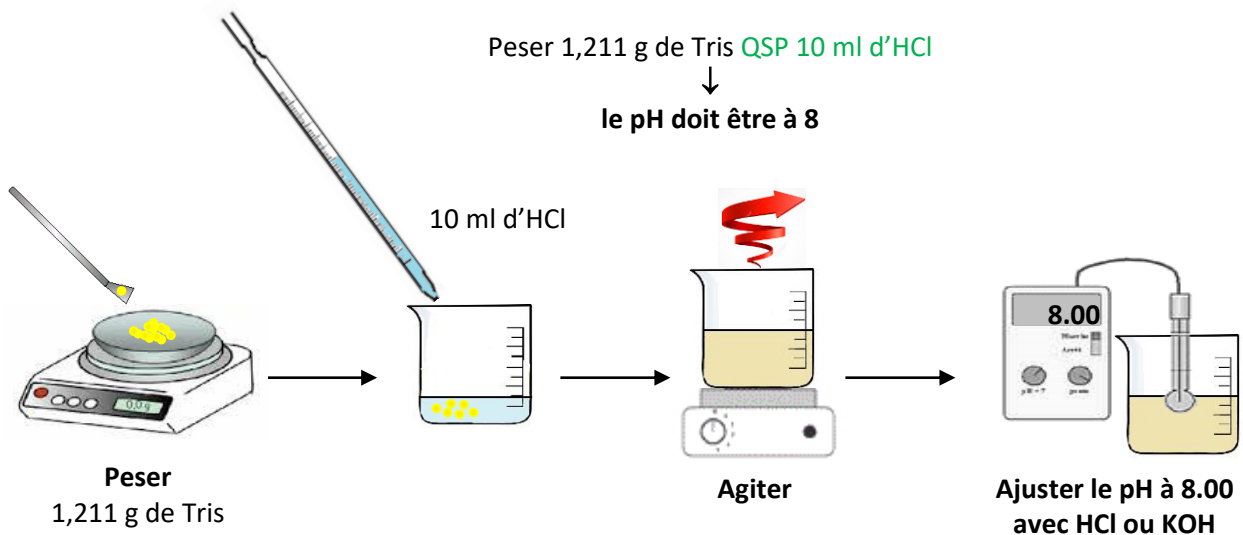
Type de tissu	Dilution utilisée
Plantaris	1/5
Soléaire	1/5

5.3.2 Préparation des solutions

Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}	[finale] _g
Tris	T1503 Sigma	121,14		
HCl ou KOH				
DTNB Ellman's	D8130 Sigma			396 g/l
Acide oxaloacétique	O4126 Sigma	132,07	10mM	1 g/l
AcetylCoA	A2181 Sigma			

➤ Tris HCl pH8 :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois RT



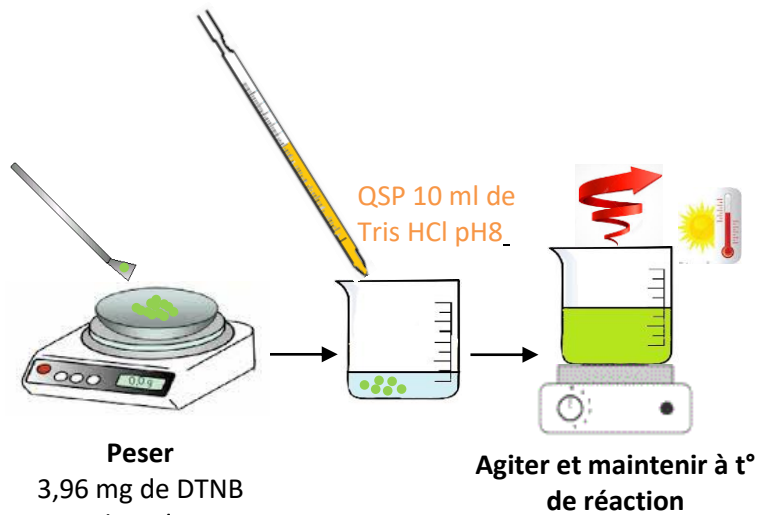
DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE

➤ DTNB Elman's :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C

Peser 3,96 mg de DTNB Elman's_ QSP 10 ml de Tris HCl pH8_

Bien homogénéiser et maintenir à la température de réaction



➤ Acide oxaloacétique:

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C

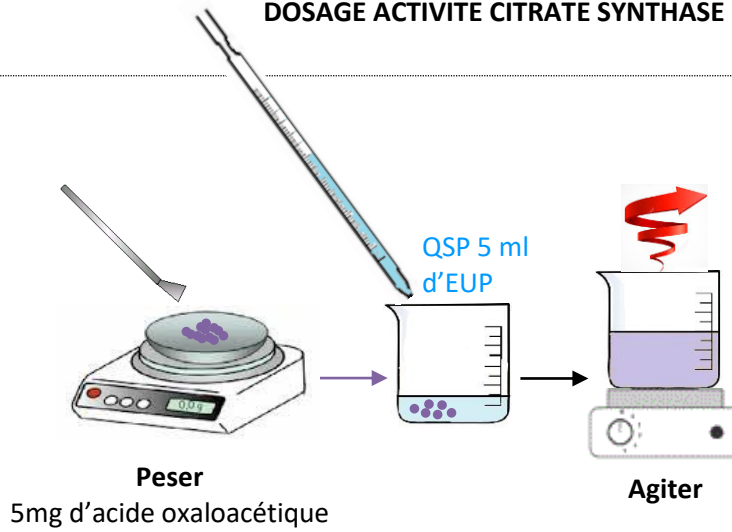
[finale]

Acide oxaloacétique

10mM

5mg
QSP 5 ml d'EUP

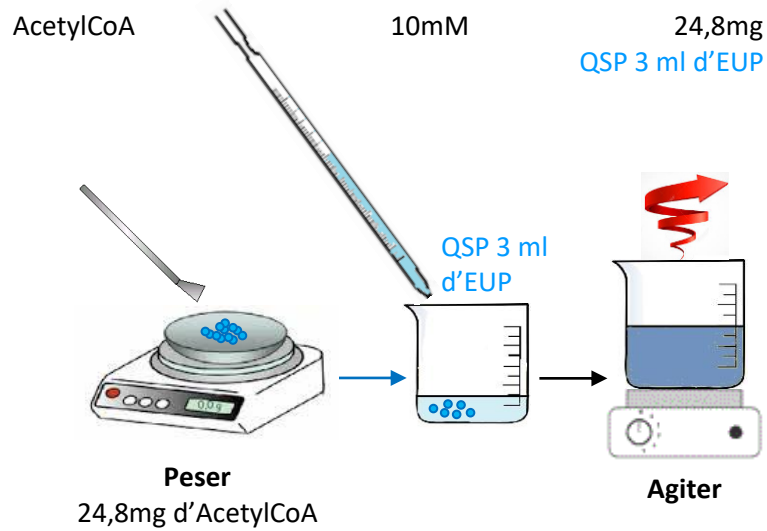
DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE



➤ AcetylCoA:

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	

[finale]



➤ Milieu réactionnel :

Nombre de mesures	DTNB-Tris-HCl	AcétylCoA	EUP
1	100µL	30µL	810µL
2	200µL	60µL	1620µL
5	500µL	150µL	4050µL

DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE

10	1mL	300μL	8,1mL
----	-----	-------	-------

5.3.3 Lecture de la variation de densité optique

- Allumer le spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 (cf 211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique).

- Régler la lecture d'absorbance à 412nm
- Allumer le bain marie
- Mettre le bain marie à la température de réaction choisie



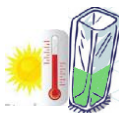
- * Bien homogénéiser le milieu réactionnel maintenu à température réactionnelle

- Placer une cuve dans le spectromètre



- Ajouter 940 μL milieu réactionnel + 10μL de tampon d'extraction CS, LDH, COX ET CK pour faire le blanc

- Mettre une nouvelle cuve



- Ajouter 940μL de milieu réactionnel +10μL d'échantillon dilué

- Lancer la lecture à 412nm de la cinétique pendant 3 min



- Ajouter 50μL d'oxaloacétate

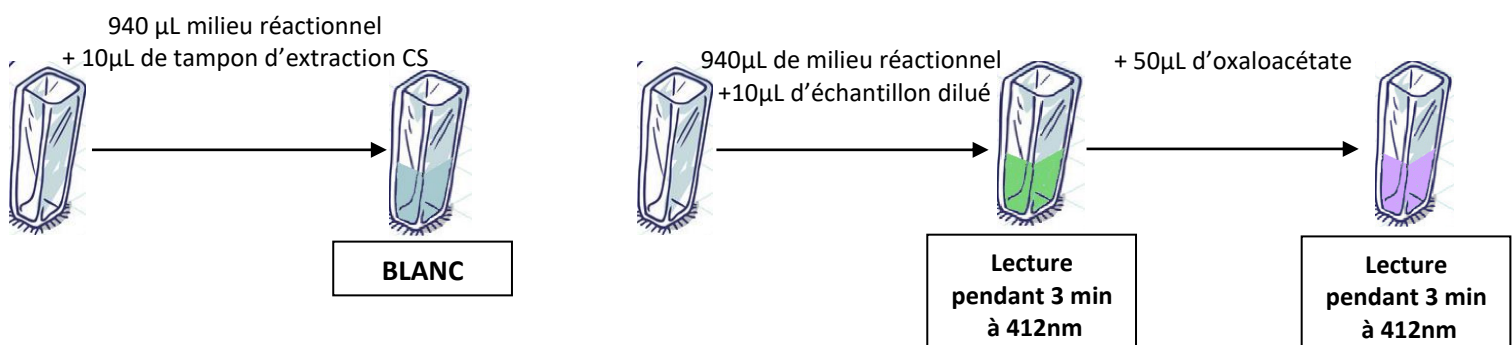
- Lancer la lecture à 412nm de la cinétique pendant 3 min.

- Enregistrer les résultats* → recommencer de * à * pour l'échantillon suivant.

1^{ère} étape : blanc tampon

2^{ème} étape : blanc échantillon

3^{ème} étape : lecture échantillon



6. CALCULS

On calcule l'activité grâce à la loi de Lambert-Beer, en utilisant la concentration et le coefficient d'extinction molaire du $C_6O_4S^{2-}$ ($\Sigma = 13600$ L/mol/cm).

**DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE**

Le calcul est le suivant :

Activité = [pente ech – pente blanc ech / 13.6 x(1000-Vol ech+Vol ech) / Vol ech*1000* facteur de dilution] / [extrait dilué]

Valeurs	Unité
Activité	Ui/g poids frais
Pente ech	DO/min
Vol ech	µl
[extrait dilué]	mg/ml

EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004

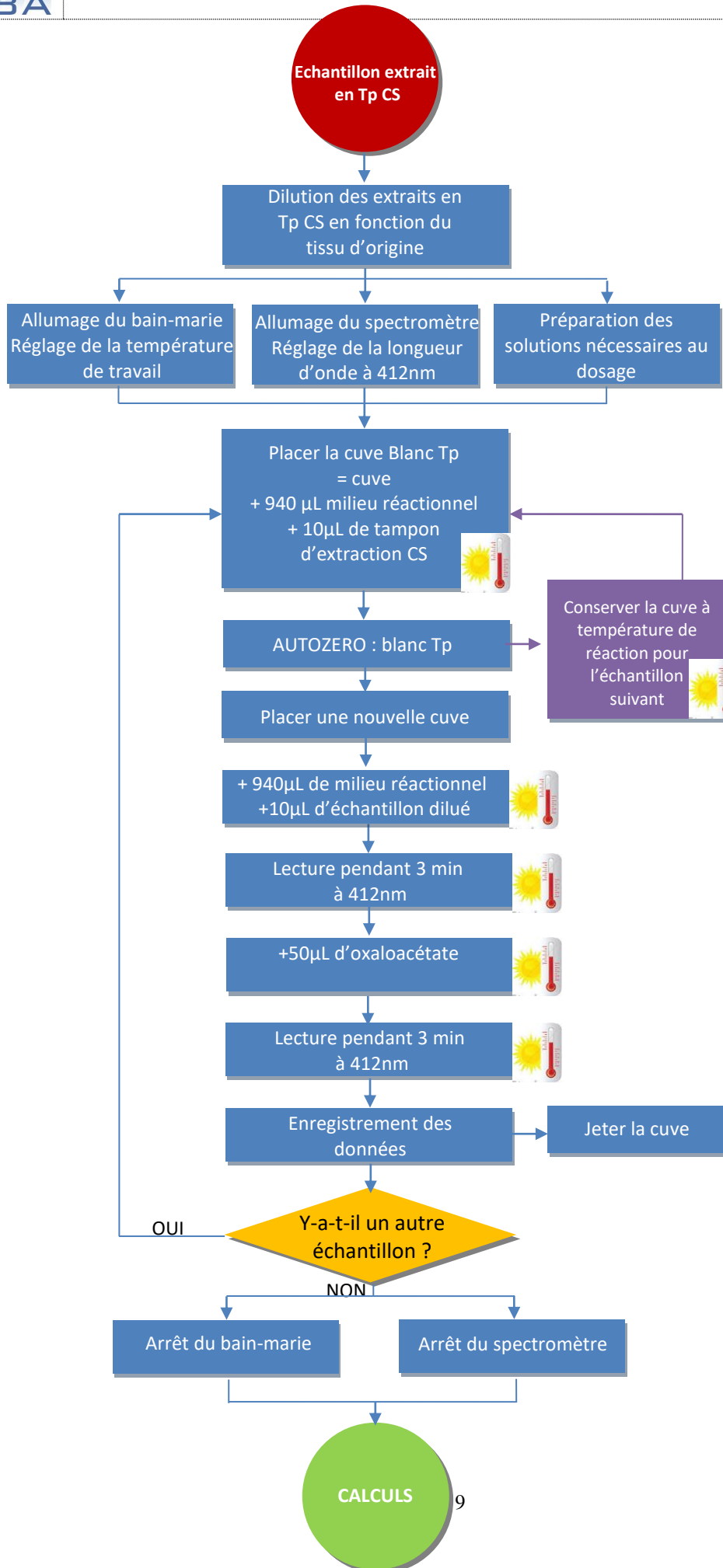
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, événements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

DOSAGE ACTIVITE CITRATE SYNTHASE

Chercheur
Ingénieur
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards
211.M.0015 Extraction dosage Activité CS

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique


211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage

11.P.0002 Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

Annexe 4

Extraction pour dosage de l'activité de la HAD

	Code : 211.M.0017		Version : 1.0		Date
	Mode opératoire				
	EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE HAD				
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 09/03/2017 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : Fonction(s) : Médecin	Valideur Qualité Date : Fonction(s) : Chef bureau qualité	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef du département ENOP	
<u>Liste de diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCN BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : MCS KOULMANN Nathalie Visa : Signature	

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création	<u>6</u>	

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
32.M.0001	Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur-20°C et -80°C de l'IRBA
32.E.0001	Fiche utilisateur salle des congélateurs
211.M.0018	Dosage Activité HAD
211.M.0020	Utilisation du Précellys
211.M.0019	Utilisation du pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS
211.E.0005	FDV G7841 pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS
211.E.0008	Enregistrement poids tissu/ Tp

Mots-clés :

Extraction, dosage, activité, HAD, Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase, Précellys, ENOP, PEACE



EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE HAD

1. OBJET

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'extraction dans le but de réaliser un dosage de l'activité de l' Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent des extractions dans le but de réaliser un dosage de l'activité de l' Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase.

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

HAD : Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase

EUP : Eau Ultrapure

SN : surnageant

BSA : Bovine Serum Albumine

Tp : tampon

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

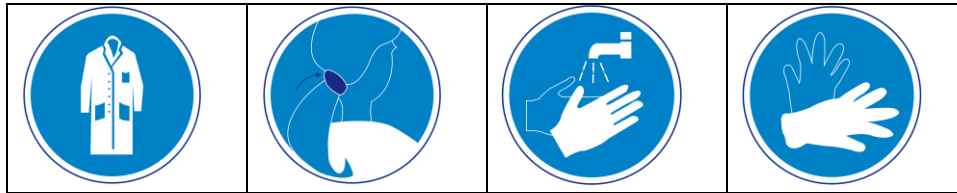
ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE HAD
5. DESCRIPTION DES ETAPES
5.1 Matériel

Etapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
Préparation du tampon	KH ₂ PO ₄	P9791 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	K ₂ HPO ₄	P9666 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	BSA	A7030 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl ou NaOH		Salle IM-AB-RC-22
	pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS	SEVEN EASY S20KS METTLER TOLEDO	Salle IM-AB-RC-23
Extraction	Precellys	BERTIN Ozyme	Salle IM-AB-RC-09

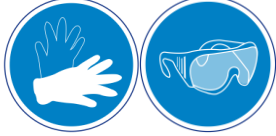



5.2 Déroulement


Cf 1.P.0005 Précautions standards

5.2.1 Préparation du tampon

Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}	[finale] _g	faire 500mL
KH ₂ PO ₄	P9791 Sigma	136	300mM	40.8 g/L	10.2 g
K ₂ HPO ₄	P9666 Sigma	228	300mM	68.4 g/L	17.1 g
HCl ou KOH					pH=7,7
BSA	A7030 Sigma		0.5%	0.5 g/100ml	2.5 g

 ➤ Tp phosphate :

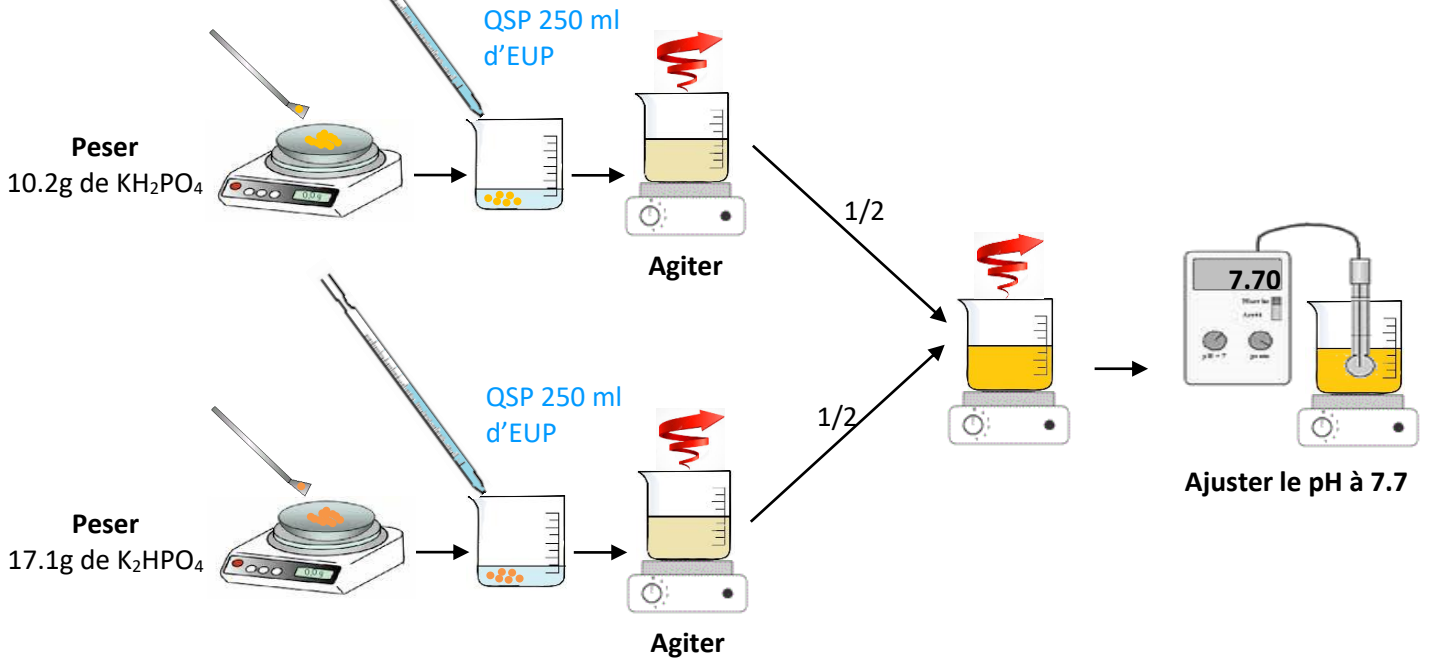
Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE HAD

Peser 10.2g de KH_2PO_4 QSP 250 ml d'EUP et Peser 17.1g de K_2HPO_4 QSP 250 ml d'EUP

Mélanger volume à volume

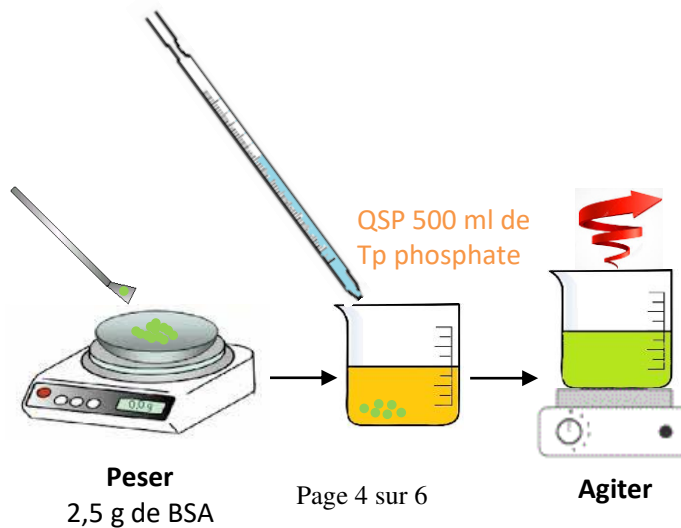
Ajuster le pH à 7.7



➤ Tp extraction :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C

Ajouter 2.5 g de BSA QSP 500 ml de Tp phosphate



EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE HAD**5.2.2 Extraction**

On travaille dans la glace pour toute l'extraction.



- Prélever un morceau d' $\cong 5$ mg du muscle et le peser. Noter le poids sur la fiche 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp.



- Mettre le morceau de tissu dans un tube Precellys CK14 contenant des billes en céramique de 1.4mm de diamètre.



- Ajouter un volume de 100 μ L de Tp/ 5 mg de muscle (se reporter à 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp)



- Broyer au Precellys avec le programme : 2x 8 sec avec 5 sec de pause



- Vortexer et laisser incuber 1 heure dans la glace.



- Récupérer le SN et le placer dans un eppendorf de 1.5ml.

- Stocker les extraits à -80°C (maximum 1 mois)

(cf : 32.M.0001 Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur- 20°C et -80°C de l'IRBA)

6. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004

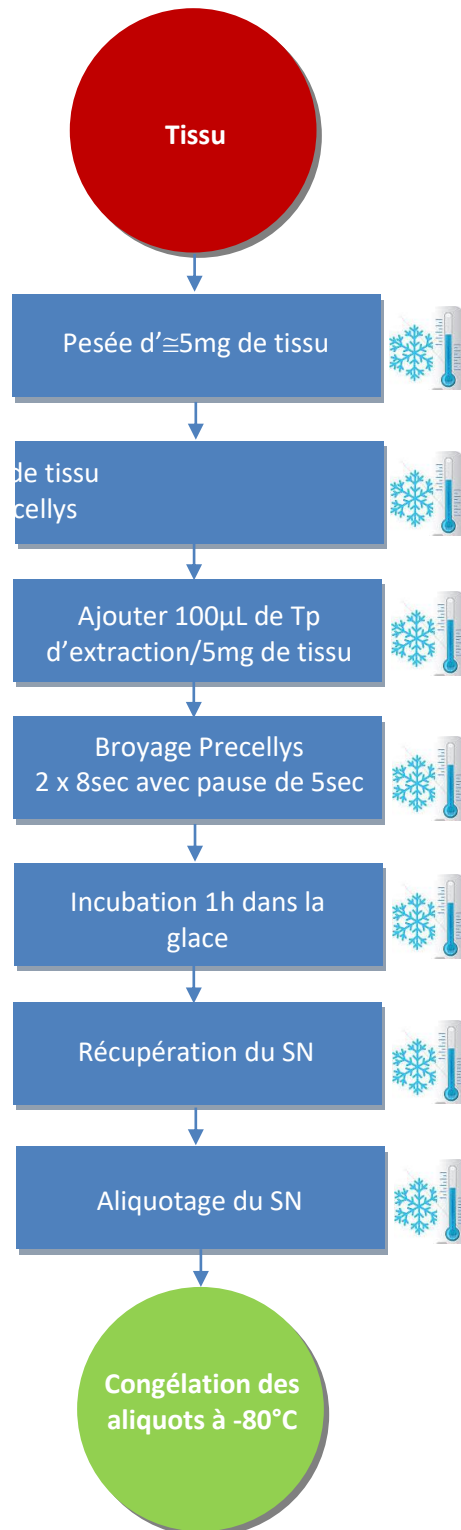
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, événements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

EXTRACTION POUR DOSAGE ACTIVITE HAD

Médecin
Infirmier
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards

211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp

211.E.00020 Utilisation du Precellys 24


11.P.0002 Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA

32.M.0001 Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur-20°C et -80°C de l'IRBA

32.E.0001 Fiche utilisateur salle des congélateurs

Annexe 5

Dosage de l'activité de la HAD

	Code : 211.M.0018		Version : 1.1	Date 03/07/2019
	Mode opératoire			
	DOSAGE HAD			
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 09/03/2017 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : Fonction(s) : Chef de l'unité PEACE	Valideur Qualité Date : Fonction(s) : Chef bureau qualité	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef du département ENOP
<u>Liste de diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCN BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : M CHENNAOUI Mounir Visa : Signature

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création	<u>10</u>	09/03/2017
1.1	Modification	<u>10</u>	03/07/2019

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
211.M.0017	Extraction dosage Activité HAD
211.M.0021	Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique
211.M.0020	
211.E.0005	Utilisation du pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS FDV G7841 pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS

Mots-clés :

Extraction, dosage, HAD, Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase, spectromètre, ENOP, PEACE

**DOSAGE HAD****1. OBJET**

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'un dosage de l' Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent un dosage de l' Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase.

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

Tp : tampon

HAD : Hydroxy-Acyl-CoA Deshydrogenase

EUP : Eau Ultrapure

QSP : Quantité Suffisante Pour

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

DO : densité optique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

DOSAGE HAD

5. DESCRIPTION DES ETAPES

5.1 Principe

Le principe de la réaction enzymatique est le suivant :

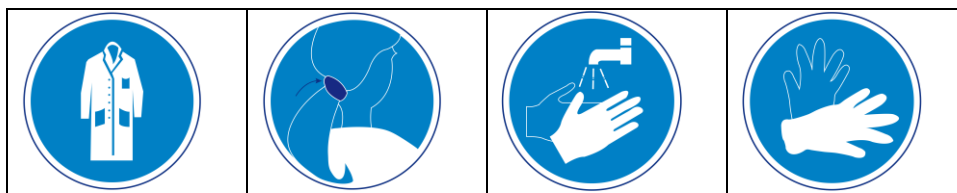


Le NAD est formé à partir du NADH qui absorbe à 340nm. Il est possible de quantifier la disparition de NADH par la variation de densité optique.

5.2 Matériel

Etapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
Préparation du milieu réactionnel	imidazole		Salle IM-AB-RC-21
	EDTA	EDS Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl ou NaOH		Salle IM-AB-RC-22
	pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS	SEVEN EASY S20KS METTLER TOLEDO	Salle IM-AB-RC-23
NADH	β -Nicotinamide adenine dinucleotide	N8129 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
AcetoacetylCoA	Acetoacetyl Coenzyme A	A1625 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Lecture	BECKMAN COULTER DU 800	BioTek Instruments	Salle IM-AB-04-30

5.3 Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards

**DOSAGE HAD****5.3.1 Préparation des échantillons**

- Diluer les échantillons dans le tampon d'extraction HAD
(cf : 211.M.0017 Extraction pour Dosage HAD)

Type de tissu	Dilution utilisée
Plantaris	1/2
Soléaire	1/4
Gastrocnémien	Pur
Ventricule gauche	1/20
Ventricule droit	1/30

5.3.2 Préparation des solutions

Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}	[finale] _g	Pour 4 éch (+ blc)
EDTA	EDS Sigma	292,24	200mM	58,45mg/mL	584,5mg
imidazole		68,1	40mM	2,72 mg/mL	27,2mg
HCl ou KOH					pH=7
NADH	N8129 Sigma	709,4	23mM	16,4mg/mL	1,64mg
AcetoacetylCoA	A1625 Sigma	851,61	5mM	4,26mg/ml	0.426mg

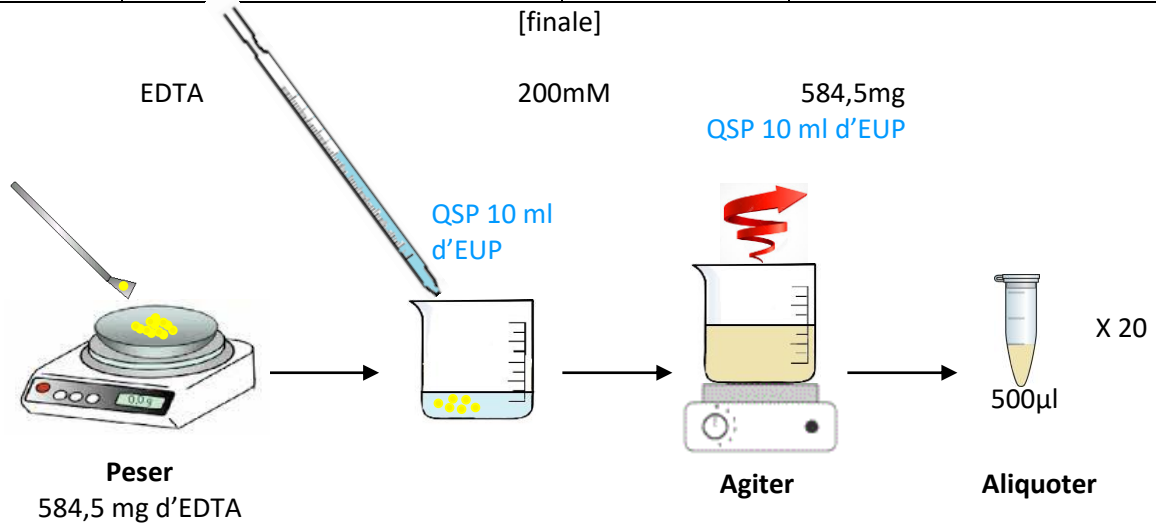


Ajuster les quantités en fonction du **nombre d'échantillons et de conditions à traiter**

DOSAGE HAD

 > **EDTA**

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C



Si l'EDTA ne se dissout pas, pensez à ajuster le pH à 7,00.

 > **Milieu réactionnel**

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C

Peser 27,2mg d'imidazole QSP 10 ml d'EUP

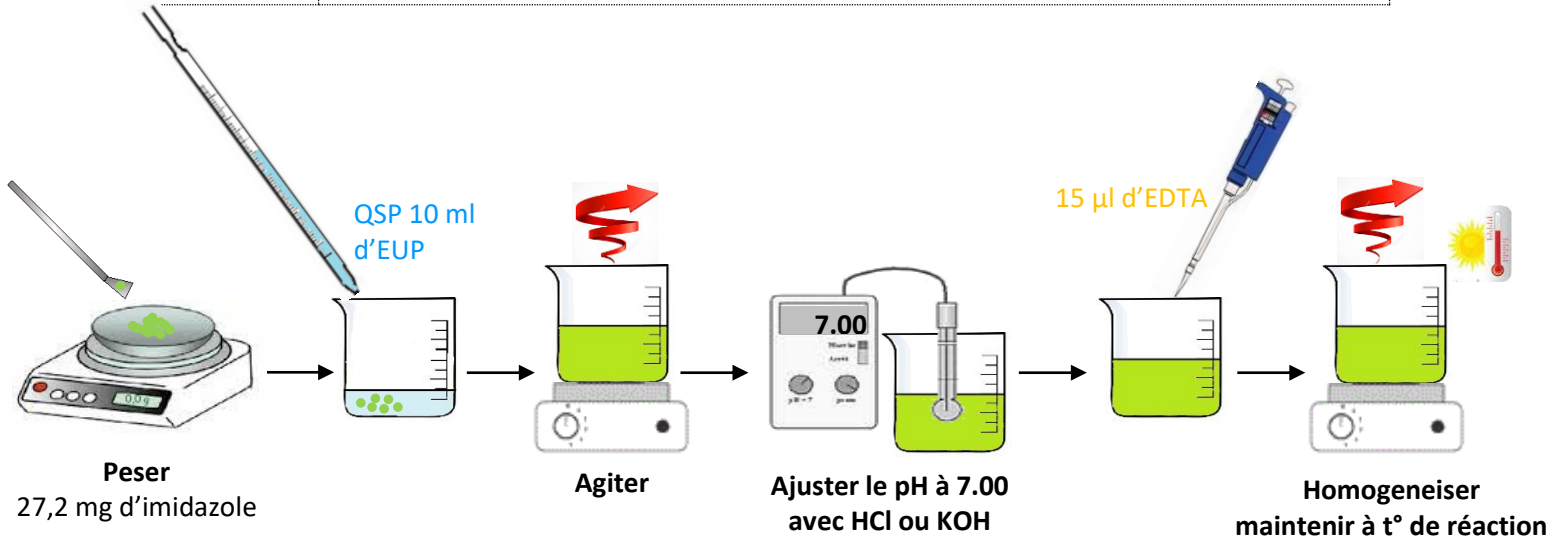
↓
Ajuster le pH à 7

↓
Ajouter 15µL d'EDTA à 200mM

Bien homogénéiser et maintenir à la température de réaction choisie pour le dosage.



DOSAGE HAD



➤ NADH:

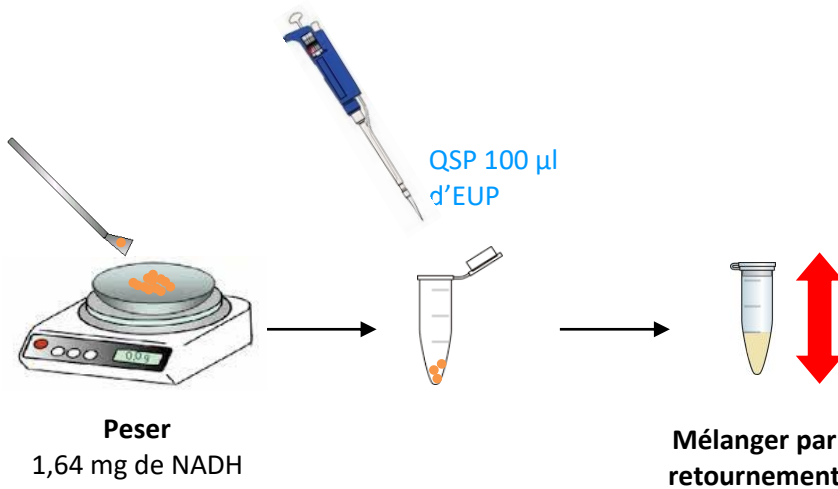
Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C

[finale]

NADH

23mM

1,64mg
QSP 100 µl d'EUP



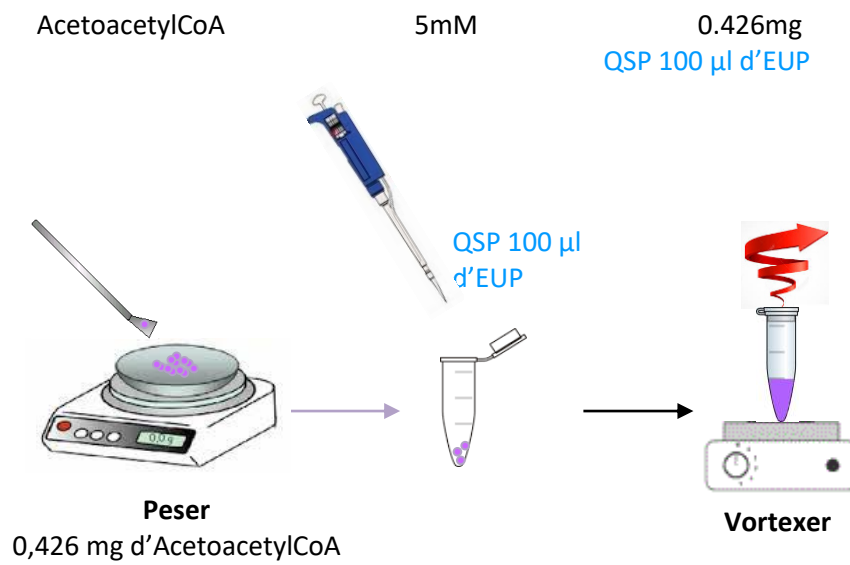


DOSAGE HAD

➤ AcetoacetylCoA:

Protection	 latex	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

[finale]



DOSAGE HAD

5.3.3 Lecture de la variation de densité optique

- Allumer le spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 (cf 211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique).

- Régler la lecture d'absorbance à 340nm

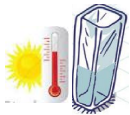
- Allumer le bain marie

- Mettre le bain marie à la température de réaction choisie



- *Bien homogénéiser le milieu réactionnel maintenu à température réactionnelle

- Placer une cuve dans le spectromètre



- Ajouter 960 μL milieu réactionnel + 30 μL de tampon d'extraction HAD + 10 μL d'AcetoacetylCoA) (on devrait mettre du NADH mais il rend la DO négative) pour faire le blanc → **BLANC**

- Mettre une nouvelle cuve



- Ajouter 950 μL de milieu réactionnel +30 μL d'échantillon dilué

- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 3 min

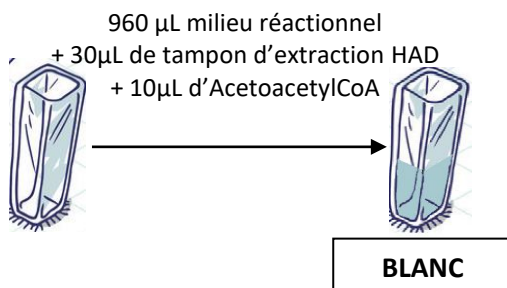


- Ajouter 10 μL d'AcetoacetylCoA + 10 μL de NADH

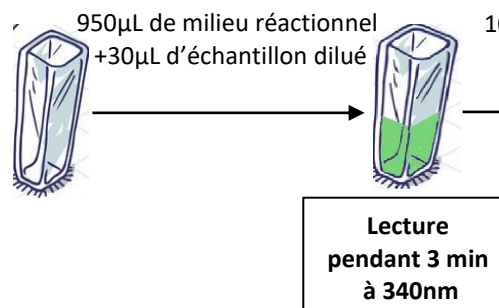
- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 3 min.

- Enregistrer les résultats* → recommencer de * à * pour l'échantillon suivant.

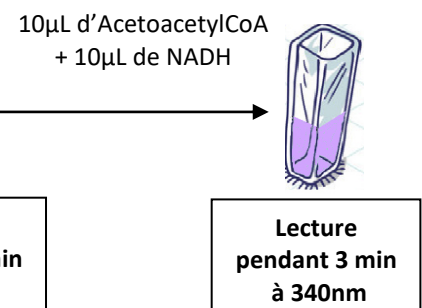
1^{ère} étape : blanc tampon



2^{ème} étape : blanc échantillon



3^{ème} étape : lecture échantillon



**DOSAGE HAD****6. CALCULS**

On calcule l'activité grâce à la loi de Lambert-Beer, en utilisant la concentration et le coefficient d'extinction molaire du NADH,H⁺ ($\Sigma = 6300 \text{ L/mol/cm}$).

Le calcul est le suivant :

Activité = $-\frac{\text{pente ech} - \text{pente blanc ech}}{6.3 \times (1000 - \text{Vol ech} + \text{Vol ech})} / \text{Vol ech} \times 1000 \times \text{facteur de dilution} / [\text{extrait dilué}]$

Valeurs	Unité
Activité	Ui/g poids frais
Pente ech	DO/min
Vol ech	μl
[extrait dilué]	mg/ml

7. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004

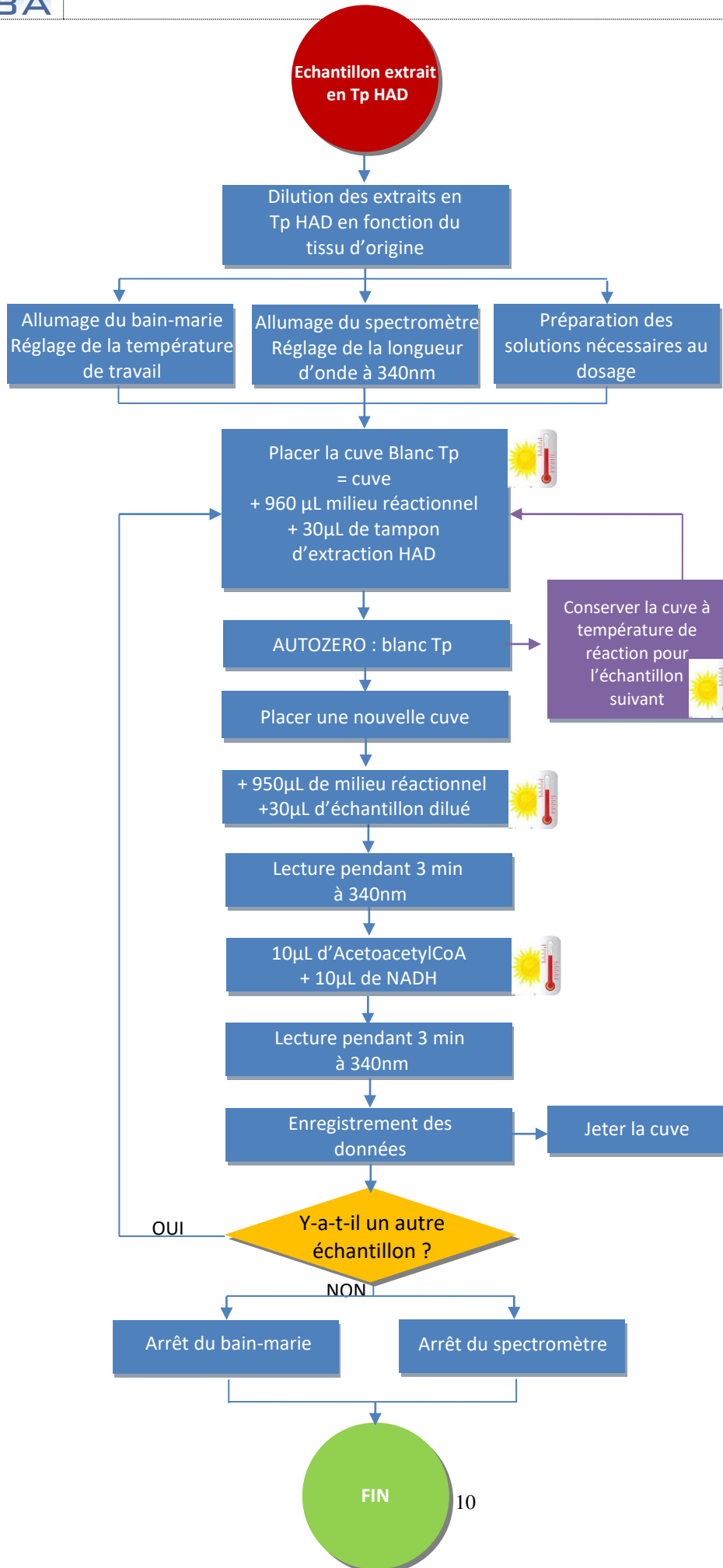
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, événements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

DOSAGE HAD

Chercheur
Ingénieur
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards

211.M.0017 Extraction dosage Activité HAD

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

11.P.0002 Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

Annexe 6

Protocole de mesure de la production d'H₂O₂ sur fibres perméabilisées

Solutions

- Tampon Z – ROS à 37°C

Concentration finale en mM:

- K-MES 110
- KCl 35
- EGTA 1
- MgCl₂ 3
- K₂HPO₄ 10
- BSA 0,5
- pH 7,3 à 37°C ajusté à 7,55 à 23°C
- pH 7,3 à 4°C ajusté à 6,9 à 23°C

Ajuster le pH : 6,9 à 23°C

Produit ((MM)	Concentration finale (mM)	g pour 100 ml	g pour 910 ml
K-MES (233,3)	110	2,5663	23,3533
KCl (74,55)	35	0,2609	2,3742
EGTA (380,35)	1	0,0380	0,3458
K ₂ HPO ₄ (174,18)	5	0,0871	0,7926
MgCl ₂ (XXX) <u>OR</u>	3	XXXX OR	XXXX OR
MgCl ₂ liq. 1M		LIQUID... 300µl	LIQUID... 2, 730µl

- HRP (Horseradish peroxydase) – Sigma 77332 : Préparé à 240U/ml dans eau. Pas stable reconstitué. A conserver en poudre. NE PAS VORTEXER

- Amplex Red – Invitrogen A36006 : Préparé à 2mM

- Reprendre 1mg d'Amplex red dans 340µl de DMSO (10mM). Stocké congelé
- Diluer dans 1,7ml (ajout de 1360µl) EXTEMPORANEMENT

- SOD (2070 UI/mg 3,2mg/ml soit 6624UI/ml). NE PAS VORTEXER

- H₂O₂ à **0,01mM** (gamme souris) ou à **0,001mM** (gamme rat).

A préparer EXTEMPORANEMENT. A partir de H₂O₂ 10 M (35%, 34,1g/mol) :

- Diluer 1µl dans 1ml d'EUP (10mM)
- Diluer 1µl de la précédente
- dans 1ml : H₂O₂ 0,01mM
- dans 10 ml : H₂O₂ 0,001mM

Mesure de production d'H₂O₂ sur fluorimètre Hitachi F-2710 :

Préparation des fibres :

Dissection des fibres dans S (solution classique de préparation des fibres décrite dans *Nature protocol* de Kuznetsov 2008) et perméabilisation avec 50µg/ml de saponine pendant 30 min à 4°C. Rinçage 10 min dans S sans saponine puis 2 rinçages de 10 min dans Z à 4°C. Garder les fibres dans Z sur glace jusqu'à utilisation.

Réglages du fluorimètre :

Dans section méthode :

- régler sur time scan
- EX : 563nm EM : 587nm
- EX slit : 5 EM slit : 5
- Time : 1500s

Allumer le fluorimètre au moins 30 minutes avant de commencer les mesures pour stabilisation et régler le bain-marie à 37°C

Gamme H₂O₂ Tableau 1

En duplicate de 100 à 600 nM

Mettre dans la cuvette :

- 2,25 ml de tampon Z (37°C)
- 22,5µl d'Amplex Red (20µM dans cuvette)
- 11,25 µl d'HRP (1,2U/ml CUVETTE)
- 3 µl de SOD (8,8 UI/µl CUVETTE)

par ajouts successifs de 100 nM toutes les 2 minutes (cf tableau)

Mesures des ROS tableau 2:

Mettre dans la cuvette :

- 2,25 ml de tampon Z (37°C)
- 22,5µl d'Amplex Red (20µM dans cuvette)
- 11,25 µl d'HRP (1,2U/ml CUVETTE)
- 3 µl de SOD (8,8 UI/µl CUVETTE)

Placer la cuvette dans le fluorimètre et régler l'agitation sur sa vitesse minimale.

Commencer l'enregistrement en cliquant sur « Measure ».

Au bout de 2 minutes, ajouter les fibres dans la cuvette (environ 0,5mg en poids sec comme pour les mesures de respiration)

Ajouter un substrat dans la cuvette toutes les deux minutes (cf tableaux).

Arrêter l'enregistrement en cliquant sur « Stop » et enregistrer le fichier. Récupérer les fibres pour pesée ultérieure et nettoyer la cuvette avec de l'alcool (70%) puis de l'eau.

Tableau 1. Gamme de concentrations d'H₂O₂

Gamme H₂O₂ 1 à 100 nM			
Vol chambre 2,25ml	Concentration	Solution stock (mM)	Ajout (µL)
Tampon 2 ou 6mg/ml de BSA	Chambre (µM)		
AMPLEX RED	20	2	22.5
HRP	2	0.24	18.75
SOD	8,8	6,6	3
H₂O₂	0,01	0,001	22,5
H₂O₂	0,025	0,001	33,75
H₂O₂	0,05	0,001	56,25
H₂O₂	0,075	0,001	56,25
H₂O₂	0,1	0,001	56,25

Tableau 2 : Protocoles de mesure la production de H₂O₂ en fonction du substrat

PYRUVATE			
2,25ml de Z « Pyr »	Concentration	Solution stock (mM)	Ajout (μL)
Tampon 2mg/ml de BSA	Chambre (μM)		
HRP	1,2	0,24	11,25
AMPLEX RED	20	2	22,5
SOD	8,8	6,6	3
Fibres			
Malate	4000	750	12
GTP 1 fois/2	5000	191	58,90
Pyruvate	2000	250	18
ADP	2000	500	9
Atractyloside	170	50	7,65

PCOA			
2,25ml de Z « Pyr »	Concentration	Solution stock (mM)	Ajout (μL)
Tampon 6mg/ml de BSA	Chambre (μM)		
HRP	1,2	0,24	11,25
AMPLEX RED	20	2	22,5
SOD	8,8	6,6	3
Fibres			
Carnitine	2000	1000	4,5
Malate	500	750	1,5
GTP 1 fois sur 2	5000	191	58,90
PCOA	400	15	60
ADP	2000	500	9
Atractyloside	170	50	7,65

Annexe 7

Protocole d'entraînement sur tapis, d'intensité et de durée progressivement croissantes

Vitesse m/min	Pente degrés	Semaine 1		Semaine 2		Semaine 3		Semaine 4		Semaine 5		Semaine 6	
		J1-J5 Durée	J6-J7 Repos	J8-J12 Durée	J13-J14 Repos	J15-J19 Durée	J20-J21 Repos	J22-J26 Durée	J27-J28 Repos	J29-J33 Durée	J34-J35 Repos	J36-J37 Durée	J38-J39 TESTS
7,8	10												
11,4	10	2		2		2		2					
14,4	10	3		3		3		3		2		2	
18,6	10	5		5		5		5		3		3	
21,6	10	5		5		5		5		5		5	VMA
23,4	10	5		5		5		5		5		5	MR
25,8	10	25		40		5		5		5		5	
28,2	10					35		5		5		5	
30	10							40		50		55	
Temps total		45		60		60		70		75		80	

Annexe 8


Protocole de test incrémental pour déterminer la vitesse maximale aérobie

Affichage tapis	Vitesse	Durée palier	Décours
<i>Volt</i>	<i>m/min</i>	<i>min</i>	<i>min</i>
0,8	13,6	6	6
1	16,9	2	8
1,2	20,5	2	10
1,4	24,0	2	12
1,6	27,4	2	14
1,8	30,9	2	16
2	34,5	1'30	17'30
2,1	36,2	1'30	19
2,2	37,8	1'30	20'30
2,3	39,5	1'30	22
2,4	41,2	1'30	23'30
2,5	42,9	1'30	25
2,6	44,5	1'30	26'30
2,7	46,3	1'30	28
2,8	48,1	1'30	29'30
2,9	49,9	1'30	31
3	51,7	1'30	32'30

Le test est réalisé sans pente. La vitesse retenue correspond au dernier palier terminé à l'arrêt de l'effort.

Annexe 9

Dosage des unités glycosyls après hydrolyse du glycogène musculaire

	Code : 211.M.0029		Version : 1.0	Date 08/06/2018
	Mode opératoire			
	DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE Extraction en milieu basique NaOH			
<u>Service</u> <u>Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 08/06/2018 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : Fonction(s) : Médecin	Valideur Qualité Date : Fonction(s) : Chef bureau qualité	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef du département ENOP
<u>Liste de</u> <u>diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCS BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : M CHENNAOUI Mounir Visa : Signature

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création		

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
32.M.0001	Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur-20°C et -80°C de l'IRBA
32.E.0001	Fiche utilisateur salle des congélateurs
211.E.0008	Enregistrement poids tissu/ Tp

Mots-clés :

Extraction, dosage, glycogène, glucose, ENOP, PEACE



DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE
Extraction en milieu basique NaOH

1. OBJET

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation de dosage de glycogène dans un muscle.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent des dosages de glycogène dans un muscle.

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

EUP : Eau Ultrapure

Tp : tampon

SN : surnageant

Sec : seconde

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE



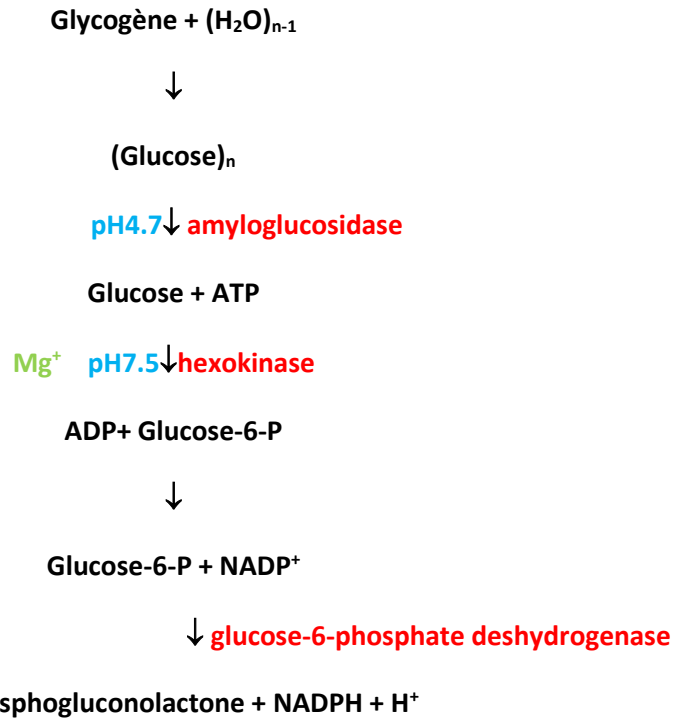
DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE

Extraction en milieu basique NaOH

5. DESCRIPTION DES ETAPES

5.1 Principe

Le principe de la réaction est le suivant :



C'est l'apparition de NADPH qui absorbe à 340 nm, que l'on mesure.

5.2 Matériel

Etapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
Préparation des solutions	NaOH	S8045 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl	258148 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	amyloglucosidase	A7420 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	hexokinase	H5625/ H4502 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	MgCl ₂	M9272 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	NADP	N0505 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	ATP	A7699/ A2383 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	Ammonium sulfate	A2923 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
hydrolyse	Tampon acetate 3M	S7899 Sigma	Salle IM-AB-RC-22

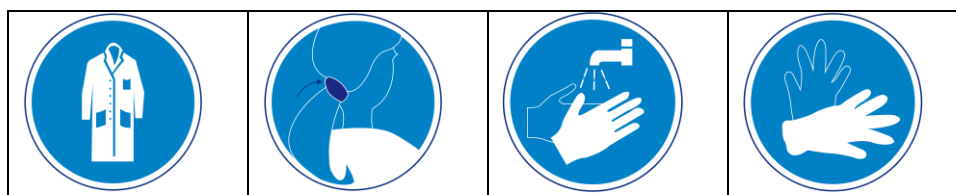


DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE

Extraction en milieu basique NaOH

Etapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
dosage	glucose-6-phosphate deshydrogenase	G8289 / G6378 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	Tris HCL 1M pH8	T2694 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	Spectrophotomètre DU800	BECKMAN COULTER DU 800	Salle IM-AB-01-30

5.3 Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards

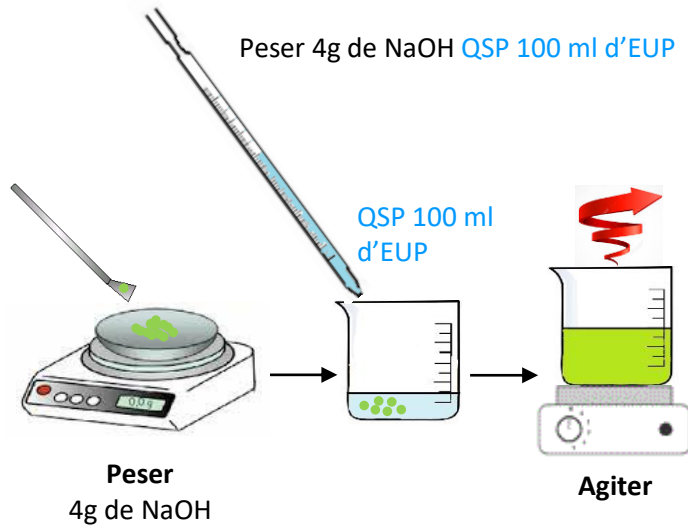
5.3.1 Préparation des solutions

Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}	[finale] _g	Quantité préparée
NaOH	S8045 Sigma	40	1N	40g/mL	100mL
NaOH	S8045 Sigma	40	2N	80g/mL	100mL
HCl	258148 Sigma	36.45	7.5M		
Ammonium sulfate	A2939 Sigma	132.14	3.2M	422.8ng/mL	1mL
amyloglucosidase	A7420 Sigma	40U/mg		10mg/mL	1mL
MgCl ₂	M9272 Sigma			20mg/mL	10mL
NADP	N0505 Sigma			8mg/mL	10mL
ATP	A7699/ A2383 Sigma			6mg/mL	10mL
glycogène	G8751 Sigma				

DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE
Extraction en milieu basique NaOH

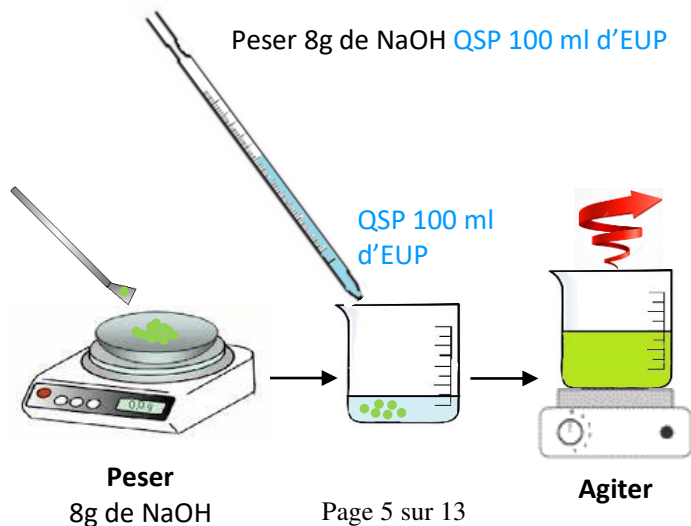
➤ Solution de NaOH 1N :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois RT



➤ Solution de NaOH 2N :

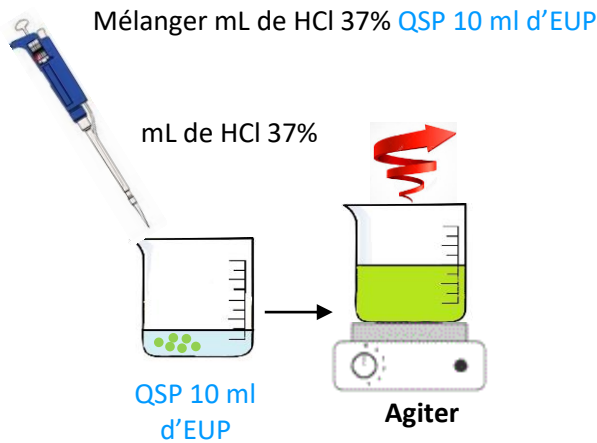
Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois RT



DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE
Extraction en milieu basique NaOH

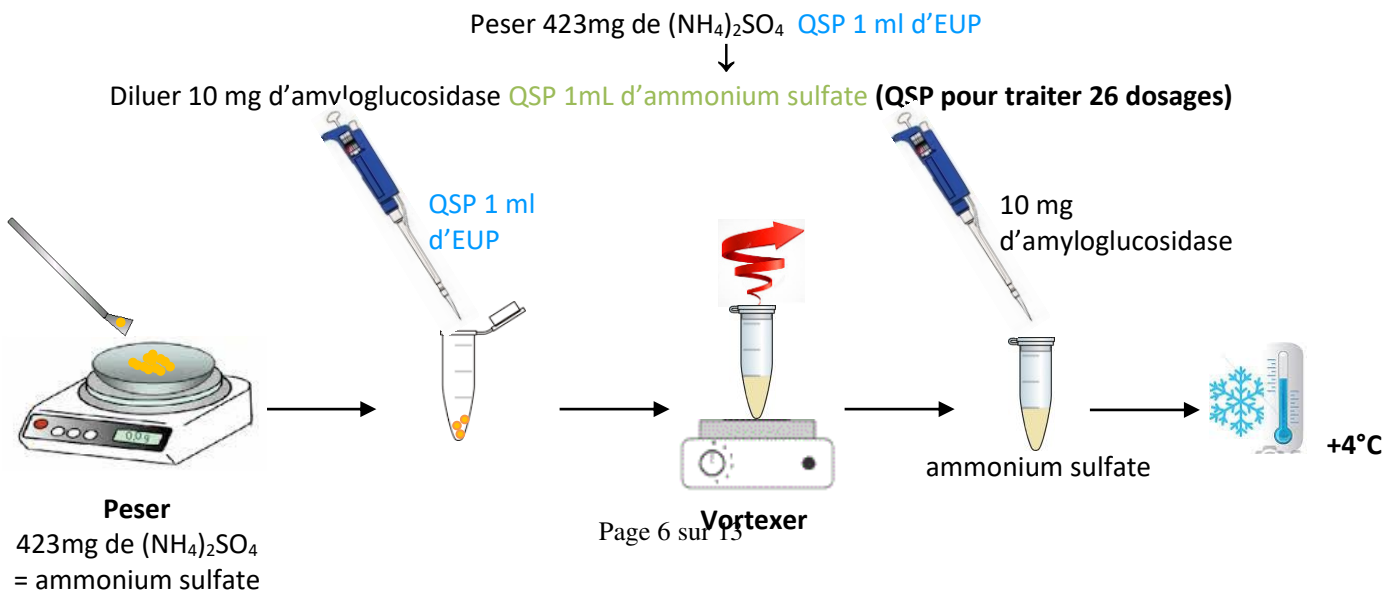
➤ Solution de HCl 7.5M :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois RT



➤ Solution d'amyloglucosidase :

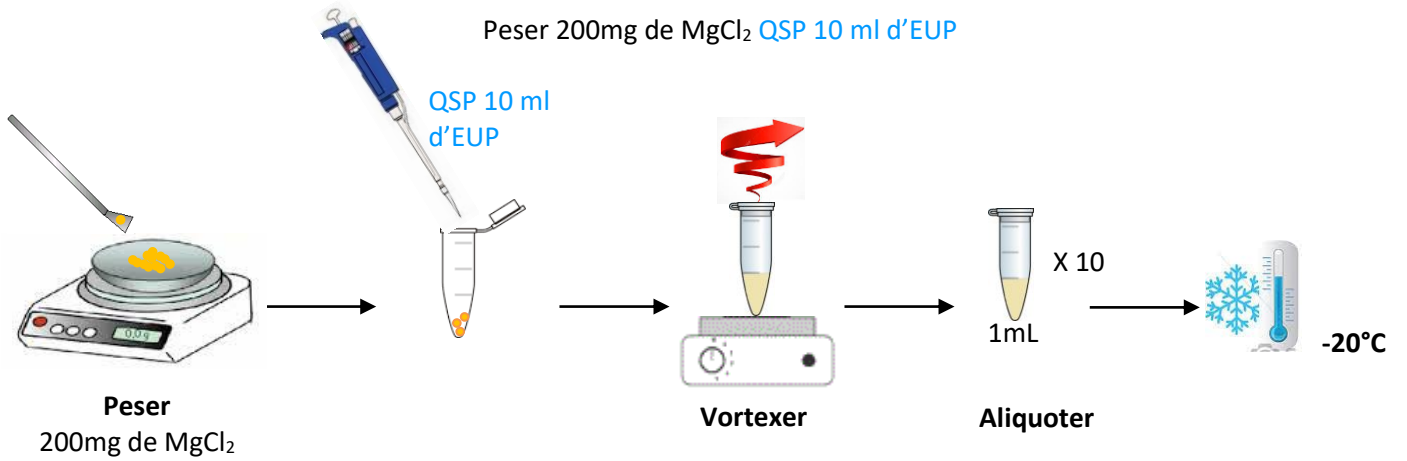
Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	3 semaines +4°C



DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE
Extraction en milieu basique NaOH

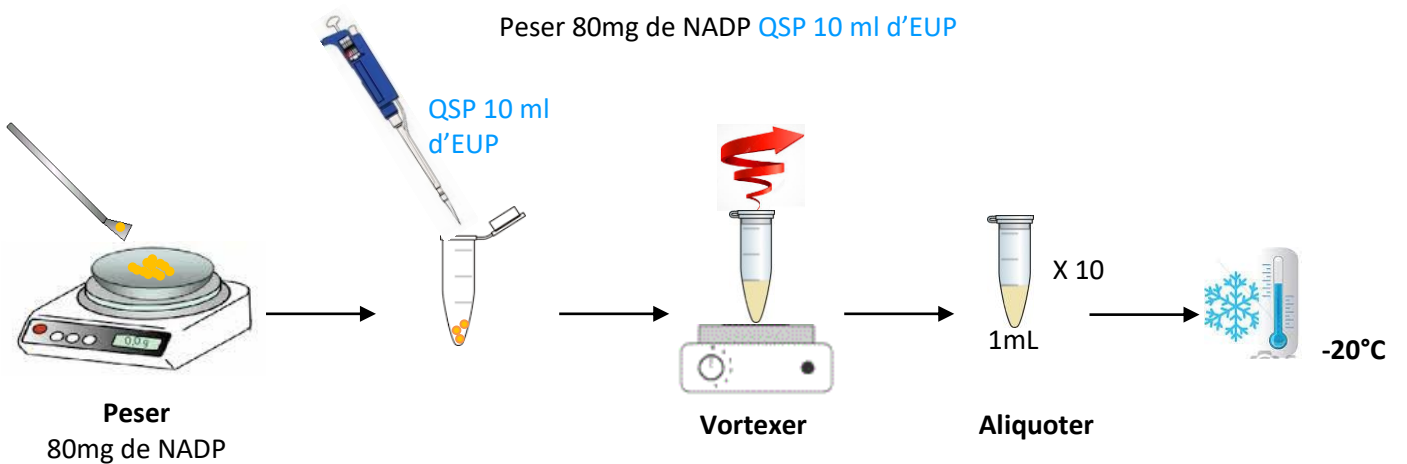
➤ Solution de MgCl₂ :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois -20°C



➤ Solution de NADP :

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois -20°C

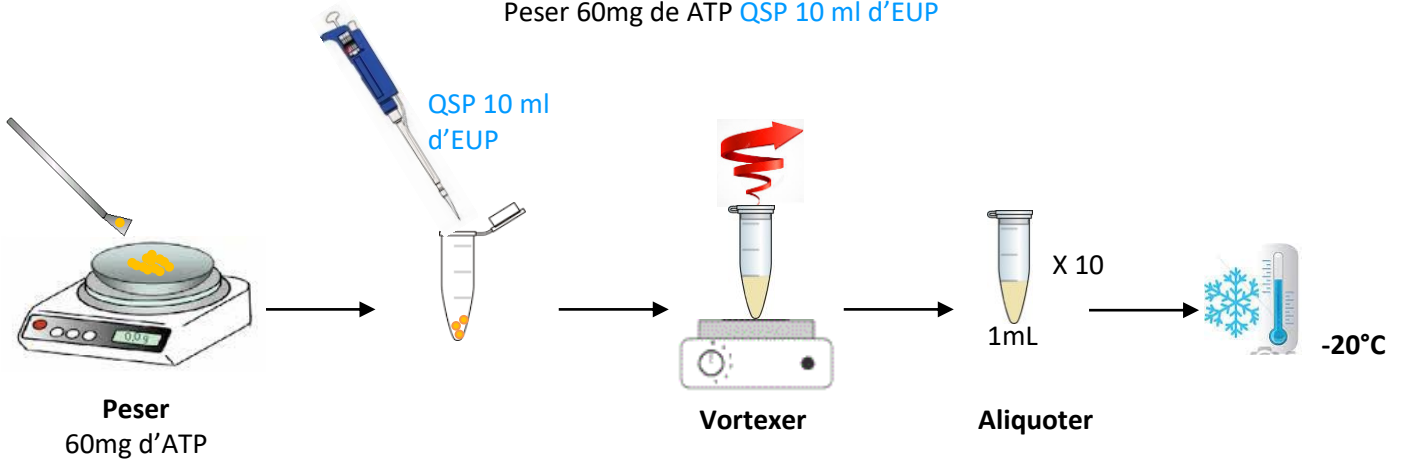


DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE
Extraction en milieu basique NaOH

➤ Solution de ATP :

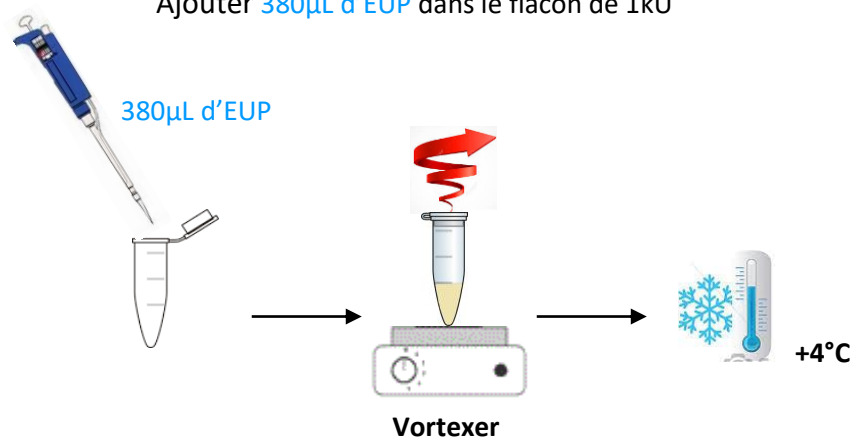
Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois -20°C

Peser 60mg de ATP QSP 10 ml d'EUP



➤ Préparation de l'hexokinase

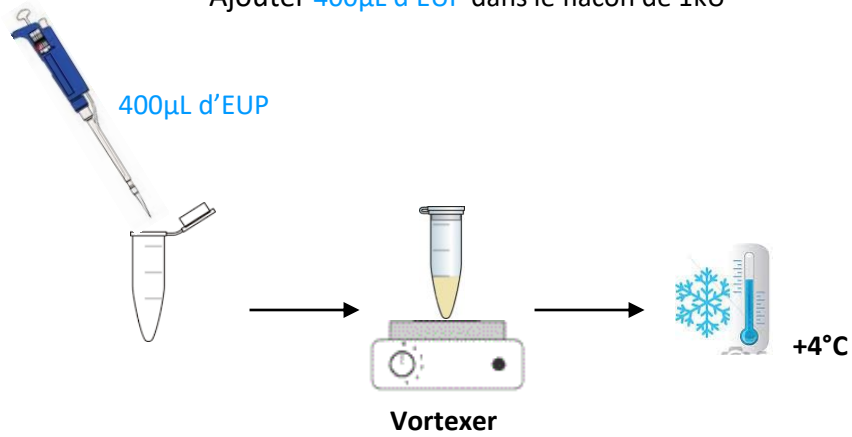
Ajouter 380µL d'EUP dans le flacon de 1kU



DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE
Extraction en milieu basique NaOH

➤ Préparation de la Glucose-6-P déshydrogénase

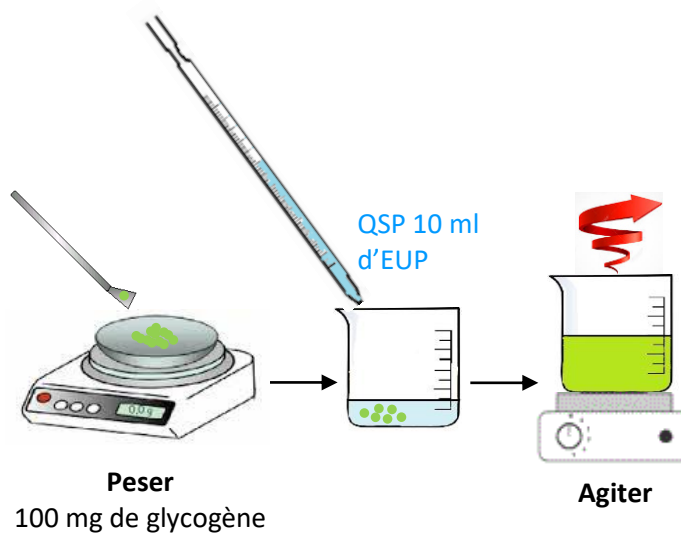
Ajouter 400µL d'EUP dans le flacon de 1kU



➤ Préparation de la gamme étalon

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1 semaine +4°C

On pèse 100 mg de glycogène du commerce QSP 10mL d'EUP, la pureté étant de 91% on aura une solution à 9.1g/L.



DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE

Extraction en milieu basique NaOH

On réalise les dilutions suivantes :

Dilutions	1	1/25	1/50	1/100
Concentration de glycogène en mg/ml	9.1	0.3	0.150	0.075

5.3.2 Extraction

- Prélever un morceau d' ≈ 5 mg du muscle et le peser. Noter le poids sur la fiche 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp
- Mettre le morceau de tissu dans un tube eppendorf et ajouter 50 volumes de NaOH 2N soit 250 μ L pour 5mg de muscle
- Placer 2h au bain-marie à 37°C sous agitation
- Placer 1h à 4°C
- Neutraliser en ajoutant 1 volume de HCl 7.5M pour 5 vol de NaOH 2N soit 50 μ L pour 5mg de muscle
- Stocker les extraits à -20°C (maximum 3 semaines)

(cf : 32.M.0001 Charte d'utilisation de la salle IMASSA AB-01-11 Congélateur -20°C et -80°C de l'IRBA)

5.3.3 Hydrolyse

- Mettre 50 μ L (peut aller jusqu'à 100 μ L) d'extrait dans 2 tubes eppendorf noté *n°ech sans hydrolyse* et *n°ech avec hydrolyse*.
- Ajouter dans chaque tube 40 μ L de Tp acétate 3M et 360 μ L d'EUP
- Dans le tube *sans hydrolyse* ajouter 35 μ L d'EUP et dans le tube *avec hydrolyse* 35 μ L d'*amyloglucosidase*
- Placer 2h à 37°C sous agitation
- Ajouter un volume de 100 μ L de NaOH 1N pour stopper l'hydrolyse (pour obtenir un pH \approx 9-10)
- Centrifuger 10 min à 3000rpm = 885g à 4°C
- Récupérer le SN et le placer dans un eppendorf de 1.5ml.



DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE

Extraction en milieu basique NaOH

5.3.4 Dosage

- Préparer le mix de dosage : **(QSP pour traiter 26 dosages)**
 - 1mL de Tp Tris-HCl 1M
 - 9mL d'EUP
 - 1mL de MgCl₂
 - 1mL de NADP
 - 1mL d'ATP
 - 20μL de Glucose-6-P déshydrogénase (+4°C)

- Dosage de la gamme étalon

Mélanger dans les cuves de spectrophotomètre :

 - 200μL de point de gamme
 - 300μL d'EUP
 - 500μL de mix de dosage

- Dosage des échantillons :

Mélanger dans les cuves de spectrophotomètre :

 - 200μL d'extrait (hydrolysé ou non)
 - 300μL d'EUP
 - 500μL de mix de dosage

DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE
Extraction en milieu basique NaOH

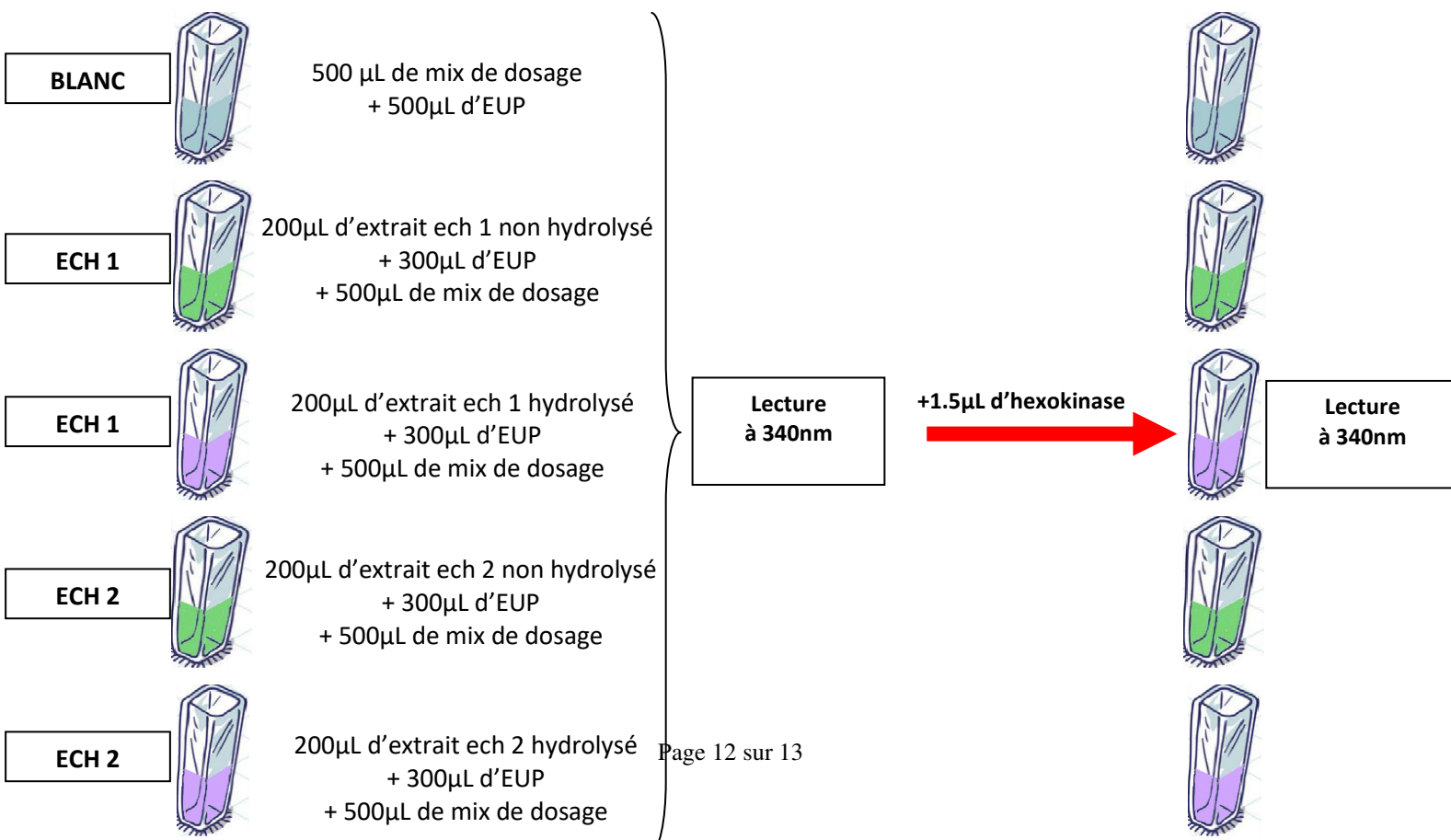
5.3.5 Lecture de la variation de densité optique

- Allumer le spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 (cf 211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique).
- Régler la lecture d'absorbance à 340nm
- *Placer dans le spectromètre une cuve blanc et 4 cuves éch
- Ajouter 500 µL de mix de dosage + 500µL d'EUP pour faire le blanc
- Ajouter 200µL d'extrait hydrolysé ou non +300µL d'EUP + 500µL de mix de dosage
- Lancer la lecture à 340nm
- Ajouter 1.5µL d'hexokinase dans la cuve blanc, la cuve éch sans hydrolyse et la cuve éch avec hydrolyse et attendre 10 min
- Lancer la lecture à 340nm
- Enregistrer les résultats* → recommencer de * à * pour l'échantillon suivant.

Pour éviter de gaspiller des produits, on peut utiliser 1 cuve blanc (500µL de mix de dosage+ 500µL d'EUP) et 1 cuve contrôle réaction (500µL de mix de dosage+ 500µL d'EUP+ 1.5µL d'hexokinase) que l'on réutilise pour chaque lecture.

1^{ère} étape : dosage glucose avant glyco-génolyse

2^{ème} étape : dosage glucose après glyco-génolyse





DOSAGE DES UNITES GLUCOSYL APRES HYDROLYSE DU GLYCOGENE MUSCULAIRE Extraction en milieu basique NaOH

6. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004


Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, événements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

Annexe 10

Dosage de l'activité Hexokinase

	Code : 211.M.0040		Version : 1.0	Date 08/09/2019
	Mode opératoire			
	DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE			
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 08/09/2019 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : Fonction(s) : Médecin	Valideur Qualité Date : Fonction(s) :	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef du département ENOP
<u>Liste de diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCS BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : MC SAUVET Fabien Visa : Signature

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création	<u>9</u>	08/09/2019

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
211.M.0021	Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage
211.M.0020	enzymologique
211.E.0005	Utilisation du pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS FDV G7841 pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS

Mots-clés :

Extraction, dosage, activité, hexokinase , spectromètre, ENOP, PEACE

**DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE****1. OBJET**

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'un dosage de l'activité de l'hexokinase

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent un dosage de l'activité de l'hexokinase

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

Tp : tampon

EUP : Eau Ultrapure

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

DO : densité optique

G6PDH : Glucose 6 Phosphate Deshydrogenase

Glucose 6P : Glucose 6 Phosphate

RT : Room température = température ambiante

ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

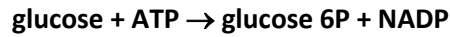
4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE

5. DESCRIPTION DES ETAPES

5.1 Principe

Le principe de la réaction enzymatique est le suivant :

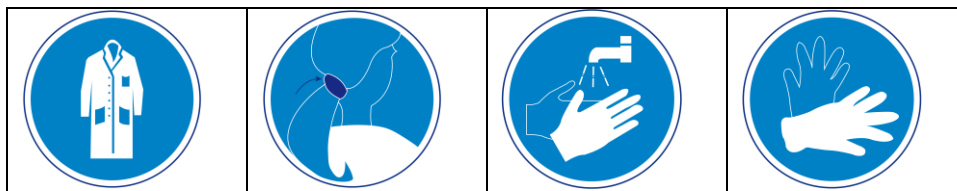


C'est la cinétique d'apparition de NADPH, qui absorbe à 340 nm, que l'on mesure.

5.2 Matériel

Tp phosphate	KH ₂ PO ₄	P9791 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	K ₂ HPO ₄	P9666 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl ou KOH		Salle IM-AB-RC-22
	pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS	SEVEN EASY S20KS METTLER TOLEDO	Salle IM-AB-RC-22
Tp extraction	BSA	Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Préparation du milieu réactionnel	Tris HCl	T5941 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	MgCl ₂	M8266 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	NADP	10128031001 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	DTT	D0632-5G Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	Glucose		Salle IM-AB-RC-22
G6PDH	G6PDH	10127655001 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
ATP	ATP	A2383 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Lecture	BECKMAN COULTER DU 800	BECKMAN COULTER DU 800	Salle IM-AB-01-30

5.3 Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards

5.3.1 Préparation des solutions stock

Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}
---------	-----------	----	-------------------------

DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE

KH₂PO₄	P9791 Sigma	136	300mM
K₂HPO₄	P9666 Sigma	228	300mM
HCl ou KOH			
BSA	A7030 Sigma	78.13	10%
Tris HCl	T5941 Sigma	157.60	1M
MgCl₂	M8266 Sigma	95.21	1M
NADP	10128031001 Sigma	765.39	100mM
DTT	D0632-5G Sigma	154.25	10%
Glucose			100mM
G6PDH	10127655001 Sigma	5 mg/ml	1000UI/ml
ATP	A2383 Sigma	551.14	1000mM

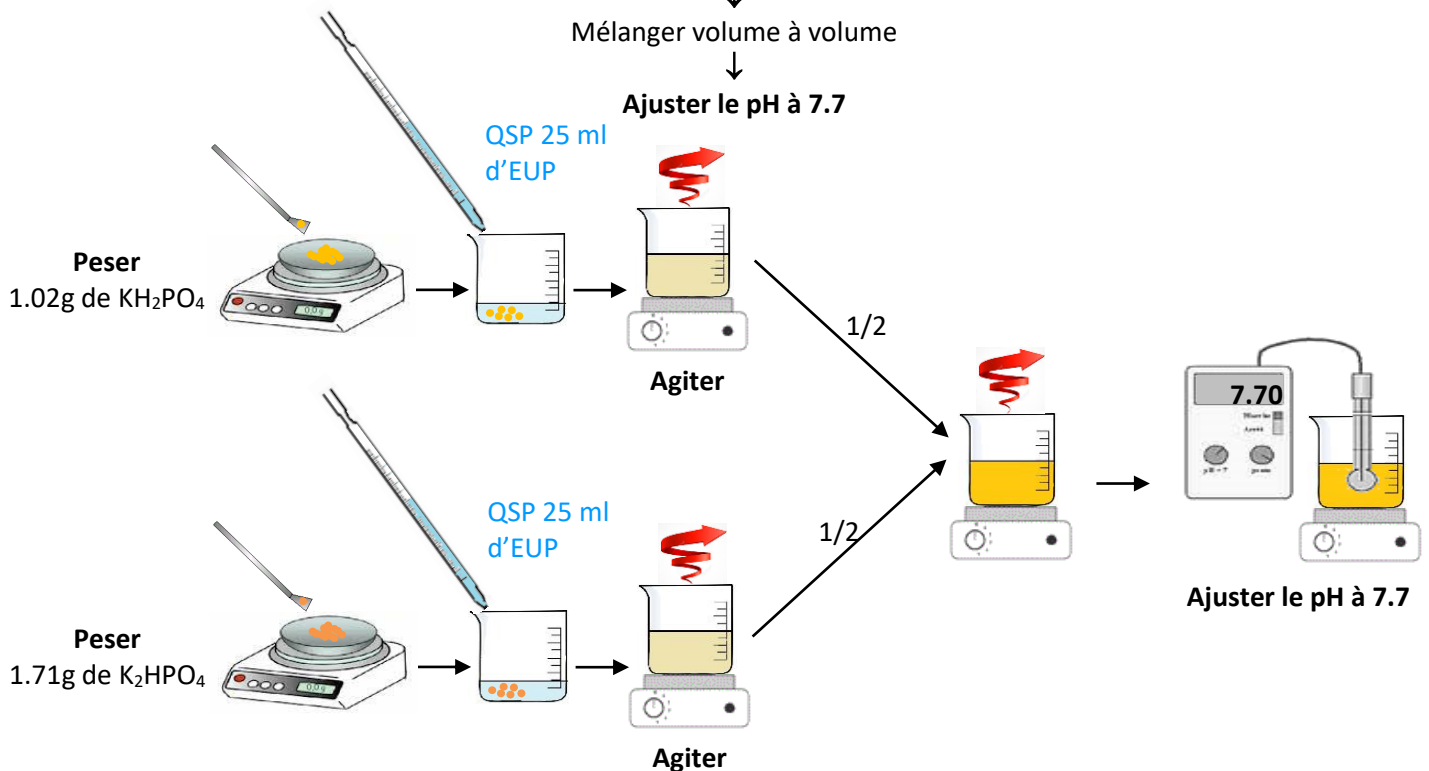
 ➤ Tp phosphate 300mM pH7.7:

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

Peser 1.02 g de KH₂PO₄ QSP 25 ml d'EUP et Peser 1.71 g de K₂HPO₄ QSP 25 ml d'EUP





Mélanger volume à volume

Ajuster le pH à 7.7



DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE

 ➤ Tampon d'extraction

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

BSA

0.5%

1 g

QSP 50 ml de Tp phosphate 300mM pH7.7

 ➤ MgCl₂ 1 M

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C




 MgCl₂

1M

1.27g

QSP 10 ml d'EUP

 ➤ Tris HCl pH8

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

Tris/HCl


1M

1.6 g

QSP 10 ml d'EUP

Ajuster le pH à 8 avec HCl à 37%.

**DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE**➤ NADP 100mM

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C





NADP

100mM

115mg

QSP 1.5 ml d'EUP

➤ DTT 10%

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

DTT

10%

1 g

QSP 10 ml d'EUP

➤ Glucose 100mM

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

glucose




100mM

1 g

QSP 10 ml d'EUP

DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE

 ➤ ATP 1000mM

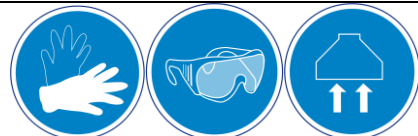



Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois +4°C

ATP

1000mM

 192 mg
 QSP 350µl d'EUP

 ➤ Milieu réactionnel
A préparer extemporanément

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois +4°C

[initiale]

[finale]

10 ml d'EUP

Tris HCl pH8

1M

100mM

1ml

 MgCl₂

1M

8mM

80µl

NADP

100mM

0.4mM

45µl

DTT

10%

0.01%

10µl

glucose

100mM

2mM

200µl

G6PDH

1750UI/ml

3.5UI/ml

11.44µl

QSP 10 ml d'EUP

5.3.2 Extraction des échantillons

 1^{ère} étape : coupe du tissu


- Prélever un morceau d'≈10mg du muscle et le peser. Noter le poids sur la fiche 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp

**DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE**

- Placer le tissu soit un tube Precellys CK14 500µl contenant des billes en céramique de 1.4mm de diamètre.

2^{ème} étape : extraction

- Diluer le tissu au 1/10 dans du Tp extraction pour que la concentration en protéines soit correcte. (cf : 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp)



- Homogénéiser :

 | Au Precellys avec le programme : 2x 8 sec avec 5 sec de pause



- Centrifuger 30 s à 672g à 2°C.



- Transférer immédiatement le surnageant dans un tube froid et placer le tube sur glace.

- Diluer les échantillons dans le tampon d'extraction

Type de tissu	Dilution utilisée
Ventricule gauche	1/5
Ventricule droit	1/10
Gastrocnémien	Non dilué
Soléaire	Non dilué

5.3.3 Lecture de la variation de densité optique

- Allumer le spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 (cf 211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique).

- Régler la lecture d'absorbance à 340nm

- Allumer le bain marie

- Mettre le bain marie à la température de réaction choisie = 25°C



- * Bien homogénéiser le milieu réactionnel maintenu à température réactionnelle

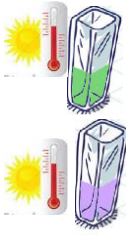
- Placer une cuve dans le spectromètre



- Ajouter 900 µL milieu réactionnel + 100µl de tampon d'extraction pour faire le blanc

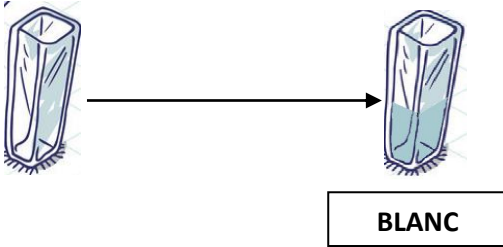
DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE

- Mettre une nouvelle cuve
- Ajouter 900 μ L milieu réactionnel + 100 μ L d'échantillon
- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 300 sec
- Ajouter 10 μ L d'ATP 1000mM
- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 300 sec
- Enregistrer les résultats* → recommencer de * à * pour l'échantillon suivant.



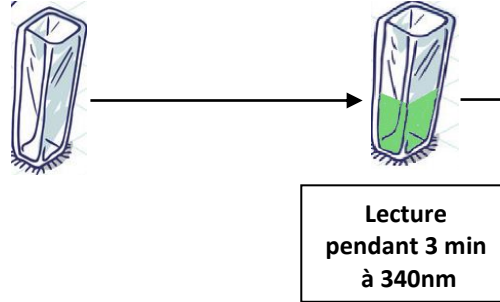
1^{ère} étape : blanc tampon

900 μ L milieu réactionnel + 100 μ L de tampon d'extraction



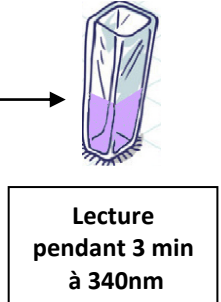
2^{ème} étape : blanc échantillon

900 μ L milieu réactionnel + 100 μ L d'échantillon dilué



3^{ème} étape : lecture échantillon

+ 10 μ L d'ATP à 1000mM



6. CALCULS

On calcule l'activité grâce à la loi de Lambert-Beer, en utilisant la concentration et le coefficient d'extinction molaire du NADH ($\Sigma = 6300 \text{ L/mol/cm}$).

Le calcul est le suivant :

Activité = [pente ech – pente blanc ech / 6.3 x (1000-Vol ech + Vol ech) / Vol ech * 1000 * facteur de dilution] / facteur pour ramener au gramme de tissu frais

Valeurs	Unité
Activité	Ui/g poids frais
Pente ech	DO/min
Vol ech	μ l
[extrait dilué]	mg/ml



DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE

7. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004

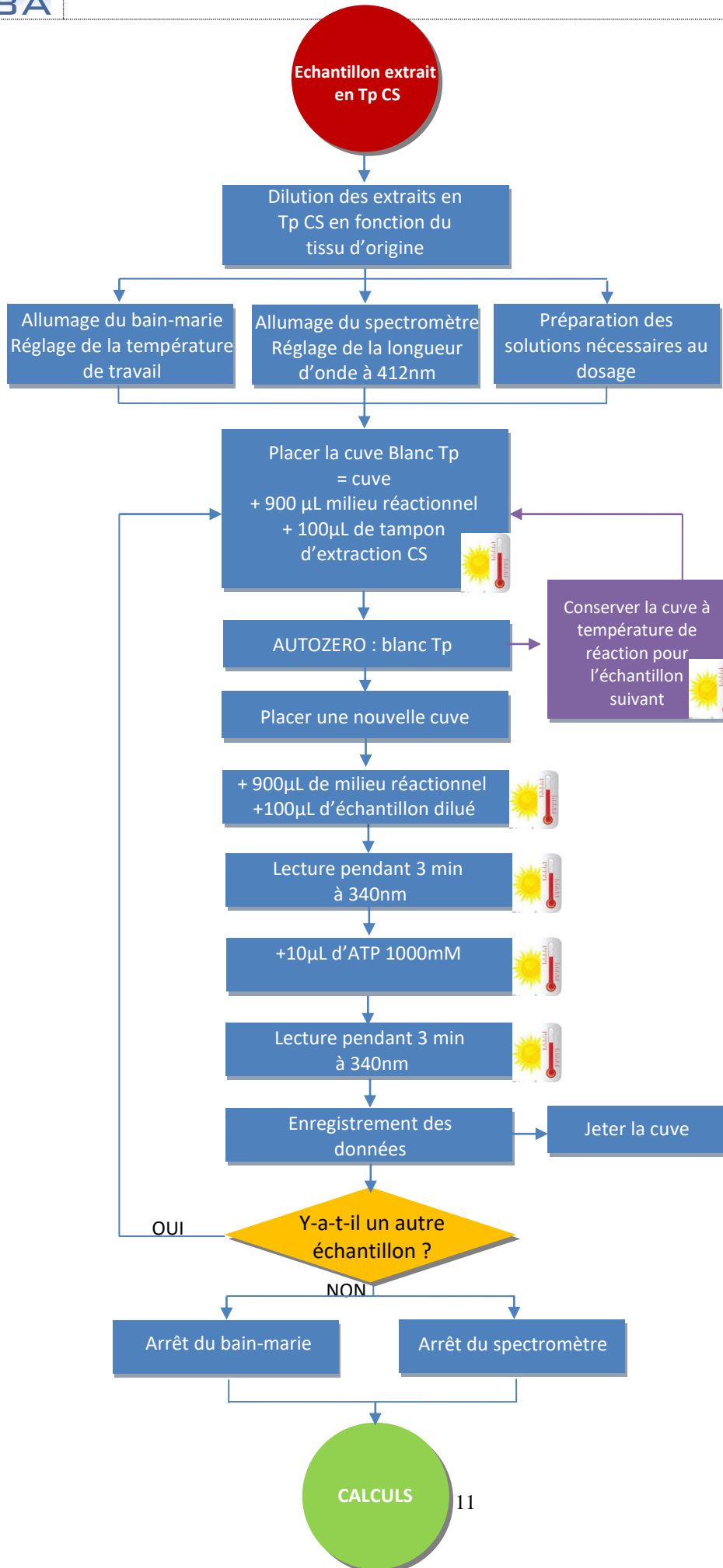
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, évènements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

DOSAGE ACTIVITE HEXOKINASE

Chercheur
Ingénieur
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards
211.M.0015 Extraction dosage Activité CS

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique


211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage

11.P.0002 Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

Annexe 11

Dosage de l'activité 6-phosphofructokinase

	Code : 211.M.0038		Version : 1.0	Date 28/08/2019
	Mode opératoire			
	DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE			
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 11/06/2019 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : 11/06/2019 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Valideur Qualité Date : Fonction(s) :	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef de l'unité PEACE
<u>Liste de diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCS BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : TLCS BAUGE Stéphane Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création	<u>8</u>	

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
211.M.0020	Utilisation du pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS
211.E.0005	FDV G7841 pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS
211.M.0013	Dosage BCA

Mots-clés :

Extraction, dosage, activité, 6-Phosphofruktokinase , spectromètre, ENOP, PEACE

**DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE****1. OBJET**

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'un dosage de l'activité de la 6-phosphofruktokinase.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent un dosage de l'activité de la 6-phosphofruktokinase.

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

Tp : tampon

PFK : 6-Phosphofruktokinase

di DHAP: di Hydroxy Acétone phosphate

G3PDH: Glyceraldehyde 3 Phosphate Deshydrogenase

Triose P isomérase : Triose Phosphate isomérase

Aldolase : disphosphofruktaldolase

EUP : Eau Ultrapure

B-NADH: nicotinamide adénine dinucléotide

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

DO : densité optique

RT : Room température = température ambiante

ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

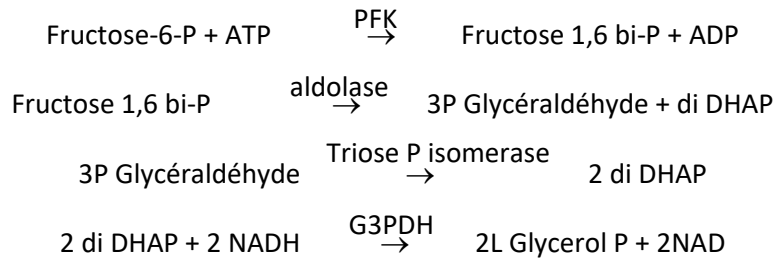
4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE

5. DESCRIPTION DES ETAPES

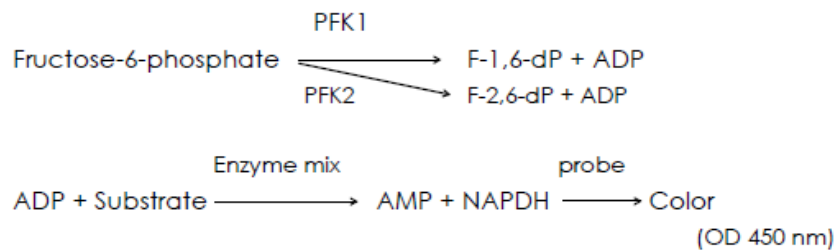
5.1 Principe

La 6-Phosphofructokinase est une enzyme qui catalyse la conversion du fructose-6-phosphate en fructose-diphosphate, en présence d'ATP. En présence de substrat spécifique et du mix d'enzymes, NADH produit qui absorbe à 450nm qui est convertit en NAD, un produit incolore. L'intensité colorimétrique est donc proportionnelle à la quantité d'enzyme dans l'échantillon.



Phosphofructokinase est une enzyme glycolytique qui joue un rôle majeur dans la régulation de la glycolyse. Il y a 2 types de phosphofructokinases: PFK1 and PFK2.

En présence d'ATP, PFK1 catalyse la conversion de fructose-6-phosphate en fructose-1,6-diphosphate, alors que PFK2 catalyse la conversion de fructose-2,6-diphosphate.



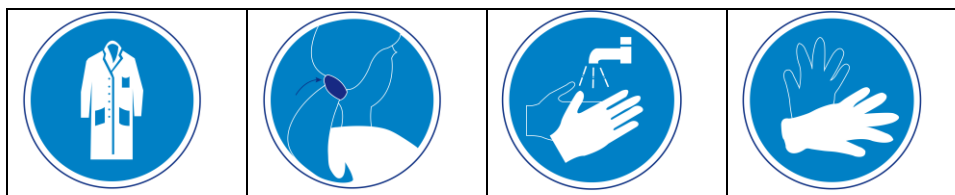
5.2 Matériel

Tp phosphate	KH ₂ PO ₄	P9791 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	K ₂ HPO ₄	P9666 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl ou KOH		Salle IM-AB-RC-22
	pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS	SEVEN EASY S20KS METTLER TOLEDO	Salle IM-AB-RC-22
Tp extraction	mercaptoethanol	M3148 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	ATP	FLAAS-10VL Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	MgCl ₂	M8266 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	NaF	S7920 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Préparation du	Tris HCl	T5941 Sigma	Salle IM-AB-RC-22

DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE

milieu réactionnel	BSA		
	mercaptoethanol	M3148 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	ATP	FLAAS-10VL Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	MgCl ₂	M8266 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
NADH	NADH	N0505 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Aldolase	Aldolase	A2714-100UN Sigma	Salle IM-AB-RC-22
TriosePisomerase	TriosePisomerase	T6258-1MG Sigma	Salle IM-AB-RC-22
G3PDH	G3PDH	10127752001 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Fructose 6 phosphate	Fructose 6 phosphate	F3627-10MG Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Lecture	BECKMAN COULTER DU 800	BECKMAN COULTER DU 800	Salle IM-AB-01-30

5.3 Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards

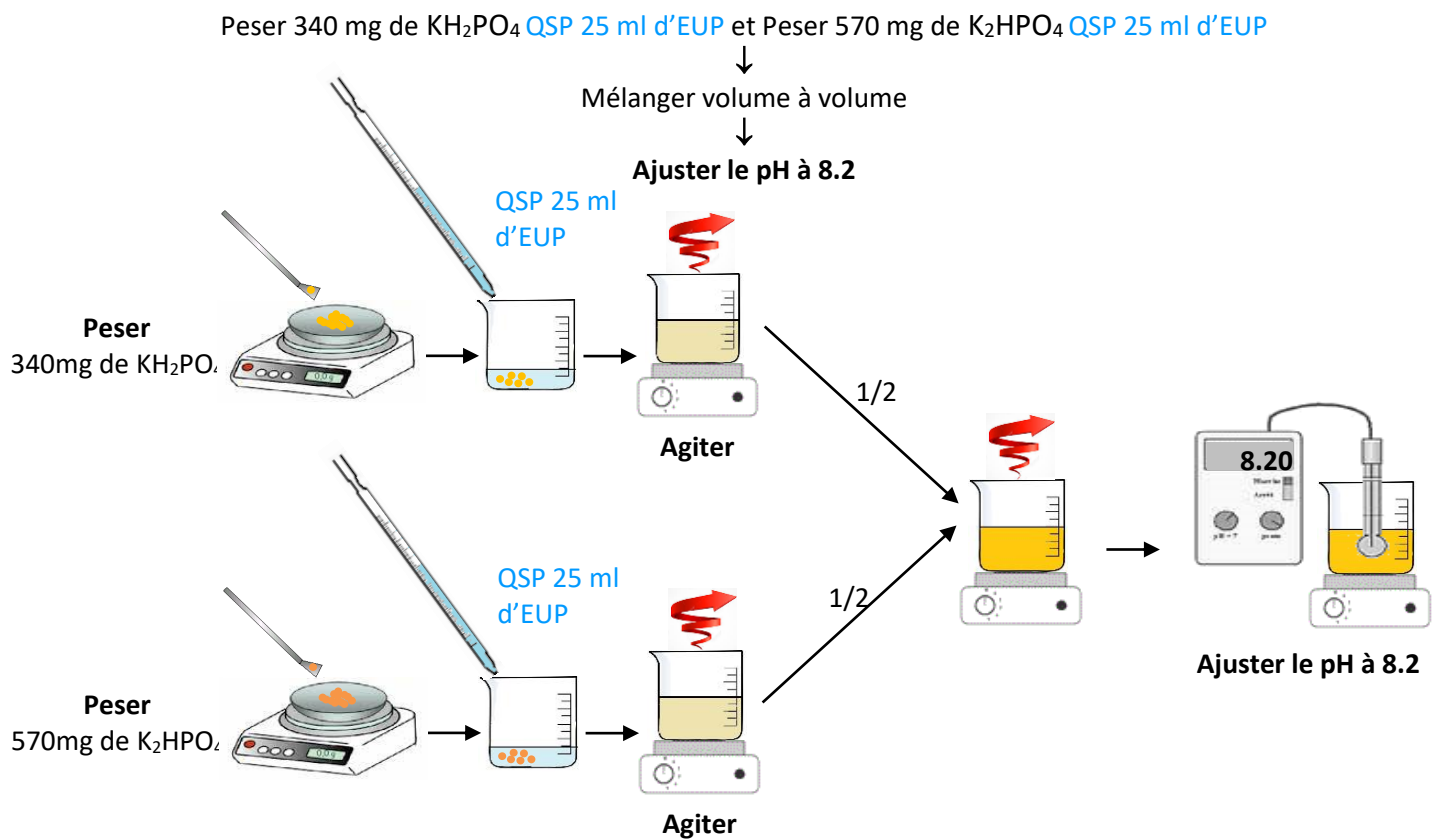
5.3.1 Préparation des solutions stock

Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}	[finale] _g
KH ₂ PO ₄	P9791 Sigma	136	100mM	13.6 g/L
K ₂ HPO ₄	P9666 Sigma	228	100mM	22.8 g/L
HCl ou KOH				
mercaptoethanol	M3148 Sigma	78.13 et d=1.114g/ ml		
ATP	FLAAS-10VL Sigma	551.14		
MgCl ₂	M8266 Sigma	95.21		
NaF	S7920 Sigma	41.99		
Tris HCl	T5941 Sigma	157.60		
NADH	N0505 Sigma	765.39		
Aldolase	A2714-100UN Sigma			
TriosePisomerase	T6258-1MG Sigma			
G3PDH	10127752001 Sigma			
Fructose 6 phosphate	F3627-10MG Sigma			

DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE

➤ Tp phosphate 100mM pH8,2:

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C



➤ MgCl_2

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	1mois +4°C

**DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE**MgCl₂

400mM

380mg

QSP 10 ml d'EUP

➤ [Tampon d'extraction pH8.2](#)

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

[initiale]

mercaptoethanol

17.5µl

ATP

200mM

125µl

MgCl₂

400mM

625µl

NaF

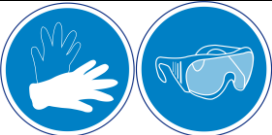


63mg

QSP 50 ml de Tp phosphate 100mM pH8,2

Pour 10 ml de Tp extraction on pèse

- 2.8 mg d'ATP (551.14 M)
- 12.6 mg NAF

➤ [Tris HCl pH8](#)

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

Tris/HCl

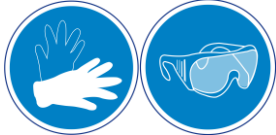



1M

1.6 g

QSP 10 ml d'EUP

Ajuster le pH à 8 avec HCl à 37%.

**DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE**➤ BSA 10%

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C






BSA

10%

1 g

QSP 10 ml d'EUP

➤ Milieu réactionnel**A préparer extemporanément**

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

[initiale]

[finale]

50 ml d'EUP

18 ml d'EUP

Tris HCl pH8

1M

30mM

1.55ml

558µl

MgCl₂

400mM

2.4mM

300µl

108µl

Mercaptoethanol

30mM

107µl

38.52µl

BSA

10%

0.012%

62.5µl

22.5µl

ATP

500mM

2.5mM

68mg

24.5mg

QSP 50 ml d'EUP

DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE

 ➤ Solution de NADH à 0.08mM
A préparer extemporanément

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C





NADH

0.08mM

1.22 µg

QSP 20 ml de milieu réactionnel

 ➤ aldolase
A préparer extemporanément

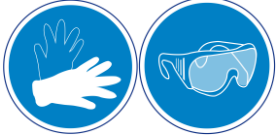



➤ Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

aldolase

vial de 100U

364µl d'EUP

 ➤ triosePisomerase
A préparer extemporanément

➤ Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

**DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE**

TriosePisomerase

vial de 3500U

28µl d'EUP

➤ Mélange enzymatique**A préparer extemporanément**

➤ Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois +4°C

aldolase

275U/ml

2.5µl

TriosePisomerase

126000U/ml

1µl

G3PDH

1700U/ml

2.35µl

QSP 495 µl de milieu réactionnel

➤ Fructose 6 phosphate 5 mM**A préparer extemporanément**

Protection	 Nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois +4°C

Fructose 6 phosphate

5mM

3.04mg

QSP 2 ml d'EUP

5.3.2 Extraction des échantillons**1^{ère} étape : coupe du tissu**

- Prélever un morceau d'≅10mg du muscle et le peser. Noter le poids sur la fiche 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp

DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE



- Placer le tissu soit un tube Precellys CK14 500µl contenant des billes en céramique de 1.4mm de diamètre.

2^{ème} étape : extraction



- Diluer le tissu au 1/10 dans du Tp extraction pour que la concentration en protéines soit correcte. (cf : 211.E.0008 Enregistrement poids tissu/ Tp)



- Homogénéiser :

└ Au Precellys avec le programme : 2x 8 sec avec 5 sec de pause



- Centrifuger 30 s à 672g à 2°C.



- Transférer immédiatement le surnageant dans un tube froid et placer le tube sur glace.

- Diluer les échantillons dans le tampon d'extraction

Type de tissu	Dilution utilisée
Ventricule gauche	½
Ventricule droit	½
Gastrocnémien	1/3
Soléaire	Non dilué

L'extraction doit être réalisée le jour du dosage

5.3.3 Lecture de la variation de densité optique

- Allumer le spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 (cf 211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique).

- Régler la lecture d'absorbance à 340nm
- Allumer le bain marie
- Mettre le bain marie à la température de réaction choisie = 25°C



- * Bien homogénéiser le milieu réactionnel maintenu à température réactionnelle

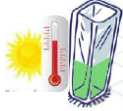
- Placer une cuve dans le spectromètre



DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE



- Ajouter 550 μL milieu réactionnel + 500 μL de NADH 0.08mM + 50 μL de F6P 5mM pour faire le blanc



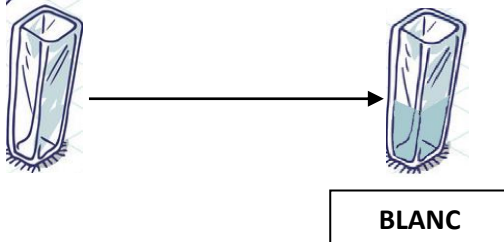
- Mettre une nouvelle cuve
- Ajouter 550 μL milieu réactionnel + 500 μL de NADH 0.08mM + 10 μL d'échantillon
- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 3 min



- Ajouter 50 μL de F6P 5 mM+ 10 μL de mélange enzymatique
- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 3 min.
- Enregistrer les résultats* → recommencer de * à * pour l'échantillon suivant.

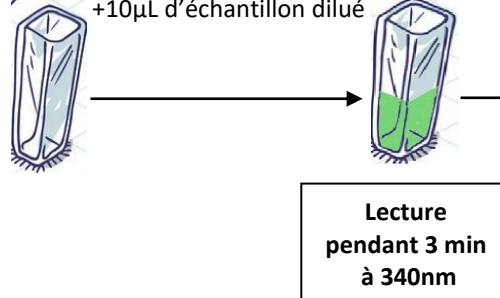
1^{ère} étape : blanc tampon

550 μL milieu réactionnel + 500 μL de NADH 0.08mM + 50 μL de F6P 5mM



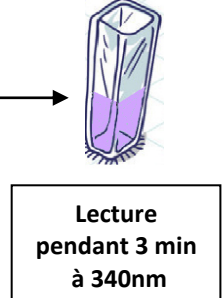
2^{ème} étape : blanc échantillon

550 μL milieu réactionnel + 500 μL de NADH 0.08mM + 10 μL d'échantillon dilué



3^{ème} étape : lecture échantillon

+ 50 μL de F6P 5 mM+ 10 μL de mélange enzymatique



6. CALCULS

On calcule l'activité grâce à la loi de Lambert-Beer, en utilisant la concentration et le coefficient d'extinction molaire du NADH ($\Sigma = 6300 \text{ L/mol/cm}$).

Le calcul est le suivant :

Activité = [pente ech – pente blanc ech / 6.3 x(1000-Vol ech+Vol ech) / Vol ech*1000* facteur de dilution] / facteur pour ramener au gramme de tissu frais

Valeurs	Unité
Activité	Ui/g poids frais
Pente ech	DO/min
Vol ech	μl
[extrait dilué]	mg/ml



DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE

7. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004

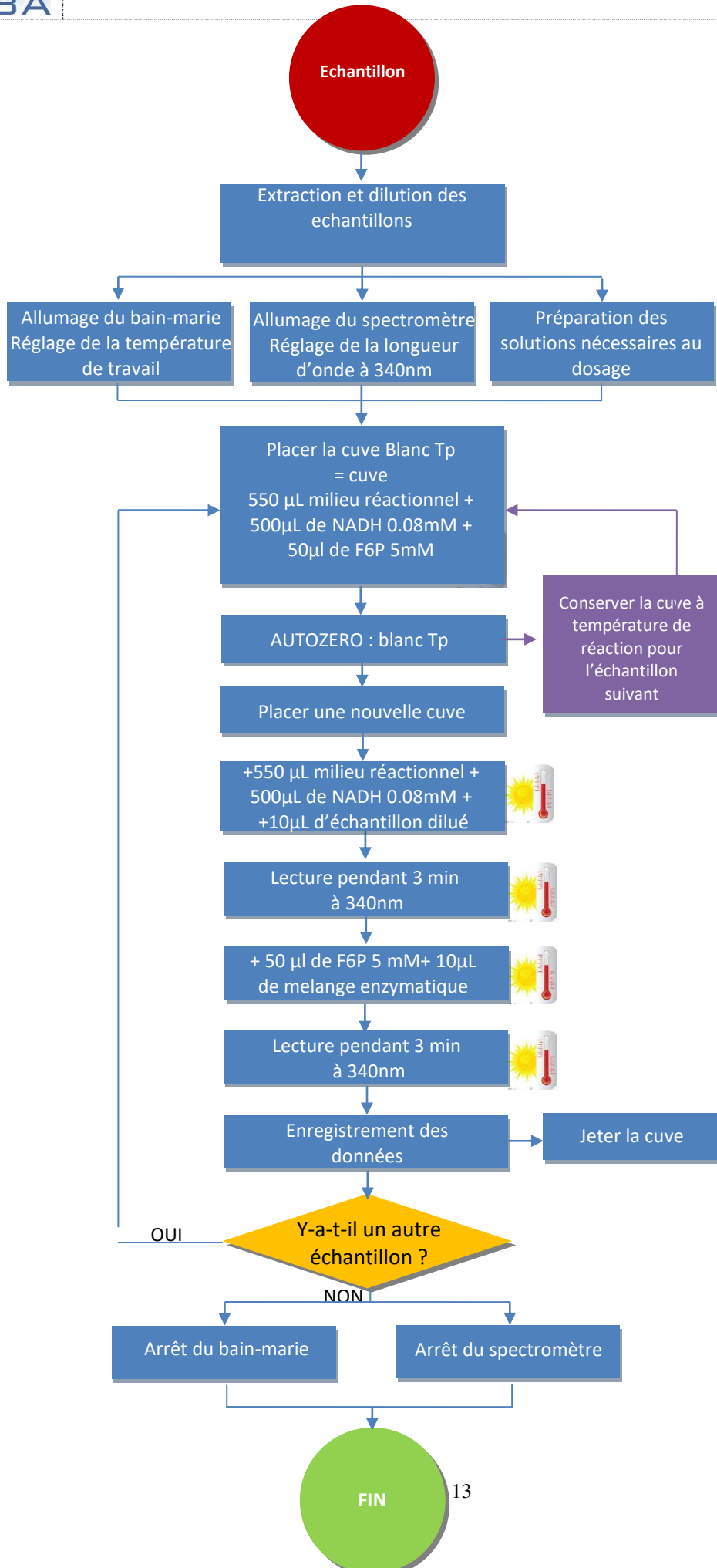
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, événements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

DOSAGE ACTIVITE 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE

Chercheur
Ingénieur
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards
211.M.0015 Extraction dosage Activité CS, LDH

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique


211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage

11.P.0002 Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

Annexe 12

Annexe 12 : Dosage de l'activité Lactate déshydrogénase (LDH)

	Code : 211.M.0036		Version : 1.0	Date 11/03/2019
	Mode opératoire			
	DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE			
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 11/03/2019 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : 12/03/2019 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Valideur Qualité Date : Fonction(s) :	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef de l'unité PEACE
<u>Liste de diffusion :</u> ENOP/PEACE	Nom(s) : TLCS BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : TLCS BAUGE Stéphane Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : MC MALGOYRE Alexandra Visa : Signature

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création	<u>8</u>	

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
211.M.0015	Extraction pour Dosage CS, LDH, COX ET CK
211.M.0021	Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique
211.M.0020	
211.E.0005	Utilisation du pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS FDV G7841 pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS

Mots-clés :

Extraction, dosage, activité, LDH, Lactate deshydrogenase , spectromètre, ENOP, PEACE



DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE

1. OBJET

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'un dosage de l'activité de la lactate deshydrogenase.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent un dosage de l'activité de la lactate deshydrogenase.

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

Tp : tampon

CS : citrate synthase

LDH : lactate deshydrogenase

COX : cyclooxygenase

CK : Créatine Kinase

EUP : Eau Ultrapure

[finale] = concentration finale du produit dans la solution

DO : densité optique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

RT : Room température = température ambiante

ENOP : Environnements opérationnels

PEACE : Unité de physiologie de l'exercice et des activités en conditions extrêmes

4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE

5. DESCRIPTION DES ETAPES

5.1 Principe

Le principe de la réaction enzymatique est le suivant :

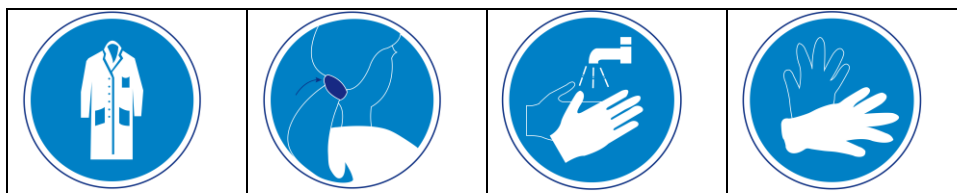


L'activité de la LDH est évaluée à partir de la variation de l'absorbance induite par la disparition de son co-enzyme, le NADH, H⁺. Ce dernier absorbe à 340nm.

5.2 Matériel

Etapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
Préparation du tampon phosphate	K2HPO4	P5504, Sigma	Salle IM-AB-RC-22
	HCl		
	KH2PO4		Salle IM-AB-RC-22
	Na pyruvate	26926298, ?	Salle IM-AB-RC-22
	pHmètre METTLER TOLEDO SEVEN EASY S20KS	P2256, Sigma	Salle IM-AB-RC-23
Préparation du tampon Nana	NADHNa2	N8129, Sigma	Salle IM-AB-RC-23
	NaHCO3		Salle IM-AB-RC-23
	DTT		Salle IM-AB-RC-23
Lecture	BECKMAN COULTER DU 800	BECKMAN COULTER DU 800	Salle IM-AB-01-30

5.3 Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards

DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE

5.3.1 Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons dans le tampon d'extraction CS, LDH, COX ET CK (cf : 211.M.0015 Extraction pour Dosage CS, LDH, COX ET CK)

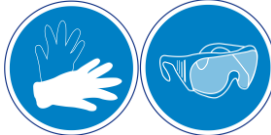

Type de tissu	Dilution utilisée
Plantaris	1/10
Soléaire	1/10

- Préparer 70 μL d'échantillon homogénéisé dilué au 1/10 :
7 μL d'échantillon homogénéisé pur + 63 μL de Tp d'extraction (DTT extemporanément)

5.3.2 Préparation des solutions

Produit	Référence	PM	[finale] _{mol}	[finale] _g
K_2HPO_4	P5504, Sigma	228,2	34,1 mM	7.78 g
KH_2PO_4	26926298, ?	136,09	7,35 mM	1 g
Na pyruvate	P2256, Sigma	110	0,63 mM	68.9 mg
NADHNa2	Sigma N8129	709.4		
NaHCO_3		84.01		
DTT				

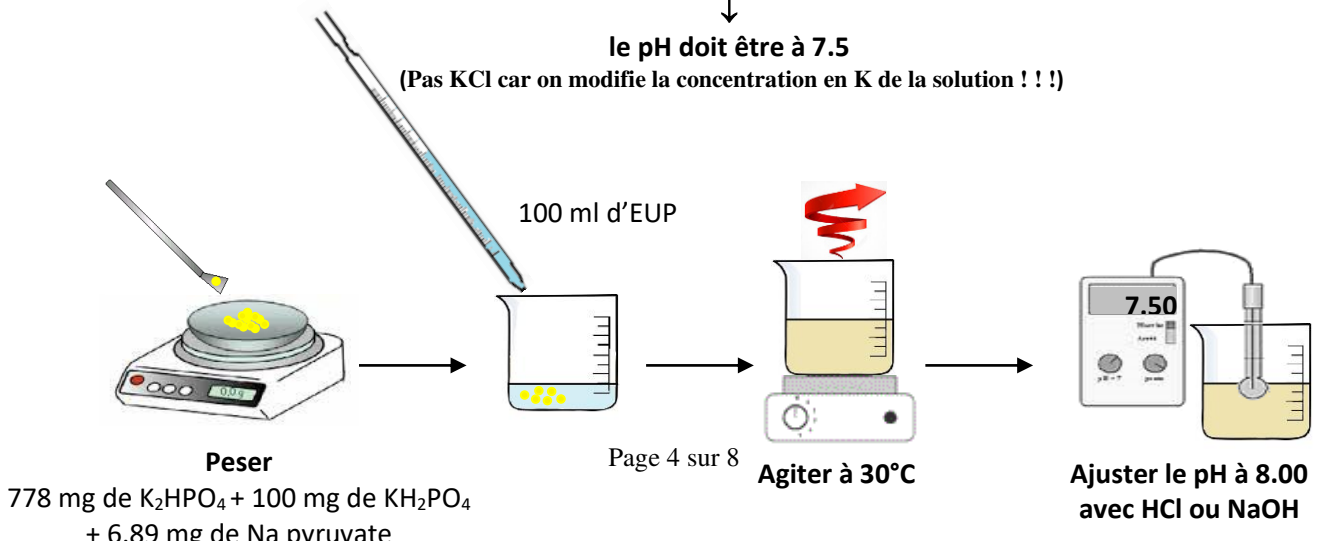
➤ Tampon d'activité totale = Tp phosphate

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois 4°C

Peser 778 mg de K_2HPO_4 + 100 mg de KH_2PO_4 + 6.89 mg de Na pyruvate QSP 100 ml d'EUP




le pH doit être à 7.5

(Pas KCl car on modifie la concentration en K de la solution !!!)



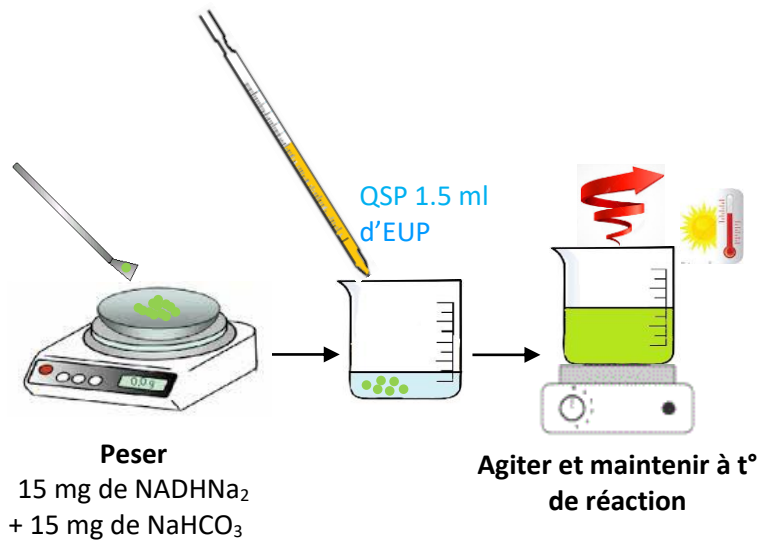
DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE

➤ Substrat = Tp Nana

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  +4°C

Peser 15 mg de NADHNa_2 +15 mg de NaHCO_3 QSP 1.5 ml d'EUP

Bien homogénéiser et maintenir à la température de réaction



➤ Milieu réactionnel :

Nombre de mesures	Tp phosphate	Tp Nana
1	3 mL	50µL
2	6 mL	100µL
5	15 mL	250µL
10	30 mL	500µL

Mettre au bain marie à 30°C

Juste avant l'utilisation, vortexer 2X30 secondes pour bien homogénéiser.

DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE

5.3.3 Lecture de la variation de densité optique

- Allumer le spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 (cf 211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique).

- Régler la lecture d'absorbance à 340nm

- Allumer le bain marie

- Mettre le bain marie à la température de réaction choisie =30°C



- * Bien homogénéiser le milieu réactionnel maintenu à température réactionnelle

- Placer une cuve dans le spectromètre



- Ajouter 3,05 ml de Tp phosphate pour faire le blanc

- Mettre une nouvelle cuve



- Ajouter 3,05 ml de milieu réactionnel

- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 3 min



- Ajouter 20µL d'échantillon dilué

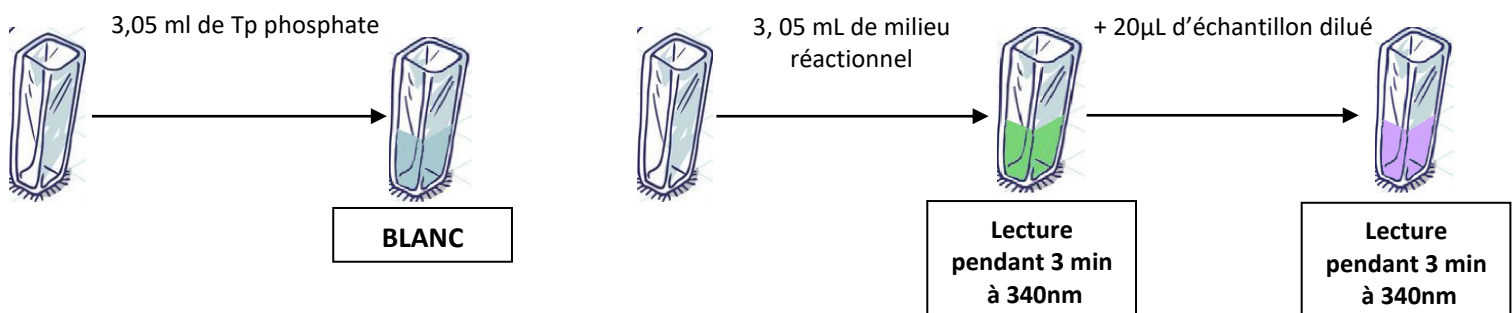
- Lancer la lecture à 340nm de la cinétique pendant 3 min.

- Enregistrer les résultats* → recommencer de * à * pour l'échantillon suivant.

1^{ère} étape : blanc tampon

2^{ème} étape : blanc échantillon

3^{ème} étape : lecture échantillon



**DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE****6. CALCULS**

On calcule l'activité grâce à la loi de Lambert-Beer, en utilisant la concentration et le coefficient d'extinction molaire du NADH,H⁺ ($\Sigma = 6300 \text{ L/mol/cm}$).

Le calcul est le suivant :

Activité = $-\frac{\text{pente ech} - \text{pente blanc ech}}{6.3 \times (1000 - \text{Vol ech} + \text{Vol ech})} / \text{Vol ech} \times 1000 \times \text{facteur de dilution} / [\text{extrait dilué}]$

Valeurs	Unité
Activité	Ui/g poids frais
Pente ech	DO/min
Vol ech	μl
[extrait dilué]	mg/ml

7. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004

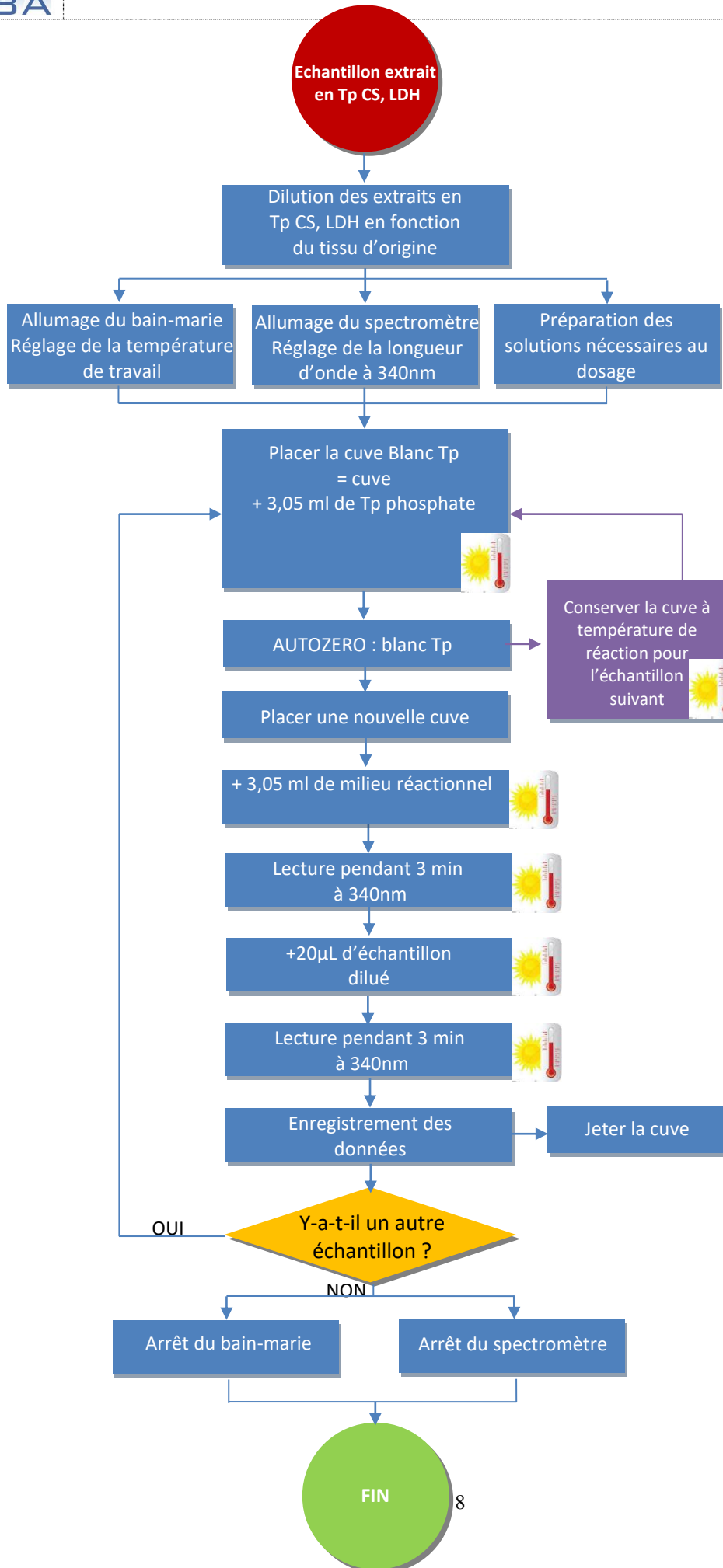
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, événements indésirables...)

➤ Revision :

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise des informations documentées 13.P.0001 de l'IRBA.

DOSAGE ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASE

Chercheur
Ingénieur
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards
211.M.0015 Extraction dosage Activité CS, LDH

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique


211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage

11.P.0002 Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA

211.M.0021 Utilisation du spectromètre BECKMAN COULTER DU 800 dans le cadre de dosage enzymologique

Annexe 13

Annexe 12 : Western blot en milieu liquide

	Code : 211.M.0014		Version : 1.0	Date : 18/09/18
	Mode opératoire			
	WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE			
<u>Service Emetteur :</u> ENOP/PEACE	Rédacteur Date : 18/09/2018 Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Vérificateur Date : Fonction(s) : Technicien de laboratoire	Valideur Qualité Date : Fonction(s) :	Approbateur Date : Fonction(s) : Chef du département ENOP
<u>Liste de diffusion :</u> Diffusion générale	Nom(s) : TLCS BOURDON Stéphanie Visa : Signature	Nom(s) : TLCS BAUGE Stéphane Visa : Signature	Nom(s) : Visa : Signature	Nom(s) : M CHENNAOUI Mounir Visa : Signature

Version	Modification(s)	Page(s)	Date
1.0	Création	<u>5</u>	18/09/2018

<u>Document(s) associé(s) :</u>	
1.P .0005	Précautions standards
11.P.0002	Procédure de gestion des déchets spécifiques produits par l'institut de recherche biomédicale des Armées
13.E.0004	Modèle de fiche d'amélioration
13.P.0001	Maitrise de la documentation
211.M.0022	Les gants aux laboratoires ENOP/PEACE
211.M.0010	Electrophorèse 1D
211.E.0014	Gel Doc™ XR+ and ChemiDoc™XRS+ Systems with Image Lab™Software UserGuide
211.E.0015	Gel Doc ChemiDoc XRS Hardware Instruction Manual
211.E.0016	Doc ChemiDoc™ XRS+ Imager

Mots-clés :

Protéine, western blot, WB, ENOP, PEACE



WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

1. OBJET

Ce mode opératoire présente les modalités de réalisation d'un Western blot en milieu liquide.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique à tous les personnels de recherche de l'IRBA qui réalisent des Western blot en milieu liquide.

3. ABREVIATION(S), DEFINITION(S)

IRBA = Institut de recherche Biomédicale des Armées

ENOP = Environnements Opérationnels

PEACE = Physiologie de l'Exercice et de l'Activité en Conditions Extrêmes

Ac = Anticorps

Ag = Antigène

WB = Western Blot

TG = Tris Glycine

TBS = Tris Buffer Solution

TBST = Tris Buffer Solution Tween

PBS = Phosphate Buffer Saline

ON = overnight

PVDF = PolyVinylidene Fluoride

BSA = Bovine Serum Albumin

PM = poids moléculaire

EUP = Eau Ultra Pure

ED = Eau Distillée

QSP = quantité Suffisante pour

HRP = horseradish peroxidase

RT = Room Temperature

ECL = enhanced chemiluminescent

4. DOCUMENT(S) DE REFERENCE

RAS

WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

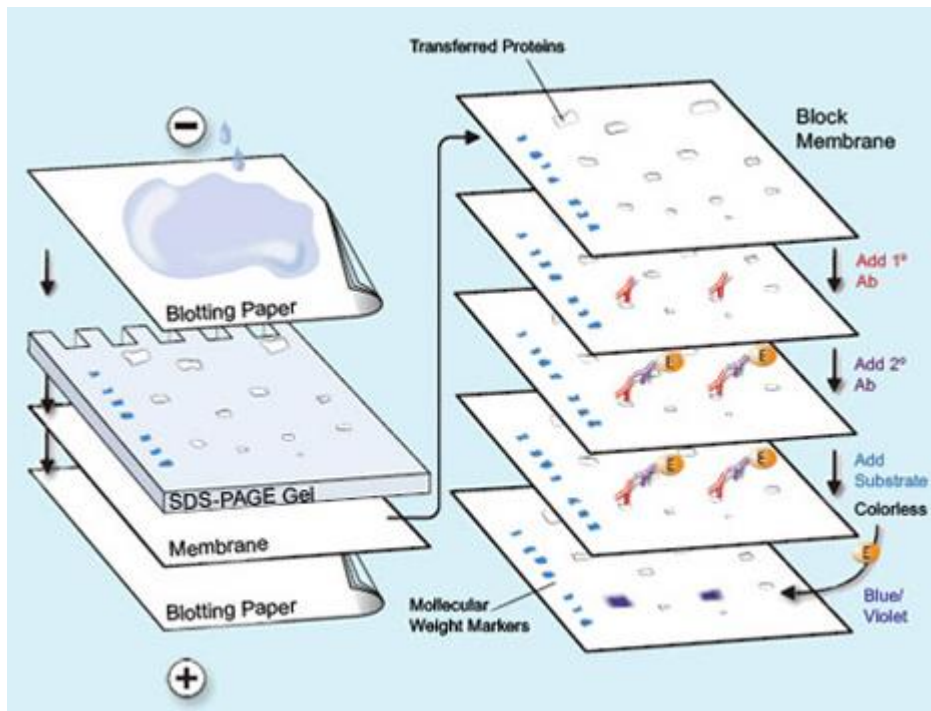
5. DESCRIPTION DES ETAPES

5.1.Principe

Un western blot, ou immunoblot, est une méthode de biologie moléculaire qui permet la détection de protéines spécifiques sur une membrane.

La technique se déroule en plusieurs étapes :

- | **Migration** : des échantillons protéiques sont déposés sur un gel d'électrophorèse et sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. Pour cela, un courant électrique est appliqué dans le gel. Plus les protéines ont une taille importante, moins elles migrent vite ;
- | **Transfert** : une fois que les protéines ont migré, elles sont transférées sur une membrane qui peut être composée de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les membranes PVDF requièrent un prétraitement au méthanol. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines ;
- | **Blocage de la membrane** : cette étape est indispensable pour limiter les interactions non spécifiques ultérieures entre les anticorps et la membrane. Le blocage est réalisé dans une solution de protéines concentrées ;
- | **Détection** : le principe consiste à appliquer sur la membrane des anticorps marqués qui sont spécifiques des protéines que l'on veut observer. On pourra ainsi observer leur position sur le gel.



5.2.Avantages/inconvénients

**WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE**

Le Western blot (immunotransfert) dépasse le concept du test ELISA en permettant la séparation du mélange protéique par taille, charge et/ou conformation. La méthode permet de détecter plusieurs cibles, contrairement au test ELISA qui permet de ne détecter qu'une seule protéine. Étant donné que l'électrophorèse de protéines sur gel sépare les protéines en bandes, il est possible de déterminer la taille de la protéine/du polypeptide cible. Il est également possible de (semi-)quantifier la protéine d'intérêt en exécutant en parallèle une analyse interne de quantité sur les échantillons dans le gel. De la même manière, la teneur en protéines des échantillons peut être comparée (« échantillon A comporte plus de protéines que l'échantillon B »).

Un des inconvénients du Western blot (immunotransfert) réside dans le fait qu'il est coûteux en temps (par rapport au test ELISA) et exige de l'expérimentateur une solide expérience. En outre, il requiert une optimisation des conditions expérimentales (par ex., isolation des protéines, tampons, type de séparation, concentration de gel, etc.)

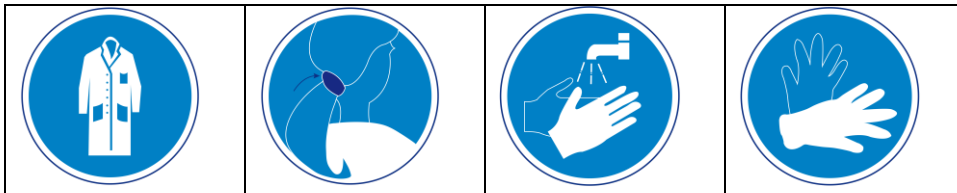
Le Western Blot en milieu humide est privilégié pour le transfert de phosphoprotéine ou de protéines de grande taille ou difficiles à transférer.

5.3. Matériel

Étapes du protocole	Désignation du matériel	Référence du fournisseur	Emplacement de stockage
Tampon de transfert	TG= tampon de transfert	161-0772 Biorad	Salle IM-AB-RC-22
	Methanol	414814 Carlo Erba	Salle IM-AB-RC-22
	Membrane de nitrocellulose	RPN3032D GEHealthcare	Salle IM-AB-RC-23
	Papier Whatman	80-1106-19 GEHealthcare	Salle IM-AB-RC-23
Transfert	Mini Trans Blot Transfert Cell	Biorad	Salle IM-AB-RC-23
Rouge Ponceau	Rouge Ponceau	81-460 Fluka	Salle IM-AB-RC-22
	Acide acétique	320099 Sigma	Salle IM-AB-RC-22
Incubation	TBS	ET220 Euromedex	Salle IM-AB-RC-23
	Tween 20	P-1379 Sigma	Salle IM-AB-RC-23
	Lait	170-6404 Biorad	Salle IM-AB-RC-23
	BSA	A7906 Sigma	Salle IM-AB-RC-23
Révélation	Clarity Western ECL, substrate	1705060 Biorad	Salle IM-AB-RC-23
	Clarity Max ECL, substrate	1705062 Biorad	Salle IM-AB-RC-23
	Chemidoc XRS+	Biorad	Salle IM-AB-RC-23

WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

5.4. Déroulement



Cf 1.P.0005 Précautions standards




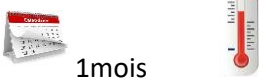
Les produits utilisés sont éliminés selon la procédure 11.P.0002 de gestion des déchets spécifiques produits par l'IRBA.

5.2.1 Préparation des solutions de base

Pour l'ensemble des techniques suivantes, il est important de porter des gants et d'avoir une vaisselle propre c'est à dire lavée avec du savon et rincée à l'ED, puis nettoyée avec de l'alcool juste avant utilisation.

Attention à la kératine.

➤ TG 1X= tampon de transfert

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois +4°C

TG (Tris Glycine) 10X






100 ml

Methanol

200 ml

QSP 1 000 ml d'EUP

**WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE**➤ Rouge Ponceau

Protection	 nitrile rouge	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  RT





Rouge Ponceau
Acide acétique

400 mg

6 ml

QSP 200 ml d'EUP

➤ TBS Tween 0.05%

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  RT





TBS 10X
Tween 20

100 ml

500 µl

QSP 1000 ml d'EUP

➤ TBS Tween 0.1%

Protection	 nitrile orange	Elimination	
Classification		Durée de conservation	 1mois  RT

TBS 10X
Tween 20

100 ml

1 ml

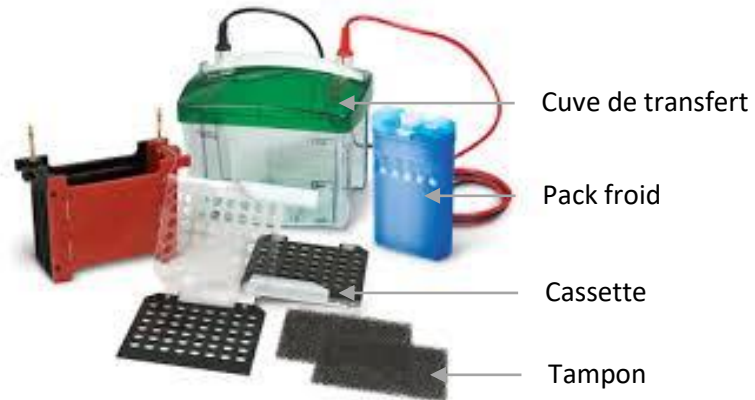
QSP 1000 ml d'EUP

WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

5.2.2 Transfert

Récupérer le gel 1D non coloré après migration et le mettre dans du tampon de transfert.

Tout ce qui va être déposé pour constituer le sandwich doit être imbibé de tampon de transfert.



Ouvrir la cassette et la poser face noire contre la paillasse.



Positionner 1 éponge



Positionner 1 papier Whatman

WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE



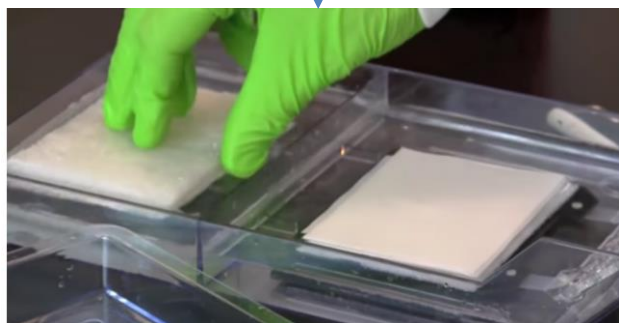
Positionner le gel d'électrophorèse



Positionner 1 membrane de nitrocellulose



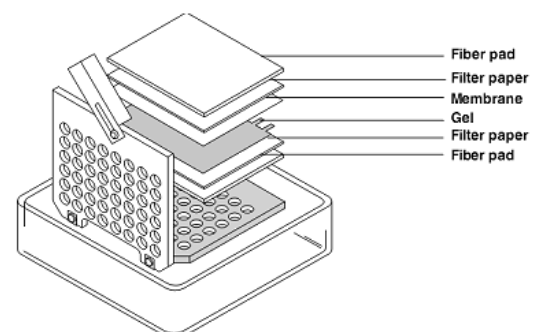
Eliminer les bulles d'air afin d'assurer un bon transfert



Positionner 1 papier Whatman



Positionner 1 éponge





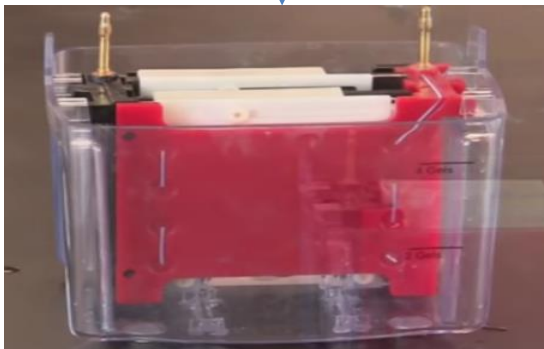
WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE



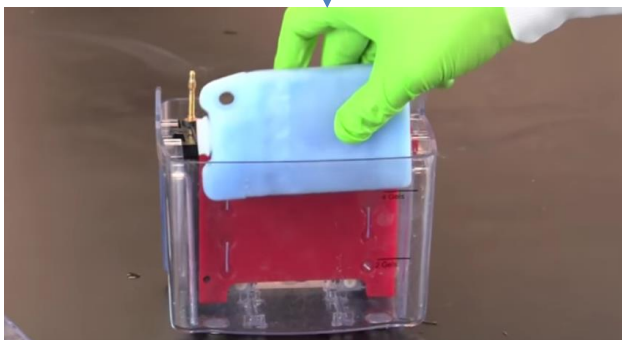
Fermer la cassette



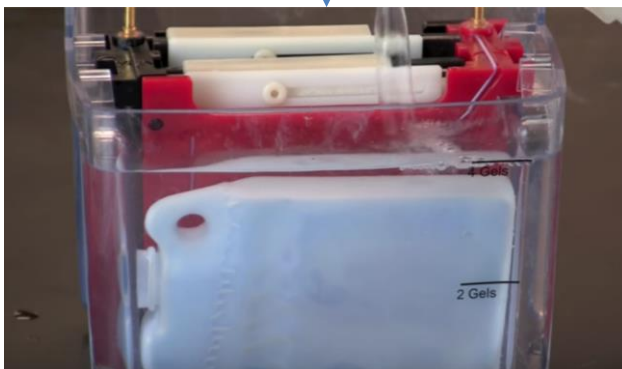
Placer la cassette entre les électrodes



Placer le tout dans la cuve de transfert

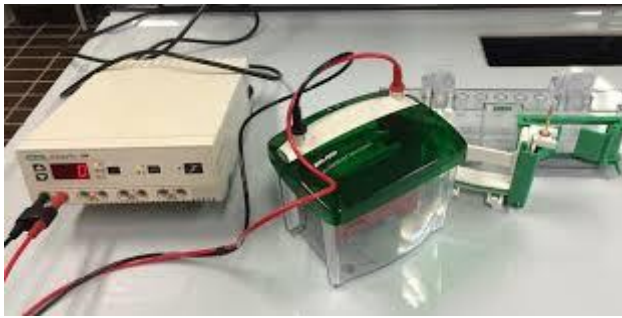


Placer un pack froid dans la cuve pour maintenir la température la plus basse possible pour éviter de dénaturer les protéines

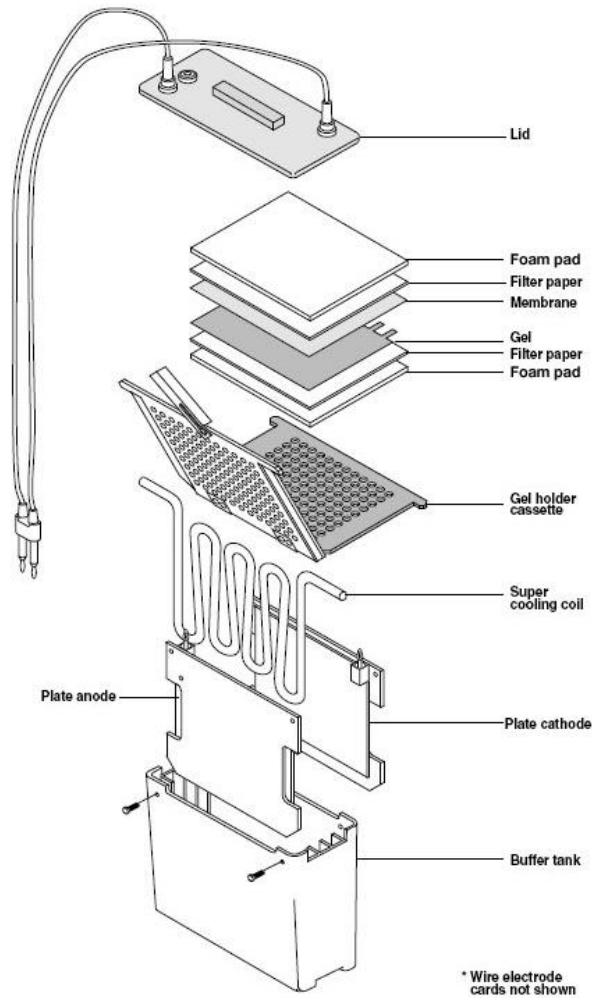


Ajouter du tampon de transfert jusqu'au niveau correspondant au nombre de gels présents dans la cuve

WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE



Transfert pendant 30 min à 100V constant



5.2.3 Coloration

La coloration de la membrane, après transfert, au rouge ponceau est une coloration transitoire qui disparaît après lavage dans de l'eau ou du PBS et qui permet de vérifier que les protéines ont bien été transférées sur la membrane, de manière homogène, et qu'il n'y avait pas de bulles d'air.

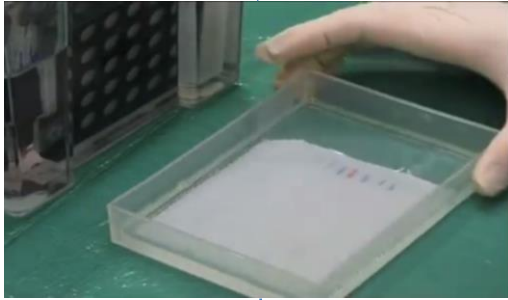
L'utilisation d'un marqueur de poids coloré permet aussi de s'assurer immédiatement que le transfert s'est bien déroulé (i.e. que les protéines ont été transférées sur la membrane), mais ne montre pas que le transfert a été homogène sur toute la membrane à l'inverse du rouge ponceau.



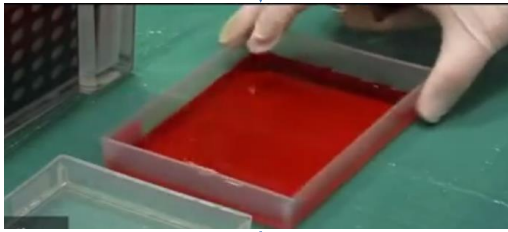
WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE



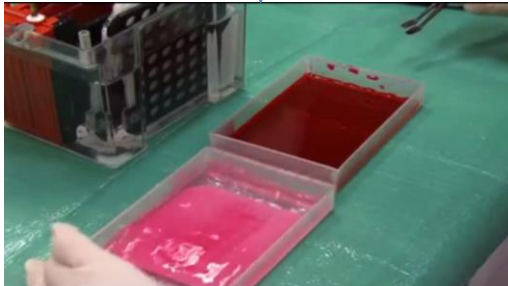
Récupérer la membrane et la placer dans un récipient face protéine vers le haut



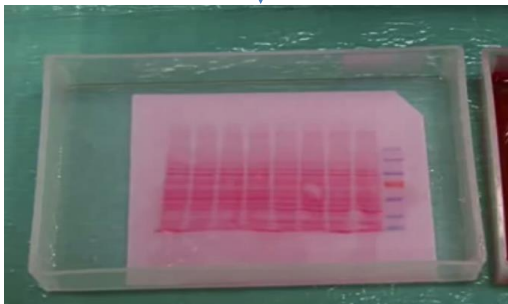
Rinçage de la membrane avec du TBST 0.05%



Coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge Ponceau pendant 2 min

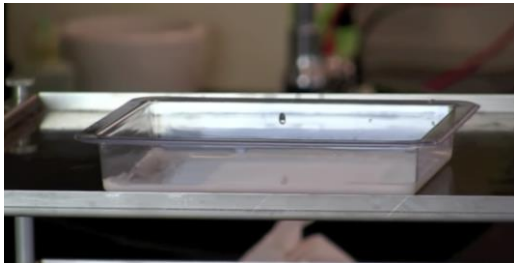


Décoloration à l'EUP jusqu'à ce que le fond soit clair et que les bandes apparaissent



WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

5.2.4 Saturation



Saturation de la membrane pendant au moins 1h à RT dans 50 ml de TBS Tween à 0,05% + 2,5 g de lait (5%).

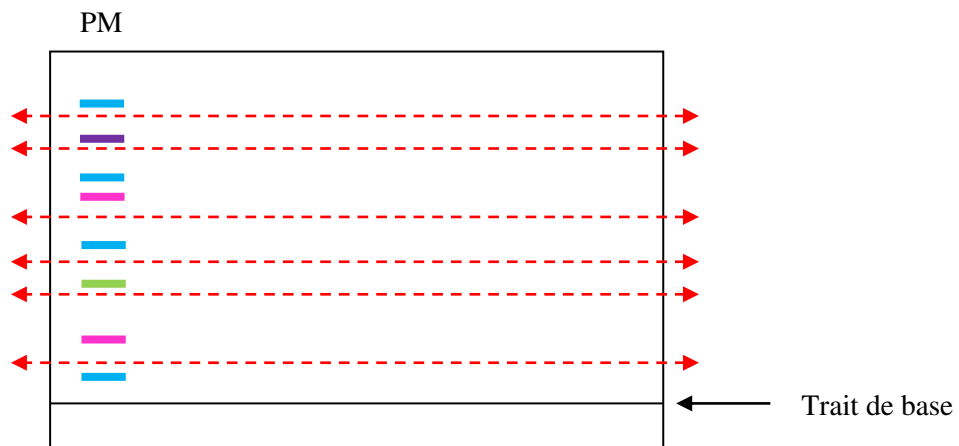
Utiliser BSA avec phospho prot car moins de bruit de fond

Lavage 3x 10 min dans du PBS Tween 0,1%.

5.2.5 Découpage de la membrane

On découpe la membrane à l'aide d'un scalpel en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêt.

On note le nom de la protéine sur la bandelette découpée. On peut ainsi pour un même échantillon faire des incubations avec différents Ac.



5.2.6 Incubations

Incubation pendant ON 4°C des strips de membrane de nitrocellulose avec Ac primaire:

Bande prot 1 : Ac primaire anti Ag1 à la dilution choisie dans 1,5 ml de PBS-Tween 0.1% BSA 2%.

Bande prot 2 : Ac primaire anti Ag2 à la dilution choisie dans 1,5 ml de PBS-Tween 0.1% BSA 2%....

WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

Lavage 3 x 10 min dans du PBS Tween 0,1%.

Incubation pendant 1h à 4°C avec l'Ac secondaire couplé HRP (ou autre dilué dans 1,5 ml de PBS-Tween 0.1% BSA 2%).

5.2.7 Révélation

Pour les Ac couplés à HRP, il faut faire une incubation dans de l'ECL.

On mélange volume à volume les 2 réactifs du kit. On incube chaque membrane avec 1,5 ml d'ECL reconstitué pendant quelques minutes.

On utilise ensuite la caméra Chemidoc XRS+ biorad pour faire les lectures. La membrane est posée sur la plaque noire, face protéine vers le haut.



Réaliser 2 lectures par membrane : une colorimétrique pour visualiser le marqueur de PM et une chemiluminétrie pour visualiser les Ac couplés à HRP ou une lecture Cy si l'Ac secondaire est couplé à une cyanine 2, 3 ou 5.

Les résultats seront visualisés et analysés grâce au logiciel Image Lab.

6. EVALUATION-REVISION

L'unité ENOP/PEACE est en charge de l'évaluation et de la révision de ce document.

➤ Evaluation :

L'évaluation est menée sous forme d'audit(s) des pratiques et de suivi d'indicateurs :

-Nombre de résultats non-conformes ou fiches d'évènements indésirables signalés par le laboratoire,



WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

Tout dysfonctionnement ou écart par rapport à cette procédure doit faire l'objet d'une fiche d'amélioration (IRBA) 13.E.0004.

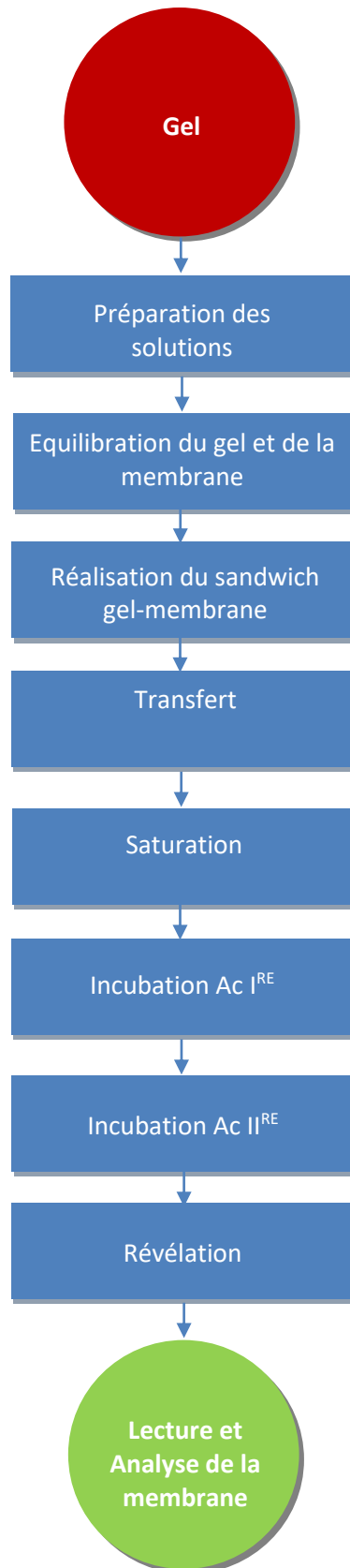
Le bilan annuel de ces indicateurs est transmis au bureau qualité afin d'être intégré dans le bilan des risques (non conformités, événements indésirables...)

➤ **Revision :**

Ce document est revu soit à l'occasion d'un dysfonctionnement, suite à des audits soit conformément à la procédure de maîtrise de la documentation 13.P.0001 de l'IRBA.

WESTERN BLOT EN MILIEU LIQUIDE

Médecin
Infirmier
Technicien
Stagiaire



1.P.0005 Précautions standards

211.E.0014
Gel Doc™ XR+ and
ChemiDoc™XRS+
Systems with Image
Lab™ Software User
Guide
211.E.0015
Gel Doc ChemiDoc XRS
Hardware Instruction
Manual

11.P.0002 Procédure de
gestion des déchets
spécifiques produits par
l'IRBA

RÉSUMÉ

Les effets de la chaleur ont été étudiés sur la fonctionnalité mitochondriale de fibres perméabilisées de soleus de rat, dans deux situations différentes. Nous avons comparé une exposition aiguë à deux températures, 35 et 40°C, pour l'oxydation du pyruvate et du palmitoyl-CoA. La chaleur a entraîné une diminution du couplage de la phosphorylation oxydative spécifique pour l'acide gras, médiée par la protéine découplante UCP3, indépendamment d'un stress oxydatif ou d'une altération structurelle. Ainsi, l'utilisation préférentielle des glucides à la chaleur pourrait être au moins en partie due à une altération de l'oxydation des lipides. Dans la seconde étude, nous avons étudié l'effet de l'acclimatation à la chaleur sur les réponses mitochondriales à l'entraînement en endurance. Seul l'entraînement en endurance a induit une augmentation du contenu mitochondrial et des capacités oxydatives mitochondriales. Aucun effet de l'acclimatation à la chaleur n'a été observé sur l'oxydation des lipides ou l'expression de UCP3. En revanche, la limitation par l'acclimatation à la chaleur de l'augmentation des capacités d'oxydation des glucides induites par l'entraînement en endurance interroge sur un frein de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie. De plus, l'entraînement en endurance et l'acclimatation à la chaleur ont induit une augmentation synergique des réserves en glycogène. L'acclimatation à la chaleur pourrait également induire des adaptations du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale et en optimiser la sensibilité à l'oxygène. Ces résultats évoquent un profil glycolytique hypoxia-like.

Mots-clés : Chaleur, acclimatation à la chaleur, entraînement en endurance, respiration mitochondriale, métabolisme, muscle squelettique, acides gras, découplage, stress oxydatif.

ABSTRACT

The effects of heat on mitochondrial function was studied in permeabilized fibers of rat soleus, in two different situations. We compared acute exposure at two temperatures, 35 and 40°C, on the oxidation of pyruvate and palmitoyl-CoA. Heat-induced a decrease in coupling of oxidative phosphorylation specifically for fatty acid, mediated by the uncoupling protein UCP3, regardless of any oxidative stress or structural alteration. Thus, carbohydrates preferred use at heat could partly be, at least, due to impaired lipid oxidation. In the second study, we investigated the effect of heat acclimation on mitochondrial responses to endurance training. Only endurance training led to an increase in mitochondrial content and mitochondrial oxidative capacities. No effect of heat acclimation was observed on lipid oxidation or on the expression of UCP3. However, heat acclimation-induced limitation of training-induced increase in carbohydrate oxidation capacities raises questions about a brake on the entry of pyruvate into the mitochondria. In addition, endurance training and heat acclimation led to a synergistic increase in glycogen stores. Heat acclimation could also induce adaptations of the IV complex of the mitochondrial respiratory chain and optimize its sensitivity to oxygen. These results suggest a hypoxia-like glycolytic profile.

Keywords : heat acclimation, endurance training, mitochondrial respiration, skeletal muscle metabolism cross-tolerance fatty acid; heat; mitochondrial uncoupling; oxidative stress; skeletal muscle