



HAL
open science

Biogenèse mitochondriale et état redox : adaptations musculaires à l'entraînement physique d'intensité modérée et élevée chez des modèles poisson et murin

Morgane Pengam

► **To cite this version:**

Morgane Pengam. Biogenèse mitochondriale et état redox : adaptations musculaires à l'entraînement physique d'intensité modérée et élevée chez des modèles poisson et murin. *Physiologie [q-bio.TO]*. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0025 . tel-04224017

HAL Id: tel-04224017

<https://theses.hal.science/tel-04224017v1>

Submitted on 1 Oct 2023

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.

THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ÉCOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale

Par **Morgane PENGAM**

Biogenèse mitochondriale et état redox

Adaptations musculaires à l'entraînement physique d'intensité modérée et élevée chez des modèles poisson et murin

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 30 mars 2021

Unité de recherche : EA 4324 – ORPHY (Optimisation des régulations physiologiques)

Rapporteurs avant soutenance :

Mme Claire THOMAS-JUNIUS
M Damien ROUSSEL

Professeur, Université Évry – Paris-Saclay
MCU-HDR, Université de Lyon

Composition du jury :

Rapporteur : **Mme Claire THOMAS-JUNIUS**
Rapporteur : **M Damien ROUSSEL**

Professeur, Université Évry – Paris-Saclay
MCU-HDR, Université de Lyon

Président : **M Jean LAROCHE**
Examineur : **M Frédéric DAUSSIN**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale
MCU-HDR, Université de Lille

Directrice de thèse : **Mme Christine MOISAN**
Co-directeur de thèse : **M Bernard SIMON**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Invitée :

Co-encadrante de thèse : **Mme Aline AMÉRAND**

MCU, Université de Bretagne Occidentale

Sommaire

Remerciements	6
Liste des travaux scientifiques	8
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux.....	12
Avant-propos	13
Chapitre 1 : Revue de littérature	16
1.1. Exercice physique et santé	17
1.1.1. Effets bénéfiques de l'exercice physique	17
1.1.1.a. Recommandations de l'OMS	18
1.1.1.b. Préventions des MCNT	18
1.1.2. Paramètres de l'exercice physique en endurance.....	20
1.1.2.a. Intensité.....	20
1.1.2.b. Durée	23
1.1.2.c. Fréquence	23
1.1.3. Types d'entraînement physique.....	24
1.1.3.a. Entraînement de type MICT (<i>Moderate-intensity continuous training</i>)	24
1.1.3.b. Entraînement de type HIIT (<i>High-intensity interval training</i>)	25
1.1.3.c. MICT <i>versus</i> HIIT.....	27
1.2. Exercice physique et muscle squelettique	27
1.2.1. Anatomie-physiologie du muscle squelettique	27
1.2.1.a. Anatomie fonctionnelle	27
1.2.1.b. Fibres musculaires	30
Composition	30
Contraction musculaire	32
1.2.2. Métabolisme énergétique et muscle squelettique	34
1.2.2.a. Métabolisme anaérobie alactique	35
1.2.2.b. Métabolisme anaérobie lactique.....	36
1.2.2.c. Métabolisme aérobie.....	37
1.2.3. Typologie des fibres musculaires	38
1.2.3.a. Mammifère.....	40
<i>Les fibres lentes de type I</i>	41

<i>Les fibres rapides de type IIX et IIB</i>	41
<i>Les fibres intermédiaires de type IIA</i>	42
1.2.3.b. Poisson.....	42
1.2.4. Adaptations du muscle squelettique à l'entraînement	44
1.2.4.a. Adaptations générales du muscle squelettique.....	45
1.2.4.b. Adaptations des fibres musculaires.....	46
1.3. La mitochondrie	47
1.3.1. Structure.....	48
1.3.2. Dynamique mitochondriale.....	49
1.3.3. Biogenèse mitochondriale.....	50
1.3.3.a. Définition	50
1.3.3.b. Quantification de la biogenèse mitochondriale	51
1.3.4. La mitochondrie : entre production d'énergie et d'espèces réactives dérivées de l'oxygène.....	52
1.3.4.a. Fonction principale de la mitochondrie : la production d'ATP <i>via</i> la phosphorylation oxydative	53
1.3.4.b. La mitochondrie : une source d'ERO	55
<i>Les différents types d'ERO</i>	56
<i>Sources cellulaires des ERO</i>	56
<i>Cibles biologiques des ERO</i>	57
L'ADN	57
Les protéines.....	57
Les lipides.....	57
<i>Défenses antioxydantes</i>	58
Antioxydants non enzymatiques.....	58
Antioxydants enzymatiques.....	59
1.3.5. Mitochondrie et exercice physique	61
1.3.5.a. Stimulation de la biogenèse mitochondriale par l'entraînement physique	61
<i>PGC-1α, acteur central de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique</i>	63
<i>Autres voies de signalisation stimulant la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique</i>	64
1.3.5.b. ERO et exercice physique	65
<i>Sources de production d'ERO dans le muscle squelettique au cours d'un exercice physique</i> ...	65
<i>Régulation des ERO dans le muscle squelettique par l'entraînement physique</i>	66
1.4. Le poisson : un modèle animal dans le domaine de la santé	68

Objectifs de thèse	70
Chapitre 2 : Résultats	73
2.1. Les protocoles d'entraînement modulent différemment la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α et l'état redox dans le muscle squelettique de la truite arc-en-ciel.....	75
2.1.1. Contexte et objectifs	75
2.1.2. Méthodologie.....	76
2.1.3. Principaux résultats et conclusions	77
Article n° 1	79
2.2. Comment les paramètres d'exercice stimulent-ils les processus relatifs à la biogenèse mitochondriale au niveau des fibres musculaires lentes et rapides chez la truite arc-en-ciel ?.....	89
2.2.1. Contexte et objectifs	89
2.2.2. Méthodologie.....	90
2.2.3. Principaux résultats et conclusions	91
Article n°2	93
2.3. Approche intégrative des réponses métaboliques au HIIT dans les muscles soléaire et EDL chez le rat.....	114
2.3.1. Contexte et objectifs	114
2.3.2. Méthodologie.....	115
2.3.3. Principaux résultats et conclusions	116
Article n°3	118
Chapitre 3 : Discussion générale	148
3.1. Objectif 1. MICT ou HIIT : quel type d'entraînement stimule le plus la biogenèse mitochondriale et les capacités antioxydantes dans le muscle squelettique ?	150
3.2. Objectif 2. Quelle combinaison de paramètres d'exercice stimule les réponses au niveau musculaire ?.....	153
3.3. Objectif 3. Les réponses sont-elles dépendantes du type de fibres musculaires ?.....	156
3.4. PGC-1 α : un élément central	160
3.5. Chronologie des réponses musculaires.....	161
3.6. Limites de notre étude	164
Conclusion générale et perspectives	168
Références	171

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Christine Moisan et Bernard Simon, je n'aurais pas pu espérer mieux en tant que directeurs de thèse. Vous avez toujours été disponibles et à mon écoute. Votre pédagogie et vos conseils scientifiques m'ont été si précieux. La richesse de nos discussions a largement contribué au bon déroulement de ma thèse.

Aline Amérand, merci pour ton encadrement, tes conseils et ton aide apportés autant sur le plan pratique que théorique. Merci de m'avoir accompagnée au congrès international de la SEB à Séville et pour tous les moments partagés.

J'ai réellement apprécié de travailler avec vous trois durant ces trois années et je suis heureuse que cela puisse se poursuivre durant mon année d'ATER. Aussi, je vous remercie de m'avoir permis de découvrir l'enseignement. Merci pour tout !

Je tiens à remercier Claire Thomas-Junius et Damien Roussel pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je suis ravie de vous présenter les travaux réalisés durant ces trois années.

Un grand merci à Frédéric Daussin et Jean Laroche d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail mais aussi pour les discussions que nous avons pu entretenir au cours de deux années lors des comités de suivi de thèse.

Anthony Guernec, Christelle Goanvec et Annie Féray, mes encadrants de Master 1 et Master 2 au sein d'ORPHY, sans vous je ne serais peut-être pas là où j'en suis actuellement et je vous remercie d'avoir contribué à mon envie de poursuivre en thèse. Votre aide m'a été et me sera toujours précieuse. Anthony, merci de m'avoir initiée à la technique de PCR. Christelle, ce fut un réel plaisir de faire courir nos rats ensemble et toujours avec le sourire, merci pour tout !

Manon, j'ai beaucoup aimé ta compagnie pour réaliser les dosages malgré le fait que tu sois une râleuse (mais ça, ce n'est pas un secret !). On s'est aussi découvert une passion commune à laquelle je pourrai consacrer un peu plus de temps désormais.

Gaëlle, Nathalie, Patrick, Jacques et Marc, merci de vous être occupés des animaux et d'avoir toujours été disponibles pour m'aider sur le plan technique.

Jocelyne, merci pour ton soutien administratif et nos petits moments de bla-bla. Je garderai toujours un bon souvenir de nos discussions matinales.

Hélène Ollivier, je te remercie de m'avoir permis d'enseigner dans le département de psychologie. L'enseignement fut une agréable découverte pour moi.

À l'équipe du midi, vous aurez rendu les pauses repas agréables et divertissantes, merci pour ces bons moments à discuter de tout et de rien ensemble.

Merci à Thomas, Jérémy, Charlotte et Aurélie avec qui j'aurai passé du temps dans le bureau des doctorants et ce, toujours dans la bonne humeur. J'ai adoré nos conversations sur des sujets aussi bien scientifiques que cinématographiques ou philosophiques.

Merci à mes stagiaires, Océane, Charlotte et Julia qui m'auront bien aidée lors des manips.

Je remercie tous les membres du laboratoire ORPHY, qui ont rendu mes journées meilleures !

Merci à ma famille pour tous les merveilleux moments partagés. C'est toujours un bonheur d'être à vos côtés ! Et surtout merci à ma maman et à ma sœur qui ont cru en moi et qui seront toujours là pour moi. Vous représentez tellement dans ma vie.

Je remercie aussi mes amis, vous me faites toujours rire et les moments de « parenthèses » passés ensemble sont toujours des bouffées d'air frais ! Merci pour ce que vous êtes.

À mes deux p'tits doudous qui reviennent de loin, merci pour votre affection et vos bêtises quotidiennes.

À toi, mon Clem, merci pour ta patience, ton soutien et surtout ton amour sans faille malgré les quelques 10 000 kilomètres qui nous ont régulièrement séparés durant ces trois ans de thèse. J'aime notre complicité et le binôme que nous formons.

Mention spéciale à mes poissons et mes rats sportifs, merci pour votre coopération. Mon projet de thèse n'aurait pas pu aboutir sans vous et votre bonne volonté.

Liste des travaux scientifiques

Publications

1. **Pengam M.**, Moisan C., Simon B., Guernec A., Inizan M. and Amérand A. (2020). *Training protocols differently affect AMPK–PGC-1 α signaling pathway and redox state in trout muscle.* Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 243, May, 110673. DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.110673
2. **Pengam M.**, Amérand A., Simon B., Guernec A., Inizan M. and Moisan C. (2021). *How do exercise training variables stimulate processes related to mitochondrial biogenesis in slow and fast trout muscle fibres?* Experimental Physiology EP089231. DOI: 10.1113/EP089231
3. **Pengam M.**, Goanvec C., Moisan C., Simon B., Albacète G., Féray A., Guernec A. and Amérand A. *Integrative approach of metabolic responses to high-intensity interval training in soleus and EDL in rats.* En préparation.

Communications orales

1. **Pengam M.**, Moisan C., Simon B. et Amérand A. *Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène : cinétiques des réponses musculaires au cours de l'entraînement.* Colloque IBSAM (Institut Brestois Santé Agro Matière), 5 juin 2018, Brest (France).
2. **Pengam M.**, Moisan C., Simon B. et Amérand A. *Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène : cinétiques des réponses musculaires au cours de l'entraînement.* Colloque IBSAM (Institut Brestois Santé Agro Matière), 19 octobre 2018, Brest (France)
3. **Pengam M.**, Moisan C., Simon B. and Amérand A. *High-intensity interval training stimulates AMPK–PGC-1 α signaling pathway, mitochondrial compounds and antioxidant systems in trout muscles.* Congrès international “Society for Experimental Biology”, 2 juillet 2019, Séville (Espagne).
4. **Pengam M.**, Moisan C., Simon B. and Amérand A. *Molecular responses involving in mitochondrial biogenesis depend on the training type in the trout red muscle.* Journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé (Universités Bretagne Loire), 11 décembre 2019, Angers (France).

Liste des abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A	GLUT4	Transporteur de glucose 4
ADN_{mt}	ADN mitochondrial	GPx	Glutathion peroxydase
ADN_n	ADN nucléaire	GSH	Glutathion réduit
ADP	Adénosine diphosphate	HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
AGPI	Acide gras polyinsaturé	HIF	<i>Hypoxia inducible factors</i>
AMP	Adénosine monophosphate	HIIT	<i>High-intensity interval training</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>	H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
ANT	<i>Adenine nucleotide translocator</i>	H⁺	Proton
ARNm	ARN messager	IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
ATF2	<i>Activating transcription factor- 2</i>	IL	Interleukine
ATP	Adénosine triphosphate	LDH	Lactate déshydrogénase
CAT	Catalase	LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
CaMK	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>	MCNT	Maladie chronique non transmissible
Ca²⁺	Calcium	MCV	Maladie cardiovasculaire
COX	Cytochrome c oxydase	MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
CS	Citrate synthase	MFF	<i>Mitochondria fission factor</i>
DRP1	<i>Dynamin related protein 1</i>	MFN	Mitofusine
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>	MICT	<i>Moderate-intensity continuous training</i>
ERO	Espèces réactives dérivées de l'oxygène	NAD	Nicotinamide adénine dinucleotide
e⁻	Électron	NFAT	<i>Nuclear factor activated T-cells</i>
FADH₂	Flavine adénine dinucléotide réduite	NOX	NAD(P)H oxydase
Fis1	<i>Fission protein 1</i>	NRF	<i>Nuclear factor erythroid-related factor</i>

OMS	Organisation mondiale de la santé
OPA1	<i>Optic atrophy protein 1</i>
OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
O₂^{•-}	Anion superoxyde
PCr	Phosphocréatine
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pi	Phosphate inorganique
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator-1α</i>
PPARα	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
p53	<i>Tumor protein 53</i> ou protéine suppresseur de tumeur p53
SIRT	<i>Silent information regulator</i> ou <i>Sirtuine</i>
SOD	Superoxyde dismutase
Tfam	<i>Mitochondrial transcription factor A</i>
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
U_{crit}	Vitesse critique (ou maximale) de nage
VMA	Vitesse maximale aérobie
$\dot{V}O_2\text{max}$	Consommation maximale d'oxygène
XO	Xanthine oxydase
¹O₂	Oxygène singulet
[•]OH	Radical hydroxyle

Liste des figures

Figure 1. Relation entre vitesse de course et consommation d'oxygène	21
Figure 2. Photographie et représentation schématique d'un tunnel de nage de type Brett .	22
Figure 3. Représentation graphique typique d'un protocole MICT (<i>Moderate-intensity continuous training</i>).....	25
Figure 4. Représentation graphique typique d'un protocole HIIT (<i>High-intensity interval training</i>)	26
Figure 5. Organisation et composition d'un muscle strié squelettique de mammifère : du muscle entier aux myofibrilles.....	29
Figure 6. Représentation d'une coupe longitudinale de la face externe d'un filet de salmonidé	30
Figure 7. Structure d'une fibre musculaire et microstructure d'une fibre musculaire en coupe longitudinale	31
Figure 8. Principales étapes de la contraction musculaire	33
Figure 9. Voies métaboliques aérobie et anaérobie.....	35
Figure 10. Situation anatomique des muscles blanc et rouge chez la truite et organisation de la musculature chez la truite	43
Figure 11. Photo de microscopie électronique et représentation schématique d'une mitochondrie	49
Figure 12. Principales fonctions de la mitochondrie	52
Figure 13. Fonctionnement de la phosphorylation oxydative.....	53
Figure 14. Localisation (cytosolique et mitochondriale) et mode d'action des enzymes antioxydantes	60
Figure 15. Stimulation de la biogenèse mitochondriale par l'exercice physique <i>via</i> différentes voies de signalisation dans le muscle squelettique	62
Figure 16. Théorie de l'hormèse mitochondriale (ou <i>mitohormesis theory</i>).....	67
Figure 17. Effets globaux du MICT et HIIT.....	154
Figure 18. Analyse en composante principale (ACP) représentant les taux d'ARNm étudiés dans le soléaire (en rouge) et dans l'EDL (en bleu) chez le rat	159
Figure 19. Chronologie de la mise en place des réponses chez la truite-arc-en-ciel	163

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification et principales caractéristiques mécaniques et biochimiques des différentes fibres musculaires chez le mammifère et le poisson	39
Tableau 2. Principaux types d'exercice et recrutement des fibres musculaires : comparaison et exemples d'applications chez le mammifère et le poisson	40
Tableau 3. Caractéristiques morphologiques et rôle des muscles soléaire et EDL de rat au repos et lors d'un exercice physique de type course.....	41
Tableau 4. Effets de 10 jours d'entraînement de type MICT et HIIT sur les transcrits et les activités enzymatiques au niveau des muscles rouge et blanc et sur le taux plasmatique en 8-isoprostanes chez la truite arc-en-ciel	78
Tableau 5. Description des paramètres d'exercice des protocoles d'entraînement.....	90
Tableau 6. Effets des différents paramètres d'exercice sur les transcrits et les activités enzymatiques au niveau des muscles rouge et blanc et sur le taux plasmatique en 8-isoprostanes chez la truite arc-en-ciel	92
Tableau 7. Effets de 6 semaines d'entraînement de type MICT et HIIT au niveau de l'animal entier (performance physique, paramètres morphométriques et systémiques) et au niveau musculaire (transcrits et activités enzymatiques) chez le rat Wistar	117

Avant-propos

Au cours d'un exercice physique, la demande énergétique est augmentée pour assurer l'activité musculaire. Cet ajustement implique le fonctionnement mitochondrial, source principale de production d'ATP et d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Le muscle squelettique, organe clé pour l'oxydation des glucides et des lipides impliquée dans les processus de production et de consommation d'énergie, influence le métabolisme énergétique de l'organisme entier. Produites à dose modérée, les ERO participent à la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaire mais quand leur production devient excessive, elles induisent des dommages sur les macromolécules biologiques. L'action des défenses antioxydantes permet de maintenir une homéostasie de la balance antioxydants/pro-oxydants. L'entraînement de type endurance à prédominance aérobie stimule la biogenèse mitochondriale, les capacités antioxydantes ainsi que l'angiogenèse musculaire et peut aussi induire des changements de typologie musculaire. L'un des acteurs centraux de la régulation de la biogenèse mitochondriale et des capacités antioxydantes musculaires est le cofacteur de transcription PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α*), activé entre autres par l'AMP kinase durant un exercice physique. L'expression de PGC-1 α serait également liée au type de fibres (oxydatives ou glycolytiques) ainsi qu'aux paramètres d'exercice.

Durant des années, seul l'entraînement en endurance continu d'intensité modérée de type aérobie (MICT, *Moderate-intensity continuous training*) a été exploré pour ses effets bénéfiques sur la santé. L'un des défis actuels est la conception de nouveaux protocoles d'entraînement physique non chronophages mais tout aussi efficaces voire plus efficaces que le MICT. L'entraînement par intervalles (HIIT, *High-intensity interval training*), qui correspond à une alternance entre des exercices de haute intensité et des temps de repos actifs ou passifs, semble répondre à ces deux critères. En effet, il a récemment été montré que le HIIT induit des adaptations physiologiques analogues à celles du MICT, comme la stimulation des capacités aérobies et du contenu mitochondrial. Certaines études démontrent même que cet entraînement serait plus efficace que le MICT et qu'il stimulerait à la fois les capacités aérobies et anaérobies. Toutefois, les réponses adaptatives à l'entraînement physique sont complexes et largement dépendantes de l'interaction de

l'intensité, de la durée et de la fréquence des séances d'exercice. La combinaison de ces paramètres pour optimiser la stimulation de la biogenèse mitochondriale musculaire est encore recherchée et les avis sont controversés. Certains auteurs présentent l'intensité comme prédominante par rapport au volume alors que d'autres exposent l'inverse. Connaître le paramètre le plus déterminant pour cette régulation mitochondriale ainsi que l'interaction entre les paramètres est primordial pour identifier le protocole d'entraînement le plus pertinent pour prévenir les risques des maladies chroniques non transmissibles (MCNT). Cependant, la méthodologie différente de chaque étude (protocoles d'entraînement, paramètres d'entraînement, modèles, types de muscles...) rend la mutualisation et l'interprétation des résultats complexes.

La recherche fondamentale en biologie utilise de nombreux modèles animaux et cellulaires afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique lors de l'exercice physique. D'un point de vue méthodologique, deux modèles animaux ont été utilisés pour ce travail de thèse : le rat Wistar et la truite arc-en-ciel. Dans la littérature, le rat est présenté comme un modèle animal de référence pour l'étude des effets de l'exercice physique sur des sujets sains ou pathologiques. Un modèle de rat atteint du syndrome métabolique, pathologie associée à un dysfonctionnement mitochondrial, a récemment été mis au point au laboratoire. La prévention de cette pathologie par le MICT a été explorée. Ainsi, l'un des projets de notre laboratoire est d'utiliser ce modèle murin afin d'étudier l'aspect préventif du syndrome métabolique par le HIIT. De nouveaux modèles et une meilleure connaissance des voies impliquées dans la biogenèse mitochondriale sont requis pour déterminer la meilleure combinaison de paramètres d'exercice et de quantifier les bienfaits de l'entraînement physique sur cette pathologie. Le poisson, quant à lui, présente de multiples avantages pour l'exploitation des effets physiologiques de l'exercice physique au niveau du muscle squelettique. En effet, ses adaptations musculaires à l'exercice physique sont globalement proches de celles du mammifère. De plus, l'un de ses principaux atouts est la séparation anatomique distincte de ses muscles rouge et blanc composés respectivement de fibres lentes oxydatives et rapides glycolytiques facilitant donc l'exploration des réponses fibres-dépendantes. Par ailleurs, la nage naturelle fait partie intégrante du cycle de vie du poisson et comme le mammifère, ses muscles sont sensibles à l'exercice tant au niveau structurel

que métabolique. Enfin, la quantité d'animaux peut être relativement importante dans une même étude expérimentale. Ainsi, l'ensemble de ces critères rend le poisson intéressant comme modèle pour l'étude de la physiologie de l'exercice. En revanche, les effets du HIIT sont peu explorés chez le poisson et donc peu de protocoles sont à disposition dans la littérature. De ce fait, le protocole de HIIT appliqué à notre modèle truite arc-en-ciel a été établi en se basant sur des données déjà référencées chez l'Homme. **Ce travail de thèse a pour objectif de déterminer une combinaison de paramètres d'exercice permettant d'optimiser la stimulation des capacités aérobies afin de prévenir les MCNT. L'utilisation de plusieurs modèles permet de mettre en évidence des processus de régulation interspécifiques. Le côté original de ces travaux porte sur le fait qu'à ce jour peu d'études ont exploré à la fois les effets des entraînements MICT et HIIT sur la biogenèse mitochondriale et sur l'état rédox dans deux types de muscles de typologie différente.**

Ce manuscrit est organisé en trois chapitres. Le premier présentera une revue de littérature sur les adaptations générales du muscle squelettique, de la stimulation de la biogenèse mitochondriale par la voie AMPK–PGC-1 α et des capacités antioxydantes au niveau musculaire lors de l'entraînement physique. Dans le deuxième chapitre, les résultats seront présentés en trois parties correspondant chacune à une publication (deux acceptées et une en préparation). Le dernier chapitre fera l'objet d'une discussion générale où nous aborderons des problématiques communes aux modèles poisson et murin. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale et des perspectives.



Chapitre 1 :

Revue de littérature

1.1. Exercice physique et santé

1.1.1. Effets bénéfiques de l'exercice physique

Le mode de vie sédentaire et la mauvaise alimentation constituent les principaux problèmes de Santé Publique du 21^{ème} siècle. Au niveau mondial, la sédentarité est considérée comme un facteur de risque majeur de maladies chroniques non transmissibles (MCNT) et a une incidence majeure sur la santé générale des populations. En 2010, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait que 25% des adultes âgés de plus de 18 ans (représentant 1,4 milliard de personnes dans le monde) et plus de 80% des adolescents de 11 à 17 ans avaient une activité physique insuffisante, et ce notamment dans les pays développés. Une activité physique pratiquée régulièrement est bénéfique pour la santé puisqu'elle réduit le risque de développer une MCNT, favorise l'équilibre psychologique et permet le maintien du poids corporel. Chez les personnes suffisamment actives, le risque de décès prématuré est diminué de 20 à 30%.

Par définition, la sédentarité est définie comme une très faible dépense énergétique due à un manque d'activité physique. Elle se caractérise le plus souvent par des comportements passifs tels que travailler sur son ordinateur, conduire, lire... L'inactivité physique quant à elle est caractérisée par des mouvements corporels presque inexistantes (Aquatias et al., 2008). Souvent confondus, les termes activité physique et exercice physique décrivent des concepts différents. Tous deux impliquent un mouvement corporel produit par les muscles striés squelettiques entraînant une augmentation de la dépense énergétique. L'activité physique peut se pratiquer dans différents types de contextes : professionnels, loisirs, travaux domestiques, déplacements... L'exercice physique correspond quant à lui à une activité physique planifiée, structurée, répétitive et intentionnelle dont l'objectif final est l'amélioration ou le maintien de la condition physique (Aquatias et al., 2008; Caspersen et al., 1985). L'exercice physique est un processus complexe impliquant l'activation synchronisée et intégrée, au niveau cellulaire ainsi que systémique, de nombreux tissus et organes (Hawley et al., 2014). L'entraînement physique quant à lui peut être défini comme une série d'exercices pratiqués sur une période de temps (Perry et al., 2010).

1.1.1.a. Recommandations de l'OMS

En 2010, l'OMS a mis en place des recommandations mondiales en matière d'activité physique pour la santé par tranche d'âge (OMS, 2010). Elles préconisent la pratique d'au minimum 30 minutes d'activité physique quotidienne. Une durée plus importante est nécessaire pour le contrôle du poids corporel.

Les enfants et adolescents (5-17 ans) en bonne santé devraient pratiquer quotidiennement 60 minutes d'activité physique d'intensité modérée à soutenue afin d'améliorer leur endurance cardiorespiratoire, leurs états musculaire et osseux ainsi que les marqueurs biologiques cardiovasculaires et métaboliques. Les activités physiques de type endurance sont principalement conseillées mais la pratique d'activités d'intensité élevée (au moins trois fois par semaine) permet un renforcement du système musculaire et de l'état osseux. Pour un bénéfice-santé supplémentaire, une durée d'activité physique plus importante est nécessaire.

Chez les adultes, une pratique hebdomadaire d'au minimum 150 minutes d'activité physique d'intensité modérée ou 75 minutes d'intensité élevée sur des périodes d'au moins 10 minutes consécutives est recommandée. Cette pratique permet une amélioration de l'endurance cardiorespiratoire, des états musculaire et osseux ainsi qu'une réduction du risque de dépression et de MCNT. La pratique d'exercices de renforcement musculaire est également préconisée.

1.1.1.b. Préventions des MCNT

En 2016, l'OMS estimait que 40,5 millions (71%) des 56 millions de décès dans le monde étaient dus à des MCNT (maladies cardiovasculaires (MCV), cancers, infections respiratoires et diabètes) dont 40% d'entre eux âgés de moins de 70 ans. Ce chiffre ne cesse de s'accroître, en raison de l'augmentation de l'espérance de vie mais aussi de certains modes de vie et facteurs environnementaux (Bennett et al., 2018). En 2030, les MCNT seront probablement la cause de 52 millions des décès. Des stratégies de prévention, de détection précoce et de prise en charge des malades permettraient de diminuer le nombre de cas. Quel que soit l'âge et l'état de santé des personnes, les bénéfices de la pratique d'une activité physique l'emporte sans conteste sur les risques encourus. L'OMS définit la

prévention comme « l'ensemble des mesures prises pour limiter le nombre et la gravité d'une maladie ». La prévention primaire permet d'éviter la survenue de la maladie en intervenant en amont sur les facteurs de risque de celle-ci. En prévention primaire, les effets bénéfiques d'une activité physique sur l'incidence des MCNT et sur la réduction de la mortalité sont d'autant plus importants lorsque l'activité physique est régulière et intense. La prévention secondaire a pour but de freiner l'évolution de la maladie en agissant lorsque les premiers signes de la maladie apparaissent. Enfin, la prévention tertiaire a pour but de réduire les complications, les invalidités et les rechutes consécutives à la maladie afin de réduire la perte d'autonomie et favoriser la réinsertion (INSERM, 2019). Depuis le 30 décembre 2016, il est inscrit dans l'article L. 1172-1 du code de la Santé Publique que « dans le cadre du parcours de soins des patients atteints d'une affection de longue durée, le médecin traitant peut prescrire une activité physique adaptée à la pathologie, aux capacités physiques et au risque médical du patient » (2016).

Le syndrome métabolique est un problème de Santé Publique au niveau mondial (Gomez-Huelgas et al., 2015). Il ne se définit pas comme étant une maladie mais se traduit par la présence de troubles physiologiques et biochimiques. Actuellement, 20 à 30% de la population adulte mondiale serait atteinte par ce syndrome (Prasun, 2020). Une personne est atteinte du syndrome métabolique lorsqu'elle présente au moins trois de ces facteurs : hypertension, glycémie à jeun élevée, dyslipidémie (hypertriglycéridémie et faible taux de cholestérol HDL (*High Density Lipoprotein*)) et/ou obésité abdominale (McCracken et al., 2018). Le tabac, le vieillissement ainsi que l'inactivité physique font partie des facteurs de risque de développement du syndrome métabolique (Gomez-Huelgas et al., 2015). De plus, il est associé à une dysfonction mitochondriale (Prasun, 2020) et il est considéré comme un puissant facteur prédictif du diabète de type 2 favorisant donc le développement de MCV (Gomez-Huelgas et al., 2015).

La prévention des facteurs cardiométaboliques du syndrome métabolique par l'entraînement physique fait l'objet d'une des thématiques au sein de notre laboratoire (Dupas et al., 2018). L'un des objectifs de ce travail de thèse a été de développer un protocole d'entraînement chez un modèle murin en accord avec le mode de vie de société actuelle. Ce point sera développé dans la partie Objectifs (page 70).

1.1.2. Paramètres de l'exercice physique en endurance

L'endurance se définit comme la faculté à soutenir longtemps un effort d'intensité inchangée et de résister à la fatigue (Millet, 2006). Les réponses induites par l'entraînement en endurance suggèrent des interférences entre les facteurs méthodologiques. Certains de ces facteurs sont des paramètres modifiables liés au programme d'entraînement (intensité, durée, fréquence, volume, durée de récupération), d'autres facteurs sont individuels (niveau d'entraînement, sexe, alimentation) (Bishop et al., 2019a; Egan and Zierath, 2013; Hawley et al., 2014). L'ensemble des paramètres modifiables de l'exercice définissent le type d'entraînement.

1.1.2.a. Intensité

Chez le mammifère, l'intensité d'un exercice physique est souvent exprimée en pourcentage de la consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_2\text{max}$). La $\dot{V}O_2\text{max}$ se définit comme la quantité la plus élevée d'oxygène consommée par unité de temps par l'organisme au cours d'un effort physique. La $\dot{V}O_2$ quant à elle ne peut plus être augmentée au-delà d'une certaine intensité d'exercice (Figure 1) (Hill and Lupton, 1923). La $\dot{V}O_2\text{max}$ est un bon prédicteur de la performance en endurance puisque c'est un paramètre déterminant pour évaluer les limites du système cardiorespiratoire et les aptitudes physiques. Cependant, la détermination de la $\dot{V}O_2\text{max}$ est difficile à réaliser et nécessite du matériel coûteux. Elle peut être estimée indirectement grâce à la vitesse maximale aérobie (VMA), correspondant à la plus petite vitesse d'exercice physique qui induit un plafonnement de la consommation d' O_2 (Figure 1). Elle permet de définir les capacités physiques aérobies de manière individuelle et de normaliser l'intensité de l'exercice (Bedford et al., 1979). Les tests de terrain Léger-Boucher et Vameval sont simples à réaliser et permettent de mesurer la VMA de chaque individu (Carminatti et al., 2013). Un exercice physique peut être catégorisé selon trois intensités : faible ($< 45\% \dot{V}O_2\text{max}$), modérée ($45-75\% \dot{V}O_2\text{max}$) ou élevée ($> 75\% \dot{V}O_2\text{max}$) (Hawley et al., 2014).

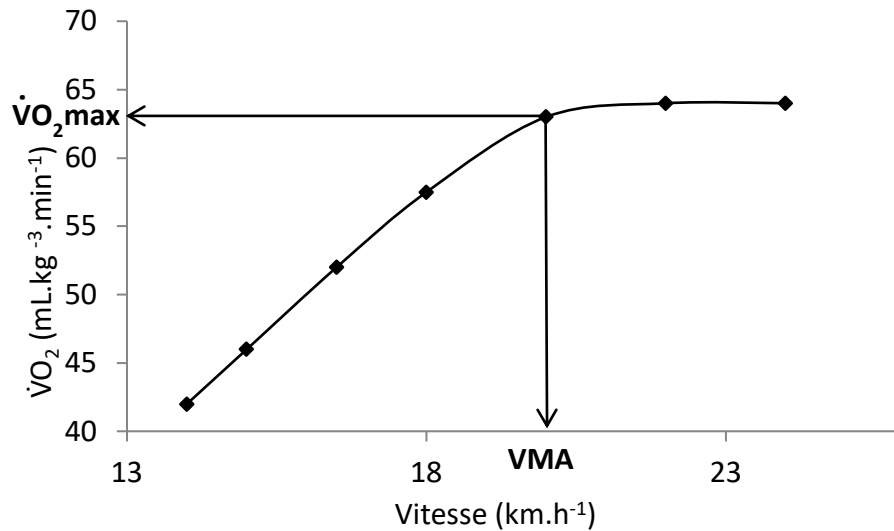


Figure 1. Relation entre vitesse de course et consommation d'oxygène. Lorsque la vitesse maximale aérobie (VMA) est atteinte, la vitesse de course peut être augmentée mais sans changement de la consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_2\text{max}$). Adapté d'après Billat et al. (2001).

Chez le poisson, l'intensité d'un exercice physique est généralement exprimée en pourcentage de la vitesse critique (ou maximale) de nage (% U_{crit}). Ce test se réalise à l'aide d'un tunnel de nage de type Brett (Figures 2A et 2B). L'augmentation de la vélocité de l'eau par paliers successifs permet de déterminer la plus haute vitesse de nage soutenue par le poisson (Figure 2C). L' U_{crit} est l'outil le plus utilisé pour évaluer les performances de nage aérobie chez les poissons (Kieffer, 2010). Bien que la comparaison inter-espèces doit rester prudente, l' U_{crit} s'apparente à la $\dot{V}O_2\text{max}$ chez le mammifère (McClelland, 2012).

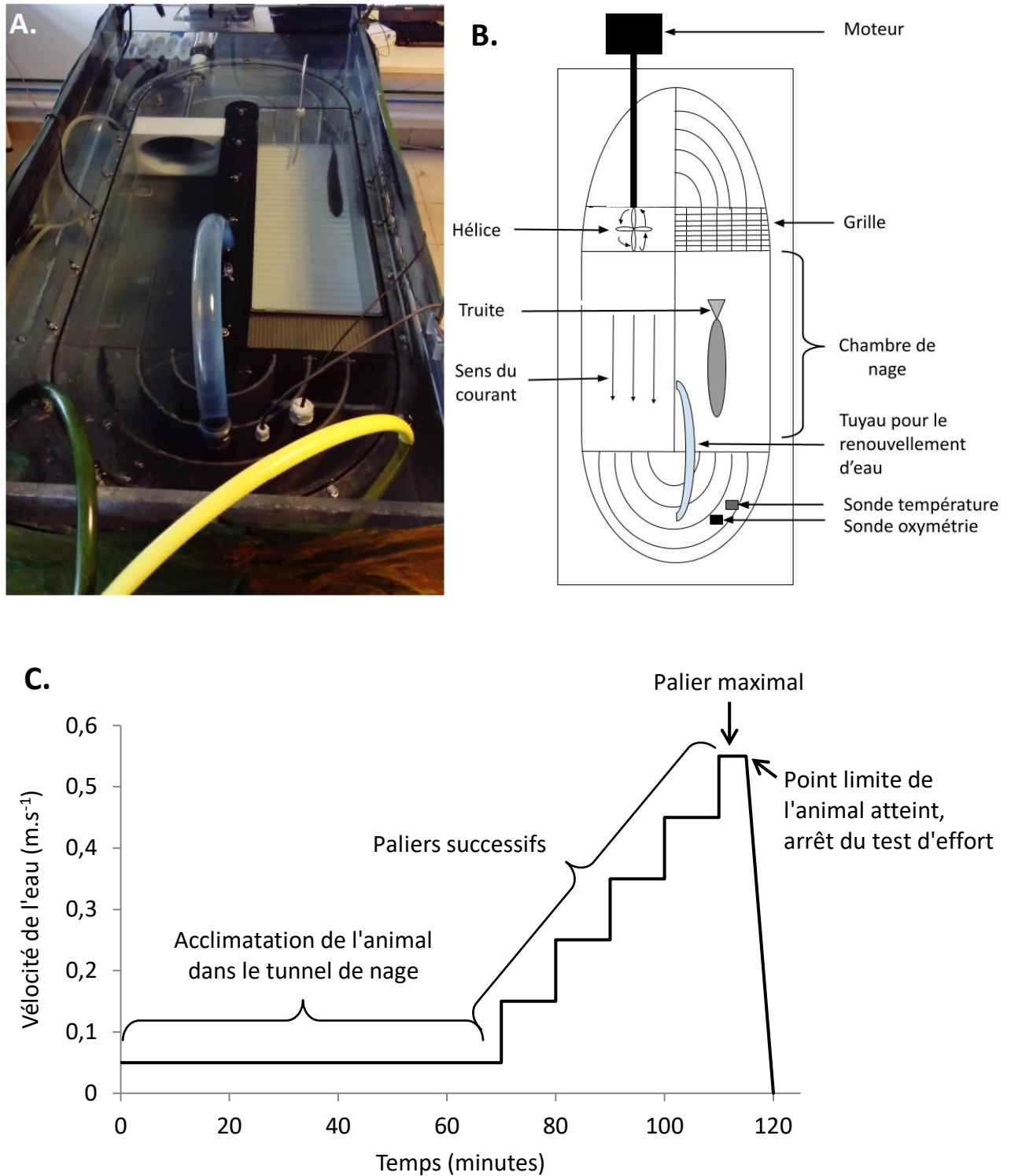


Figure 2. Photographie (A) et représentation schématique (B) d'un tunnel de nage de type Brett. Ce type de tunnel de nage permet de déterminer la vitesse critique de nage (U_{crit}) du poisson en augmentant la vitesse de l'eau par paliers successifs jusqu'à épuisement de l'animal (C). L' U_{crit} est déterminée grâce à l'équation suivante : $U_{crit} = V_{n-1} + V_i \times \frac{t_n}{T_i}$ où V_{n-1} correspond à la vitesse du dernier palier entièrement effectué, V_i à l'incrément de la vitesse, t_n à la durée du dernier palier effectué et T_i à la durée de chaque palier (Brett, 1964).

1.1.2.b. Durée

Ce paramètre peut aussi bien faire référence à la durée de la session d'exercice, à la durée de récupération entre chaque session ainsi qu'à la durée totale de l'entraînement.

La durée de la session d'exercice est un déterminant important pour les réponses adaptatives. Chez le rat, Dudley et al. (1982) ont montré qu'une durée minimale était requise pour stimuler les capacités oxydatives du muscle squelettique mais l'augmentation de la durée de la session d'exercice ne les améliore pas. Chez l'Homme, une augmentation des séances d'endurance accroît la fatigue musculaire et l'utilisation des substrats. De ce fait, la durée de récupération devra être aussi plus longue que la durée de la session d'exercice. La durée de récupération entre les sessions d'exercice influe les réponses à l'entraînement et son augmentation permettrait une meilleure adaptation (Bishop et al., 2019a). Parallèlement, la durée totale de l'entraînement a également un rôle primordial dans les réponses moléculaires et cellulaires (Dudley et al., 1982). Chez le rat, quelques jours de course sur tapis suffisent à améliorer les capacités oxydatives et à réduire le stress oxydatif du muscle squelettique (Daussin et al., 2012).

1.1.2.c. Fréquence

La fréquence permet de distinguer deux types d'exercice. L'exercice physique aigu se définit comme une séance d'exercice unique tandis que l'exercice physique chronique (ou entraînement) correspond à une série d'exercices pratiqués sur une période de temps donné.

La fréquence de l'entraînement, quant à elle, est directement liée au nombre de sessions d'exercices pratiqués chaque semaine mais aussi au nombre de séances d'exercices pratiqués dans une même journée. Chez l'Homme, il a été montré que multiplier les séances quotidiennes d'exercice améliore la $\dot{V}O_2\max$, réduit la quantité totale de graisse (Ghiarone et al., 2019) et augmente les capacités mitochondriales du muscle squelettique (Stavrinou et al., 2018).

Le volume d'entraînement équivaut à la charge de travail effectué sur la durée totale de l'exercice (Bishop et al., 2019a). Il se définit comme le produit de l'intensité relative de l'exercice, de la durée et du nombre de séances d'exercices (Granata et al., 2018a).

1.1.3. Types d'entraînement physique

Actuellement, les entraînements de type MICT (*Moderate-intensity continuous training*) et HIIT (*High-intensity interval training*) suscitent un réel intérêt dans le domaine de la recherche pour la prévention des MCNT. Ce sont les principaux entraînements explorés et comparés chez le mammifère dans le but de déterminer le protocole le plus bénéfique pour la santé. Dans ce paragraphe, ces deux entraînements seront détaillés.

1.1.3.a. Entraînement de type MICT (*Moderate-intensity continuous training*)

Depuis le début du 20^{ème} siècle, l'exercice physique fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques afin de connaître les mécanismes d'adaptations et mieux comprendre le fonctionnement du corps humain à l'effort (Wilmore et al., 2017). Durant de nombreuses années seul l'entraînement continu d'intensité modérée communément appelé MICT (MacInnis and Gibala, 2017) a été étudié. Cet entraînement fait appel à des mouvements rythmiques sollicitant les mêmes groupes musculaires pendant un minimum de 10 minutes consécutives (course à pied, cyclisme, nage, ski de fond...). Une seule répétition, sans intervalle de repos, caractérise l'entraînement continu. Le MICT se pratique à une intensité modérée (jusqu'à environ 75% de la $\dot{V}O_2\text{max}$ pour des personnes peu entraînées) et sollicite donc le métabolisme aérobie (Figure 3) (Laplaud, 2001). Les exercices de type aérobie représentent l'aptitude d'un individu à utiliser et maintenir un pourcentage élevé de la $\dot{V}O_2\text{max}$ aussi longtemps que possible. Elle permet de fournir suffisamment d' O_2 aux muscles squelettiques pour le maintien de leur activité et pour la production énergétique sans acidose métabolique (Gomes et al., 2012). En principe, l'effort peut durer jusqu'à épuisement des réserves.

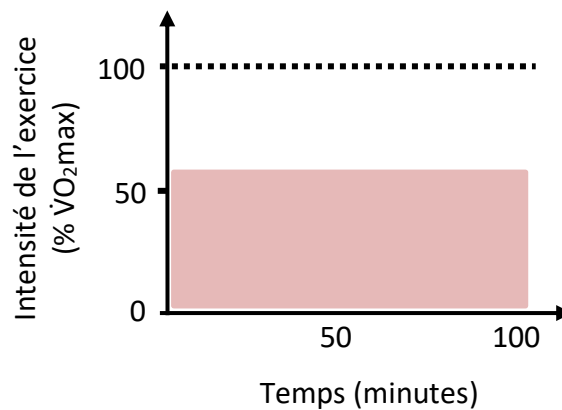


Figure 3. Représentation graphique typique d'un protocole MICT (*Moderate-intensity continuous training*). La ligne en pointillés représente la consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_2\text{max}$). Un entraînement de type MICT se pratique à intensité modérée ($< 75\%$ de la $\dot{V}O_2\text{max}$) pendant une période plus ou moins prolongée. D'après MacInnis and Gibala (2017).

De par sa facilité de mise en place, l'entraînement de type MICT est souvent utilisé dans les études sur les modèles mammifères (course sur tapis, nage) et l'intensité appliquée est généralement inférieure à 75% de $\dot{V}O_2\text{max}$ afin de solliciter principalement le métabolisme aérobie (Billat, 2017). La limite aérobie de la nage soutenue, typique du MICT chez les poissons, se situe aux alentours de 80% de U_{crit} pour les salmonidés dont fait partie la truite arc-en-ciel (Hvas and Oppedal, 2017).

1.1.3.b. Entraînement de type HIIT (*High-intensity interval training*)

L'entraînement intermittent ou par intervalles, communément appelé HIIT, alterne des périodes d'intensité élevée ($> 75\%$ $\dot{V}O_2\text{max}$) avec des phases de récupération active ou passive (Figure 4). Le HIIT suscite un vif intérêt dans le milieu scientifique pour sa capacité à améliorer plusieurs aspects de la santé cardiométabolique (Francois and Little, 2015). Il a été étudié pour la première fois en 1972 en réhabilitation cardiaque (Weston et al., 2014). En clinique, les niveaux d'intensité et la durée des périodes d'effort qui caractérisent le HIIT ne sont pas standardisés mais adaptés à la santé cardiorespiratoire des individus (Francois and Little, 2015). Pour des résultats optimaux, l'alternance entre les périodes d'effort et celles de repos devrait respecter un ratio de 1:3 (élevé:bas) (Herodek et al., 2014). Généralement, la période de haute intensité dure 30 secondes à quelques minutes et la période de récupération entre 1 et 5 minutes (Shiraev and Barclay, 2012). Chez l'Homme, les périodes

de haute intensité pourraient consister en un sprint à vélo ou en course à pied chez un athlète alors que pour une personne sédentaire ou diabétique, elles consisteraient en une marche rapide ou en montée. Grâce aux périodes de repos, le modèle « on/off » de ce genre d'entraînement pourrait permettre à des personnes non habituées ou à faible condition physique d'effectuer des exercices de haute intensité (Francois and Little, 2015).

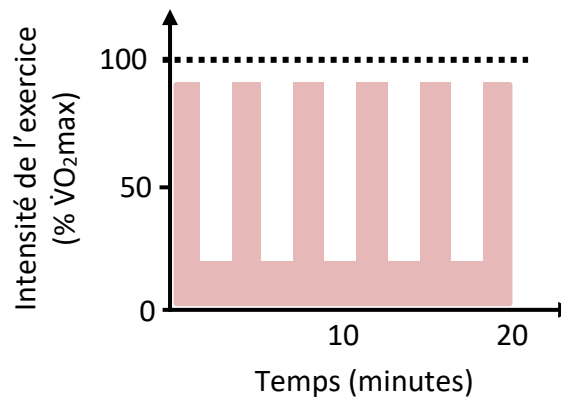


Figure 4. Représentation graphique typique d'un protocole HIIT (*High-intensity interval training*). La ligne en pointillés représente la consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_2\text{max}$). La partie « active » du HIIT est généralement supérieure à 75% de la $\dot{V}O_2\text{max}$ et chaque intervalle peut durer quelques secondes à plusieurs minutes. D'après Francois and Little (2015) et MacInnis and Gibala (2017).

Lorsque l'intensité d'un exercice est supérieure à 75% de $\dot{V}O_2\text{max}$, le métabolisme aérobie ne fournit pas suffisamment d'ATP (adénosine triphosphate). Ainsi, en complément de cette filière énergétique, le métabolisme anaérobie lactique commence à fournir de l'ATP de façon importante. Un exercice anaérobie sollicite une intensité supérieure au seuil lactique. L'acide lactique ainsi formé est rapidement dissocié en lactate et en H^+ , ce qui déclenche une acidose sanguine (Millet, 2006) et empêche la prolongation de l'effort sur le long terme. Un exercice intermittent bref à intensité élevée sollicite à la fois le métabolisme anaérobie et le métabolisme aérobie. En effet, lors des premières répétitions d'un exercice intermittent, la resynthèse d'ATP se fait principalement par le métabolisme anaérobie. Lors de la période de récupération, les réserves en phosphagène sont en partie resynthétisées et l'hémoglobine et la myoglobine en partie ré-oxygénées (Reiss et al., 2013).

Chez les poissons, la nage intermédiaire « burst-and-glide » est un bon exemple de HIIT. En effet, ce type de nage alterne une nage explosive ($> 80\% U_{crit}$) et une nage dite « de glissement » pendant laquelle le corps du poisson est maintenu droit et sans mouvement. Toutefois, il ne pourra pas être maintenue indéfiniment en raison de l'accumulation progressive de métabolites provenant du métabolisme anaérobie (Jones, 1982; Tudorache et al., 2013).

1.1.3.c. MICT *versus* HIIT

Chez l'Homme, le HIIT induit des adaptations physiologiques caractéristiques du MICT telles qu'une amélioration de la capacité aérobie ($\dot{V}O_2max$) (MacInnis and Gibala, 2017) et augmente davantage que le MICT le contenu et l'efficacité des mitochondries dans le muscle squelettique (MacInnis et al., 2017). D'un point de vue Santé Publique, ces résultats sont intéressants étant donné que le « manque de temps » reste l'un des principaux obstacles à la pratique régulière des activités physiques (Gibala et al., 2012). Sur la base de ces quelques résultats, le HIIT semblerait être un bon compromis en termes d'apport bénéfices-santé et compatible avec le rythme de vie actuel. Toutefois, ce type d'entraînement peut potentiellement être non adapté et de ce fait dangereux pour les personnes présentant des MCNT ou celles en mauvaise condition physique. Il a cependant été montré que dans un environnement contrôlé, 16 semaines de HIIT améliorent certains paramètres métaboliques et cardio-respiratoires tels que la $\dot{V}O_2max$ et la sensibilité à l'insuline chez des personnes atteintes de syndrome métabolique (Tjønnå et al., 2008).

1.2. Exercice physique et muscle squelettique

1.2.1. Anatomie-physiologie du muscle squelettique

1.2.1.a. Anatomie fonctionnelle

Chez les vertébrés, il existe trois catégories de muscles, d'une part les muscles lisses et le muscle cardiaque, tous deux soumis à un contrôle involontaire exercé par le système nerveux autonome et d'autre part les muscles squelettiques, représentant la majeure partie des muscles, soumis au contrôle volontaire exercé par le système nerveux somatique. Les muscles squelettiques jouent un rôle primordial dans le maintien de la posture, dans la

locomotion et dans le contrôle de l'environnement grâce à leur capacité à générer une force sur les extrémités osseuses par l'intermédiaire des tendons. Chez les espèces endothermes, ils permettent aussi le maintien de la température interne (Billat, 2017). Le muscle squelettique est également connu pour être un organe sécrétoire. Grâce à la sécrétion de diverses myokines, il est capable de réguler sa propre fonction ainsi que celle d'autres organes par voie paracrine ou endocrine. De nombreuses myokines, principalement l'interleukine-6 (IL-6), agissent sur les métabolismes glucidique et lipidique et ont des effets anti-inflammatoires et anti-tumoraux (Aoi, 2017). Ainsi, ces molécules pourraient avoir un rôle important dans la prévention des maladies liées à l'inactivité physique (Pedersen, 2011).

Chez le mammifère, le muscle squelettique représente environ 40% de sa masse totale (Egan and Zierath, 2013). Ce tissu contient des cellules musculaires (ou myocytes ou fibres musculaires), du tissu conjonctif ainsi que du tissu adipeux et dans une moindre mesure du tissu nerveux et du tissu vasculaire. Chaque niveau de structure du muscle est entouré d'un tissu conjonctif. Le fascia, membrane fibro-élastique constituée de tissu conjonctif, sépare les muscles les uns des autres. De la périphérie du muscle vers le centre, on distingue l'épimysium qui est l'enveloppe externe du muscle, le péri-mysium qui délimite chaque faisceau musculaire au sein duquel chaque fibre musculaire est entourée d'endomysium (Figure 5) (Billat, 2017; Listrat et al., 2015).

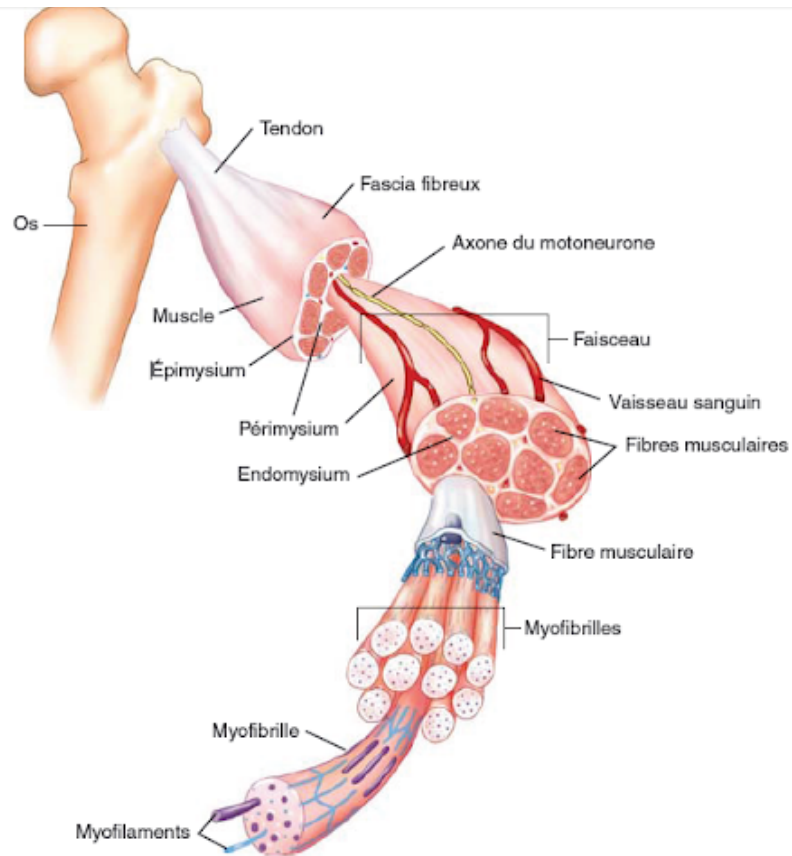


Figure 5. Organisation et composition d'un muscle strié squelettique de mammifère : du muscle entier aux myofilaments. Le muscle squelettique est relié à l'os par un tendon. Il est séparé des autres muscles par un tissu conjonctif : le fascia. Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires, contenant eux-mêmes des fibres musculaires constituées de myofibrilles à l'intérieur desquelles sont présents des myofilaments qui sont à l'origine des contractions musculaires. Chacune de ces structures est entourée d'un tissu conjonctif, de la périphérie vers le centre du muscle, on distingue : l'épimysium, le périmysium et l'endomysium. Des artères, des veines, des nerfs et du tissu adipeux composent aussi le muscle.

Chez le poisson, le tissu musculaire occupe une part plus importante que chez les autres vertébrés et représente plus de 60% de la masse corporelle des poissons téléostéens (Alami Durante and Rescan, 2003; Johnston, 2006). L'anatomie des muscles du poisson diffère de celle des mammifères. Le muscle squelettique du poisson est constitué d'un ensemble de segments musculaires regroupant les fibres musculaires sous forme de faisceaux : les myomères (ou myotomes). Ils ont une forme en W et sont disposés parallèlement à l'axe longitudinal. Chaque myomère est entouré de myosepte, un tissu conjonctif homologue à l'épimysium (Figure 6) (Listrat et al., 2015). Contrairement aux

mammifères, les poissons ne possèdent pas de véritable système tendineux proprement dit mais le myosepte serait probablement l'ancêtre évolutif du tendon (Summers and Koob, 2002). En effet, il a pour rôle de transmettre les forces de contraction d'un myomère à l'autre. Tout comme chez le mammifère, le tissu conjonctif intramusculaire des poissons forme un réseau de soutien de la masse musculaire (Listrat et al., 2015). Par ailleurs, le poisson possède du tissu adipeux intramusculaire exclusivement blanc, localisé principalement dans les myoseptes des muscles rouge et blanc (Bonnet et al., 2015).

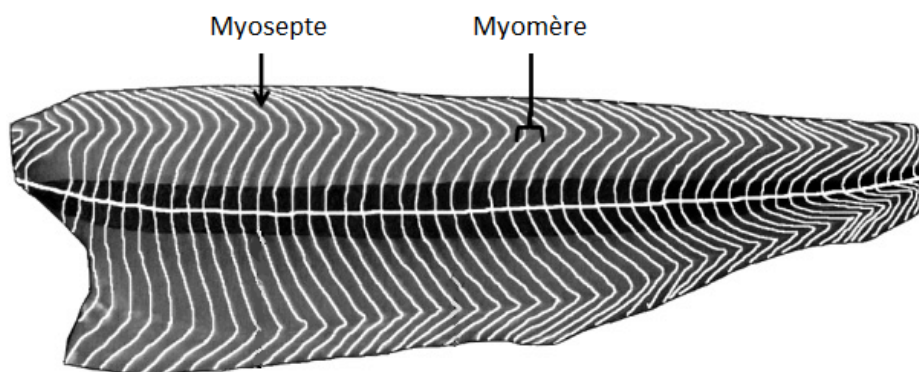


Figure 6. Représentation d'une coupe longitudinale de la face externe d'un filet de salmonidé. Les myomères, chacun séparé par le myosepte, ont une forme en W et sont répartis parallèlement (Listrat et al., 2015).

1.2.1.b. Fibres musculaires

Composition

Les fibres musculaires sont des cellules allongées et fusiformes qui s'étendent généralement sur toute la longueur du muscle (Figure 7A). Leur longueur est de quelques millimètres chez le poisson à plusieurs centimètres chez les mammifères (Listrat et al., 2015). Chaque fibre musculaire est entourée d'un sarcolemme, dans lequel se trouve le sarcoplasme constitué d'organites et de nombreuses myofibrilles. Ces fibres ont la particularité d'être polynucléées. Le réticulum sarcoplasmique est un réseau de canaux membranaires qui entoure chaque myofibrille. Il joue un rôle central dans l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}), ion essentiel à la contraction musculaire.

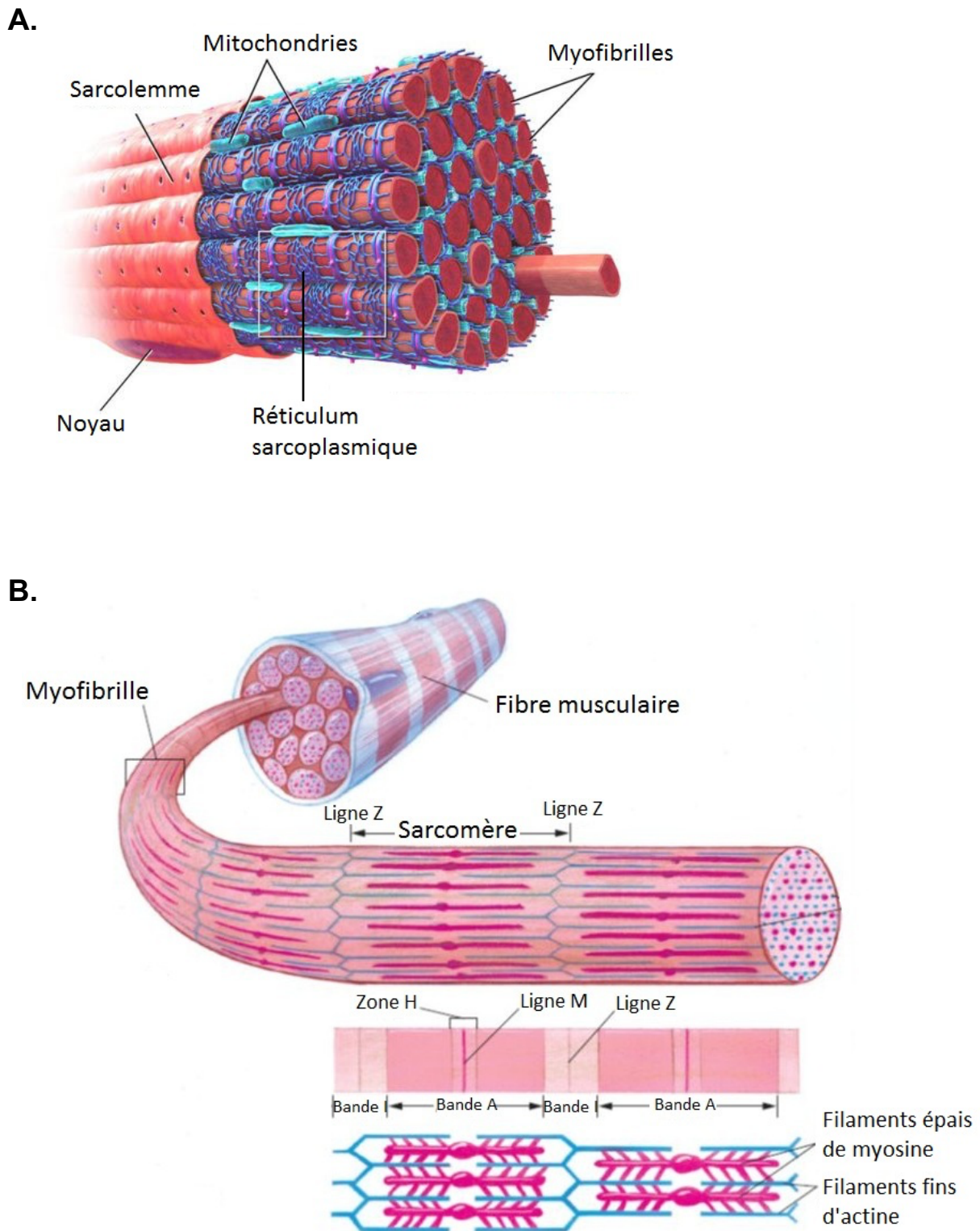


Figure 7. Structure d'une fibre musculaire (A). Les fibres musculaires sont entourées d'un sarcolemme renfermant des organites cellulaires et des myofibrilles, élément de base de ces fibres. Chaque myofibrille est entourée d'un réticulum sarcoplasmique. **Microstructure d'une fibre musculaire en coupe longitudinale (B).** L'unité structurale et fonctionnelle des myofibrilles est le sarcomère. Il est constitué de myofilaments fins d'actine (bande I) et de myofilaments épais de myosine (bande A).

Les myofibrilles, éléments de base des fibres musculaires, sont principalement composées de deux types de myofilaments protéiques : les myofilaments épais de myosine et les myofilaments fins d'actine (Figure 7B). L'alternance entre ces deux myofilaments donne un aspect strié aux muscles squelettiques. Les myofilaments d'actine sont constitués de troponine et de tropomyosine, protéines jouant un rôle important dans la régulation du processus de contraction musculaire. L'unité morphologique et fonctionnelle des myofibrilles est le sarcomère. Dans la zone centrale du sarcomère (bande A), les myofilaments d'actine recouvrent ceux de myosine. La zone H, uniquement composée de myosine, traverse la bande A en son milieu. Cette bande est délimitée de part et d'autre par une bande I, constituée uniquement d'actine. Chaque sarcomère est séparé l'un de l'autre par une fine couche de tissu conjonctif : la ligne Z (Billat, 2017).

Contraction musculaire

Il existe différents types de contraction musculaire selon la modification de la longueur du muscle et le caractère constant ou non de sa vitesse de contraction. Si le mouvement est dynamique, la contraction peut être soit concentrique (raccourcissement des sarcomères) soit excentrique (élongation des sarcomères). Si le mouvement implique une vitesse constante de modification de la longueur du muscle, la contraction est qualifiée d'isocinétique et s'il n'implique aucun changement au niveau musculaire, la contraction est dite isométrique (Billat, 2017; Hong and Kim, 2018).

Le processus de contraction musculaire débute par l'arrivée d'un influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire. Les molécules d'acétylcholine ainsi libérées dans l'espace synaptique se fixent sur des récepteurs spécifiques au niveau du sarcolemme engendrant une dépolarisation de la cellule musculaire. Lorsque cette dépolarisation atteint le réticulum sarcoplasmique, du Ca^{2+} est libéré et diffuse dans le muscle. La fixation d'un Ca^{2+} sur la troponine induit un changement de sa conformation ainsi qu'un mouvement d'hélice de la tropomyosine. Ce mouvement libère les sites d'attachement de la myosine situés à la surface des protéines d'actine. Ce sont les ponts d'union (ou têtes de myosine) situés à la surface des myofilaments de myosine qui s'accrochent aux myofilaments d'actine. Cette liaison initie la libération de l'ATP stockés dans la tête de myosine. L'ATPase, fixée sur celle-ci, permet l'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi. L'énergie libérée suite à cette transformation permet l'inclinaison de la tête de myosine et la constitution des ponts d'acto-myosine. Ce

processus d'accrochage permet le glissement du myofilament d'actine sur celui de myosine avec pour conséquence le raccourcissement ou l'élongation des sarcomères aboutissant à une contraction musculaire à l'issue de laquelle une force est générée. Ce processus est renouvelé tant que du Ca^{2+} est disponible. L'absence d'influx nerveux à la jonction neuromusculaire met fin à la contraction musculaire. Sans Ca^{2+} , la tropomyosine reprend sa configuration initiale, masquant alors les sites de liaison pour la myosine et rendant impossible toute liaison entre les myofilaments d'actine et ceux de myosine (Figure 8) (Billat, 2017).

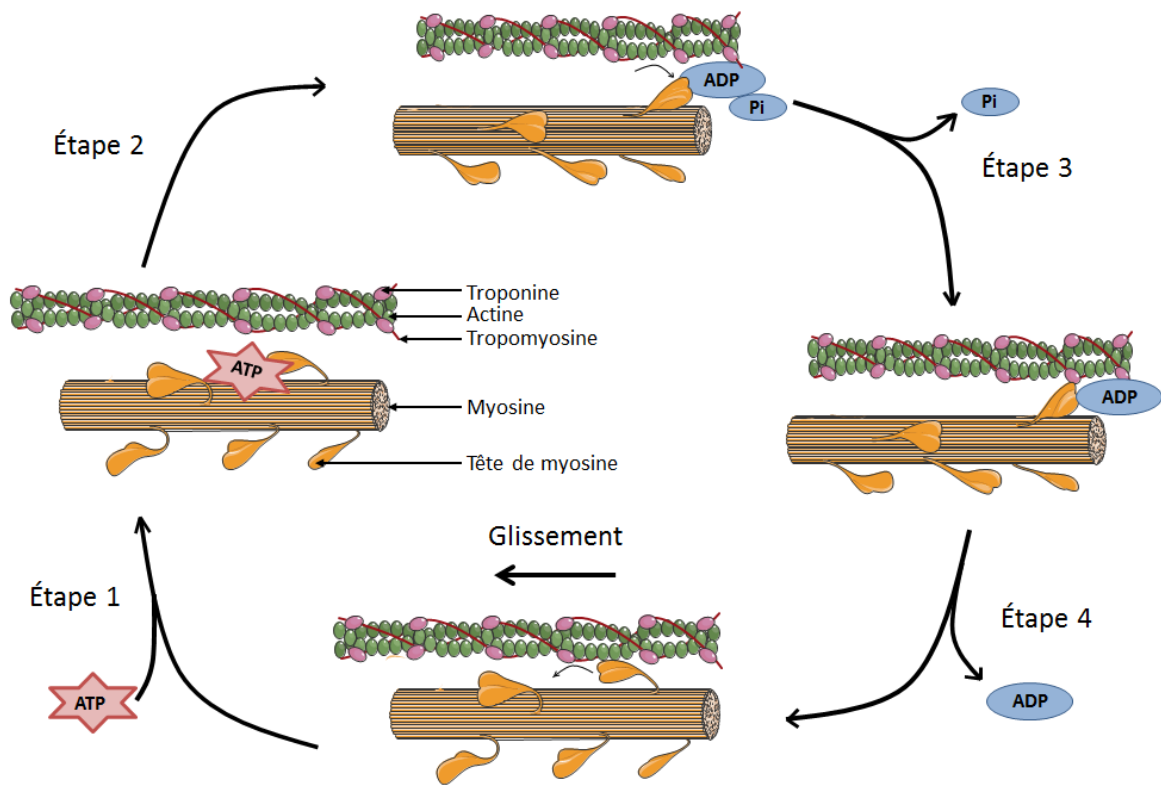


Figure 8. Principales étapes de la contraction musculaire. La fixation de l'ATP libère la tête de myosine par rupture des ponts d'acto-myosine. Ensuite, l'hydrolyse de l'ATP permet le retour à la configuration initiale de la tête de myosine. Puis, le départ du phosphate inorganique permet la fixation de la tête de myosine sur l'actine. Enfin, le départ de l'ADP permet le basculement de la tête de myosine et la contraction musculaire. En l'absence d'ATP, les têtes de myosine restent fixées à l'actine, c'est la rigidité cadavérique.

Toutes les fibres innervées par le même motoneurone constituent une unité motrice et ont la même typologie (Hug, 2018). La vitesse de contraction d'une unité motrice sera d'autant plus rapide que l'activité ATPasique de la myosine est importante (Moss and Solaro, 2019). La vitesse de conduction de l'influx nerveux est plus élevée dans les fibres rapides de type IIB (> 100 m/s) que dans les fibres lentes de type I (< 30 m/s) (Pette, 1980). La typologie des fibres musculaires sera détaillée en 1.2.3 (page 38).

1.2.2. Métabolisme énergétique et muscle squelettique

La contraction musculaire est possible, en grande partie, grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Chez l'Homme, la concentration intramusculaire d'ATP est d'environ 5 mmol.kg⁻¹ de muscle frais. Théoriquement, cette réserve d'ATP est épuisée par un exercice physique maximal d'une durée de 2 à 4 secondes. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la concentration intramusculaire d'ATP est de l'ordre de 1 mmol.kg⁻¹ (Birceanu et al., 2014). Trois voies métaboliques vont permettre la resynthèse d'ATP : anaérobie alactique, anaérobie lactique et aérobie (Figure 9). Ces voies diffèrent par les composés et les mécanismes sollicités pour cette resynthèse et sont dépendantes du type d'exercice pratiqué.

Dans le cytosol, l'ATP peut aussi être resynthétisé sous l'action de l'adénylate kinase à partir de deux molécules d'ADP. Les concentrations d'ADP libres étant faibles, cette réaction synthétise une faible quantité d'ATP (Martin-Krumm, 2016).

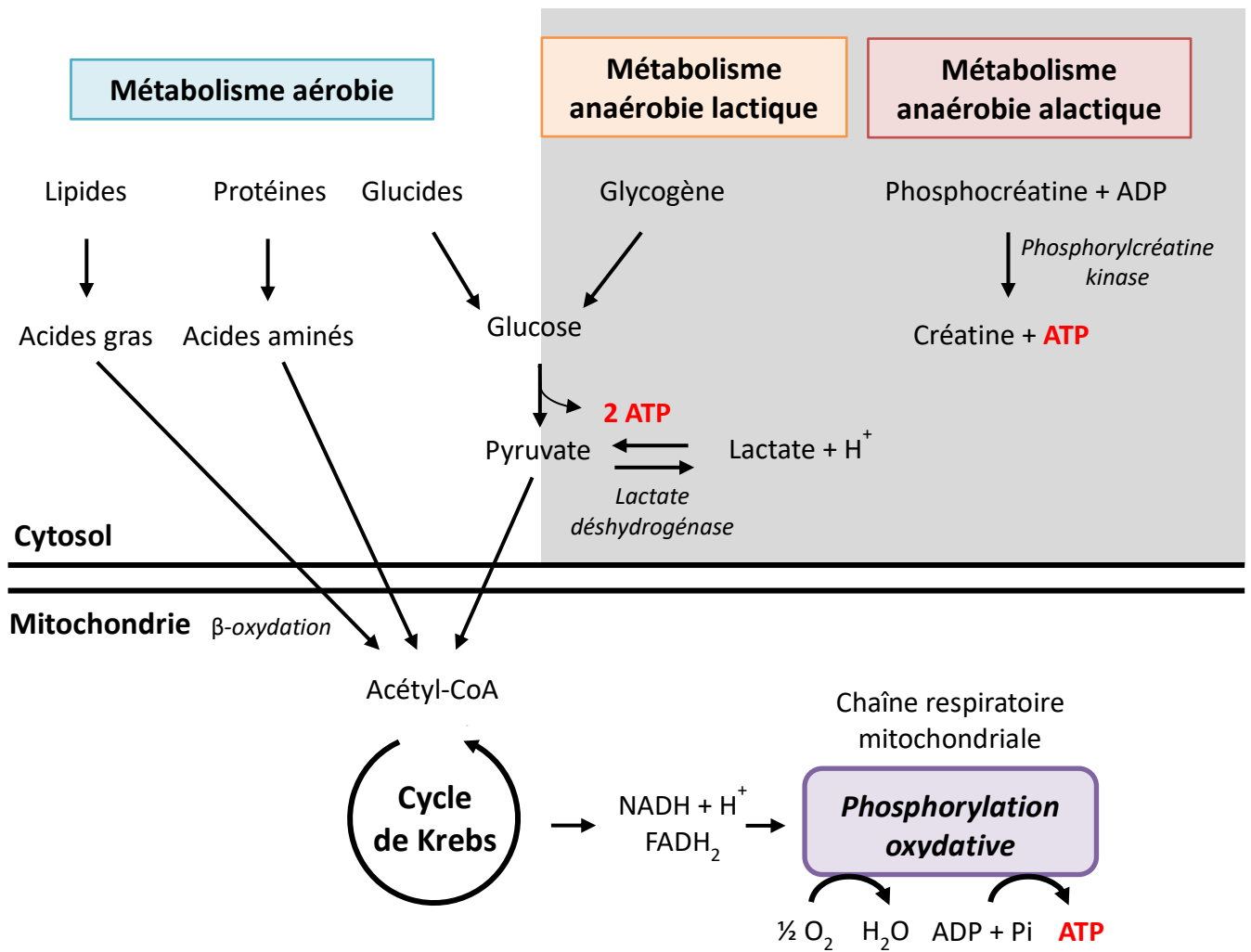


Figure 9. Voies métaboliques aérobies et anaérobies. Au cours du métabolisme aérobic, la dégradation et l'oxydation des lipides, des protéines et des glucides permettent la production d'ATP *via* la phosphorylation oxydative. À partir de la dégradation du glucose plasmatique et/ou du glycogène (musculaire et hépatique), le métabolisme anaérobie lactique produit de l'ATP et du lactate. Au cours du métabolisme anaérobie alactique, l'ADP est transformé en ATP et la phosphocréatine en créatine sous l'action de la phosphorylcréatine kinase, sans production de lactate. D'après Poortmans and Boisseau (2017).

1.2.2.a. Métabolisme anaérobie alactique

La filière énergétique anaérobie alactique mobilise la phosphocréatine (PCr). Au sein d'une cellule musculaire, le stock de PCr est environ trois fois supérieur à celui de l'ATP. Sa concentration est inférieure dans les fibres de type I par rapport aux fibres de type II (Tsintzas et al., 2001). L'hydrolyse de la PCr nécessite l'action de la phosphorylcréatine kinase mais ne requiert pas d'O₂. Sous l'action de cette enzyme, la PCr est hydrolysée en créatine et l'ADP est converti en ATP (Martin-Krumm, 2016). Les réserves musculaires en PCr

peuvent être entièrement utilisées. Chez l'Homme, ces réserves ont une capacité de production d'ATP jusqu'à 30 secondes à 70% de $\dot{V}O_2$ max. Toutefois, elles sont épuisées en moins de 10 secondes lors d'un effort maximal (Sahlin, 1986). Si l'exercice continue, la resynthèse d'ATP sera possible grâce aux autres sources de production comme la voie anaérobie lactique et/ou la voie aérobie.

1.2.2.b. Métabolisme anaérobie lactique

La filière énergétique anaérobie lactique utilise le glucose sanguin ainsi que les réserves en glycogène musculaire et hépatique. Le stock de glycogène des muscles squelettiques est deux à trois fois plus élevé que celui du foie. Les fibres de type I contiennent environ 15% de glycogène en moins que les fibres de type II. Ce métabolisme nécessite l'action de la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme qui catalyse la conversion réversible du pyruvate en lactate. La LDH, retrouvée chez tous les vertébrés dont le poisson, est une enzyme tétramérique composée de deux types de sous-unités : M (*Muscle*) et H (*Heart*), codées respectivement par les gènes *Ldh-a* et *Ldh-b*. Elle est ubiquitaire mais prédominante dans certains tissus selon les sous-unités qui la composent (Farhana and Lappin, 2020). Les propriétés chimiques des sous-unités M et H expliqueraient leur distribution dans les différents tissus. Les isoenzymes constituées des sous-unités M réduisent principalement le pyruvate en lactate dans les tissus susceptibles d'être exposés à une anaérobie lactique transitoire, comme les muscles squelettiques. Les isoenzymes composées de sous-unités H sont abondantes dans les tissus où l'apport en O_2 est relativement constant et qui oxydent préférentiellement le lactate en pyruvate, comme le cœur (Chang et al., 2020; Urbańska and Orzechowski, 2019).

Dans le cadre du métabolisme lactique, la glycolyse permet la transformation du glucose en pyruvate dans le cytosol et ce dernier est transformé en acide lactique par l'action de la LDH. À pH physiologique, l'acide lactique est rapidement transformé en lactate et H^+ . Par le biais de NAD^+ et $NADH$, cette réaction qui ne nécessite pas d' O_2 produit deux molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose.

L'activité des enzymes de la glycolyse est plus rapide que celles du cycle de Krebs. Ainsi, le devenir du pyruvate est déterminé par le flux glycolytique. Si ce flux est rapide, le pyruvate sera utilisé dans le cytosol par la voie anaérobie lactique. S'il est lent, le pyruvate sera utilisé

au niveau mitochondrial par la voie aérobie (Martin-Krumm, 2016). La filière anaérobie lactique est principalement sollicitée lors des exercices physiques puissants et courts comme par exemple un sprint chez le mammifère ou une poursuite proie-prédateur chez le poisson. Ces types d'exercice sollicitent tout de même la filière anaérobie alactique au cours des premières secondes. Chez l'Homme, la filière anaérobie lactique permet de fournir de l'ATP pendant 1 à 7 min à 70% de $\dot{V}O_2\text{max}$ (Billat, 2017). Si l'exercice se prolonge, l'accumulation du lactate induit une acidose perturbant ainsi l'activité musculaire.

1.2.2.c. Métabolisme aérobie

Tout comme la voie anaérobie lactique, la voie aérobie utilise le glucose sanguin ainsi que les réserves de glycogène musculaire et hépatique. La filière énergétique aérobie est celle fournissant la plus grande quantité d'ATP mais avec un débit de production moins important que les filières anaérobies. L' O_2 est indispensable à cette voie pour la production d'ATP à partir de glucides, lipides et/ou protéines. La dégradation du glucose conduit à la formation du pyruvate dans le cytosol. Dans la mitochondrie, le pyruvate est oxydé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), c'est la décarboxylation oxydative. Ce dernier va rentrer dans le cycle de Krebs et fournir les équivalents réduits à la chaîne respiratoire mitochondriale ($NADH + H^+$ et $FADH_2$). Quant aux lipides et aux protéines, ils sont respectivement dégradés en acides gras et en acides aminés. Ces derniers sont alors transformés en acétyl-CoA dans la mitochondrie. La β -oxydation permet la transformation des acides gras en acétyl-CoA. Cette molécule pourra alors rentrer dans le cycle de Krebs et produire les équivalents réduits. Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, la consommation d'une demi-molécule d' O_2 permet la production d'une molécule d'ATP *via* l'hydrolyse de l'ADP + Pi. L'activité physique utilisant cette voie métabolique est pratiquée à intensité modérée et peut être maintenue sur une longue durée (> 10 minutes), c'est l'exemple type de l'endurance. Chez l'Homme, l'utilisation complète des réserves de glucides et de glycogène permettrait de maintenir un effort à 70% de $\dot{V}O_2\text{max}$ durant environ 90 minutes. Par contre, les stocks d'acide gras, considérables chez l'Homme, permettent de fournir de l'énergie sur une période de plusieurs jours (Billat, 2017; Martin-Krumm, 2016; Poortmans and Boisseau, 2017).

1.2.3. Typologie des fibres musculaires

Les mammifères possèdent des muscles squelettiques mixtes, c'est-à-dire composés de plusieurs types de fibres musculaires, alors que les poissons ont la particularité d'avoir des muscles squelettiques composés exclusivement d'un seul type de fibre musculaire. La classification des fibres musculaires a longtemps été basée sur les propriétés biochimiques des fibres musculaires et notamment l'activité ATPasique des myosines qui est en relation avec la vitesse de contraction musculaire. Cependant, cette activité n'est pas spécifique aux myosines puisque les ATPases liées à la membrane contribuent aussi à l'hydrolyse de l'ATP. L'identification de marqueurs moléculaires spécifiques à un type de fibre musculaire, comme les isoformes des chaînes lourdes de myosine, a permis d'établir une classification plus précise des fibres (Qaisar et al., 2016; Schiaffino, 2018). Il existe trois grandes catégories de fibres musculaires : les fibres lentes de type I, les fibres intermédiaires de type IIA et les fibres rapides de type IIX/IIB (Tableau 1). Leur contribution est différente selon le mouvement ou le type d'exercice physique pratiqué (Tableau 2).

Tableau 1. Classification et principales caractéristiques mécaniques et biochimiques des différentes fibres musculaires chez le mammifère et le poisson. D'après Alami Durante and Rescan (2003), Billat (2017), Listrat et al. (2015), Martin-Krumm (2016) et Picard et al. (2003).

Type de fibres musculaires	Mammifère	I	IIA	IIIX	IIB (non présentes chez l'Homme)
	Poisson	Rouge	Rose	Blanche	
Résistance à la fatigue		+++	++	+	
Rapidité de la contraction Activité ATPasique		+	+++	+++	
Taille du motoneurone		+	++	+++	
Propriété métabolique		Oxydative	Oxydative et glycolytique	Glycolytique	
Filière énergétique prédominante		Aérobie	Aérobie et anaérobie	Anaérobie	
Densité capillaire		+++	++	+	
Densité mitochondriale		+++	++	+	
Substrats	ATP	++	+++	+++	
	PCr	+	+++	+++	
	Glycogène	+	++	+++	
	Lipides	+++	++	+	

+++ : élevé ; ++ : intermédiaire ; + : faible.

Tableau 2. Principaux types d'exercice et recrutement des fibres musculaires : comparaison et exemples d'applications chez le mammifère et le poisson. D'après Billat (2017), Egan and Zierath (2013) et Tudorache et al. (2013).

Type d'exercice	Mammifère	Poisson	Principales fibres musculaires recrutées
Peu intense et continu	10 minutes à 1 heure (ou plus) Course en endurance	Nage soutenue (de l'anglais, <i>sustained swimming</i>) > 200 minutes Migration (certaines espèces)	Lentes
Intense et limité	20 secondes à 10 minutes Course rapide	Nage prolongée (de l'anglais, <i>prolonged swimming</i>) 20 secondes à 200 minutes Nage qui inclue nages soutenue et explosive	Lentes Intermédiaires Rapides
Très intense et bref	10 à 20 secondes Sprint, saut, lancer	Nage explosive (de l'anglais, <i>burst swimming</i>) < 20 secondes Poursuite proie-prédateur	Rapides

1.2.3.a. Mammifère

Chez le mammifère, la majorité des muscles squelettiques sont hétérogènes et la proportion des fibres musculaires est variable selon les muscles. Par exemple, chez le rat, l'un des modèles de notre étude, le soléaire est principalement composé de fibres de type I alors que l'EDL (*Extensor Digitorum Longus*) est exclusivement constitué de fibres de type II (Tableau 3) (Eng et al., 2008). Les pourcentages respectifs des types de fibres musculaires ont leur importance pour la réalisation de certaines activités physiques en relation avec les paramètres d'intensité et de durée.

Tableau 3. Caractéristiques morphologiques et rôle des muscles soléaire et EDL de rat au repos et lors d'un exercice physique de type course.

Type de muscles	Pourcentage en isoformes de chaîne lourde de myosine (%) (Eng et al., 2008)				Rôle au repos	Rôle dans un exercice physique de type course
	I	IIA	IIX	IIB		
Soléaire <i>Soleus</i>	80,2	19,8	0	0	Muscle de posture (Sasaki and Neptune, 2006)	Accélération verticale (Sasaki and Neptune, 2006)
Long extenseur des orteils EDL	0	10,5	25,1	64,4	Extension des orteils Dorsiflexion de la cheville (Eng et al., 2008)	Stabilisation de la surface plantaire et du talon (Moening et al., 1993)

Les fibres lentes de type I

Les fibres à contraction lente sont aussi appelées fibres oxydatives ou de type I. Une forte proportion de ces fibres est retrouvée dans les muscles nécessaires à la posture. Ces fibres contiennent beaucoup de mitochondries et sont entourées de nombreux capillaires. Les fibres lentes ont un aspect plus rouge que les autres fibres puisqu'elles contiennent d'avantage de myoglobine. L'O₂ se fixe sur cette protéine musculaire et elle le transporte de la membrane cellulaire à la mitochondrie où l'ATP sera produit. Les fibres de type I sont résistantes à la fatigue du fait de leur importante capacité à métaboliser l'ATP à partir d'O₂.

Les fibres rapides de type IIX et IIB

Les fibres à contraction rapide sont aussi appelées fibres glycolytiques ou de type IIX et IIB. Seules les fibres IIX sont exprimées chez l'Homme. Comparées aux fibres de type I, ces fibres résistent moins à la fatigue et ont un métabolisme aérobie plus faible puisqu'elles contiennent peu de mitochondries. Elles sont cependant riches en glycogène, leur procurant une capacité anaérobie lactique importante. Ces fibres ont davantage de myofibrilles et d'ATPases que les fibres lentes, leur permettant une contraction musculaire plus importante et plus rapide. Ainsi, la force générée par les fibres rapides est plus importante que celle des fibres lentes.

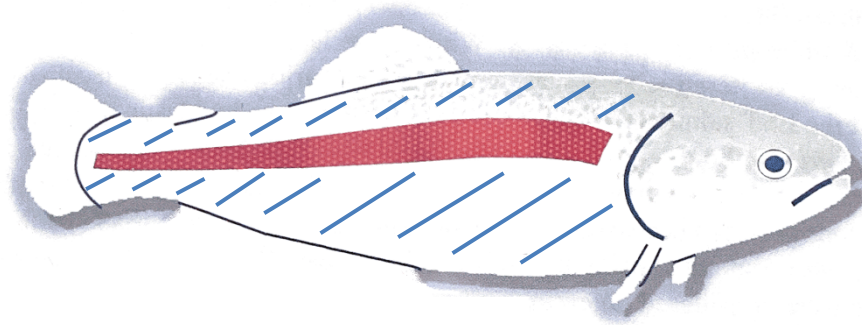
Les fibres intermédiaires de type IIA

Les fibres intermédiaires sont aussi appelées fibres rapides glycolytiques et oxydatives ou de type IIA. Elles ont des caractéristiques biochimiques et de résistance à la fatigue situées entre celles des fibres lentes et rapides. Leur vitesse et leur force de contraction sont supérieures à celles des fibres de type I mais inférieures à celles des fibres de type IIB et IIX (Billat, 2017; Maire, 2015; Martin-Krumm, 2016).

1.2.3.b. Poisson

Chez le poisson, le tissu musculaire est composé de trois types de muscles squelettiques situés sur des zones anatomiques distinctes : le muscle blanc majoritaire, le muscle rouge superficiel situé sous la ligne latérale et le muscle rose intermédiaire (Figure 10) (Alami Durante and Rescan, 2003; Listrat et al., 2015). Les muscles blanc et rouge sont composés respectivement de fibres rapides glycolytiques et de fibres lentes oxydatives (McClelland, 2012). Chez la majorité des poissons téléostéens, ces muscles sont séparés par du muscle rose qui est constitué de fibres intermédiaires ayant de fortes activités oxydative et glycolytique (Alami Durante and Rescan, 2003; Johnston, 2001). Parmi les poissons téléostéens, la truite arc-en-ciel présente une masse musculaire composée d'environ 96% de muscle blanc, 4% de muscle rouge et moins de 1% de muscle rose (Johnston, 2001; Stickland, 1983). La typologie musculaire particulière du poisson fait de cet animal un outil méthodologique intéressant pour les études en physiologie de l'exercice. Comme chez le mammifère, les fibres musculaires sont recrutées différemment selon l'intensité de nage du poisson. Il existe trois grandes catégories de nage : soutenue (*sustained swimming*), prolongée (*prolonged swimming*) et explosive (*burst swimming*) (Tableau 2) (Kieffer, 2010).

A.



B.

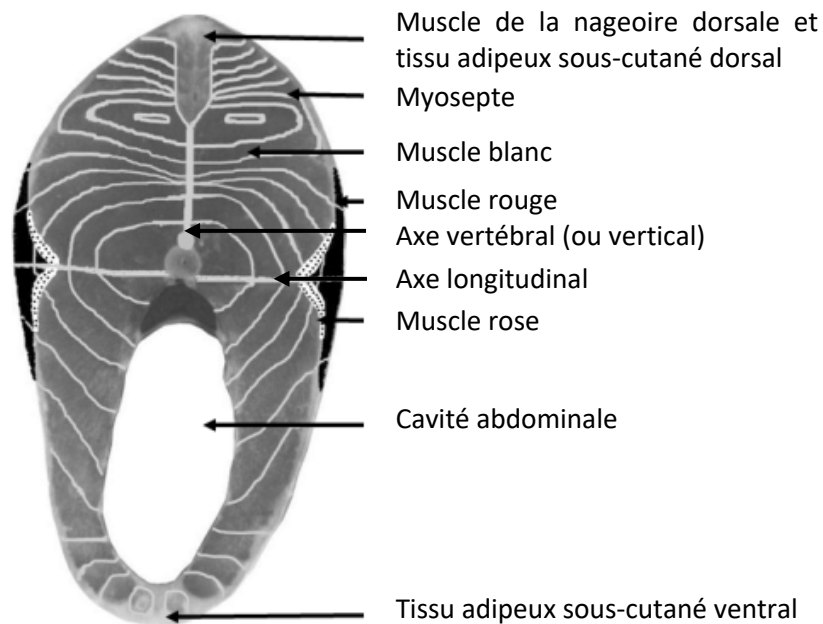


Figure 10. Situation anatomique des muscles blanc et rouge chez la truite (A). La partie colorée en rouge représente le muscle rouge et la partie hachurée en bleu le muscle blanc. D'après Planas et al. (2013). **Organisation de la musculature chez la truite (vue d'une darne en coupe transversale) (B).** D'après Listrat et al. (2015).

La nage soutenue ($< 80\% U_{crit}$) implique une faible vitesse de nage et sollicite le métabolisme aérobie afin d'être maintenue sur de longues périodes (> 200 minutes) sans générer de fatigue chez l'animal comme lors de la migration de certaines espèces (Kieffer, 2010; Tudorache et al., 2013). Les fibres rouges oxydatives, analogues aux fibres de type I, sont recrutées lors de ce type de nage (Hvas and Oppedal, 2017).

La nage prolongée (jusqu'à 80% U_{crit}) peut être maintenue jusqu'à l'épuisement physiologique pendant une durée de 20 secondes à 200 minutes. Elle sollicite les métabolismes aérobie et anaérobie. Ainsi, les fibres rouges et blanches sont recrutées. C'est une nage intermédiaire entre la nage soutenue et la nage explosive (Tudorache et al., 2013). La nage explosive (> 80% U_{crit}) quant à elle peut être maintenue sur une durée inférieure à 20 secondes. Elle requiert le métabolisme anaérobie et sollicite donc les fibres blanches glycolytiques, correspondant aux fibres de type IIX/IIB chez le mammifère, qui permettent des mouvements de nage rapide grâce à leur vitesse de contraction rapide ainsi qu'à leur orientation au sein du muscle blanc (Alami Durante and Rescan, 2003). Elles sont par exemple recrutées, en plus des fibres rouges, lors d'une poursuite proie-prédateur (Tudorache et al., 2013).

Le recrutement des fibres roses oxydatives et glycolytiques analogues aux fibres de type IIA, ont fait l'objet de très peu d'études. Du fait de leurs métabolismes aérobie et anaérobie, ces fibres seraient probablement sollicitées lorsque la vitesse de nage est relativement importante comme par exemple durant une nage prolongée ou nage explosive.

1.2.4. Adaptations du muscle squelettique à l'entraînement

Avant d'aborder ce sujet, il convient de distinguer les effets de l'exercice physique aigu de ceux de l'exercice physique chronique. En plus de modifier l'expression de certains gènes et protéines dans les muscles squelettiques, une séance d'exercice physique modifie temporairement certains paramètres physiologiques tels que le flux sanguin, la production d'hormones et l'activité des systèmes nerveux et immunitaire (Aoi, 2017). Ces effets transitoires modulent temporairement l'activité électrochimique des réseaux neuronaux. Ils commencent à opérer peu de temps après le début de l'exercice physique et s'interrompent quelques secondes à quelques minutes après l'arrêt de l'effort. Quant aux effets de l'entraînement, ils peuvent s'étendre sur du long terme (quelques semaines à plusieurs années) (Audiffren et al., 2011). L'entraînement améliore diverses fonctions physiologiques dont notamment le métabolisme énergétique (Aoi, 2017). Les adaptations face à l'entraînement sont persistantes au repos et sont en grande partie l'effet cumulé de celles obtenues à la suite d'une seule séance d'exercice. Les perturbations répétées de l'homéostasie cellulaire entraînent une série de réponses adaptatives qui visent à minimiser les perturbations lors de la prochaine séance d'exercice (Perry et al., 2010). En revanche, la

programmation de l'entraînement doit être adaptée à chaque individu afin d'éviter le surentraînement qui se définit comme « la diminution de la capacité de performance, en dépit de l'augmentation ou du maintien du niveau d'entraînement » (Amoretti et al., 2020). Dans cette partie, les principaux effets l'exercice physique chronique au niveau du muscle squelettique seront abordés.

1.2.4.a. Adaptations générales du muscle squelettique

Le muscle squelettique est un tissu modulable répondant constamment à la demande énergétique. La répétition de contractions musculaires au cours d'un exercice physique représente un stimulus conduisant à des adaptations physiologiques *via* la libération par les myocytes de certains facteurs tels que les myokines et les facteurs de croissance. L'entraînement aérobie augmente le nombre de capillaires par fibre musculaire assurant ainsi un meilleur apport d'O₂. Dans les fibres musculaires de type I, il stimule la biogenèse mitochondriale pour faire face à l'augmentation du métabolisme oxydatif (Martin-Krumm, 2016). Une sur-régulation de la quantité et de la qualité des mitochondries accroît l'utilisation du glucose, des lipides et des protéines par les fibres musculaires améliorant ainsi le métabolisme énergétique aérobie (Lee and Song, 2018). Sur le long terme, la contraction musculaire a un effet direct sur l'homéostasie du glucose par l'augmentation de son transport et de sa consommation durant un exercice physique. Pendant la période post-exercice, les taux d'ARNm et l'expression protéique des transporteurs de glucose 4 (GLUT4) augmentent, rendant les cellules musculaires plus sensibles à l'insuline, ce qui favorise la capture du glucose qui s'accompagne d'une augmentation de la synthèse en glycogène. Chez un individu sain, l'entraînement pourrait augmenter jusqu'à 80% la quantité de protéine GLUT4 (Gautier and Mauvais-Jarvis, 2008). L'entraînement stimule aussi les capacités antioxydantes pour lutter et prévenir les effets néfastes des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) (Venditti et al., 2015). Ces aspects seront abordés dans le point 1.3.5.b (page 65). Un entraînement anaérobie, sollicitant principalement les fibres de type II, induit une hausse des stocks d'ATP et de PCr dans ce type de fibres (Martin-Krumm, 2016). Sous l'effet d'une activité musculaire, l'augmentation de la concentration en IGF (*Insulin-like growth factor*)-1 stimule les synthèses protéiques et joue un rôle important sur l'anabolisme musculaire résultant de l'entraînement de force (Aquatias et al., 2008). Toutes ces adaptations musculaires proviennent de l'activation et/ou de l'inhibition des voies de

signalisation qui régulent l'expression, la transcription et la traduction des gènes sensibles à l'entraînement conduisant à des modifications des quantités protéiques et des activités enzymatiques. L'ensemble de ces adaptations contribuent à l'amélioration des performances associées à l'entraînement (Hackney, 2019).

1.2.4.b. Adaptations des fibres musculaires

Les propriétés du muscle squelettique dépendent majoritairement des caractéristiques transmises par voie héréditaire mais ce ne sont pas les seules responsables des performances de l'individu (Poortmans and Boisseau, 2017). En effet, la composition en fibres musculaires peut être modifiée par d'autres facteurs comme l'entraînement, la stimulation neuromusculaire, les hormones et le vieillissement. La conversion des types de fibres induite par l'entraînement est déterminée par une répétition de stimuli au niveau des nerfs qui induit un relargage de Ca^{2+} intracellulaire stocké dans le réticulum sarcoplasmique. La modulation des flux de Ca^{2+} active la calcineurine, une phosphatase qui stimule le NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*). Ce facteur de transcription stimule la transcription de gènes impliqués dans l'activité nerveuse. Un autre élément important de la transmission du message nerveux *via* la calcineurine est représenté par le rôle des myogénines. En interagissant avec le génome, ces protéines régulent l'expression génique des protéines musculaires. Elles sont particulièrement impliquées dans l'augmentation des capacités oxydatives du muscle en réponse à l'entraînement. L'activation de ces différentes voies de signalisation calcique agit sur la différenciation métabolique et structurale des muscles. Elle est en grande partie responsable de l'augmentation de la synthèse des chaînes lourdes de myosine de type lent et de la biogenèse mitochondriale en réponse à l'entraînement physique (Aquatias et al., 2008; Qaisar et al., 2016).

Dans le cas de l'entraînement, le muscle squelettique doit s'adapter afin de répondre aux besoins spécifiques induits par les exercices répétés. D'une manière générale, des individus non-entraînés possèdent autant de fibres lentes que de fibres rapides. Il est désormais admis que les fibres rapides peuvent se transformer en fibres lentes sous l'action d'un entraînement de type endurance et notamment lorsque le volume de celui-ci est important (Wilson et al., 2012). Le pourcentage de fibres pouvant être transformé reste encore discuté. Cet entraînement peut augmenter jusqu'à 25% la surface des fibres lentes

(Bury, 2012). D'autres études menées chez le mammifère ont démontré qu'un entraînement de type force induisait une transition des fibres lentes vers les formes rapides (Wilson et al., 2012) et augmentait la masse musculaire. Cette augmentation résulte principalement d'une hypertrophie musculaire qui se définit par une hausse des constituants cellulaires ou un élargissement des espaces inter-fibrillaires (Bigard, 2004). Chez l'Homme, une hypertrophie musculaire se produit lorsque les muscles doivent répondre régulièrement à une intensité d'exercice qui dépasse 60-70% de la force maximale volontaire (Billat, 2017). La calcineurine est impliquée dans la régulation de l'hypertrophie chez le mammifère, la transcription du gène codant pour cette protéine est stimulée en réponse à un entraînement aérobie. Bien que la calcineurine soit conservée chez tous les eucaryotes, il a été démontré qu'elle ne jouait pas un rôle majeur dans la régulation de l'hypertrophie musculaire induite par l'entraînement chez la truite arc-en-ciel (Martin and Johnston, 2005). Chez le poisson, l'augmentation de la densité musculaire peut être la conséquence d'une hypertrophie et/ou d'une hyperplasie. L'hyperplasie musculaire, désignant l'augmentation du volume du muscle dû à un accroissement du nombre de cellules (McClelland, 2012), n'a pas encore été confirmée chez l'Homme (Bigard, 2004).

1.3. La mitochondrie

Les mitochondries, organites subcellulaires d'origine endosymbiotique, ont été identifiées pour la première fois il y a plus d'un siècle, mais leur véritable morphologie et leur nature dynamique (déplacement, fusion et fission) ont longtemps été ignorées (Sauvanet et al., 2010). Les mitochondries sont considérées comme des centrales énergétiques cellulaires puisqu'elles ont pour fonction principale la production d'énergie sous forme chimique utilisable par l'organisme : l'ATP. Les mitochondries peuvent être altérées par la sédentarité, les maladies métaboliques et le vieillissement par exemple, induisant alors une baisse de leur capacité à produire de l'énergie par le métabolisme aérobie au niveau du muscle squelettique (Joseph et al., 2016). Par le biais de modifications mitochondriales, les cellules sont capables de s'adapter face à différentes perturbations endogènes ou exogènes comme par exemple l'hypoxie, l'altitude, la température et l'exercice physique. Ainsi, chez le mammifère comme chez le poisson, pour faire face à l'augmentation de la demande énergétique, l'entraînement physique induit des adaptations

au niveau du muscle squelettique comme l'augmentation de la densité mitochondriale et des capacités oxydatives (Boushel et al., 2014; McClelland, 2012).

1.3.1. Structure

Dans les années 1950, la mitochondrie est présentée comme un organite allongé et isolé constitué de deux membranes : une externe et une interne présentant des invaginations appelées « crêtes mitochondriales » (Palade, 1953) (Figure 11). Ces deux membranes lipidiques divisent la mitochondrie en deux compartiments aqueux distincts : l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Dans le muscle squelettique de mammifères, la membrane externe mitochondriale peut s'associer à la membrane du réticulum sarcoplasmique pour faciliter les échanges d'ions (Ca^{2+}) et de lipides entre compartiments. Ces échanges jouent un rôle important dans de nombreuses voies de signalisation notamment dans de la dynamique mitochondriale, l'apoptose et la mitophagie. En revanche, chez certains poissons téléostéens, cette liaison entre réticulum sarcoplasmique et mitochondries n'existe pas dans les fibres rapides en raison de la proximité des mitochondries avec la périphérie des fibres musculaires (Boncompagni et al., 2020). La membrane externe est perméable aux éléments chimiques de faible poids moléculaire (acides gras, pyruvate, nucléotides, O_2 , H^+ ...) alors que la membrane interne est plus sélective. En effet, cette dernière est imperméable aux H^+ tandis que l' O_2 , l' H_2O , le CO_2 et le NO peuvent la traverser. La production d'ATP, effectuée par le complexe F_0F_1 ATP synthase, est couplée au système transporteur d'électrons (complexes I à IV et éléments mobiles de la chaîne respiratoire). L'ensemble de ces éléments, enchâssé dans la membrane interne mitochondriale, constitue la phosphorylation oxydative. Cette membrane forme des crêtes mitochondriales, augmentant ainsi sa surface (Mannella et al., 2013). La matrice mitochondriale contient les enzymes du cycle de Krebs, de la β -oxydation des acides gras, de l'oxydation des acides aminés et de défense antioxydante. L'ADN mitochondrial (ADN_{mt}) et les éléments essentiels pour sa réplication, sa transcription et sa traduction sont contenus dans cette matrice (MacKenzie and Payne, 2007). L' ADN_{mt} , d'origine maternelle, est circulaire et représente 1% de l'ADN cellulaire (Dolezal et al., 2006). Bien que les mitochondries possèdent leur propre ADN, elles ne sont considérées que comme semi-autonomes puisque plusieurs protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale sont codées par l'ADN nucléaire (ADN_{n}) (Westermann, 2010). Chez le mammifère comme chez le poisson,

les 37 gènes de l'ADN_{mt} codent pour 13 sous-unités protéiques de la phosphorylation oxydative (Attardi, 1985; Zardoya et al., 1995).

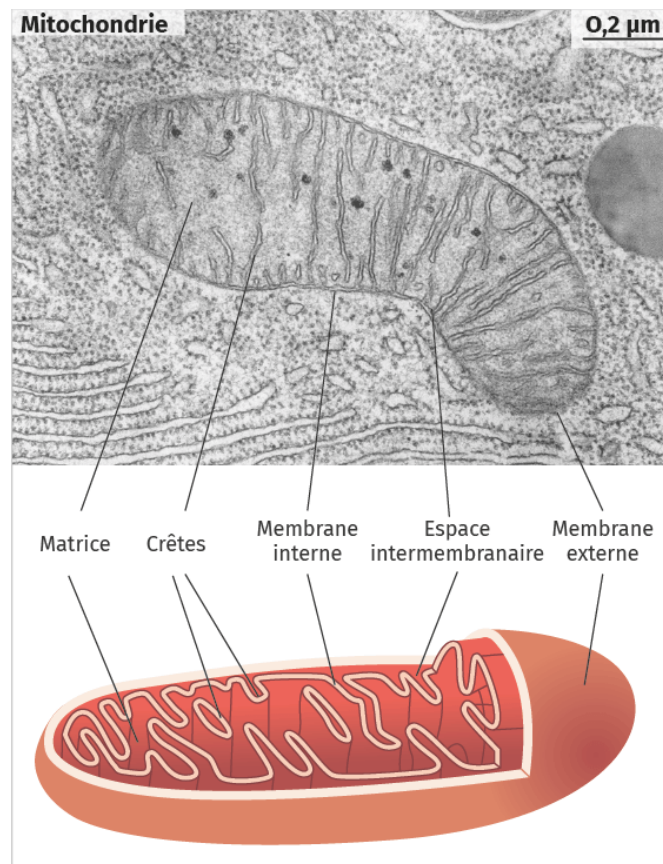


Figure 11. Photo de microscopie électronique et représentation schématique d'une mitochondrie. D'après Westermann (2010).

1.3.2. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont capables de changer de forme, de taille et d'emplacement afin de s'adapter aux fluctuations de la demande énergétique (Lee and Song, 2018). Ce sont des organites constamment en mouvement le long du cytosquelette (Westermann, 2010). La morphologie des mitochondries est gouvernée par la dynamique mitochondriale dans laquelle sont impliqués des processus conservés chez les eucaryotes tels que la fusion, la fission et la mitophagie (Sauvanet et al., 2010). Une coordination équilibrée entre ces processus est essentielle pour optimiser l'efficacité mitochondriale et le maintien d'une population mitochondriale saine (Lee and Song, 2018). Des anomalies de cette dynamique

dues par exemple à une accumulation de mutations et à la perte d'ADN_{mt} ont des conséquences néfastes sur les fonctions mitochondriales du muscle squelettique (Joseph et al., 2016; Westermann, 2010).

La fusion permet la formation d'un réseau de mitochondries interconnectées, nommé réticulum mitochondrial, permettant l'échange de protéines et de complexes de la phosphorylation oxydative (Lee and Song, 2018; Sauvanet et al., 2010; Westermann, 2010). Deux isoformes de mitofusines (MFN1 et MFN2), ancrées dans les membranes externes mitochondriales, permettent la fusion de ces membranes. La fusion des membranes internes est médiée par OPA1 (*Optic atrophy protein 1*) qui est localisée dans l'espace intermembranaire et reliée à la membrane interne mitochondriale (Chan, 2006). Ces trois dynamines (MFN1, MFN2 et OPA1) ont un domaine GTPase qui est essentiel pour les réactions de fusion des mitochondries (Chan, 2006; Ishihara et al., 2004).

La fission permet quant à elle la séparation d'une mitochondrie en deux. Elle est médiée par différents acteurs tels que MFF (*Mitochondria fission factor*), Fis1 (*Fission protein 1*) et DRP1 (*Dynamin related protein 1*). MFF et Fis1 sont situés à la surface de la membrane externe mitochondriale et recrutent DRP1 en cas de stress cellulaire. DRP1 forme alors une spirale autour des mitochondries qui les comprime et les sépare en deux en coupant les membranes (Chan, 2006; Wang and Youle, 2016). La fission produit également de nombreux fragments mitochondriaux qui seront éliminés par mitophagie (Twig et al., 2008). La mitophagie est induite en réponse à différents stress cellulaires comme des carences en nutriments, des conditions hypoxique ou apoptotique ainsi qu'au cours du processus de différenciation cellulaire (Goldman et al., 2010).

1.3.3. Biogenèse mitochondriale

1.3.3.a. Définition

Le nombre de mitochondries évolue constamment. Une mitochondrie peut se diviser de deux façons : soit par segmentation soit par partition. La segmentation se fait par fission tandis que la partition est un allongement d'une crête mitochondriale qui va diviser la mitochondrie. Dans les deux cas, il y a formation de deux mitochondries filles à partir d'une mitochondrie mère. La biogenèse se définit comme la création d'un nouvel organisme vivant à partir d'un organisme préexistant. Le terme « biogenèse mitochondriale » a souvent été

utilisé pour faire référence à la génération de nouvelles mitochondries, mais aussi à la croissance mitochondriale ainsi que la synthèse de nouveaux composants mitochondriaux (Jornayvaz and Shulman, 2010). La biogenèse mitochondriale est surtout contrôlée par le génome nucléaire par le biais des cascades transcriptionnelles impliquant des cofacteurs et des facteurs de transcription mais nécessite tout de même une coordination des génomes mitochondrial et nucléaire (Ventura-Clapier et al., 2019). Afin que les vertébrés puissent s'adapter aux conditions de stress environnementaux (exercice physique, hypoxie, température...), leurs cellules ont développé des mécanismes élaborés comme la régulation du nombre de mitochondries pour répondre aux besoins énergétiques (O'Brien and Mueller, 2010; Popov, 2020).

1.3.3.b. Quantification de la biogenèse mitochondriale

Il y a encore 20 ans, la méthode la plus courante pour évaluer la biogenèse mitochondriale consistait à utiliser une approche histologique soit par des techniques de fluorescence soit par la microscopie électronique en transmission permettant de mesurer directement la densité mitochondriale grâce à un système d'imagerie bidimensionnelle (Medeiros, 2008). En raison des contraintes de coût et de temps de ces techniques, des mesures de substitution plus accessibles et plus pratiques ont depuis été développées. L'évolution de la densité mitochondriale résulte de la production ainsi que de la dégradation de protéines mitochondriales. Le contenu mitochondrial peut donc être évalué *via* des mesures d'activités enzymatiques, du contenu de l'ADN_{mt}, de protéines et de lipides mitochondriaux clés. L'activité des principales enzymes impliquées dans le cycle de Krebs et dans la phosphorylation oxydative sont souvent utilisées. Un lien étroit existe entre le contenu mitochondrial et l'activité de la citrate synthase (CS), première enzyme limitante du cycle de Krebs (Larsen et al., 2012). L'activité de la CS est le biomarqueur le plus largement utilisé pour évaluer les capacités aérobies et la densité mitochondriale dans le muscle squelettique et donc la biogenèse mitochondriale (Leek et al., 2001). Il a également été démontré que l'activité des complexes I à IV de la respiration mitochondriale concordait avec la densité mitochondriale (Larsen et al., 2012).

1.3.4. La mitochondrie : entre production d'énergie et d'espèces réactives dérivées de l'oxygène

La mitochondrie est au centre de nombreux processus physiologiques. Elle va notamment intervenir dans la production d'énergie sous forme d'ATP ainsi que dans la production d'ERO. Cet organe est aussi impliqué dans d'autres phénomènes comme l'apoptose, l'homéostasie calcique, la thermogénèse ainsi que dans certaines voies cataboliques (cycle de Krebs, β -oxydation) et anaboliques (synthèse des hèmes ou des nucléotides pyrimidiques) (Wallace, 2012) (Figure 12).

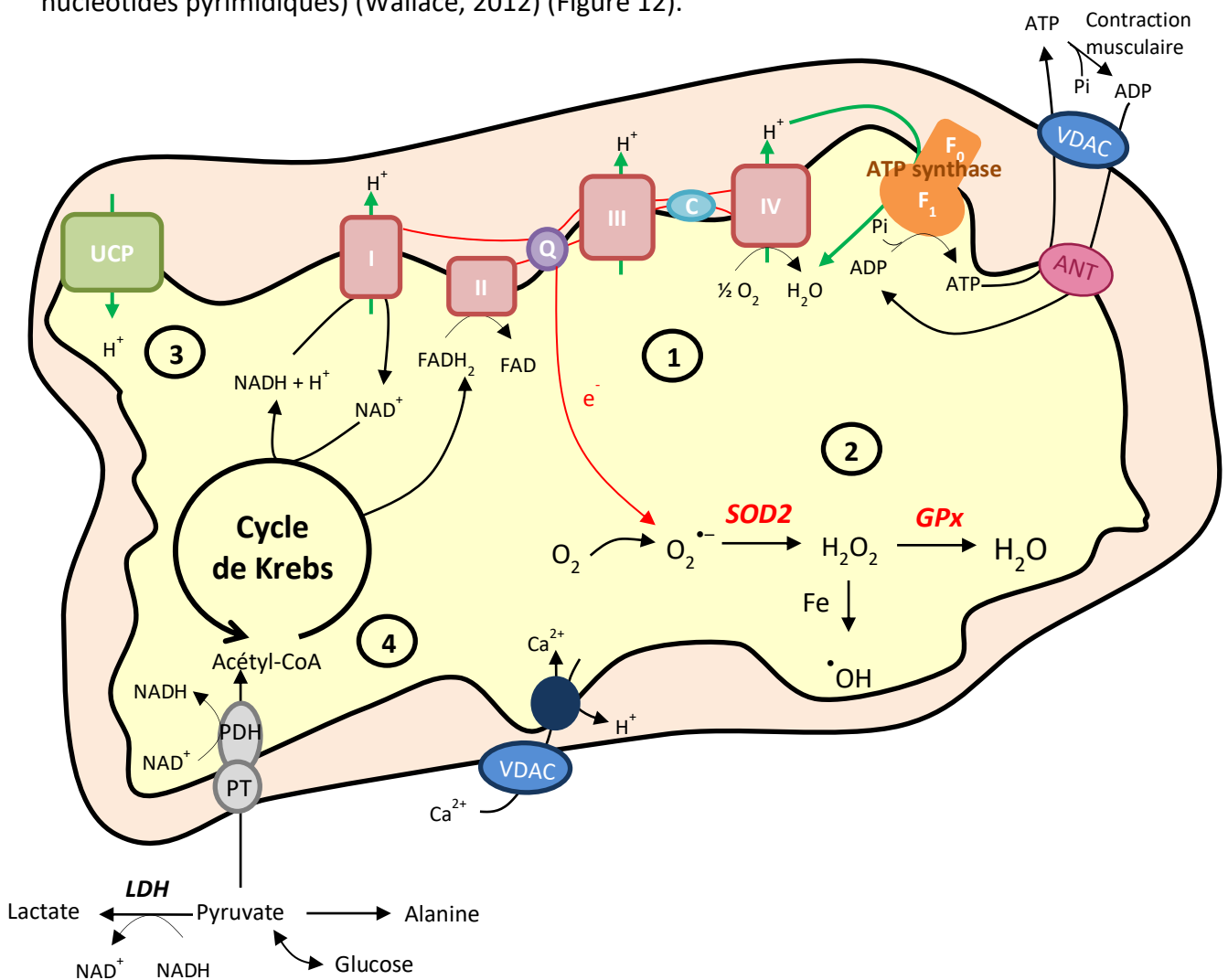


Figure 12. Principales fonctions de la mitochondrie. Les principaux processus représentés sont la synthèse d'ATP par la phosphorylation oxydative (1), la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène ainsi que leur dégradation par les enzymes antioxydantes (2), la thermogénèse *via* les UCPs (3) et le métabolisme du calcium et du glucose (cycle de Krebs et métabolisme du pyruvate) (4). D'après Wallace (2012).

ANT : adenine nucleotide translocator, PDH : pyruvate dehydrogenase, PT : pyruvate transporter, VDAC : voltage-dependent anion channel.

1.3.4.a. Fonction principale de la mitochondrie : la production d'ATP *via* la phosphorylation oxydative

La fonction principale de la mitochondrie est la production d'énergie métabolique. Le catabolisme des glucides, des lipides et des protéines fournit aux deux premiers complexes de la chaîne respiratoire les équivalents réduits transporteurs de protons et d'électrons : $\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 . La phosphorylation oxydative est composée d'une chaîne respiratoire mitochondriale, elle-même constituée de quatre complexes protéiques, de deux éléments mobiles (ubiquinone et cytochrome c) et d'un complexe V (F_0F_1 ATP synthase). L'ensemble de ces éléments protéiques, enchâssé dans la membrane interne mitochondriale, permet la production d'ATP (Figure 13).

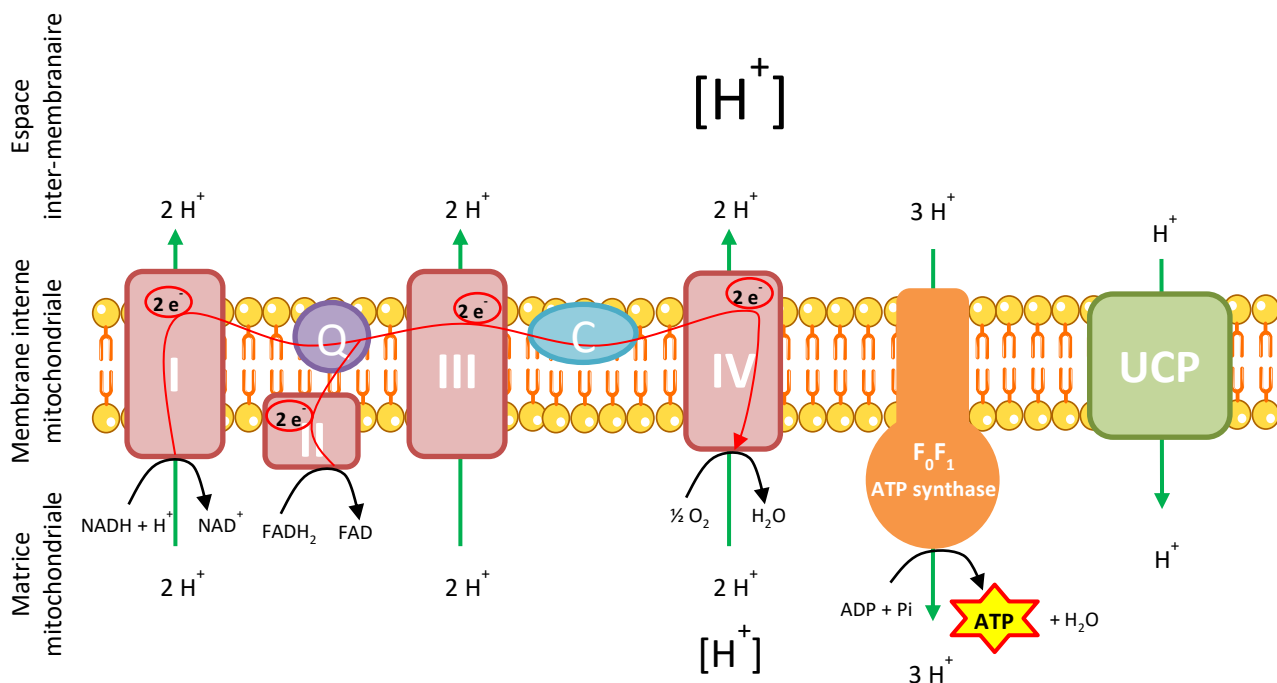


Figure 13. Fonctionnement de la phosphorylation oxydative. Enchâssée dans la membrane interne mitochondriale, la chaîne respiratoire mitochondriale est constituée de 4 complexes protéiques ainsi que de deux transporteurs d'électrons (ubiquinone ou coenzyme Q_{10} (Q) et cytochrome c (C)). Le complexe F_0F_1 ATP synthase de la phosphorylation oxydative permet la production d'ATP grâce au passage des protons dans le sens du gradient électrochimique. Les protons peuvent également passer dans la matrice mitochondriale grâce aux protéines découplantes (UCPs). D'après (Poortmans and Boisseau, 2017). $[\text{H}^+]$: concentration en protons.

Le complexe I (NADH – ubiquinone oxydoréductase), constitué de 45 sous-unités différentes dont 7 codées par l'ADN_{mt}, permet l'oxydation du NADH + H⁺ en NAD⁺. Les électrons ainsi libérés sont captés par le premier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale : la flavine mononucléotide, sous-unité du complexe I. Chaque couple d'électrons est ensuite transporté jusqu'au complexe III (ubiquinone – cytochrome c oxydoréductase) composé de 11 sous-unités par le biais d'un transporteur mobile situé dans la membrane interne mitochondriale : l'ubiquinone (ou coenzyme Q₁₀). Le complexe II (succinate – ubiquinone oxydoréductase), composé de 4 sous-unités, est une enzyme intrinsèque de la membrane interne mitochondriale qui catalyse la conversion du FADH₂ en FAD. Chaque couple d'électrons libéré par cette réaction est aussi transporté par le biais de l'ubiquinone jusqu'au complexe III. Le complexe III transfère les électrons au complexe IV par l'intermédiaire du cytochrome c, autre transporteur mobile de la chaîne respiratoire. Le complexe IV (cytochrome c oxydase ou COX) est composé de 13 sous-unités dont 3 codés par l'ADN_{mt}. Grâce aux électrons transportés le long de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce complexe réduit une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau. L'O₂ est l'accepteur final d'électrons.

L'énergie des réactions d'oxydo-réduction permet un transfert de H⁺ de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire contre le gradient de concentration au niveau des complexes enzymatiques I, III et IV. Le gradient électrochimique ainsi créé suite à l'accumulation des H⁺ dans l'espace inter-membranaire sera utilisé par le complexe V (F₀F₁ ATP synthase). Le complexe V de la phosphorylation oxydative est composé de deux parties : un domaine catalytique composé de 5 sous-unités en contact avec la matrice mitochondriale et un domaine ancré dans la membrane interne permettant le retour des protons dans cette matrice. Le nombre de sous-unités de ce dernier varie en fonction des espèces. Le domaine catalytique du complexe V catalyse la réaction suivante : ADP + Pi → ATP. L'ATP ainsi formé dans la mitochondrie est exporté dans le cytosol grâce à l'ANT (*adenine nucleotide translocator*) et échangé contre de l'ADP cytoplasmique par cette même enzyme. Plusieurs maladies humaines mitochondriales sont causées par des mutations des gènes codant pour le complexe V comme l'atrophie optique de Leber (Papa et al., 2012).

Une partie des H⁺ accumulés au niveau de l'espace inter-membranaire rejoint la matrice mitochondriale sans passer par le complexe F₀F₁ ATP synthase mais par des

protéines découplantes (UCPs, de l'anglais *Uncoupling proteins*). Dans ce cas, les H⁺ ne contribuent pas à la production d'ATP, on parle alors de « découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale ». Le gradient est alors dissipé sans production d'énergie sous forme d'ATP. Toutefois, il est maintenu par l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'UCP1 est exclusivement localisée dans le tissu adipeux brun des mammifères et joue un rôle dans la thermogénèse en augmentant considérablement la conductance des H⁺ de la membrane interne mitochondriale. Elle représente plus de 10% des protéines membranaires (Brand and Esteves, 2005). Chez le mammifère, l'UCP2 est exprimée de façon ubiquitaire et l'UCP3 est principalement localisée dans le muscle squelettique (Bo et al., 2008), représentant 0,01% à 0,1% des protéines membranaires (Brand and Esteves, 2005). Étant aussi présentes chez les ectothermes comme les poissons, les UCPs assureraient des fonctions autres que la thermogénèse. Chez la truite arc-en-ciel, l'UCP2 est ubiquitaire (Coulibaly et al., 2006) et l'UCP3 est principalement exprimée dans le foie et le cœur (Kim et al., 2004). La séquence peptidique et les fonctions physiologiques de ces UCPs sont très similaires et il existe des similitudes inter-espèces (poisson et mammifère) (Coulibaly et al., 2006). Ces deux UCPs ont un rôle d'antioxydant indirect et protègent ainsi les cellules des dommages liés aux ERO (Brand and Esteves, 2005). Cette dernière notion sera abordée dans le point 1.3.4.b (page 59).

1.3.4.b. La mitochondrie : une source d'ERO

La mitochondrie est au centre du paradoxe de l'oxygène. Cette molécule est essentielle à la survie cellulaire par son rôle d'accepteur final d'électrons dans la phosphorylation oxydative mais peut aussi devenir toxique en tant que source d'ERO. Les ERO sont produites en très faible quantité en condition physiologique et sont générées en grande quantité lors d'un stress oxydatif pouvant alors endommager la structure des macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipides). Afin d'éviter la toxicité potentielle des ERO tout en préservant leurs propriétés de signalisation, il est essentiel que les mitochondries contrôlent leur production et leur dégradation (Kuksal et al., 2017). L'équilibre des ERO mitochondriales dépend à la fois du taux de réduction de l'O₂ et des capacités antioxydantes (Aon et al., 2010). Les mammifères, tout comme les poissons, sont dotés de systèmes antioxydants mais leur action peut être dépassée dans certaines

circonstances entraînant ainsi un stress et des dommages oxydatifs (Kuksal et al., 2017; Otto and Moon, 1996).

Les différents types d'ERO

La molécule d'O₂ a une structure biradicale libre due à ses deux électrons célibataires. L'O₂ peut être réduit en eau par quatre électrons au niveau de la COX de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figures 12 et 13) ou subir une réduction univalente, au niveau de l'ubiquinone par exemple, conduisant à la formation d'un anion superoxyde (O₂^{•-}). La dangerosité de l'O₂^{•-} réside dans le fait que son électron célibataire cherche à s'apparier à d'autres molécules, se traduisant par une attaque radicalaire. L'O₂^{•-}, potentiellement toxique, peut être dismuté en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) de façon spontanée ou par l'action de la superoxyde dismutase. Le H₂O₂ est une molécule et non un radical libre du fait de l'appariement entre ses électrons. La dégradation du H₂O₂ est possible grâce à deux enzymes antioxydantes : la catalase et la glutathion peroxydase. Bien que moins réactives que les autres ERO, le H₂O₂ est une molécule tout de même toxique. Il a la capacité de former l'oxygène singulet (¹O₂), un état métastable très actif de la molécule d'O₂, mais aussi le radical hydroxyle ([•]OH) en présence de cation métallique Fe²⁺ *via* la réaction de Fenton (Gardès-Albert et al., 2003; Maetzke and Knak Jensen, 2006). Le [•]OH est l'espèce radicalaire la plus nocive pour l'organisme. Du fait de sa demi-vie courte (10⁻⁹ seconde), sa réactivité est élevée (Pryor, 1986).

Sources cellulaires des ERO

En condition physiologique, certains organites cellulaires tels que les lysosomes, le réticulum endoplasmique lisse, les peroxysomes, le noyau et principalement les mitochondries produisent des ERO (Turrens, 2003). Les NAD(P)H oxydases (NOX), les xanthine oxydases (XO), les lipoxygénases et les cyclo-oxygénases sont également impliquées dans la production d'ERO (Radak et al., 2012).

Au niveau de la membrane interne mitochondriale, le transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale s'accompagne d'une perte d'électrons. Cette fuite d'électrons est notamment localisée au niveau de l'ubiquinone qui transfère les couples d'électrons des complexes I et II au complexe III. L'O₂ subit alors une réduction univalente et se transforme en O₂^{•-}, lui-même à l'origine de la formation d'autres ERO (H₂O₂ et [•]OH)

(Turrens, 2003). Chez les organismes aérobies, la fuite d'électrons d'origine mitochondriale fait partie des sources majeures de production d'ERO cellulaires dans le muscle squelettique (Radak et al., 2012). Cette fuite d'électrons est cependant limitée puisque seulement 2% de l'O₂ présent au niveau de la mitochondrie serait transformé en ERO (Gardès-Albert et al., 2003).

Cibles biologiques des ERO

L'ADN

Les réactions induites par les ERO, telles que des modifications de bases azotées, des cassures simple et double-brin, conduisent à des altérations de l'ADN_n et l'ADN_{mt}. Ces modifications peuvent être responsables d'altérations des messages génétiques impliqués dans les processus liés au déclenchement de cancers, du vieillissement cellulaire et de diverses pathologies comme le diabète (Haleng et al., 2007).

Les protéines

Les protéines sont de potentielles cibles d'attaque pour les ERO. Sous l'effet de ceux-ci, les chaînes latérales des acides aminés peuvent être oxydées entraînant une fragmentation et/ou la formation de liaisons croisées intra- ou inter-chaînes. Indirectement, les acides aminés et les protéines peuvent également être confrontés à la glyco-oxydation et à la lipoxydation. La majorité des altérations sont irréversibles et peuvent engendrer des modifications fonctionnelles importantes. Ces oxydations forment des composés carbonylés qui sont des marqueurs biologiques pour évaluer le stress oxydatif (Haleng et al., 2007).

Les lipides

Le radical hydroxyle •OH est capable de réagir avec des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant alors une réaction en chaîne de proche en proche de peroxydation lipidique. Cette réaction aboutit à une altération de la fluidité membranaire conduisant à la mort de la cellule (Haleng et al., 2007). Par exemple, la peroxydation lipidique de l'acide arachidonique par les ERO conduit à la production d'isoprostanes. Le dosage de l'isoprostane constitue une approche pertinente pour évaluer l'état de stress oxydatif *in vivo* (Montuschi et al., 2004). Les lipoprotéines circulantes, quant à elles, peuvent aussi être soumises à des attaques radicalaires conduisant à la formation de LDL (*Low Density Lipoprotein*) oxydées. Les macrophages qui captent ces LDL oxydées se

transforment en cellules spumeuses qui ont un rôle dans les premières étapes de l'athérosclérose (Haleng et al., 2007).

Défenses antioxydantes

Les défenses antioxydantes sont communes ou très similaires chez tous les vertébrés (Reischl et al., 2007) et protègent les macromolécules biologiques en limitant les effets des ERO (Steinbacher and Eckl, 2015). Elles peuvent être de nature enzymatique ou non.

Antioxydants non enzymatiques

L'alimentation sous forme de fruits et de légumes apporte de nombreux antioxydants non enzymatiques d'origine exogène non synthétisés par l'organisme. La vitamine C participe au maintien de l'intégrité des tissus vasculaires et conjonctifs en protégeant les phospholipides membranaires des dommages peroxydatifs. La vitamine E peut s'insérer dans les membranes cellulaires, bloquant ainsi la réaction en chaîne de peroxydation lipidique. Elle forme des dérivés radicalaires peu réactifs incapables d'attaquer les substrats lipidiques. La plupart des caroténoïdes comme le β -carotène interagissent avec l' $^1\text{O}_2$, responsable des dommages causés par les rayons UV au niveau de la peau et de la cataracte. Le lycopène, caroténoïde contenu dans les tomates, est le meilleur antioxydant des 600 caroténoïdes naturels et est associé à une baisse de risque de cancer. Les flavonoïdes ont une action antioxydante dans les systèmes de peroxydation lipidique en agissant contre l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Pisoschi and Pop, 2015).

Certains des antioxydants d'origine endogène piègent les radicaux libres en captant l'électron célibataire et les transforment en molécules ou en ions stables (Coulter et al., 2006). Parmi les antioxydants non enzymatiques endogènes, l'acide urique protège les membranes érythrocytaires des peroxydations lipidiques en piégeant $^1\text{O}_2$ et $\bullet\text{OH}$. Le coenzyme Q_{10} réduit, premier transporteur d'électrons de la chaîne mitochondriale de transport des électrons, protège les membranes cellulaires et les lipoprotéines plasmatiques des attaques radicalaires. Il est capable de piéger l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ en le transformant en H_2O_2 , pris en charge par la catalase ou la glutathion peroxydase. La mélatonine, connue pour son activité protectrice contre le stress oxydatif mitochondrial, est capable de piéger certains ERO telles que $\text{O}_2^{\bullet-}$ et $\bullet\text{OH}$.

La production d'ERO mitochondriales peut également être régulée de façon indirecte. Les UCP2 et UCP3 auraient un rôle de défenses antioxydantes en augmentant la vitesse de transfert des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et notamment au niveau de l'ubiquinone. En effet, grâce à leur action découplante de la phosphorylation oxydative, ceux-ci limiteraient la fuite d'électrons et atténueraient donc la production de radicaux libres (Brand and Esteves, 2005). Des études ont montré que des souris *knock-out* *Ucp2* et *Ucp3* produisent davantage d'ERO respectivement dans les macrophages (Arsenijevic et al., 2000) et dans le muscle squelettique (Vidal-Puig et al., 2000).

Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques de nature endogène sont la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase (Figure 14). Quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc ont également leur importance puisqu'ils servent de cofacteurs aux enzymes antioxydantes.

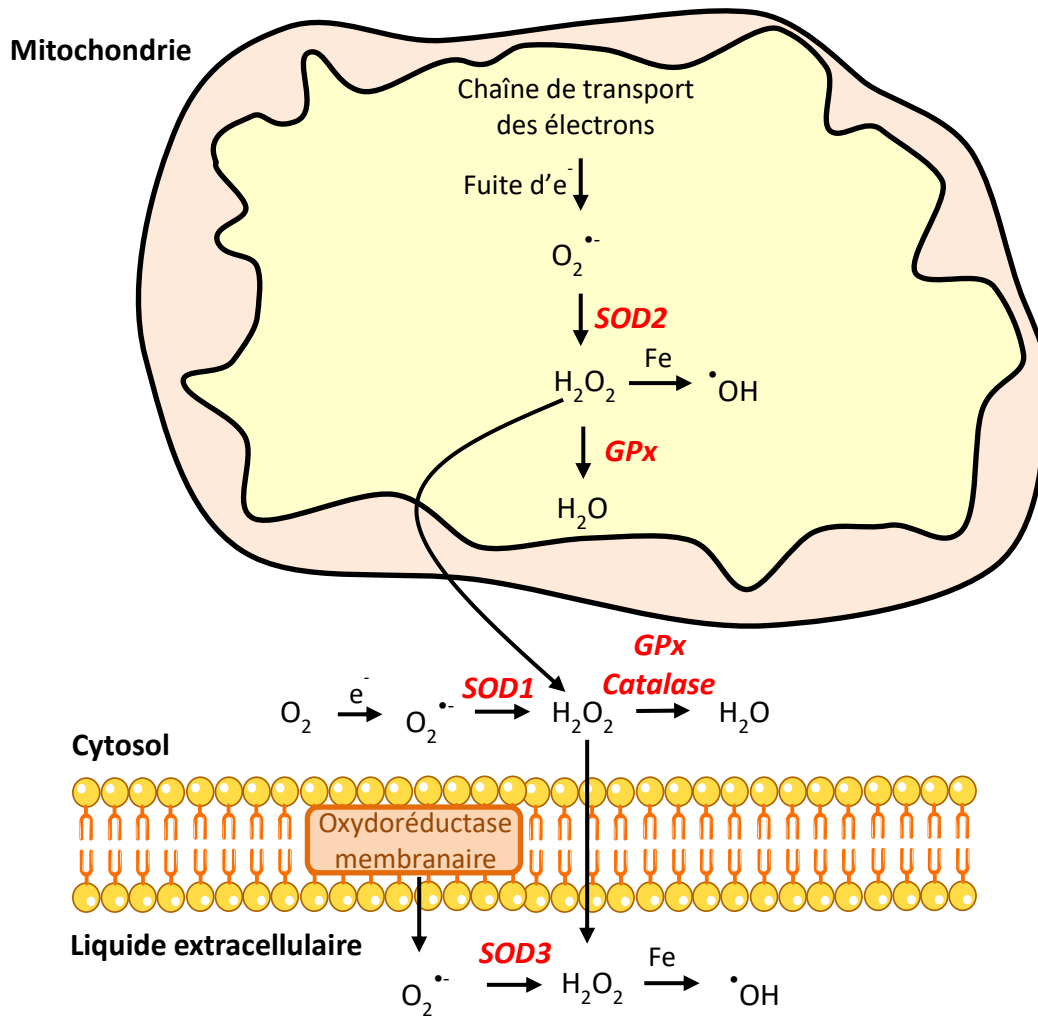


Figure 14. Localisation (cytosolique et mitochondriale) et mode d'action des enzymes antioxydantes. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$) traversent difficilement la membrane mitochondriale tandis que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) passe facilement au travers des membranes mitochondriale et plasmique. Les SOD transforment $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 qui est pris en charge par les GPx et la catalase afin d'être dégradé en H_2O . D'après Jackson (2005).

La superoxyde dismutase (SOD) transforme l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Le H_2O_2 ainsi formé est pris en charge soit par la catalase soit par la glutathion peroxydase. Cette enzyme est retrouvée sous trois isoformes. Il existe deux sortes de CuZn-SOD : la SOD1, exprimée dans le cytosol, et la SOD3, présente au niveau extracellulaire. La SOD2 (Mn-SOD) est exprimée dans la matrice et l'espace inter-membranaire mitochondriaux.

La catalase est exprimée dans la plupart des cellules, tissus et organes. Sa concentration est importante dans le foie et les érythrocytes. Cette enzyme permet la dégradation du H₂O₂ en H₂O.

La glutathion peroxidase (GPx) est une sélénoprotéine existant sous cinq isoformes. Elle catalyse à la fois la réduction du H₂O₂ et des hydroperoxydes organiques en H₂O ou en alcools correspondants. C'est un système enzymatique de détoxification des peroxydes lipidiques, sous-produits réactifs dérivés de l'oxydation des AGPI par les radicaux libres. Le glutathion réduit (GSH) fonctionne comme un donneur d'électrons (Pisoschi and Pop, 2015).

1.3.5. Mitochondrie et exercice physique

Il est désormais reconnu que l'entraînement en endurance induit des effets bénéfiques sur la santé en stimulant la biogenèse mitochondriale ainsi que les capacités aérobies du muscle squelettique. La biogenèse mitochondriale est médiée par différentes voies de signalisation cellulaire où PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α*) joue un rôle central pour la majorité d'entre elles. De plus, l'entraînement renforce les systèmes de défenses antioxydantes endogènes afin de réguler les ERO produits durant l'exercice physique (He et al., 2016). Par ailleurs, il stimule également des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale et la mitophagie améliorant ainsi la qualité des mitochondries (Joseph et al., 2016).

1.3.5.a. Stimulation de la biogenèse mitochondriale par l'entraînement physique

Les premières études menées par John O. Holloszy ont montré qu'il existait un lien étroit entre contenu mitochondrial et exercice physique (Holloszy, 1967). Plusieurs événements induits par l'exercice physique sont perçus comme un stress par la cellule tels que l'augmentation de la consommation d'O₂, des ratios AMP/ATP et NAD⁺/NADH, de la production d'ERO, de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire ou encore la stimulation AMP cyclique. La répétition de ces différents stress cellulaires conduit à l'amélioration du métabolisme mitochondrial et de la phosphorylation oxydative *via* la stimulation de la biogenèse mitochondriale et de la dynamique mitochondriale au niveau du muscle squelettique (Huertas et al., 2019). Parmi les voies de signalisation, nous nous sommes

focalisés sur la voie AMPK–PGC-1 α , connue pour être l’une de celles qui stimuleraient le plus la biogenèse mitochondriale et les capacités oxydatives dans le muscle squelettique au cours d’un entraînement physique (Jäger et al., 2007; Stepto et al., 2012; Trewin et al., 2018) (Figure 15).

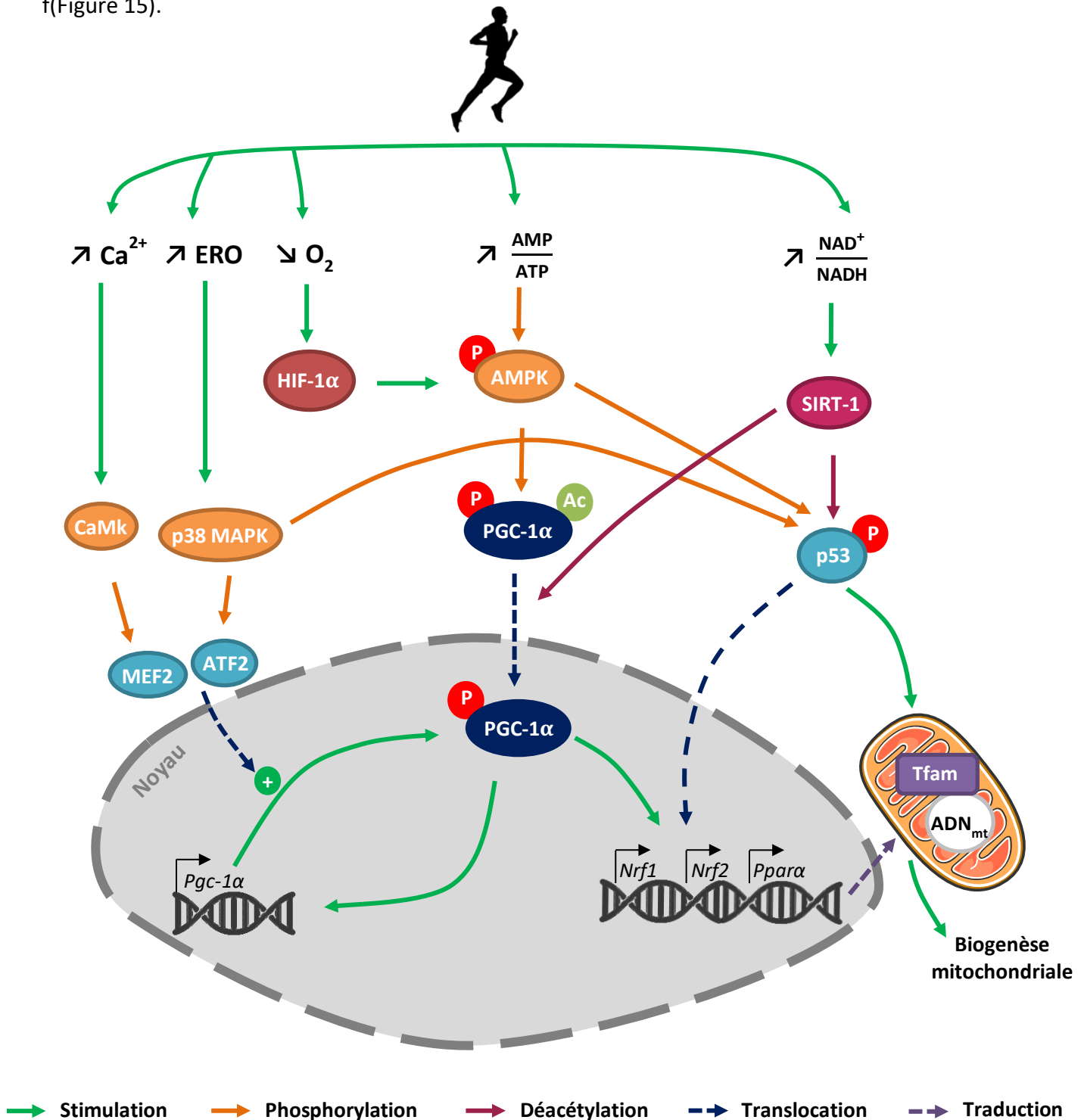


Figure 15. Stimulation de la biogenèse mitochondriale par l’exercice physique *via* différentes voies de signalisation dans le muscle squelettique. D’après Huertas et al. (2019).

AC : acétylation, P : phosphorylation.

PGC-1 α , acteur central de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique

La découverte du cofacteur de transcription PGC-1 α a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires déclenchés par les exercices physiques répétés. L'activation de PGC-1 α , par l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) par exemple, induit sa translocation vers le noyau afin d'orchestrer la biogenèse mitochondriale mais aussi d'autoréguler sa propre expression. PGC-1 α active certains facteurs de transcription nucléaires comme NRF (*Nuclear factor erythroid related factor*)-1 et -2 (Huertas et al., 2019). NRF-1 active Tfam (*Transcription factor mitochondrial A*), effecteur final de la réplication et de la transcription de l'ADN_{mt} (Gureev et al., 2019; Popov, 2020). NRF-2, quant à lui, contrôle l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes, maintenant ainsi l'homéostasie des ERO (Aquilano et al., 2013). PGC-1 α est un acteur clé dans l'homéostasie des ERO puisqu'il initie une cascade de réponses inhibant leur production et que parallèlement, son expression est stimulée par les ERO (St-Pierre et al., 2006). Par ailleurs, PGC-1 α régule le taux de glucose en contrôlant l'expression des GLUT4 dans le muscle squelettique (Olesen et al., 2010).

L'AMPK, retrouvé dans toutes les cellules eucaryotes, est un senseur métabolique qui participe au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire en réponse à de nombreux signaux métaboliques. Cette enzyme ubiquitaire se présente sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique (α) et de deux sous-unités régulatrices (β et γ). Chacune de ces sous-unités sont représentées par différentes isoformes codées par des gènes distincts. Chez les vertébrés, les cellules doivent maintenir une balance énergétique stable caractérisée par un ratio ATP/ADP élevé. Lorsque cette balance énergétique est perturbée par un facteur environnemental comme l'exercice physique ou l'hypoxie, la production d'ATP décroît et le ratio AMP/ATP augmente, favorisant ainsi l'activation de l'AMPK. Ensuite, la phosphorylation du PGC-1 α par l'AMPK stimulera entre autres la phosphorylation oxydative et la biogenèse mitochondriale (Foretz et al., 2006). L'activation de l'AMPK est aussi induite par HIF-1 α (*Hypoxia-inductible factor-1 α*) qui est stimulé par l'augmentation de la consommation en O₂ (Huertas et al., 2019). De plus, l'activité de l'AMPK est sensible à l'état redox cellulaire. Il a, par exemple, été démontré que le H₂O₂ stimule son activité (Trewin et al., 2018).

Toutefois, l'expression de PGC-1 α n'est pas uniquement stimulée par l'AMPK. En effet, son activité est aussi coordonnée par les kinases liées au Ca²⁺ et aux ERO, facteurs sensibles

au stress induit par l'exercice physique. Dans ce cas, la transcription de PGC-1 α est contrôlée par la protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendantes (CaMK) et les p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*), qui phosphorylent respectivement MEF2 (*Myocyte enhancer factor-2*) et ATF2 (*Activating transcription factor-2*). Ces deux facteurs de transcription sont ensuite transloqués dans le noyau où ils vont stimuler la transcription de PGC-1 α (Huertas et al., 2019).

Autres voies de signalisation stimulant la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique

Au cours de cette dernière décennie, un facteur de transcription régulant le contenu et la fonction mitochondriale au cours de l'entraînement physique a été identifié : la protéine suppresseur de tumeur p53. Comme PGC-1 α , son expression est aussi stimulée par l'AMPK et par les p38 MAPK. La stimulation de p53 favorise son déplacement vers le noyau où elle peut réguler plusieurs protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire. Ce facteur de transcription peut également affecter la transcription de l'ADN_{mt} en formant un complexe avec Tfam et l'ADN_{mt} (Huertas et al., 2019).

En réponse à la hausse de la demande énergétique, le taux de NAD⁺ est augmenté suite à l'utilisation de NADH + H⁺ par le complexe I de la phosphorylation oxydative. La concentration en NAD⁺ et le ratio NAD⁺/NADH reflètent les états redox et énergétique cellulaires. Chez les mammifères, la famille des sirtuines comprend 7 paralogues (SIRT1-7) exprimés de manière ubiquitaire. L'activité de SIRT1 est renforcée en cas de hausse des taux de NAD⁺ (Cantó and Auwerx, 2012). Les principales cibles de SIRT1 sont PGC-1 α et p53 (Huertas et al., 2019), SIRT1 les active par le biais d'une modification post-traductionnelle : la déacétylation (Rasouri et al., 2007). Chez le mammifère, l'inhibition de SIRT1 réduit les performances à l'exercice en diminuant le contenu mitochondrial dans le muscle squelettique et en altérant donc la respiration mitochondriale. En revanche, sa stimulation augmente l'expression des protéines de la chaîne respiratoire codées par les génomes mitochondrial et nucléaire par le biais de la déacétylation de PGC-1 α (Drake et al., 2016).

Chez le poisson, bien que des facteurs de transcription semblent réguler le contenu mitochondrial en réponse à l'entraînement physique dans le muscle squelettique de poisson-zèbre, le co-activateur PGC-1 α ne jouerait pas un rôle direct dans la régulation de la CS

(LeMoine et al., 2010). Toutefois, d'autres auteurs ont montré une expression coordonnée des transcrits de PGC-1 α et de la CS dans le muscle rouge de la truite arc-en-ciel (Magnoni et al., 2014).

1.3.5.b. ERO et exercice physique

Il est désormais reconnu et largement documenté qu'un exercice physique aigu a pour conséquence une hausse de la production d'ERO. Cette production d'ERO peut se traduire par un stress oxydatif et une inflammation localisés pouvant causer des dommages musculaires. En revanche, une répétition d'exercices appropriés (d'intensité modérée à élevée) stimule les réponses adaptatives et renforce les systèmes de défenses antioxydantes endogènes pour lutter contre l'excès d'ERO, maintenant ainsi l'équilibre redox des cellules musculaires (He et al., 2016).

Sources de production d'ERO dans le muscle squelettique au cours d'un exercice physique

Durant un exercice physique, les contractions musculaires conduisent à l'accumulation d'ERO provenant de différentes sources de production telles que les mitochondries, les NOX et les XO (He et al., 2016). La mitochondrie a longtemps été citée comme principale source de production d'ERO au niveau du muscle squelettique lors d'un exercice physique mais aujourd'hui les avis sont controversés. En effet, la production d'O₂^{•-} est plus élevée dans le muscle au repos que lors d'une contraction musculaire, suggérant ainsi que la mitochondrie n'est peut-être pas la source principale d'ERO durant un exercice physique (Powers and Jackson, 2008). Les NOX, situées dans les membranes des phagocytes plasmatiques et dans les fibres musculaires (sarcolemme et tubules T), sont de puissants producteurs d'ERO durant les contractions musculaires. Les XO, présentes dans l'endothélium vasculaire et le cytosol des fibres musculaires, contribuent à la production d'O₂^{•-} durant les contractions isométriques (He et al., 2016). Le stress oxydatif induit par l'augmentation de la production d'ERO lors d'un exercice physique est régulé par les systèmes antioxydants lors de la période de repos. Toutefois, les adaptations mises en place pour lutter contre ce stress oxydatif sont limitées et transitoires (Radak et al., 2012).

Régulation des ERO dans le muscle squelettique par l'entraînement physique

L'entraînement physique induit une augmentation aiguë et répétée de stress métabolique, thermique, hypoxique, mécanique et oxydatif impliquant ainsi une adaptation physiologique pour y faire face (Merry and Ristow, 2016).

Les ERO générées au niveau mitochondrial au cours des contractions musculaires dans les muscles squelettiques actifs sont considérées comme signaux fondamentaux pour déclencher l'hormèse mitochondriale (ou *mitohormesis*) (Figure 16). Plus généralement, la théorie de l'hormèse se définit comme le processus par lequel un organisme s'adapte face à un stress métabolique afin de retrouver une homéostasie. La théorie de l'hormèse mitochondriale repose sur le principe que de légères perturbations de l'homéostasie mitochondriale, induit par un stress oxydatif par exemple, active les voies de signalisation cellulaires qui stimulent par exemple la biogenèse mitochondriale, les défenses antioxydantes et la sensibilité à l'insuline (Steinbacher and Eckl, 2015). En effet, les ERO ont un rôle essentiel dans l'activation des voies de signalisation cellulaire conduisant aux adaptations physiologiques comme la stimulation de NRF-2. Ce facteur de transcription redox sensible est le premier responsable de la stimulation de la transcription des gènes codant pour les systèmes de défenses antioxydantes (He et al., 2016). L'entraînement physique augmente les activités de la SOD et de la GPx dans le sang et dans les muscles squelettiques (He et al., 2016). Toutefois, les activités des enzymes antioxydantes sont dépendantes des paramètres de l'exercice physique (intensité, durée, fréquence et volume). En effet, chez le mammifère, l'activité de la GPx est davantage stimulée avec un HIIT comparé à un MICT (Criswell et al., 1993) et d'autant plus lorsque la durée du HIIT est longue (30 minutes *versus* 60 minutes) (Powers et al., 1994). Ainsi, ces adaptations permettent aux individus entraînés d'être moins exposés que les individus non-entraînés aux effets néfastes des ERO en cas de futures perturbations lors d'un exercice. Grâce aux adaptations cellulaires, les sujets entraînés tolèrent mieux le stress oxydatif généré durant un exercice physique (He et al., 2016). De plus, en améliorant la capacité de dégradation des ERO, l'entraînement physique est considéré comme une mesure préventive contre les maladies impliquant un stress oxydatif (Bouزيد et al., 2015).

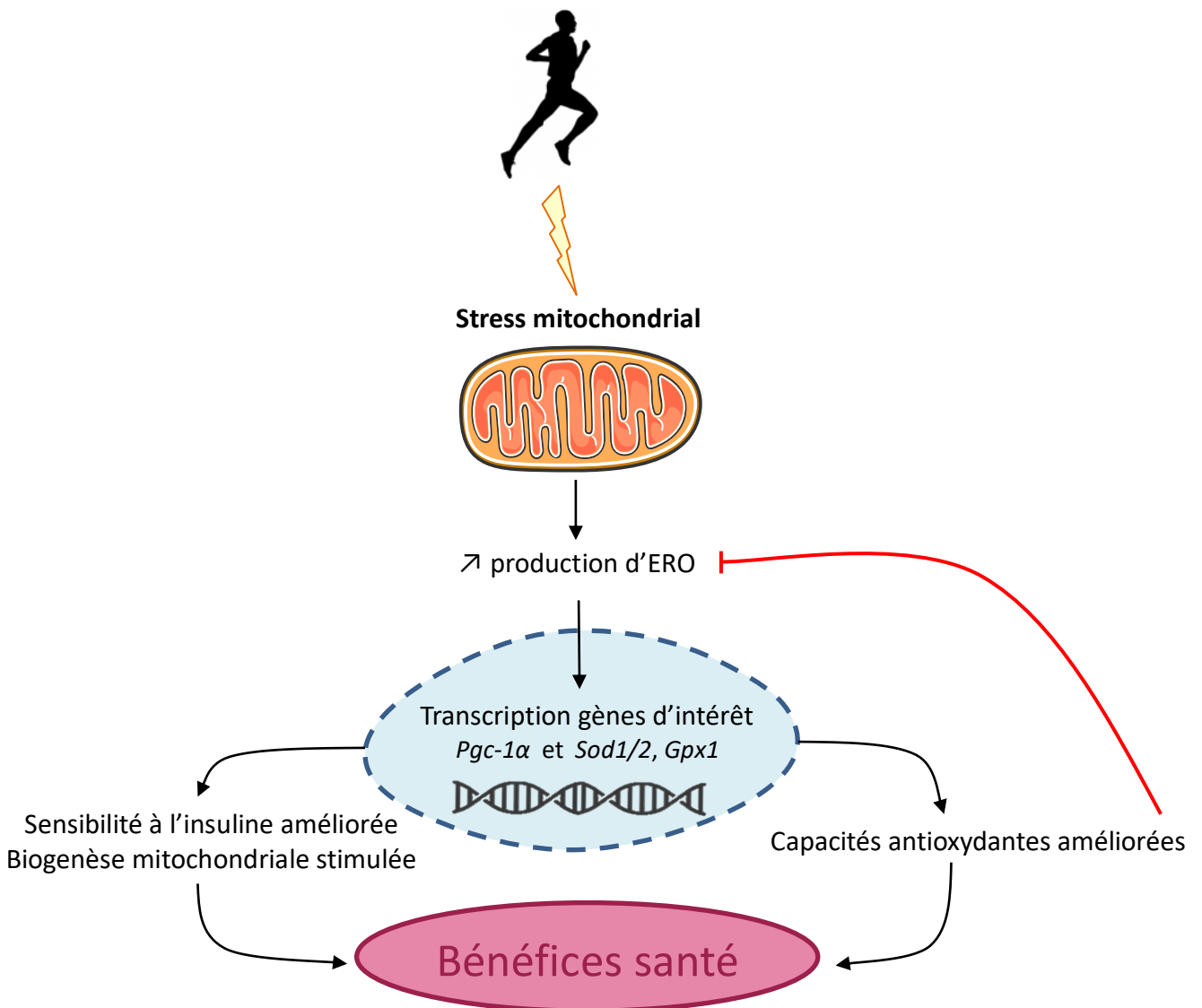


Figure 16. Théorie de l'hormèse mitochondriale (ou *mitohormesis theory*). L'hormèse mitochondriale fait le lien entre exercice physique, production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) et défenses antioxydantes. L'exercice physique induit une production d'ERO induisant, sur le long terme, une stimulation de l'expression de PGC-1 α qui améliore la sensibilité à l'insuline et stimule la biogenèse mitochondriale ainsi que de l'expression des SOD1 et 2 et de GPx1. Les défenses antioxydantes protègeront la cellule contre de futurs stress. Ces adaptations diminuent le risque de développement de pathologies. D'après Merry and Ristow (2016) et Ristow et al. (2009).

1.4. Le poisson : un modèle animal dans le domaine de la santé

La recherche fondamentale en biologie est essentielle pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires. D'un point de vue méthodologique, de nombreux modèles animaux et cellulaires sont utiles. Le choix du modèle doit être pertinent et s'effectue en fonction des problématiques posées (Neufer et al., 2015). Parmi les différents modèles animaux possibles, le poisson est utilisé en recherche fondamentale et biomédicale (Li et al., 2010). Il fait partie des modèles utilisés pour mimer la pathogénèse de la maladie chez l'Homme. Grâce au développement des techniques de séquençage, le génome de plusieurs espèces de poissons est désormais connu dont celui du poisson-zèbre (*Danio rerio*) et de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Jang et al., 2020).

Le poisson-zèbre a montré son intérêt dans de nombreuses avancées médicales comme par exemple les dystrophies musculaires congénitales (Kawahara et al., 2011), le diabète (Falkmer, 1961), en cancérologie (Meeker and Trede, 2008)... Leur facilité d'élevage en grand nombre en laboratoire (Li et al., 2010) ainsi que le développement, l'accessibilité et la transparence des embryons (Ekker and Akimenkko, 1991) sont quelques exemples de ses atouts.


Plus récemment, le killi turquoise (*Nothobranchius furzeri*) d'Afrique est utilisé comme modèle animal dans le cadre de l'étude des effets du vieillissement. En effet, il a une durée de vie d'environ 6 mois comparativement au poisson-zèbre (3 à 5 ans) ou au rat et à la souris (3 ans). Les mécanismes liés au vieillissement sont communs à ceux des vertébrés supérieurs tels que le déclin de la fertilité, le raccourcissement des télomères, les dégénérescences neuronale et musculaire (Daya et al., 2020; Harel and Brunet, 2015).

Depuis plus de 60 ans, l'étude de la nage chez le poisson suscite un vif intérêt et a fait l'objet d'un grand nombre d'études physiologiques sur les capacités d'exercice des poissons (Black et al., 1962). La plupart de ces recherches ont porté sur les salmonidés pour des raisons pratiques comme la disponibilité de poissons de tailles différentes et la facilité d'expérimentation en laboratoire ainsi que pour des raisons physiologiques comme leur haute performance physique. Plusieurs études ont exploré de façon intégrée les mécanismes biochimiques sollicités lors d'un exercice physique exhaustif et lors de la récupération après

l'exercice. Chez le poisson, les bienfaits de l'exercice physique sont explorés avec deux objectifs : améliorer la qualité de la production en aquaculture et élucider des mécanismes physiologiques à bénéfice santé conservés chez l'Homme et le poisson.

En aquaculture, on cherche à améliorer la robustesse des salmonidés afin de limiter les pertes animales tout en respectant la demande des consommateurs pour une alimentation durable et éthique. L'entraînement à l'endurance aérobie est une stratégie efficace qui stimule la croissance des poissons et diminue leur stress. Chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*), Castro et al. (2011) ont montré que l'entraînement physique aérobie stimulait la réponse immunitaire et protégeait la fonction cardiaque.

Du fait de ces nombreux avantages, l'utilisation du poisson comme modèle en physiologie de l'exercice physique peut être une approche pertinente afin de mieux comprendre les principes physiologiques de base des muscles des vertébrés supérieurs. En effet, il possède des types de fibres anatomiquement séparées facilitant alors l'étude des réponses spécifiques à chaque type de fibres. La nage fait partie intégrante de son cycle de vie et il est confronté à nager à contre-courant dans son milieu naturel, facilitant alors la mise en place des protocoles d'entraînement. Les muscles de poisson sont sensibles à l'exercice et des réponses structurelles et biochimiques sont rapidement mises en place (McClelland, 2012). Enfin, il existe une conservation phylogénétique de nombreuses molécules d'intérêt entre le poisson et le mammifère comme GLUT4, IGF-1 (Bertucci et al., 2019), AMPK, CS (Morash et al., 2014), les enzymes antioxydantes (Birnie-Gauvin et al., 2017)... Toutes ces molécules étant impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique chez l'Homme.



Objectifs de thèse

Il est désormais reconnu qu'une activité physique pratiquée régulièrement stimule des processus qui participent aux bénéfices-santé comme la biogenèse mitochondriale (Granata et al., 2018b) et les défenses antioxydantes (Hyatt et al., 2016) au niveau du muscle squelettique de mammifères. Dans notre société, la population manque de temps pour la pratique régulière d'une activité physique (Gibala et al., 2012). Ainsi, l'un des principaux défis actuels est d'établir un protocole d'entraînement qui optimise la stimulation de ces processus afin de réduire les risques de développer une MCNT, tout en diminuant le temps à y consacrer. Les réponses induites par l'entraînement sont étroitement liées aux paramètres qui le caractérisent (durée, intensité, fréquence et volume) (MacInnis and Gibala, 2017). Récemment, les paramètres d'intensité et de volume ont fait l'objet de méta-analyses mais les avis sont controversés. En effet, selon MacInnis et al. (2019), l'intensité de l'exercice serait plus importante que le volume d'entraînement pour augmenter le contenu mitochondrial dans le muscle squelettique chez l'Homme tandis que Bishop et al. (2019) expose l'inverse.

Dans notre laboratoire, différents facteurs de prévention sont étudiés sur les pathologies cardiovasculaires et musculaires, dont l'activité physique. Plusieurs modèles animaux (rats, souris, poissons) sont ainsi utilisés pour mieux comprendre les mécanismes physiologiques liés aux effets bénéfiques de l'entraînement. Par exemple, il a été démontré que 6 semaines de MICT chez le rat a des effets bénéfiques sur les facteurs de risque du syndrome métabolique (Dupas et al., 2018).

Dans ce travail de thèse, nous avons décidé de mener en parallèle une étude chez le poisson et chez le rat pour des raisons précédemment évoquées. L'utilisation de ces deux modèles offre également l'opportunité d'analyser les résultats dans un contexte de physiologie comparée.

Le **premier objectif** de notre travail a été d'établir un protocole d'entraînement qui stimule la biogenèse mitochondriale et améliore les capacités de défenses antioxydantes. Deux types d'entraînement en endurance ont été explorés : le MICT et le HIIT. Ces entraînements ont la capacité de stimuler PGC-1 α , cofacteur de transcription connu pour être le plus puissant régulateur de la biogenèse mitochondriale chez le mammifère. Ainsi, la voie de signalisation AMPK-PGC-1 α ainsi que les systèmes antioxydants, présents chez les deux espèces, ont été explorés par des études transcriptomique et protéique. Les protocoles

d'entraînement (nage chez le poisson et course chez le rat) ont été établis avec des intensités presque similaires pour le MICT (57% U_{crit} et 65% VMA) et pour le HIIT (90% U_{crit} et 85-90% VMA). Cette étude a fait l'objet de deux publications. La première (publiée dans *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A* en 2020) concerne les réponses induites par le MICT et le HIIT chez la truite arc-en-ciel et la troisième (en préparation) celles induites par ces mêmes types d'entraînement chez le rat.

Le **deuxième objectif** a été de déterminer le paramètre d'exercice qui stimule le plus les réponses adaptatives explorées. Pour répondre à cette problématique, le modèle poisson a été utilisé et six protocoles d'entraînement de nage variant par leur intensité, durée, fréquence et volume ont été établis. Cette étude est présentée dans la publication n°2 (acceptée pour publication dans *Experimental Physiology* en 2021).

Le **troisième objectif** a eu pour but de distinguer les adaptations mitochondriales et antioxydantes de l'entraînement dans deux types de fibres : oxydatives et glycolytiques. Le recrutement des fibres musculaires est différent selon le type exercice physique chez le mammifère (Kristensen et al., 2015) comme chez le poisson (Tudorache et al., 2013). Le muscle rouge est exclusivement composé de fibres lentes oxydatives et le muscle blanc de fibres rapides glycolytiques. Ainsi, dans un souci de physiologie comparée des réponses fibres-dépendantes en fonction de l'exercice physique, nous avons fait le choix de prélever chez le rat, le soléaire, constitué de 80% de fibres lentes, et l'EDL, composé uniquement de fibres rapides. Les réponses fibres-dépendantes induites par l'entraînement chez le poisson et chez le rat ont été traitées dans les trois publications et seront discutées dans la suite du manuscrit.

Le **quatrième objectif** a consisté en la validation de l'utilisation du modèle truite arc-en-ciel pour l'étude de ces mécanismes au niveau du muscle squelettique. Nous discuterons des similitudes et des différences de réponses interspécifiques mais aussi des limites des modèles utilisés dans la discussion générale.



Chapitre 2 :

Résultats

Les résultats de ce travail de thèse obtenus à partir de deux modèles animaux (truite arc-en-ciel et rat Wistar) seront présentés dans ce deuxième chapitre sous la forme de trois parties, chacune correspondant à une publication (deux acceptées et une en préparation). Chacune des publications sera présentée de façon synthétique. Les synthèses des trois études incluront une brève présentation de son contexte, des objectifs, de la méthodologie et des résultats discutés. Pour plus de détails, le lecteur pourra se référer à la publication elle-même, présentée à la suite de son résumé.

Dans la littérature, il a été montré que des mécanismes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et dans l'état redox sont en partie ubiquitaires chez le mammifère et le poisson. Ainsi, une des hypothèses émises serait que nos modèles pourraient présenter des similitudes quant aux modifications musculaires suite à l'entraînement. Ainsi, nous avons tenté de construire une méthodologie d'entraînement relativement proche chez nos deux modèles animaux (types d'entraînement, intensité de l'exercice, temps de récupération après la dernière séance d'exercice, choix des muscles, étude de transcrits et d'activités enzymatiques phylogénétiquement conservés).

Tout d'abord, nous avons fait le choix de comparer des types d'entraînement d'intensité comparable chez la truite arc-en-ciel et le rat Wistar : le MICT et le HIIT. Les intensités d'exercice auxquelles ont été soumis ces modèles sont relativement proches. En effet, celle du MICT a été fixée à 57% de l' U_{crit} pour le poisson et à 65% de la VMA pour le rat puis, l'intensité du HIIT à respectivement 90% de l' U_{crit} et à 85-90% de la VMA. De plus, le choix des prélèvements musculaires a été réfléchi de manière à ce que la composition en fibres musculaires soit proche chez les deux modèles. Le muscle rouge de la truite arc-en-ciel peut ainsi être comparé au soléaire (80% de fibres de type I) et le muscle blanc à l'EDL (100% de fibres de type II). Ensuite, afin d'être certains d'étudier les effets de l'entraînement et non ceux de l'exercice physique aigu, le temps de repos après la dernière session d'exercice était de 65 heures chez le poisson et compris entre 48 et 72 heures chez le rat.

2.1. Les protocoles d'entraînement modulent différemment la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α et l'état redox dans le muscle squelettique de la truite arc-en-ciel

Publication n°1 :

Training protocols differently affect AMPK–PGC-1 α signaling pathway and redox state in trout muscle

Pengam M., Moisan C., Simon B., Guernec A., Inizan M. and Amérand A.
Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.
Volume 243, May 2020. DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.110673

2.1.1. Contexte et objectifs

Ces dernières années, l'entraînement par intervalles de type HIIT a suscité un réel intérêt en termes de bénéfices pour la santé chez le mammifère (Homme et murins confondus). Chez l'Homme, le HIIT stimulerait davantage la biogenèse mitochondriale et les capacités oxydatives que le MICT (MacInnis et al., 2017). Les effets de ces types d'entraînement sur la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α et la biogenèse mitochondriale ont été étudiés chez le mammifère. Toutefois, les résultats sont variés et parfois contradictoires. Cela est dû, d'une part, à la diversité des paramètres d'entraînement étudiés comme l'intensité par exemple (MacInnis et al., 2019; Taylor et al., 2005) et d'autre part au type de muscle étudié, le recrutement de fibres différant selon de l'intensité de l'exercice (Godin et al., 2010; Taylor et al., 2005). Parmi les modèles animaux utilisés en physiologie de l'exercice, le poisson est considéré comme intéressant du fait de ses nombreux atouts (décrits précédemment dans le Chapitre 1, pages 68-69). Si le HIIT est très peu exploré chez le poisson, il a été montré que l'entraînement par intervalles d'intensité modérée, chez le saumon Atlantique, stimule les défenses antioxydantes (Castro et al., 2011). Parmi les poissons, la truite arc-en-ciel est reconnue comme étant un bon modèle pour l'optimisation des protocoles de nage. Elle est utilisée depuis quelques années pour

mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les adaptations à l'entraînement physique (Kieffer, 2010).

Ainsi, cette première publication a pour objectif d'étudier les effets de deux types d'entraînement (MICT et HIIT) sur les réponses moléculaires et biochimiques de la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α , de la CS, des complexes de phosphorylation oxydative (OXPHOS) ainsi que des défenses antioxydantes au niveau des muscles squelettiques rouge oxydatif et blanc glycolytique de truite arc-en-ciel. Les différences structurales et métaboliques de ces deux muscles laissent supposer qu'une adaptation différente de la biogenèse mitochondriale pourrait se mettre en place. À ce jour, les effets de l'entraînement sur l'ensemble de cette cascade de signalisation aérobie conduisant à une biogenèse mitochondriale y compris les ERO ont été peu explorés simultanément.

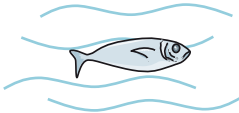

2.1.2. Méthodologie

Les effets de deux types d'entraînement d'une durée de 10 jours (MICT et HIIT) sur les adaptations mitochondriales et les défenses enzymatiques antioxydantes ont été comparés dans les muscles rouge et blanc de truite arc-en-ciel. Le MICT consistait à faire nager les poissons à une intensité modérée (57% de leur U_{crit}). Les poissons soumis au régime HIIT, ont quant à eux nagé deux heures par jour à 90% de leur U_{crit} . Pour atteindre nos objectifs, plusieurs transcrits de la cascade de signalisation aérobie AMPK–PGC-1 α , de la CS et des complexes OXPHOS ont été quantifiés par PCR (*Polymerase chain reaction*) en temps réel. Les activités enzymatiques de la CS et de la COX, exclusivement localisées dans les mitochondries, ont également été dosées. Ces activités enzymatiques sont des marqueurs couramment utilisés pour évaluer le contenu mitochondrial (Larsen et al., 2012). L'évaluation du statut redox a été réalisée à différents niveaux d'analyses en déterminant les taux des ARNm des défenses antioxydantes et les activités enzymatiques correspondantes (SOD, GPx et CAT) dans les muscles squelettiques ainsi que les taux en 8-isoprstanés plasmatiques, ce dernier étant connu pour être un marqueur pertinent du stress oxydatif (Montuschi et al., 2004).

2.1.3. Principaux résultats et conclusions

Les principaux résultats sont présentés dans le Tableau 4. Contrairement au MICT, le HIIT a stimulé les transcrits impliqués dans la cascade de réponses de la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α , notamment dans le muscle rouge. **Ces résultats mettent en évidence que les réponses transcriptionnelles impliquées dans la cascade de réponses aérobies sont dépendantes du type d'entraînement ainsi que du type de fibres musculaires. Les réponses plus importantes dans le muscle rouge que dans le muscle blanc suggèrent que les entraînements, dont notamment le HIIT, ont davantage sollicités les fibres oxydatives que les fibres glycolytiques.** En revanche, aucun changement des activités de la CS, de la COX et des défenses antioxydantes musculaires ainsi que du taux en 8-isoprostanes plasmatique n'a été constaté. **Il est probable que la durée de l'entraînement et/ou l'intensité de l'exercice ont été insuffisantes pour qu'une adaptation protéique ait eu le temps de se mettre en place. L'analyse des corrélations entre les ARNm suggère une régulation coordonnée de la CS et de la voie AMPK–PGC-1 α , des complexes OXPHOS ainsi que des défenses antioxydantes dans le muscle rouge. La truite-arc-en-ciel paraît être un modèle intéressant pour l'étude de cette voie de signalisation cellulaire dans le domaine de la physiologie de l'exercice.**

Tableau 4. Effets de 10 jours d'entraînement de type MICT et HIIT sur les transcrits et les activités enzymatiques au niveau des muscles rouge et blanc et sur le taux plasmatique en 8-isoprostanes chez la truite arc-en-ciel.

		MICT 			HIIT 		
		Muscle rouge	Muscle blanc	Plasma	Muscle rouge	Muscle blanc	Plasma
Transcrits	AMPK	→	↘ (<i>Ampkα1</i>)		↗ (<i>Ampkα2</i>)	→	
	PGC-1α	↘	↘		→	→	
	Citrate synthase	→	→		↗	↗	
	Complexes OXPHOS	→ (↗ <i>Cox2</i>)	↘ (<i>Nd1</i> , <i>Cox1</i>)		↗ (tous les ARNm étudiés)	→	
	Enzymes antioxydantes	→	→		↗ (<i>Gpx1</i>)	→	
Activités enzymatiques (CS, COX, SOD, GPx, CAT)		→	→		→	→	
Marqueur du stress oxydatif (8-isoprostanes)				→			→

↗ : stimulation significative ; ↘ : diminution significative ; → : pas d'effet significatif.

Article n° 1



Training protocols differently affect AMPK–PGC-1 α signaling pathway and redox state in trout muscle

Morgane Pengam, Christine Moisan, Bernard Simon, Anthony Guernec, Manon Inizan, Aline Amérand*

Université de Brest, EA 4324 ORPHY, UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Victor Le Gorgeu, F-29200 Brest, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Moderate intensity training
High intensity training
Skeletal muscle
Mitochondrial biogenesis
Antioxidant defenses

ABSTRACT

Beneficial effects of physical exercise training are in part related to enhancement of muscle mitochondrial performance. The effects of two different trainings were investigated on transcripts and proteins of the AMPK–PGC-1 α signaling pathway, the mitochondrial functioning (citrate synthase (CS), oxidative phosphorylation complexes, uncoupling proteins (UCP)) and the antioxidant defenses (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase) in rainbow trout red and white skeletal muscles. One group of trouts swam for 10 days at a moderate intensity (approximately 57% U_{crit} or 2.0 body lengths/s, 23.5 h/day) and another group at a high intensity (approximately 90% U_{crit} or 3.2 body lengths/s, 2 h/day). In the red muscle, the increase of Cs mRNA levels was significantly correlated with the transcripts of *Ampka1*, *Ampka2*, *Pgc-1 α* , the oxidative phosphorylation complexes, *Ucp2 α* , *Ucp2 β* , *Sod1*, *Sod2* and *Gpx1*. After 10 days of training, high intensity training (HIT) stimulates more the transcription of genes involved in this aerobic pathway than moderate intensity training (MIT) in the skeletal muscles, and mainly in the red oxidative muscle. However, no changes in CS, cytochrome c oxidase (COX) and antioxidant defenses activities and in oxidative stress marker (isoprostane plasmatic levels) were observed. The transcriptomic responses are fiber- and training-type dependent when proteins were not yet expressed after 10 days of training. As in mammals, our results suggest that HIT could promote benefit effects in fish.

1. Introduction

Physical exercise is recognized to improve human health but the involved cellular and molecular mechanisms remain to be fully elucidated (Neufer et al., 2015). The stimulation of the mitochondrial biogenesis and antioxidant defenses induced by physical activity in skeletal muscle are largely considered as contributor to improve overall health (Gabriel and Zierath, 2017). These cellular responses and their adaptations are highly dependent on the parameters of the physical exercise protocols such as intensity, duration and frequency (Bishop et al., 2019; MacInnis et al., 2019). High intensity interval training (HIIT), characterized by short high intensity fractions interspersed with regular recovery time intervals (Cochran et al., 2014), could be even more beneficial for health than moderate intensity continuous training (MICT). In mammals, the mitochondrial biogenesis and the oxidative phosphorylation (OXPHOS) capacities should be more stimulated after

HIIT compared to MICT (MacInnis et al., 2017).

Among the signaling pathways activated in the skeletal muscle during a physical exercise, the AMP-activated protein kinase (AMPK)–peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) coactivator-1 α (PGC-1 α) is the main one stimulating the mitochondrial biogenesis and the oxidative capacities in vertebrates, including fish (Correia et al., 2015; Magnoni et al., 2014; Morash et al., 2014). The AMPK is activated by a cellular stress such as exercise which decreases ATP concentration and then increases AMP:ATP ratio (Winder and Hardie, 1996). This kinase, which stimulates PGC-1 α , is considered as a key molecule in the oxidative metabolism upregulating the OXPHOS. PGC-1 α may interact with transcription factors which lead to the transcription of specific genes such as those encoding antioxidant enzymes and mitochondrial respiratory chain proteins (Bratic and Larsson, 2013; Hawley et al., 2014). AMPK and PGC-1 α are both redox sensitive, meaning that this signaling pathway can be influenced by the

Abbreviations: COX, cytochrome c oxidase; CS, citrate synthase; GPx, glutathione peroxidase; HIT, high intensity training; MIT, moderate intensity training; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) coactivator-1 α ; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; UCP, uncoupling protein; U_{crit} , critical swimming speed

* Corresponding author.

E-mail address: aline.amerand@univ-brest.fr (A. Amérand).

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110673>

Received 5 September 2019; Received in revised form 29 January 2020; Accepted 6 February 2020

Available online 07 February 2020

1095-6433/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

reactive oxygen species (ROS) (Trewin et al., 2018).

The effects of different exercise modalities on the AMPK-PGC-1 α signaling pathway and associated compounds have been studied in human and rodents. The results related to the regulation of this pathway are variable and sometimes contradictory, in part due to the exercise parameters, mainly intensity (Bartlett et al., 2012; Egan et al., 2010; MacInnis et al., 2019). Godin et al. (2010) suggested these results may be in part explained by differences in fiber type recruitment. The investigations in mammals are often performed on whole skeletal muscle containing mixed type fibers (oxidative type I fibers and glycolytic type IIb fibers) when metabolic responses to physical exercise can also be influenced by the specific fiber type recruitment. Concerning mitochondrial function, MICT and HIIT stimulated for example the cytochrome *c* oxidase complex in the human *vastus lateralis* when no exercise training effects were observed in isolated fibers I and II (MacInnis et al., 2017).

In the present study, the rainbow trout was used as a model for several reasons. First, unlike mammals, fish has anatomically separated fast (white glycolytic muscle) and slow (oxidative red muscle) twitch fibers. Such particularity is interesting to investigate the fiber type-specific adaptations to training. Second, fish is also easily to train and may globally respond to endurance training in a similar manner as mammals. For example, training exercise can stimulate mitochondrial biogenesis in fish even if mRNA regulation could be distinct from mammals (McClelland, 2012). Third, the rainbow trout is particularly used in exercise physiology providing a good model for optimizing exercise protocols and for better understanding cellular or molecular mechanisms involved in training exercise adaptation (Kieffer, 2010). Finally, the AMPK-PGC-1 α signaling pathway has been identified in rainbow trout and previously explored in conditions of moderate intensity training by Morash et al. (2014).

The present study aimed to compare a moderate intensity training (MIT) and a high intensity training (HIT) (10 days for both) on the transcriptional and enzymatic activity responses involved in AMPK-PGC-1 α signaling pathway, mitochondrial activity and antioxidant systems. We hypothesized that these two training intensities could differently affect red and white muscles in rainbow trout.

2. Materials and methods

2.1. Fish and experimental conditions

The experimental design was made in accordance with the animal experimental authorization n°472802, respecting the three “R” (replace, reduce, refine).

Juvenile female rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) were obtained from a local fish farm (EARL pisciculture de Lescoat, Lesneven, France). At their arrival at the laboratory, fishes were acclimated for two weeks before experimentation in 400 L polyethylene tanks filled with continuously renewed and aerated water at 15 °C with a natural photoperiod (10 h:14 h light:dark). All the trouts were tagged in subcutaneous between the head and the dorsal fin (Glass tag 2 × 12 mm, Biolog-id, Bernay, France). Individual measurements of body mass (BM = 113 ± 2.2 g) and body length (BL = 20.6 ± 0.2 cm) were realized.

Before starting the training, the critical swimming speed (U_{crit}) was determined to obtain the water velocity corresponding to the training intensity protocols. The U_{crit} of 8 fishes was measured in a Brett-type swimming tunnel according to Brett (1964) and Farrell (2008). Before the experimentation, each fish was placed into the swimming tunnel 1 h with a water velocity at 0.05 m/s to acclimate. Then, water velocity was increased by 0.10 m/s every 10 min until exhaustion, in water maintained at 15 ± 0.5 °C. U_{crit} was calculated for each animal using Brett's equation: $U_{crit} = V_{n-1} + V_i \times \frac{t_n}{T_i}$ (in which V_{n-1} is the velocity of the last completed swimming speed (m/s); V_i is the velocity increment (0.1 m/

s); t_n is the duration of the last step (min) and T_i is the duration of each step (10 min)). The mean of U_{crit} was 3.41 ± 0.16 BL/s ($n = 8$).

For the training experiment, 36 healthy fishes from the same animal batch were randomly transferred and divided into three polyethylene tanks of 450 L with aerated tap water maintained at 15 ± 0.5 °C and renewed in half every day. One of these tanks kept fishes presenting only spontaneous movements and were used as control, “Untrained” ($n = 12$). The other two circular tanks (diameter: 128 cm; height: 75 cm) kept experimental training groups: “MIT” ($n = 12$) and “HIT” ($n = 12$). In order to get a uniform water flow, a little circular tank (diameter: 50 cm; height: 47 cm) was added in the center of each tank. The two training protocols lasted 10 days during which trouts were observed every day.

The MIT program exposed trouts to a water flow of 0.41 m/s corresponding to a swimming speed of 57% U_{crit} (2.0 BL/s) during 23.5 h per day. Water flow was stopped one time per day during 30 min when fishes were fed to satiation.

For HIT program, trouts started to swim at 0.41 m/s (57% U_{crit}) for 10 min to acclimate to the water flow and then, were exposed to a water flow of 0.65 m/s corresponding to a swimming speed of 90% U_{crit} (3.2 BL/s) for 2 h/day.

Trained animals were killed by cerebral commotion 65 h after the 10 days training programs to avoid potential acute effects of exercise. BL and BM were recorded. At the beginning and at the end of the experiment, condition factor (CF) was calculated for each fish using the following equation: $CF = \frac{BM \times 100}{BL^3}$ where BM is expressed in g and BL in cm (Fulton, 1902). Red and white muscles were rapidly excised along the last 5 to 10 cm before caudal fin and more precisely at the lateral line level for red muscle. Plasma samples were collected from 5% EDTA-blood by centrifugation at 3000g for 5 min at room temperature. All these samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further analyses.

2.2. RNA extraction

Total RNA was isolated from red and white muscles using the NucleoSpin® RNA Set for NucleoZOL (Macherey Nagel, Hoerd, France). Briefly, 30 mg of tissue previously ground in liquid nitrogen and stored at -80 °C were homogenized for 2 × 15 s with an Ultraturax in 500 μ L of NucleoZOL. After adding 200 μ L of DNase/RNase-free water and incubating 15 min at room temperature, samples were centrifuged (12,000 g, 15 min, 4 °C). 500 μ L of the supernatant were collected and the same volume of MX buffer was added. This solution was transferred into NucleoSpin® columns. RNA was fixed at the silica membrane of the columns by centrifugation (8000 g, 1 min, room temperature). The silica membranes were then washed and dried with the RA3 buffer containing ethanol. RNA was eluted in 40 μ L of DNase/RNase-free water and stored at -80 °C until use. RNA concentrations were measured with a SimpliNano™ spectrophotometer and their purity was assessed using OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratios. Their integrity was also checked by an electrophoresis on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide.

2.3. mRNA quantification by Real-Time Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

1000 ng of each sample RNA was reverse transcribed with the qScript™ cDNA synthesis kit (Quanta BioSciences, VWR, France) containing a reaction mix (dNTPs, oligo(dt) and random primers, enzyme specific buffer and Mg²⁺) and the Reverse Transcriptase. Complementary DNA (cDNA) was diluted 10-fold for PCR experiments and stored at -20 °C. Real-Time RT-PCR was realized with a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, France). Target genes were amplified and quantified by SYBR®green incorporation (EurobioGreen® Mix qPCR 2 × Lo-Rox; Eurobio Ingen, Courtaboeuf, France) with specific primers presented in Table 1. The

Table 1

Primer sequences used for Real-Time RT-PCR analysis. The hybridization temperature was 60 °C for all primers. Primers were own designed except those with a subscript number.

Target gene	Abbreviation	Primer sequences (5' to 3')	Data base	Accession number
18S ribosomal RNA	18S rRNA ¹	(F) CGGAGGTTGGAAGACGATCA (R) TCGCTAGTTGGCATCGTTTAT	GenBank	AF308735.1
Adenosine monophosphate kinase α 1	<i>Ampka1</i>	(F) GCCACCATCAAAGAGATCCG (R) TCAAACCTTCTCACACCTCC	GenBank	XM_021590586
Adenosine monophosphate kinase α 2	<i>Ampka2</i>	(F) CGCTCAAGAGGGCTACCATT (R) CAGACTCGGTGCTCTCAAAC	GenBank	XM_021604240
Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α	<i>Pgc-1α</i> ²	(F) CAACCACCTTGCCACTTCCT (R) GGTTCAGAGATCTCCACAC	GenBank	FJ710605.1
Citrate synthase	<i>Cs</i> ¹	(F) AACCAACCTCACTCATCACCA (R) GCAGCAGAAGCAGCCATAA	GenBank	XM_021566131
Superoxide dismutase 1	<i>Sod1</i> ³	(F) AGGCTGTTTGGCTGCTCAA (R) CCAATCAGCTTCACAGGACCAT	GenBank	AF469663.1
Superoxide dismutase 2	<i>Sod2</i> ³	(F) CCACACCATCTTGGACAAAC (R) GGAGCCAAAGTACGGTTGA	Tigr	TC123543
Glutathione peroxidase 1	<i>Gpx1</i> ³	(F) CCTGGGAAATGGCATCAAGT (R) GGGATCATCCATTGGTCCATAT	Tigr	TC94794
Uncoupling protein 2 α	<i>Ucp2α</i>	(F) ACCAAACCGACGTTACCATGG (R) TTAAGAAGCGCGTCTTGATG	GenBank	NM_001124654.1
Uncoupling protein 2 β	<i>Ucp2β</i>	(F) TATTGCCATGGTGACCAAGGA (R) CTACAGAGGAGTGGTGTAGTT	GenBank	NM_001124571.1
NADH dehydrogenase 1	<i>Nd1</i>	(F) TTGTACCCGTTCTGTAGCAG (R) TAGTTTTAGGCCGTCIGCGAT	GenBank	NP_008290
Cytochrome c oxidase 1	<i>Cox1</i>	(F) TCAACCAACCACAAAGACATTG (R) CACGTTATAGATTGGTCATCC	GenBank	NP_008292
Cytochrome c oxidase 2	<i>Cox2</i> ²	(F) GAGGCAATAAAGGCTGTTGGT (R) GCCGTTCTCTTTAGGTGTA	GenBank	NP_008293
Cytochrome c oxidase 4	<i>Cox4</i> ⁴	(F) TAGGTGGGGACATGGTGTT (R) CCCAGGAGCCCTTCTCCTTC	Sigenae	tcav0004c.i.22_3.1.s.om.8
Adenosine triphosphate synthase 6	<i>Atp synthase 6</i>	(F) CTTGACCAATTTATGAGCCC (R) TCGGTTGATGAACCCCTTG	GenBank	NP_008295

(F): Forward, (R): Reverse.

References: ¹Magnoni et al. (2013) ²Eya et al. (2015) ³Gunnarsson et al. (2009) ⁴Kolditz et al. (2008)

cycling conditions consisted in a denaturing step at 95 °C for 2 min, followed by 40 to 50 cycles of amplification (denaturation: 95 °C for 5 s; annealing/extension: 60 °C for 30 s). Finally, a melting curve program was carried out from 60 °C to 95 °C with a heating rate of 0.1 °C per s, showing a single product with a specific melting temperature for each gene and sample evaluated.

Standard curves were established to determine and compare the transcription level of the different target genes in the three experimental groups. To obtain these curves, all genes were first amplified from a pool of RT products prepared with samples from control and experimental groups. PCR products were separated on a 2% agarose gel with ethidium bromide and purified using the Nucleospin gel and PCR Clean-Up® kit (Macherey Nagel, Hoerd, France). These products were then quantified using a SimpliNano™ spectrophotometer before proceeding to a serial dilution from 10 pg/μL to 0.001 fg/μL. A seven-point standard curve was used to determine the PCR efficiency of each primer pair (between 90% and 100%) and the transcription level of the different genes in all samples. Each gene was amplified in a single run from triplicates for standard points and duplicates for sample points. Quantification was normalized using 18S ribosomal RNA (rRNA) considered as a reference gene. This choice was validated by the absence of significant differences in 18S rRNA levels between experimental groups for each muscle (red and white) ($p > .05$). All mRNA levels were first calculated with the ratio: $\frac{\text{target gene mRNA}}{18S \text{ rRNA}}$ and then expressed as fold change with the untrained group which was set to 1.

2.4. Enzyme activities and oxidative stress marker

All measurements were performed at 15 °C and determined using a plate reader (SAFAS Xenius, Monaco). All samples were measured in duplicate.

2.4.1. Citrate synthase activity

50 mg of frozen red and white muscles were homogenized with a Polytron homogenizer in an extraction buffer (100 mM TRIS HCl, pH 8.1, 4 °C). Citrate synthase (CS) activity was assessed at 412 nm on the supernatant using 1 mM DTNB (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid), 12.3 mM acetyl CoA and 100 mM oxaloacetate (Srere, 1969). CS activity was expressed in μmol DTNB reduced/min/g wet tissue.

2.4.2. Cytochrome c oxidase activity

Frozen red and white muscles were homogenized with a Polytron homogenizer in an extraction buffer (100 mM TRIS, 2 mM EDTA and 2 mM DTE, pH 7.4, 4 °C). The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4 °C. Cytochrome c oxidase (COX) activity was determined on the supernatant at 550 nm using 2 mM reduced cytochrome c and 330 mM sodium phosphate buffer (Smith and Conrad, 1956). COX activity was expressed in nmol cytochrome c oxidized/min/g wet tissue.

2.4.3. Antioxidant enzyme activities

200 mg of frozen red and white muscles were homogenized with a Polytron homogenizer in an extraction buffer (75 mM TRIS and 5 mM EDTA, pH 7.4, 4 °C). After a centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4 °C, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were determined on the resulting supernatant.

SOD activity was assessed at 480 nm using an indirect method that inhibits the adrenaline to adenosine reaction with the xanthine/hypoxanthine reaction as a superoxide anion producer (Misra and Fridovich, 1972). One unit (U) of SOD activity corresponds to the amount of sample needed to cause 50% inhibition relative to the control without tissue. SOD activity was expressed in U/mg wet tissue.

CAT activity was determined at 240 nm through its capacity to transform hydrogen peroxide (H₂O₂) into water and oxygen (Beers and

Sizer, 1952). The adding of 200 mM H₂O₂ initiated the reaction. CAT activity was expressed in nmol H₂O₂/min/g wet tissue.

GPx activity was measured at 340 nm with an indirect method adapted from Ross et al. (2001) by Farhat et al. (2015). Briefly, the activity was determined from the decrease of NADPH induced by a coupled reaction with glutathione reductase. GPx activity was expressed in nmol NADPH oxidized/min/g wet tissue.

2.4.4. Oxidative stress marker

Total plasmatic 8-isoprostane (free and esterified in lipids) were measured in duplicate using an Elisa kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) according to the manufacturer's protocol. All samples were hydrolyzed using 15% KOH and incubated 60 min at 40 °C and then neutralized with potassium phosphate buffer. Another step of purification was necessary with ethanol. Finally, samples were extracted using ethyl acetate containing 1% methanol and SPE Cartridges (C-18) (Cayman Chemical). After 18 h of incubation, 8-isoprostane plasmatic concentration was measured at 410 nm and expressed in pg/mL.

2.5. Statistical analysis

All results were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). Statistics were performed using Statistica v. 12 software (StatSoft, France). Normality and homogeneity of population were respectively tested using Shapiro-Wilk and Levene tests. Adapted tests were then performed: one-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were followed respectively by a post-hoc test (HSD) or a Mann-Whitney test. Significance threshold was set at $p < .05$. A Pearson test was used to analyze the correlations between mRNA variables, the threshold for significance was set at $p < .05$.

3. Results

3.1. Condition factor

The condition factor (CF), commonly used in fish farm to follow fish health, was measured for each animal (including the untrained group) at the beginning and at the end of the experiment. Trainings (MIT and HIT) had no effects on the CF (Table 2).

3.2. Influence of two training protocols (MIT and HIT) on muscle transcripts

3.2.1. AMPK-PGC-1 α signaling pathway

In the red muscle, HIT induced a ~30% increase in the *Ampka2* mRNA content compared to untrained and MIT groups ($p < .05$). No changes were observed on the *Ampka1* mRNA levels between groups. In the MIT group, the *Pgc-1 α* mRNA content was significantly reduced by 2-fold ($p < .05$) compared to untrained and HIT groups in red and white muscles. In the white muscle, both MIT and HIT decreased the

Table 2

Condition factors of rainbow trouts.

	Untrained n = 12	MIT n = 12	HIT n = 12
Initial CF ^a	1.28 ± 0.02	1.27 ± 0.02	1.29 ± 0.04
Final CF ^b	1.30 ± 0.02	1.31 ± 0.03	1.30 ± 0.04

Results were shown as means ± SEM. No significant differences were observed. CF: condition factor = $\frac{BM \times 100}{BL^3}$ with body mass (BM) in g and body length (BL) in cm.

MIT: moderate intensity training; HIT: high intensity training.

^a Initial CF: condition factor measured at the beginning of the experiment.

^b Final CF: condition factor measured at the end of the experiment.

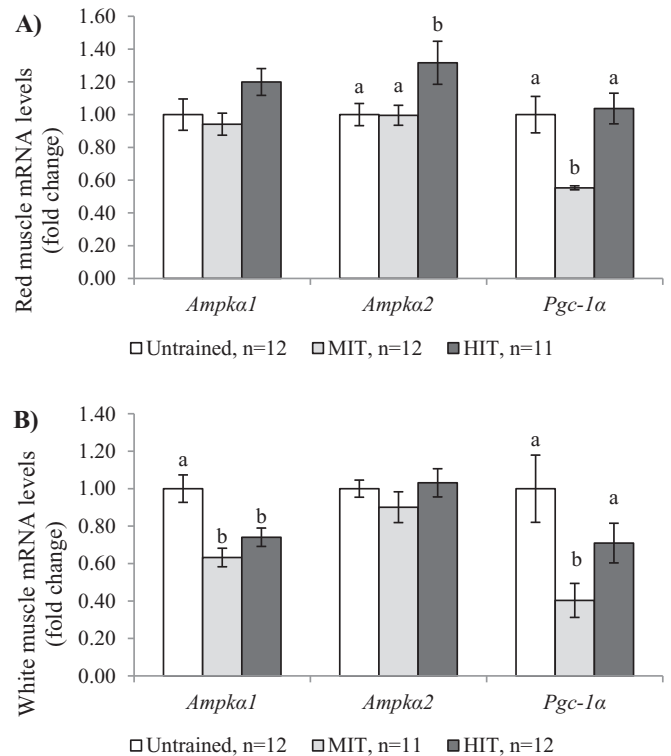


Fig. 1. Effects of MIT (moderate intensity training) and HIT (high intensity training) on the *Ampka1*, *Ampka2* and *Pgc-1a* mRNA levels in red (A) and white (B) muscles of the rainbow trout. Results were expressed as fold change with the untrained group, which was set to 1. Results were shown as means ± SEM. Similar letters indicate no significant differences ($p > .05$) between groups.

Ampka1 mRNA levels whereas the *Ampka2* mRNA quantity was unchanged (Fig. 1, A and B).

3.2.2. Mitochondrial functioning

HIT up-regulated the *Cs* mRNA levels compared to untrained and MIT groups in both types of trout skeletal muscle. In the red muscle, the mRNA levels of *Nd1*, *Cox1*, *Cox2*, *Cox4* and *Atp synthase 6* were also increased by HIT compared to the untrained group. The MIT group showed a 65% increase ($p < .05$) in the *Cox2* mRNA content in the red muscle and a decrease in *Nd1* and *Cox1* mRNA levels in the white muscle compared to the untrained group. In addition, the *Nd1*, *Cox2*, *Cox4* and *Atp synthase 6* mRNA levels were up-regulated by HIT in the red muscle when compared to the MIT group. In the white muscle, a decrease in the *Nd1* mRNA levels by MIT was shown compared to untrained and HIT groups whereas no modifications were observed for the *Cox2*, *Cox4* and *Atp synthase 6* gene transcriptions. In the red muscle, HIT raised the *Ucp2a* and *Ucp2b* mRNA levels compared to the MIT group. In the white muscle, both types of training did not modify these two genes contents (Fig. 2, A and B).

3.2.3. Antioxidant defenses

In the red muscle, the *Sod1* and *Sod2* mRNA levels in HIT group were ~20% higher ($p < .05$) than in the MIT group. In the same muscle, HIT induced a ~50% increase ($p < .05$) in the *Gpx1* mRNA content compared with untrained and MIT groups (Fig. 3, A). However, no training effects on the antioxidant enzymes gene transcription were observed in the white muscle (Fig. 3, B).

3.3. Correlations analysis in skeletal muscles

In the red muscle, the mRNA level of *Cs* was significantly correlated (moderate correlation: $0.4 \leq R < 0.7$ or strong correlation:

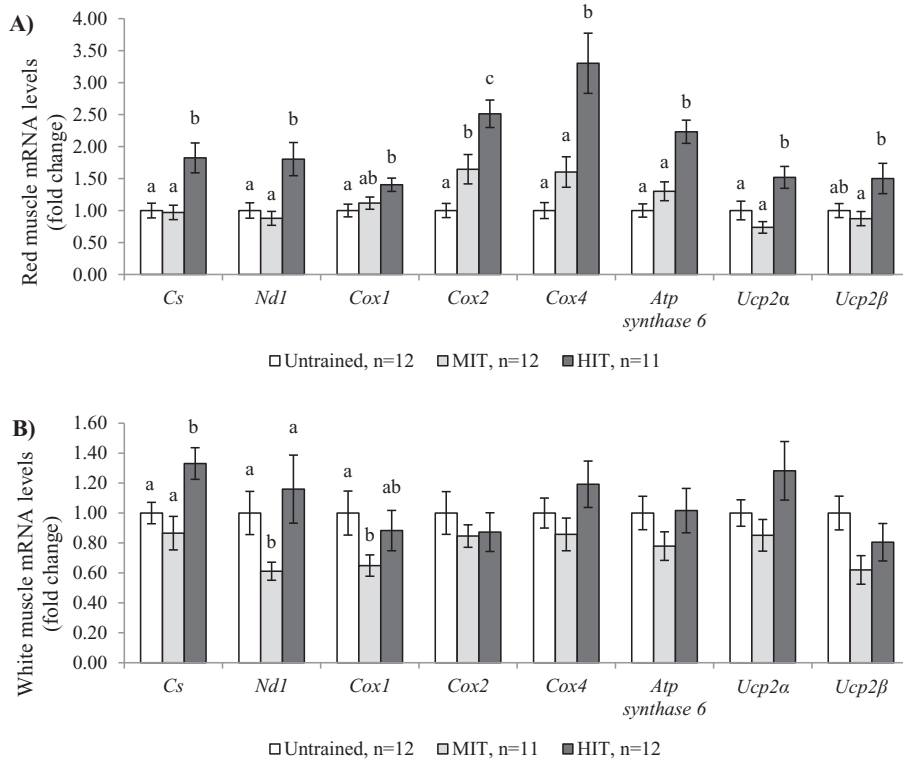


Fig. 2. Effects of MIT (moderate intensity training) and HIT (high intensity training) on citrate synthase (Cs), NADH dehydrogenase 1 (Nd1), cytochrome c oxidase 1, 2 and 4 (Cox1, 2 and 4), ATP synthase 6 and uncoupling proteins (Ucp) 2α and 2β mRNA levels in red (A) and white (B) muscles of the rainbow trout. Results were expressed as fold change with the untrained group, which was set to 1. Results were shown as means ± SEM. Similar letters indicate no significant differences (p > .05) between groups.

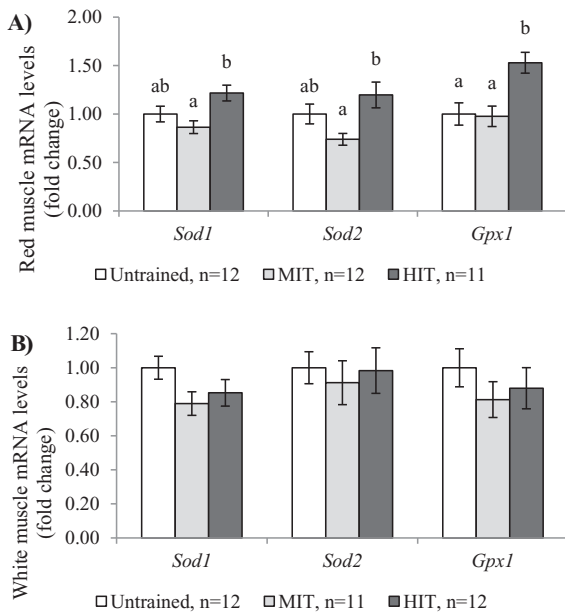


Fig. 3. Effects of MIT (moderate intensity training) and HIT (high intensity training) on the superoxide dismutase (Sod) 1 and 2 and glutathione peroxidase 1 (Gpx1) mRNA levels in red (A) and white (B) muscles of the rainbow trout. Results were expressed as fold change with the untrained group, which was set to 1. Results were shown as means ± SEM. Similar letters indicate no significant differences (p > .05) between groups.

0.7 ≤ R < 1) with transcripts of compounds related to the AMPK–PGC-1α signaling pathway (*Ampka1*, *Ampka2* and *Pgc-1α*), the mitochondrial functioning (*Nd1*, *Cox*, *Atp synthase 6* and *Ucp2α*) and antioxidant defenses (*Sod1*, *Sod2* and *Gpx1*) (Table 3). In the white muscle, Cs transcripts were significantly correlated with the mRNA of *Ampka2*, mitochondrial functioning compounds (except *Cox2* and *Ucp2β*) and all target antioxidant systems (Table 3).

Table 3

Correlations between Cs mRNA vs. *Ampka1*, *Ampka2*, *Pgc-1α*, *Nd1*, *Cox1*, *Cox2*, *Cox4*, *Atp synthase 6*, *Sod1*, *Sod2*, *Gpx1*, *Ucp2α* and *Ucp2β* mRNA in red and white muscles.

	Red muscle n = 35	White muscle n = 35
Cs		
<i>Ampka1</i>	R = 0.66*	R = 0.27
<i>Ampka2</i>	R = 0.71*	R = 0.50*
<i>Pgc-1α</i>	R = 0.64*	R = 0.01
<i>Nd1</i>	R = 0.79*	R = 0.58*
<i>Cox1</i>	R = 0.70*	R = 0.42*
<i>Cox2</i>	R = 0.61*	R = 0.25
<i>Cox4</i>	R = 0.80*	R = 0.49*
<i>Atp synthase 6</i>	R = 0.81*	R = 0.40*
<i>Ucp2α</i>	R = 0.74*	R = 0.64*
<i>Ucp2β</i>	R = 0.40*	R = 0.29
<i>Sod1</i>	R = 0.74*	R = 0.34*
<i>Sod2</i>	R = 0.82*	R = 0.59*
<i>Gpx1</i>	R = 0.74*	R = 0.43*

The threshold for significance was set at p < .05 and significant correlations were represented by *.

3.4. Enzymatic activities (citrate synthase, cytochrome c oxidase and antioxidant systems)

No significant effects were observed on the enzymatic CS, COX, SOD, CAT and GPx activities with training in both skeletal muscles (Table 4).

3.5. Oxidative stress marker

Neither MIT nor HIT modified the plasmatic concentration of 8-isoprostane (Table 5) considered as an oxidative stress marker (the arachidonic acid peroxidation product).

Table 4
Effects of MIT and HIT on CS, COX, SOD, CAT and GPx activities in red and white muscles.

	Red muscle			White muscle		
	Untrained n = 12	MIT n = 12	HIT n = 12	Untrained n = 12	MIT n = 12	HIT n = 12
CS ($\mu\text{mol DTNB reduced}/\text{min}/\text{g WT}$)	25.4 \pm 2.1	25.3 \pm 2.4	24.9 \pm 1.6	2.9 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2	3.1 \pm 0.2
COX (nmol cyt. c oxidized/min/g WT)	40.4 \pm 7.3	41.3 \pm 5.3	44.6 \pm 6.0	6.3 \pm 1.0	5.9 \pm 1.1	8.3 \pm 1.1
SOD (U/mg WT)	3.9 \pm 0.4	3.7 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	0.31 \pm 0.02	0.33 \pm 0.04	0.30 \pm 0.04
CAT (nmol H ₂ O ₂ /min/g WT)	354.8 \pm 29.2	338.0 \pm 50.7	372.3 \pm 42.1	ND	ND	ND
GPx (nmol NADPH/min/g WT)	275.1 \pm 22.7	293.0 \pm 18.6	254.7 \pm 17.7	151.3 \pm 17.1	167.6 \pm 21.5	185.0 \pm 13.4

Results were shown as means \pm SEM. No significant differences were observed between groups. MIT: moderate intensity training; HIT: high intensity training; CS: citrate synthase; COX: cytochrome c oxidase; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; WT: wet tissue; ND: not detected.

Table 5
Effects of MIT and HIT on plasmatic 8-isoprostane concentrations.

	Untrained n = 12	MIT n = 12	HIT n = 11
8-isoprostane (pg/mL)	165 \pm 24	129 \pm 20	154 \pm 19

Results were shown as means \pm SEM. No significant differences were observed between groups.

MIT: moderate intensity training; HIT: high intensity training.

4. Discussion

The present paper is the first to concurrently study the effects of moderate and high intensity trainings on the signaling pathway cascade AMPK–PGC-1 α , OXPHOS complexes and antioxidant defenses in red and white muscles of trout. The three main findings of this study are: 1) HIT stimulated more than MIT the signaling pathway cascade involving AMPK–PGC-1 α , OXPHOS complexes and antioxidant enzymatic systems in trout muscles; 2) these training adaptations were largely more activated in the red oxidative muscle than in the white glycolytic muscle; 3) as in mammals, HIT could have benefit effects in fish by stimulating this signaling pathway cascade and antioxidant defenses.

As in mammals, AMPK serves as a cellular energy sensor in fish. Activation of AMPK has been reported in numerous environmental and endogenous conditions such as exposure to hypoxia or anoxia, changed in nutritional states and increased in activity (Craig et al., 2018; Fuentes et al., 2013; Magnoni et al., 2014). AMPK α isoforms are extremely conserved across vertebrates, including fish (Craig et al., 2018). Among them, we studied the mRNA encoding for AMPK α 1 and AMPK α 2 in the rainbow trout skeletal muscle. Our data showed that the responses of AMPK α isoforms were fibers- and training-type depending. In fish, the role of each skeletal muscle fiber is exclusive of a swimming type. Aerobic and sustained swimming recruits preferentially the oxidative skeletal muscle (red muscle) whereas the glycolytic skeletal muscle (white muscle) is mainly involved in anaerobic and burst swimming (Palstra et al., 2013).

Our data showed that both trainings decreased the *Ampka1* mRNA levels in the white muscle (Fig. 1,B) whereas only HIT increased the *Ampka2* mRNA level in the red muscle (Fig. 1,A). Our results were difficult to compare to others because Morash et al. (2014) quantified total *Ampk* mRNA and not separated isoforms in the trout muscle. They showed a 10-fold rise in the red muscle after one week of MIT with a return to the control level after 2 and 4 weeks of training. So, it seems that the *Ampk* mRNA could be regulated during the first days of training in skeletal muscle.

In mammal skeletal muscles, AMPK regulates the expression of PGC-1 α . This transcriptional co-factor could be considered as the key player

of adaptations induced by endurance exercise training and it has an important role in the regulation of genes involved in mitochondrial biogenesis and antioxidant defenses (Olesen et al., 2010). Several studies in mammals focused on the effects of acute exercise but less on the effects of chronic exercise. Among them, Hyatt et al. (2016) showed that 10 days of MIT increased the *Pgc-1 α* mRNA content in the rat *plantaris* muscle (mainly composed of type II fibers) with no changes in the *soleus* muscle (mainly composed of type I fibers), that suggested a *Pgc-1 α* transcriptomic response fiber-type dependent. In the present study, compared to untrained and HIT groups, the *Pgc-1 α* transcripts levels were surprisingly down-regulated after 10 days of MIT in both red and white skeletal muscles (Fig. 1,A and B). In the literature, a decrease in PGC-1 α expression was often related to reduce mitochondrial performance in mammals (Mortensen et al., 2007) or in fish (Gilbert et al., 2014). Here, in the red muscle, it was not the case because the mRNA of the OXPHOS complexes are, for most of them, unchanged or increased after 10 days of MIT. Differently, in the white muscle, MIT decreased *Ampka1*, *Pgc-1 α* and some electron transport chain (ETC) complexes mRNA too (see below).

HIT had no effect on the *Pgc-1 α* mRNA levels compared to the untrained group but numerous transcripts of the mitochondrial functioning were also upregulated mainly in the red muscle (see below). Thus, we can suppose that during both training conditions (MIT and HIT) the regulation of the *Pgc-1 α* gene has already been occurred at least in the red muscle. This regulation could happened earlier in comparison to the overexpression of *Pgc-1 α* mRNA reported in the red muscle after 30 or 40 days of sustained swimming (Magnoni et al., 2013, 2014). However, our results were closed to those reported in zebrafish when one week of moderate interval training (twice daily for 3 h separated by 2 h rest period) increased the *Pgc-1 α* mRNA quantity in the skeletal muscle with a return to the control value after 8 weeks of training (LeMoine et al., 2010).

Because it is known that PGC-1 α stimulates mitochondrial gene and antioxidant defenses during oxidative stress periods, such as physical exercise (Gilbert et al., 2014), we studied the training effects on mitochondria activity. The first main global result was that the mRNAs of genes involved in mitochondrial functioning were more regulated in the red muscle than in the white muscle. Secondly, we showed that HIT upregulated more target genes (*Cs*, OXPHOS complexes and *Ucp*) than MIT in the oxidative fibers. So, as in mammals, oxidative metabolism genes regulation should predominate in type I fibers (Wang and Sahlin, 2012).

Citrate synthase (CS), enzyme involved in the Krebs cycle, is considered as a mitochondrial biogenesis marker. Compared to untrained and MIT groups, HIT upregulated the *Cs* mRNA levels in the both muscles (Fig. 2,A and B) but neither MIT nor HIT had effect on the CS enzymatic activity (Table 4). In fish, studies focused on the training

adaptations of Cs mRNA or CS activity separately but not simultaneously. Among them, Magnoni et al. (2013, 2014) showed an increase in Cs mRNA levels in trout muscles after 30 days of MIT but they did not determine Cs mRNA levels in the early stages of training. In other studies, it was reported that CS activity increased after 30 days of MIT in trout (Morash et al., 2014) or zebrafish muscles (McClelland et al., 2006). So, we suggest that the translation of Cs mRNA may not have occurred in our study maybe because of short duration and/or intensity training. In mammals, it is often reported that mRNA precede (Perry et al., 2010) or coincide (Daussin et al., 2012) with changes in mitochondrial enzyme activity and protein content. In vertebrate, including fish, HIT appears to be an effective training to improve the mitochondrial biogenesis in the oxidative muscle even if the time course of responses in fish could be different from mammals (Bexfield et al., 2009; MacInnis et al., 2017).

Mitochondrial DNA encodes for 13 proteins in the OXPHOS (including ND1, COX1, COX2 and ATP synthase 6) whereas the remaining mitochondrial proteins (including COX4) are encoded by nuclear genes (Smeitink et al., 2001). In our study, HIT stimulated analyzed OXPHOS complex transcripts (*Nd1*, *Cox (1, 2 and 4)*, *Atp synthase 6*) in the red muscle, confirming that HIT stimulated mitochondrial functioning transcripts (Fig. 2,A). Differently, there were no changes in the white muscle (Fig. 2,B). MIT only stimulated *Cox2* mRNA in the oxidative red muscle. Our training protocols did not significantly modify the COX activity but HIT tended to increase in white muscle when compared to MIT ($p = .07$; Table 4). McClelland et al. (2006) showed that COX activity increased in zebrafish but after 30 days of sustained swimming. Few studies focused on the OXPHOS complexes mRNA in the present training conditions in mammals and at our knowledge, none in fish. Our results confirmed a fiber-type molecular response depending on training-type.

The UCPs are present in the inner mitochondrial membrane and principally known for its thermogenesis function. By dissipating the proton electrochemical gradient, UCP2 would have also a common role as redox sensors by reducing mitochondrial ROS production because of a more important electron transport through the mitochondrial ETC (Ji and Zhang, 2014). In fish, the effects of different environmental stressors (temperature, hypoxia, nutrient) have been studied on UCP2 (Bermejo-Nogales et al., 2014) but not the training effects at our knowledge. In the present paper, two UCP2 isoform genes (*Ucp2a* and *Ucp2b*) have been studied which have 93% of similitude in their sequences in rainbow trout (Coulibaly et al., 2006). In the red muscle, HIT increased the transcription of the gene encoding for UCP2a compared to untrained and MIT groups. This training stimulated *Ucp2b* mRNA compared to the other groups (Fig. 2, A). Neither MIT nor HIT affected the *Ucp2a* and *Ucp2b* mRNA levels in the white muscle (Fig. 2,B). HIT would enhance the transcription of *Ucp2a* in the red muscle. This mild uncoupling of mitochondrial OXPHOS may represent a process of defense against oxidative stress in mitochondria by reducing the potential electron leak associated to physical exercise.

During physical exercise, ROS are generated from different sources (mitochondrion, NADPH oxidase and xanthine oxidase) by contracting skeletal muscle (He et al., 2016). Even if mitochondrion is often cited as a main source (Davies et al., 1982; Gredilla et al., 2004; Powers and Jackson, 2008), the primary site remains unclear (Powers et al., 2011). It is known that ROS are necessary for numerous cellular adaptive mechanisms (Ljubovic et al., 2010). Single bouts of acute exercise may enhance ROS overproduction and cause potential oxidative damage. But, regular aerobic exercise, through ROS acting as signaling agents, can improve muscle oxidative balance by upregulation of endogenous antioxidant defenses systems (Steinbacher and Eckl, 2015). Among the main enzymatic antioxidants, SOD reduce the superoxide anion to hydrogen peroxide though two isoforms: SOD1 (Cu/Zn-SOD) and SOD2 (Mn-SOD) respectively present in the cytoplasm and in mitochondria. GPx and CAT mainly transform the hydrogen peroxide to water (Birben et al., 2012).

MIT did not modify the mRNA levels of the antioxidant enzymes (*Sod1*, *Sod2* and *Gpx1*; Fig. 3, A and B) and the enzymatic activities (SOD, CAT and GPx; Table 4) in both muscles. 8-isoprostanes, as radical attack targets are recognized to be a relevant marker of the oxidative stress (Montuschi et al., 2004). Its plasmatic concentration was unaffected by MIT (Table 5) suggesting that no ROS deleterious effects and overproduction occurred after 10 days of MIT in rainbow trout.

Differently from MIT conditions, HIT stimulated the antioxidant defenses mRNA levels in the oxidative muscle only (Fig. 3,A). The antioxidant enzymes activities remained unchanged in both muscles (Table 4). As for CS and COX results, translation of antioxidant enzymes mRNA may not occurred maybe because of short duration and/or intensity training. In rat, 12 weeks of HIT permitted to stimulate the enzymatic activities of SOD and GPx only in the *soleus* muscle (Criswell et al., 1993). Thereby, HIT seemed also to induce fiber type-specific antioxidant transcript responses mainly activated in the oxidative muscle. Otherwise, the absence of oxidative stress, supported by no change in 8-isoprostane plasmatic levels (Table 5), was conform to the mitohormesis theory. This theory explains that ROS generation associated with repeated exercise can result in antioxidant adaptations to facilitate protection in subsequent oxidative insult (Bo et al., 2013). The absence of oxidative stress at the systemic level induced by the training protocols is coherent with the calculated condition factors reflecting a good health of the fishes (Table 2).

To explore the relationships among the components analyzed, correlations between different mRNA levels of parameters were assessed. This analysis demonstrates that, mainly in the red muscle, the Cs mRNA is positively correlate to almost all the studied transcripts related to AMPK-PGC-1 α signaling pathway, OXPHOS and antioxidant enzymatic defenses. The significant positive correlation was moderate or strong for *Ampka1*, *Ampka2* and *Pgc-1a* ($0.64 < R < 0.71$) and OXPHOS components ($0.40 < R < 0.81$). The antioxidant systems presented strong relationships in the red muscle ($0.74 < R < 0.82$) (Table 3). These results suggested a coordinate regulation of the mitochondrial biogenesis with the AMPK-PGC-1 α signaling pathway and the activation of antioxidant defenses including UCP2 α as observed in mammals (Gouspillou et al., 2014). In the mouse skeletal muscle, overexpression of PGC-1 α induced a stimulation of the mitochondrial biogenesis involving a rise of the expression of genes encoding for OXPHOS complexes such as *Cox* (Leick et al., 2008). Based on our results and those of LeMoine et al. (2010), PGC-1 α seems sensitive to the exercise stimulus in fish. That confirms, as in mammals, its involvement in the regulation of mitochondrial biogenesis at least in conditions of exercise (Magnoni et al., 2014).

To a lesser extent, in the white muscle, Cs transcripts were moderately correlated with the *Ampka2* mRNA ($R = 0.50$), mitochondrial functioning compounds (except *Cox2* and *Ucp2b*) and antioxidant defenses (except *Sod1*) (Table 3). MIT and HIT had few effects on transcripts in white muscle in comparison to red muscle. Red muscle fibers are recruited during slow or moderate intensity movements when both red and white fibers are recruited during high intensity movements (Jayne and Lauder, 1994). In salmonids, studies showed that aerobic metabolism predominates in swimming up to 70 to 90% of their U_{crit} and that the recruitment of white fibers in rainbow trout initiated at swimming speeds around 80% U_{crit} (Hvas and Oppedal, 2017; Webb, 1971). Therefore in our study, an intensity of 90% U_{crit} was chosen for HIT in order to stimulate not only red muscle (as supposed during MIT) but potentially also white muscle. Our data show mRNA adaptations of the studied signaling pathway, mitochondrial compounds and antioxidant defenses mainly in the red muscle after HIT. During HIT, when fishes swam at 90% U_{crit} , the red oxidative muscle recruitment should be even greater than during MIT and the white glycolytic muscle should be also mobilized but in a lesser extent. We can hypothesize than a longer period of high intensity exercise (> 2 h/day) could have been more efficient in stimulating mitochondrial biogenesis in white muscle.

Our study has some methodological limitations related to the choice

of some protocol parameters. Ten days of training might be considered as too short in comparison to the durations of training used in previous studies. In fish, the CS activity is increased only after 30 days of sustained swimming whereas mRNAs are stimulated during the early stages between 1 and 2 weeks (LeMoine et al., 2010; McClelland et al., 2006; Morash et al., 2014). In a perspective to explore the temporal changes of adaptations of the AMPK–PGC-1 α signaling pathway and antioxidant systems to training, we chose to first explore their early changes. In the present paper, we clearly showed after 10 days of training the stimulation of mRNA levels mainly with the HIT protocol, but the duration was probably not long enough to observe concomitant protein changes. One of our perspectives remains to investigate a longer training duration.

The timing of sampling after training (65 h) might be long but was decided on the basis of different elements. First, LeMoine et al. (2010) compared training and acute exercise mRNA responses and concluded that 24 h of resting period were not sufficient to avoid the last exercise training session effects. Second, the present study using fish as model was performed in a perspective of human health. For mammals including human, the muscle biopsy is currently performed 48 or 72 h after the final training session to avoid potential acute exercise effects (Ghiarone et al., 2019; MacInnis et al., 2017). Third, the time of recovery is often reported to be slower in fish in comparison to mammals in part due to difference in body temperature (Milligan et al., 2000). So, for the above reasons and to be consistent with these studies in mammals, a resting period of 65 h was chosen to avoid any acute exercise effects with the risk of losing some early mRNA expression levels.

5. Conclusion

This study was the first to compare MIT and HIT on the AMPK–PGC-1 α , mitochondrial compounds and antioxidant defenses molecular responses in the trout skeletal muscles. Overall, the transcriptional response to swim training was more activated in the red muscle than in the white muscle. We suggested that the transcripts stimulation could be delayed or less regulated by training in the white muscle in these training conditions.

Several mammalian studies showed that HIIT stimulates more than MICT mitochondrial biogenesis and the muscle oxidative capacity (Godin et al., 2010). The present study reported that also in fish HIT was more relevant than MIT to stimulate the signaling pathway cascade involving AMPK–PGC-1 α , mitochondrial compounds and antioxidant defenses in the red muscle. The use of fish models may provide further insights for understanding the mechanisms by which exercise training improves health.

Acknowledgments

This study was funded by a ministerial scholarship. We would like to thank Patrick Calvès and Océane Cloarec for their technical assistance.

Declarations of Competing Interest

None.

References

Bartlett, J.D., Hwa Joo, C., Jeong, T.-S., Louhelainen, J., Cochran, A.J., Gibala, M.J., Gregson, W., Close, G.L., Drust, B., Morton, J.P., 2012. Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1 α mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 112, 1135–1143.

Beers, R.F.J., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 276–287.

Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2014. Tissue-specific gene expression and functional regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) by hypoxia and nutrient availability in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): implications on the physiological significance of UCP1–3 variants. *Fish Physiol. Biochem.* 40, 751–762.

Bexfield, N.A., Parcell, A.C., Nelson, W.B., Foote, K.M., Mack, G.W., 2009. Adaptations to high-intensity intermittent exercise in rodents. *J. Appl. Physiol.* 107, 749–754.

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.

Bishop, D.J., Botella, J., Granata, C., 2019. CrossTalk opposing view: exercise training volume is more important than training intensity to promote increases in mitochondrial content. *J. Physiol.* 597, 4115–4118.

Bo, H., Jiang, N., Ji, L.L., Zhang, Y., 2013. Mitochondrial redox metabolism in aging: effect of exercise interventions. *J. Sport Health Sci.* 2, 67–74.

Bratic, A., Larsson, N.-G., 2013. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* 123, 951–957.

Brett, J.R., 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 21, 1183–1226.

Cochran, A.J.R., Percival, M.E., Tricarico, S., Little, J.P., Cermak, N., Gillen, J.B., Tarnopolsky, M.A., Gibala, M.J., 2014. Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. *Exp. Physiol.* 99, 782–791.

Correia, J.C., Ferreira, D.M.S., Ruas, J.L., 2015. Intercellular: local and systemic actions of skeletal muscle PGC-1s. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 305–314.

Coulibaly, I., Gahr, S.A., Palti, Y., Yao, J., Rexroad, C.E., 2006. Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 7, 203.

Craig, P.M., Moyes, C.D., LeMoine, C.M.R., 2018. Sensing and responding to energetic stress: evolution of the AMPK network. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 224, 156–169.

Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K., Grinton, S., 1993. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25, 1135–1140.

Daussin, F.N., Rasseigneur, L., Bouitbir, J., Charles, A.-L., Dufour, S.P., Geny, B., Burelle, Y., Richard, R., 2012. Different timing of changes in mitochondrial functions following endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 44, 217–224.

Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., Packer, L., 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1198–1205.

Egan, B., Carson, B.P., Garcia-Roves, P.M., Chibalin, A.V., Sarsfield, F.M., Barron, N., McCaffrey, N., Moyna, N.M., Zierath, J.R., O’Gorman, D.J., 2010. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 588, 1779–1790.

Eya, J., Ukwuaba, V., Yossa, R., Gannam, A., Eya, J.C., Ukwuaba, V.O., Yossa, R., Gannam, A.L., 2015. Interactive effects of dietary lipid and phenotypic feed efficiency on the expression of nuclear and mitochondrial genes involved in the mitochondrial electron transport chain in rainbow trout. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 7682–7706.

Farhat, F., Dupas, J., Amérand, A., Goanvec, C., Feray, A., Simon, B., Guegueniat, N., Moisan, C., 2015. Effect of exercise training on oxidative stress and mitochondrial function in rat heart and gastrocnemius muscle. *Redox Rep.* 20, 60–68.

Farrell, A.P., 2008. Comparisons of swimming performance in rainbow trout using constant acceleration and critical swimming speed tests. *J. Fish Biol.* 72, 693–710.

Fuentes, E.N., Safian, D., Einarsdottir, I.E., Valdés, J.A., Elorza, A.A., Molina, A., Björnsson, B.T., 2013. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR activation, and mitochondrial biogenesis: implications for cell metabolism and growth in skeletal muscle of the fine flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 186, 172–180.

Fulton, T.W., 1902. Rate of Growth of Sea Fishes. Neill & Co., Edinburgh.

Gabriel, B.M., Zierath, J.R., 2017. The limits of exercise physiology: from performance to health. *Cell Metab.* 25, 1000–1011.

Ghiarone, T., Andrade-Souza, V.A., Learsi, S.K., Tomazini, F., Ataide-Silva, T., Sansonio, A., Fernandes, M.P., Saraiva, K.L., Figueiredo, R.C.B.Q., Tourneur, Y., et al., 2019. Twice-a-day training improves mitochondrial efficiency, but not mitochondrial biogenesis, compared with once-daily training. *J. Appl. Physiol.* 127 (3), 713–725.

Gilbert, M.J.H., Zerulla, T.C., Tierney, K.B., 2014. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. *Exp. Gerontol.* 50, 106–113.

Godin, R., Ascah, A., Daussin, F.N., 2010. Intensity-dependent activation of intracellular signalling pathways in skeletal muscle: role of fibre type recruitment during exercise. *J. Physiol.* 588, 4073–4074.

Gospillou, G., Sgaroto, N., Norris, B., Barbat-Artigas, S., Aubertin-Leheudre, M., Morais, J.A., Burelle, Y., Taivassalo, T., Hepple, R.T., 2014. The relationship between muscle fiber type-specific PGC-1 α content and mitochondrial content varies between rodent models and humans. *PLoS One* 9, e103044.

Gredilla, R., Phaneuf, S., Selman, C., Kendaiah, S., Leeuwenburgh, C., Barja, G., 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.

Gunnarsson, L., Kristiansson, E., Rutgersson, C., Sturve, J., Fick, J., Förlin, L., Larsson, D.G.J., 2009. Pharmaceutical industry effluent diluted 1:500 affects global gene expression, cytochrome P450 1A activity, and plasma phosphate in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2639–2647.

Hawley, J.A., Hargreaves, M., Joyner, M.J., Zierath, J.R., 2014. Integrative biology of exercise. *Cell* 159, 738–749.

He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C.-C., Yang, W., Zuo, L., 2016. Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Front. Physiol.* 7.

Hvas, M., Oppedal, F., 2017. Sustained swimming capacity of Atlantic salmon. *Aquac. Environ. Interact.* 9, 361–369.

Hyatt, H.W., Smuder, A.J., Sollanek, K.J., Morton, A.B., Roberts, M.D., Kavazis, A.N., 2016. Comparative changes in antioxidant enzymes and oxidative stress in cardiac, fast twitch and slow twitch skeletal muscles following endurance exercise training. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 8, 160–168.

Jayne, B.C., Lauder, G.V., 1994. How swimming fish use slow and fast muscle fibers:

- implications for models of vertebrate muscle recruitment. *J. Comp. Physiol. A*. 175, 123–131.
- Ji, L.L., Zhang, Y., 2014. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise: role of redox signaling. *Free Radic. Res.* 48, 3–11.
- Kieffer, J.D., 2010. Perspective—exercise in fish: 50+ years and going strong. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 156, 163–168.
- Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefèvre, F., Médale, F., 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 294, R1154–R1164.
- Leick, L., Wojtaszewski, J.F.P., Johansen, S.T., Kiilerich, K., Comes, G., Hellsten, Y., Hidalgo, J., Pilegaard, H., 2008. PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E463–E474.
- LeMoine, C.M.R., Craig, P.M., Dhekney, K., Kim, J.J., McClelland, G.B., 2010. Temporal and spatial patterns of gene expression in skeletal muscles in response to swim training in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Physiol. B* 180, 151–160.
- Ljubicic, V., Joseph, A.-M., Saleem, A., Uguccioni, G., Collu-Marchese, M., Lai, R.Y.J., Nguyen, L.M.-D., Hood, D.A., 2010. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1800, 223–234.
- MacInnis, M.J., Zacharewicz, E., Martin, B.J., Haikalas, M.E., Skelly, L.E., Tarnopolsky, M.A., Murphy, R.M., Gibala, M.J., 2017. Superior mitochondrial adaptations in human skeletal muscle after interval compared to continuous single-leg cycling matched for total work. *J. Physiol.* 595, 2955–2968.
- MacInnis, M.J., Skelly, L.E., Gibala, M.J., 2019. CrossTalk proposal: exercise training intensity is more important than volume to promote increases in human skeletal muscle mitochondrial content. *J. Physiol.* 597, 4111–4113.
- Magnoni, L.J., Crespo, D., Ibarz, A., Blasco, J., Fernández-Borràs, J., Planas, J.V., 2013. Effects of sustained swimming on the red and white muscle transcriptome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 166, 510–521.
- Magnoni, L.J., Palstra, A.P., Planas, J.V., 2014. Fueling the engine: induction of AMP-activated protein kinase in trout skeletal muscle by swimming. *J. Exp. Biol.* 217, 1649–1652.
- McClelland, G.B., 2012. Muscle remodeling and the exercise physiology of fish. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 40, 165–173.
- McClelland, G.B., Craig, P.M., Dhekney, K., Dipardo, S., 2006. Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Physiol.* 577, 739–751.
- Milligan, C.L., Hooke, G.B., Johnson, C., 2000. Sustained swimming at low velocity following a bout of exhaustive exercise enhances metabolic recovery in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 203, 921–926.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Montuschi, P., Barnes, P.J., Roberts, L.J., 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18, 1791–1800.
- Morash, A.J., Vanderveken, M., McClelland, G.B., 2014. Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. *Front. Physiol.* 5, 452.
- Mortensen, O.H., Plomgaard, P., Fischer, C.P., Hansen, A.K., Pilegaard, H., Pedersen, B.K., 2007. PGC-1 β is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day vs. once daily on expression of the PGC-1 family. *J. Appl. Physiol.* 103, 1536–1542.
- Neufer, P.D., Bamman, M.M., Muoio, D.M., Bouchard, C., Cooper, D.M., Goodpaster, B.H., Booth, F.W., Kohrt, W.M., Gerszten, R.E., Mattson, M.P., et al., 2015. Understanding the cellular and molecular mechanisms of physical activity-induced health benefits. *Cell Metab.* 22, 4–11.
- Olesen, J., Kiilerich, K., Pilegaard, H., 2010. PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* 460, 153–162.
- Palstra, A.P., Beltran, S., Burgerhout, E., Brittijn, S.A., Magnoni, L.J., Henkel, C.V., Jansen, H.J., van den Thillart, G.E.E.J.M., Spaik, H.P., Planas, J.V., 2013. Deep RNA sequencing of the skeletal muscle transcriptome in swimming fish. *PLoS One* 8, e53171.
- Perry, C.G.R., Lally, J., Holloway, G.P., Heigenhauser, G.J.F., Bonen, A., Spriet, L.L., 2010. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 588, 4795–4810.
- Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88, 1243–1276.
- Powers, S.K., Talbert, E.E., Adhietty, P.J., 2011. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J. Physiol.* 589, 2129–2138.
- Ross, S.W., Dalton, D.A., Kramer, S., Christensen, B.L., 2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 130, 289–303.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., DiMauro, S., 2001. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat. Rev. Genet.* 2, 342–352.
- Smith, L., Conrad, H., 1956. A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 403–413.
- Srere, P.A., 1969. [1] citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acylating)]. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, pp. 3–11.
- Steinbacher, P., Eckl, P., 2015. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 5, 356–377.
- Trewin, A.J., Berry, B.J., Wojtovich, A.P., 2018. Exercise and mitochondrial dynamics: keeping in shape with ROS and AMPK. *Antioxidants* 7, 7.
- Wang, L., Sahlin, K., 2012. The effect of continuous and interval exercise on PGC-1 α and PDK4 mRNA in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *Acta Physiol.* 204, 525–532.
- Webb, P.W., 1971. The swimming energetics of trout: II. oxygen consumption and swimming efficiency. *J. Exp. Biol.* 55, 521–540.
- Winder, W.W., Hardie, D.G., 1996. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 270, E299–E304.

2.2. Comment les paramètres d'exercice stimulent-ils les processus relatifs à la biogenèse mitochondriale au niveau des fibres musculaires lentes et rapides chez la truite arc-en-ciel ?

Publication n°2 :

How do exercise training variables stimulate processes related to mitochondrial biogenesis in slow and fast trout muscle fibres?

Pengam M., Amérand A., Simon B., Guernec A., Inizan M. and Moisan C. (2021)

Journal of Experimental Physiology

DOI: 10.1113/EP089231

2.2.1. Contexte et objectifs

L'un des défis actuels de notre société est de déterminer un protocole d'entraînement non chronophage conduisant à des effets bénéfiques pour la santé afin de limiter le développement des maladies chroniques non transmissibles. Toutefois, aucun consensus sur les types d'entraînement n'a encore été défini. De ce fait, de nombreuses études tentent de définir le protocole d'entraînement qui stimule le plus la biogenèse mitochondriale musculaire, adaptation reconnue comme étant un processus important dans la prévention de diverses pathologies chroniques. Pour cela, il paraît important de déterminer quel serait le paramètre d'exercice le plus pertinent entre, principalement l'intensité et le volume, tout en tenant compte de l'influence de la durée et de la fréquence. L'intensité de l'exercice et le volume de l'entraînement ont fait l'objet de méta-analyses récentes chez l'Homme et les avis sont controversés. En effet, MacInnis et al. (2019) mettent en avant l'intérêt de l'intensité d'exercice pour la stimulation du contenu mitochondrial dans le muscle squelettique alors que Bishop et al. (2019) ont argumenté en faveur du volume d'entraînement.

Le principal objectif est d'identifier le paramètre d'exercice et/ou une combinaison efficace pour stimuler la cascade de réactions impliquant la voie AMPK–PGC-1 α , les complexes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et les défenses antioxydantes dans les fibres musculaires rouges et blanches chez la truite arc-en-ciel.

2.2.2. Méthodologie

Six protocoles de nage différant par leur intensité, leur durée, leur fréquence et leur volume d'entraînement ont été mis en œuvre (Tableau 5). La durée d'entraînement de certains protocoles a été augmentée à 20 jours (par rapport aux 10 jours d'entraînement de l'étude n°1) dans le but d'étudier aussi la chronologie de mise en place des réponses induites par l'entraînement physique. Puis, sur la base que le HIIT semblait plus bénéfique que le MICT pour stimuler la biogenèse mitochondriale (cf. étude n°1), nous avons décidé d'explorer deux fréquences de HIIT (une ou deux sessions de deux heures par jour). Les intensités d'exercice appliquées ont été de 57% de l' U_{crit} pour le MICT et de 90% de l' U_{crit} pour le HIIT. Afin de répondre à notre objectif, l'effet de chacun des paramètres de l'entraînement (intensité, durée, fréquence et volume) ont été étudiés séparément dans les muscles rouge et blanc. Les dosages (transcrits et activités enzymatiques) effectués dans le cadre de cette deuxième étude sont les mêmes que ceux réalisés lors de la première. Par ailleurs, l'activité et les transcrits des sous-unités de la LDH ont également été dosés de manière à disposer d'indices sur l'activité du métabolisme anaérobie, probablement sollicité lors du HIIT.





Tableau 5. Description des paramètres d'exercice des protocoles d'entraînement.

Type d'entraînement	Intensité (% U_{crit})	Durée (jours)	Fréquence (nombre de sessions/jour)	Volume (UA)
HIIT	90	10	1 \times 2 h	1 747
		20		3 493
		10	2 \times 2 h	3 493
		20		6 987
MICT	57	10	-	13 395
		20	-	25 850

2.2.3. Principaux résultats et conclusions

Le Tableau 6 récapitule les principaux résultats. Nos résultats démontrent que le HIIT stimule davantage que le MICT les transcrits de la voie de signalisation impliquant AMPK–PGC-1 α , la CS, les complexes de la OXPHOS et les systèmes enzymatiques antioxydants dans les muscles rouge et blanc, confirmant ainsi les résultats obtenus dans notre première étude. Quel que soit le type de muscle, **l'intensité de l'exercice apparait comme le paramètre le plus déterminant pour stimuler les réponses transcriptionnelles et protéiques liées au métabolisme aérobie**. Néanmoins, nous avons également démontré que, **pour une intensité donnée, le volume est déterminant pour stimuler ces réponses qui se sont révélées par ailleurs fibres-dépendantes**. En effet, les fibres glycolytiques nécessitent un volume d'entraînement plus important que les fibres oxydatives pour la mise en place des adaptations transcriptionnelles. Par ailleurs, **contrairement au muscle rouge, le muscle blanc requiert une durée d'entraînement et une fréquence de HIIT plus importantes pour la stimulation des transcrits**. Les activités enzymatiques augmentent avec la fréquence dans les deux muscles et avec la durée seulement dans le muscle rouge. Enfin, les activités enzymatiques de la CS et de la LDH témoignent que **le muscle blanc tend à développer un métabolisme plus aérobie sous l'influence d'une intensité d'exercice élevée couplée à un important volume d'entraînement**.

Tableau 6. Effets des différents paramètres d'exercice sur les transcrits et les activités enzymatiques au niveau des muscles rouge et blanc et sur le taux plasmatique en 8-isoprostanes chez la truite arc-en-ciel.

		 Intensité	 Durée	 Fréquence HIIT	 Volume	
					HIIT	MICT
Muscle rouge	Transcrits	↗ <i>Ampka1, Pgc-1α</i> <i>Ucp2α</i> <i>Ldh-a</i>	↗ <i>Pgc-1α</i> défenses antioxydantes <i>Ldh-b</i> ↘ complexes OXPHOS <i>Ldh-a</i>	↘ <i>Ampka2</i> <i>Cs, Cox1-2-4</i> <i>Sod2, Ucp2α et 2β</i> <i>Ldh-a</i>	↘ <i>Ampka2</i> <i>Cs, complexes</i> OXPHOS <i>Ldh-a</i>	↗ <i>Pgc-1α</i> <i>Sod2</i> <i>Ldh-b</i> ↘ <i>Cox2</i>
	Activités enzymatiques	→	↗ LDH, SOD, GPx (p=0.07)	↗ CS, SOD, CAT (p=0.08)	↗ LDH, SOD	↗ LDH
Muscle blanc	Transcrits	↗ <i>Pgc-1α</i> <i>Cs</i> (p=0.06), <i>Nd1</i> <i>Ucp2α</i> <i>Ldh-b</i>	↗ <i>Ampka1, Pgc-1α</i> <i>Cox1</i> <i>Sod1, Sod2, Ucp2β</i> <i>Ldh-b</i>	↗ <i>Nd1, Cox2, Atp synthase 6</i> <i>Gpx1</i> <i>Ldh-b</i> ↘ <i>Pgc-1α</i> <i>Ucp2β</i>	↗ <i>Pgc-1α</i> <i>Cs, complexes</i> OXPHOS <i>Sod1, Gpx1, Ucp2α</i> <i>Ldh-b</i>	↗ <i>Pgc-1α</i> (p=0.06) <i>Nd1, Cox1</i> <i>Ldh-b</i>
	Activités enzymatiques	→	→	↗ CS, SOD	↗ CS ↘ LDH	→
Plasma	8-isoprostanes	→	→	↗	↗	→

Les symboles ↗, ↘ ou → correspondent respectivement à une stimulation significative, à une diminution significative ou pas d'effet face à l'augmentation de l'intensité de l'exercice, de la durée d'entraînement, de la fréquence du HIIT ou du volume d'entraînement.



Article n°2

How do exercise training variables stimulate processes related to mitochondrial biogenesis in slow and fast trout muscle fibres?

Morgane Pengam  | Aline Amérand  | Bernard Simon | Anthony Guernec |
Manon Inizan | Christine Moisan 

EA 4324 ORPHY, UFR Sciences et Techniques,
Université de Brest, 6 avenue Victor Le
Gorgeu, Brest F-29238, France

Correspondence

Morgane Pengam, Université de Brest, UFR
Sciences et Techniques, EA 4324 ORPHY, 6
avenue Victor Le Gorgeu, 29238 Brest, France.
Email: morgane.pengam@univ-brest.fr

Funding information

None.

Edited by: Joseph Bruton

Abstract

Exercise is known to be a powerful way to improve health through the stimulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle, which undergoes cellular and molecular adaptations. One of the current challenges in human is to define the optimal training stimulus to improve muscle performance. Fish are relevant models for exercise training physiology studies mainly because of their distinct slow and fast muscle fibres. Using rainbow trout, we investigated the effects of six different training protocols defined by manipulating specific training variables (such as exercise intensity, volume, duration and frequency), on mRNAs and some proteins related to four sub-systems (AMP-activated protein kinase–peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α signalling pathway, mitochondrial function, antioxidant defences and lactate dehydrogenase (LDH) metabolism) in both red and white muscles (RM and WM, respectively). In both muscles, high-intensity exercise stimulated more mRNA types and enzymatic activities related to mitochondrial biogenesis than moderate-intensity exercise. For volume, duration and frequency variables, we demonstrated fibre type-specific responses. Indeed, for high-intensity interval training, RM transcript levels are increased by a low training volume, but WM transcript responses are stimulated by a high training volume. Moreover, transcripts and enzymatic activities related to mitochondria and LDH show that WM tends to develop aerobic metabolism with a high training volume. For transcript stimulation, WM requires a greater duration and frequency of exercise than RM, whereas protein adaptations are efficient with a long training duration and a high frequency in both muscles.

KEYWORDS

exercise training, mitochondria, skeletal muscle

1 | INTRODUCTION

The practice of regular physical exercise is recommended to reduce the risk of many chronic illnesses such as cardiovascular diseases

(Karjalainen et al., 2015). Exercise training promotes numerous health benefit effects that include metabolic changes such as increases in maximal oxygen uptake ($\dot{V}_{O_{2max}}$), insulin sensitivity and oxidation of fatty acids (Bamman et al., 2014). It has also been largely demonstrated

that endurance training can improve muscle aerobic capacity by stimulating mitochondrial biogenesis (i.e. the generation of new mitochondrial components that enhance mitochondrial function and content) (Gabriel & Zierath, 2017). Studies are still needed, however, to (i) define the best training exercise protocols for stimulating mitochondrial biogenesis, and (ii) identify the precise cellular and molecular events involved and their temporal changes (MacInnis & Gibala, 2017; Trewin et al., 2018).

Currently, the challenge is to optimise training protocols to stimulate mitochondrial biogenesis adaptations in skeletal muscle. Interval training often consists of short periods of high intensity exercise interspersed by periods of recovery and represents a time efficient exercise type leading to many mitochondrial adaptations similar to those of moderate endurance training (Richards et al., 2011). However, no consensus has been reached on the most relevant training variable to stimulate mitochondrial biogenesis among relative work intensity, duration and frequency of exercise (MacInnis & Gibala, 2017). Indeed, although some human studies have shown that exercise intensity is the most important variable determining the stimulation of citrate synthase activity (used as marker of mitochondrial biogenesis) (MacInnis et al., 2019), but other studies underline exercise training volume, which is the product of exercise intensity, duration and frequency (Bishop et al., 2019). For ethical and methodological reasons (cohorts in parallel, biopsy size limitation), such experimentation is difficult to conduct in human. New models are therefore needed to take such investigations further.

Fish are a relevant model to explore mitochondrial adaptations to different modes of exercise training. Compared with mammals, fish offer the advantage of having clearly separated slow and fast fibres (McClelland, 2012; Pengam et al., 2020). This is a relevant criterion for exercise physiology studies because red oxidative and white glycolytic fibres are recruited differently depending on the type and the duration of exercise (Hvas & Oppedal, 2017). Energetic and electromyographic studies in salmonids, including rainbow trout, have defined the swimming velocities where red and white fibres are preferentially recruited (Altringham & Ellerby, 1999; Burgetz et al., 1998).

Several cellular pathways involved in mitochondrial biogenesis have been proposed to be responsible for mediating the adaptive responses to exercise training (Ji et al., 2016). Among these, the AMP-activated protein kinase (AMPK)-peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) signalling pathway is the main pathway that increases oxidative capacities in vertebrates, including fish (Lin et al., 2005). The depletion of ATP induced by a cellular stress such as exercise increases the AMP:ATP ratio, which activates AMPK (Jäger et al., 2007). This kinase upregulates PGC-1 α , which in turn stimulates mitochondrial and antioxidant genes (Olesen et al., 2010). This signalling pathway is regulated in part by reactive oxygen species (ROS) because some proteins, including AMPK and PGC-1 α , are known to be redox sensitive (Trewin et al., 2018).

In a previous study performed in rainbow trout, we demonstrated that, as in mammals, a high intensity-low volume training is more

New Findings

• What is the central question of this study?

Exercise is known to promote mitochondrial biogenesis in skeletal muscle, but what are the most relevant training protocols to stimulate it?

• What is the main finding and its importance?

As in mammals, training in rainbow trout affects slow and fast muscle fibres differently. Exercise intensity, relative to volume, duration and frequency, is the most relevant training variable to stimulate the processes related to mitochondrial biogenesis in both red and white muscles. This study offers new insights into muscle fibre type-specific transcription and expression of genes involved in mitochondrial adaptations following training.

efficient than a moderate intensity-high volume training at stimulating the transcripts related to the AMPK-PGC-1 α signalling pathway, mitochondrial functioning and antioxidant defences (Pengam et al., 2020). These responses were also greater in red muscle (RM) than in white muscle (WM). However, the question remains as to whether these fibre type-specific responses were more closely related to exercise intensity or to training volume.

The present study aimed to investigate the influence of exercise variables (intensity, volume, training duration and frequency) on the AMPK-PGC-1 α signalling pathway in RM and WM.

For this purpose, four swimming protocols were developed for rainbow trout. Transcripts and proteins involved in the AMPK-PGC-1 α signalling pathway, mitochondrial compounds, antioxidant defences and lactate dehydrogenase metabolism were explored in RM and WM and the data compared to a previous study (Pengam et al., 2020).

2 | METHODS

2.1 | Ethical approval

The experiment was designed in accordance with animal experimental authorisations no. 472802 and no. 16046. The three 'Rs' (replace, reduce and refine) were respected during the stabling and experiments. Juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were acquired from a local fish farm (EARL Pisciculture de Lescoat, Lesneven, France) and were killed by cerebral concussion at the end of the experiment. The present study complied with principles and standards for reporting experiments in *Experimental Physiology* (Grundy, 2015).

TABLE 1 Training protocols of the experimental groups

Experimental group	<i>n</i>	Training type	Volume (AU)	Intensity (% U_{crit})	Duration (days)	Frequency (session/day)
HIIT1, 10 ^a	12	HIIT	1747	90	10	1 × 2 h
HIIT1, 20	10		3493		20	1 × 2 h
HIIT2, 10	10		3493		10	2 × 2 h
HIIT2, 20	10		6987		20	2 × 2 h
MICT, 10 ^a	12	MICT	13,395	57	10	—
MICT, 20	10		25,850		20	—

^aExperimental groups used in a previous study (Pengam et al., 2020). HIIT, high-intensity interval training; MICT, moderate-intensity continuous training; U_{crit} , critical swimming speed; *n*: number of fish per group.

2.2 | Animals and experimental procedures

2.2.1 | Animals

On their arrival in the laboratory, the trout were acclimated for 2 weeks in 400-l polyethylene tanks filled with continuously renewed and aerated water at 15°C with a natural photoperiod (10 h:14 h light:dark). The experimental work was performed in winter. All trout were tagged subcutaneously between the head and the dorsal fin (Glass tag 2 × 12 mm, Biolog-id, Bernay, France). The body mass (134.4 ± 25.3 g; *n* = 96) and body length (BL; 21.9 ± 1.5 cm; *n* = 96) were measured for each animal.

The present study included six experimental training groups (Table 1), two of which come from a previous study (Pengam et al., 2020). The training protocols of these six groups differed according to the following exercise variables: intensity, volume, duration and frequency. Training volume was calculated according to the formula given below (also used in mammals, Granata et al., 2018):

$$\text{Training volume (AU)} = \text{training duration (days)} \\ \times \text{exercise intensity (\% } U_{crit}) \times \text{exercise timing (hours/day)}$$

Fish were randomly divided among three polyethylene tanks of 450 l with aerated tap water maintained at 15 ± 0.5°C and half renewed every day. One of these tanks contained untrained fish presenting only spontaneous movements, which were used as controls (*n* = 32). The other two circular tanks (diameter: 128 cm; height: 75 cm) were used for the experimental training groups: moderate intensity continuous training (MICT, *n* = 22) or high intensity interval training (HIIT, *n* = 42). In order to obtain uniform water flow, a smaller circular tank (diameter: 50 cm; height: 47 cm) was placed within each circular tank at the centre.

2.2.2 | Training protocols

Before starting the training, the critical swimming speed (U_{crit}) was determined to work out the water velocity corresponding to the training intensity protocols. For each experiment, the U_{crit} of eight fish was measured in a Brett-type swimming tunnel according to Brett

(1964) and Farrell (2008). The mean U_{crit} (3.26 ± 0.52 BL/s) was not significantly different between experimental groups. Before the beginning of the U_{crit} test, each fish was placed in the swimming tunnel for 1 h with a water velocity of 0.05 m/s to acclimate. Then, water velocity was increased by 0.10 m/s every 10 min until exhaustion, in water maintained at 15 ± 0.5°C. U_{crit} was calculated for each animal using Brett's equation: $U_{crit} = V_{n-1} + V_i \times \frac{t_n}{T_i}$, where V_{n-1} is the velocity of the last completed swimming speed (m/s); V_i is the velocity increment (0.1 m/s); t_n is the duration of the last step (min) and T_i is the duration of each step (10 min).

Fish of the MICT groups swam at approximately 57% U_{crit} for 23.5 h per day for 10 or 20 consecutive days. Water flow was stopped once per day for 30 min during which the fish were fed *ad libitum*. For HIIT regimes, fish were exercised at approximately 57% U_{crit} for 10 min to acclimate them to the water flow and were then exposed to a swimming speed of approximately 90% U_{crit} . Trout swam 5 days a week once daily for 2 h (HIIT1) or twice daily for 2 h (HIIT2), with a 2-h rest period. These training treatments were continued for 10 or 20 days (Table 1).

2.2.3 | Tissue sampling

To avoid potential effects of acute exercise on the results, samples were collected 65 h after the last training session (Leek et al., 2001; MacInnis et al., 2017). RM and WM were rapidly excised along the last 5–10 cm in front of the caudal fin and more precisely at the lateral line level for RM. Plasma samples were collected from 5% EDTA–blood by centrifugation at 3000 g for 5 min at room temperature. Muscles and plasma were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until further analyses.

2.3 | RNA extraction, reverse transcription and real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from 30 mg RM and WM using the NucleoSpin® RNA Set for NucleoZOL (Macherey Nagel, Hoerd, France) and stored at –80°C as previously described in Pengam et al. (2020). RNA concentrations were measured with a SimpliNano™

TABLE 2 Primer sequences used for Real-Time RT-PCR analysis

Target gene	Abbreviation	Primer sequences (5' to 3')	Database	Accession number
18S ribosomal RNA	18S rRNA ¹	(F) CGGAGGTTCTGAAGACGATCA (R) TCGCTAGTTGGCATCGTTTAT	GenBank	AF308735.1
Adenosine monophosphate kinase α 1	<i>Ampkα1</i>	(F) GCCACCATCAAAGAGATCCG (R) TCAAACCTTCTCACACACCTCC	GenBank	XM_021590586
Adenosine monophosphate kinase α 2	<i>Ampkα2</i>	(F) CGCTCAAGAGGGCTACCATT (R) CAGACTCGGTGCTCTCAAAC	GenBank	XM_021604240
Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α	<i>Pgc-1α</i> ²	(F) CAACCACCTTGCCACTTCCT (R) GGTTCAGAGATCTCCACAC	GenBank	FJ710605.1
Citrate synthase	<i>Cs</i> ¹	(F) AACCAACCTCACTCATCACCA (R) GCAGCAGAAGCAGCCATAA	GenBank	XM_021566131
Superoxide dismutase 1	<i>Sod1</i> ³	(F) AGGCTGTTTGCCTGCTCAA (R) CCAATCAGCTTCACAGGACCAT	GenBank	AF469663.1
Superoxide dismutase 2	<i>Sod2</i> ³	(F) CCACACCATCTTCTGGACAAAC (R) GGAGCCAAAGTCACGGTTGA	Tigr	TC123543
Glutathione peroxidase 1	<i>Gpx1</i> ³	(F) CCTGGGAAATGGCATCAAGT (R) GGGATCATCCATTGGTCCATAT	Tigr	TC94794
Uncoupling protein 2 α	<i>Ucp2α</i>	(F) ACCAAACCGACGTTACCATGG (R) TTAAGAAGCGCGCTTGTATG	GenBank	NM_001124654.1
Uncoupling protein 2 β	<i>Ucp2β</i>	(F) TATTGCCATGGTGACCAAGGA (R) CTACAGAGGAGTGGTGTAGTT	GenBank	NM_001124571.1
NADH dehydrogenase 1	<i>Nd1</i>	(F) TTGTACCCGTTCTGTAGCAG (R) TAGTTTTAGGCCGCTGCGAT	GenBank	NP_008290
Cytochrome c oxidase 1	<i>Cox1</i>	(F) TCAACCAACCACAAAGACATTG (R) CACGTTATAGATTTGGTCATCC	GenBank	NP_008292
Cytochrome c oxidase 2	<i>Cox2</i> ²	(F) GAGGCAATAAAGGCTGTTTGGT (R) GCCGTTCTTCTTTAGGTGTAA	GenBank	NP_008293
Cytochrome c oxidase 4	<i>Cox4</i> ⁴	(F) TACGTGGGGACATGGTGTT (R) CCCAGGAGCCCTTCTCCTTC	Sigenae	tcav0004c.i.22_3.1.s.om.8
Adenosine triphosphate synthase 6	<i>Atp synthase 6</i>	(F) CTTTCGACCAATTTATGAGCCC (R) TCGGTTGATGAACCACCCTTG	GenBank	NP_008295
Lactate dehydrogenase A	<i>Ldh-a</i>	(F) AGGTCATGGACCTGCAGCAT (R) GGCTGTACTTGACGATCTGG	GenBank	XM_021564046.1
Lactate dehydrogenase B	<i>Ldh-b</i>	(F) GGTCCAGAGGAACGTCAACA (R) TGCCGATGACACGGTGTGTTG	GenBank	XM_021577545.1

The hybridisation temperature was 60°C for all primers. Primers were designed by ourselves except those with a subscript number. (F): Forward, (R): Reverse. References: ¹Magnoni et al. (2013); ²Eya et al. (2015); ³Gunnarsson et al. (2009); ⁴Kolditz et al. (2008).

(Biochrom Spectrophotometers/Fisher Scientific, Illkirch, France) spectrophotometer and their purity was assessed using OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratios. Their integrity was also checked by electrophoresis on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide.

Each sample of RNA was reverse transcribed with the qScript™ cDNA synthesis kit (Quanta BioSciences, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) containing a reaction mix and reverse transcriptase. Complementary DNA was diluted 10-fold for PCR experiments and stored at -20°C.

Real-time RT-PCR was realised with a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) as previously described in Pengam et al. (2020). Briefly, target genes were amplified and quantified by SYBR® Green incorporation (EurobioGreen® Mix qPCR 2x Lo-Rox; Eurobio Ingen, Courtaboeuf,

France) with specific primers (presented in Table 2). The cycling conditions consisted in a denaturing step at 95°C for 2 min, followed by 40–50 cycles of amplification (denaturation: 95°C for 5 s; annealing/extension: 60°C for 30 s). At the end of amplification, a melting curve programme was carried out. A seven-point standard curve was used to determine the PCR efficiency of each primer pair (between 90% and 100%) and the transcription level of the different genes in all samples. Each gene was amplified in a single run from triplicates for standard points and duplicates for sample points. Quantification was normalised using 18S ribosomal RNA (rRNA) as a reference gene. This choice was validated by the absence of significant differences in 18S rRNA levels between experimental groups for each muscle (red and white) ($P > 0.05$). All mRNA levels were first calculated with the ratio target gene mRNA/18S rRNA and mRNA levels of each

experimental group were then expressed as fold change with respect to the untrained group, which was set at 1.

2.4 | Enzyme activities and oxidative stress marker

All measurements were determined using a plate reader (SAFAS Xenius, Monaco) and were performed in duplicate at 15°C.

2.4.1 | Citrate synthase activity

For each tissue type, 50 mg of frozen muscle were homogenised with a Polytron homogeniser in an extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.1, 4°C). Citrate synthase (CS) activity was determined as previously described in Pengam et al. (2020).

2.4.2 | Lactate dehydrogenase activity

Tissue samples, 70 mg of frozen RM and 150 mg of frozen WM, were homogenised with a Polytron in an extraction buffer (100 mM Tris, 2 mM EDTA and 2 mM dithioerythritol, pH 7.4, 4°C). The homogenate was centrifuged at 12,000 *g* for 20 min at 4°C. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined on the resulting supernatant at 340 nm using 40 mM sodium pyruvate and 40 mM NADH. Activity was calculated based on oxidation of NADH and expressed in $\mu\text{mol oxidised NADH}/\text{min}/\text{mg protein}$.

2.4.3 | Antioxidant enzyme activities

For each tissue type, 200 mg of frozen muscles were homogenised in an extraction buffer (75 mM Tris and 5 mM EDTA, pH 7.4, 4°C) with a Polytron homogeniser. After centrifugation at 12,000 *g* for 10 min at 4°C, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were determined on the resulting supernatant as previously described in Pengam et al. (2020). Catalase activity was not detectable in WM.

2.4.4 | Plasmatic oxidative stress marker

Total plasmatic 8-isoprostane (free and esterified in lipids) concentration was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's protocol. All samples were hydrolysed using 15% KOH and incubated for 60 min at 40°C and then neutralised with potassium phosphate buffer. A further purification step was then necessary with ethanol. Finally, samples were extracted using ethyl acetate containing 1% methanol and SPE Cartridges (C-18) (Cayman Chemical). After 18 h of incubation, plasmatic 8-isoprostane concentration was measured at 410 nm and expressed in pg/ml.

2.5 | Statistical analysis

All values are given as means with standard deviation (SD). Statistics were performed using Statistica v. 13 software (StatSoft, Paris, France). Normality of population distributions was tested using the Shapiro-Wilk test. The appropriate tests were then used to detect significant differences: one-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests followed by a *post hoc* test (HSD) or a Mann-Whitney test, respectively. The significance threshold was set at $P < 0.05$.

Correlations were calculated and a principal component analysis (PCA) were performed using R software and the *FactoMineR* package. Correlation matrix coefficients were obtained with a Pearson test using the R *corrplot* package.

3 | RESULTS

3.1 | mRNA correlations and principal component analysis

Based on the mRNA data from the six training protocols, numerous mRNA levels of each subsystem (AMPK-PGC-1 α signalling pathway, mitochondrial functioning, antioxidant defences and LDH metabolism) were found to be correlated with one another in both RM and WM (Figure 1, left). The first two dimensions of the PCA accounted for more than 64% of the total variance in both muscles (Figure 1, right). Some differences were observed between RM and WM. Correlations were more numerous and higher between AMPK-PGC-1 α signalling pathway mRNAs and both mitochondrial functioning and antioxidant defence subsystems in RM than in WM. In WM, the correlations between mitochondrial functioning, antioxidant defences and LDH metabolism were more numerous and higher than in RM. In contrast to RM, *Pgc-1 α* and *Cs* were not correlated in WM.

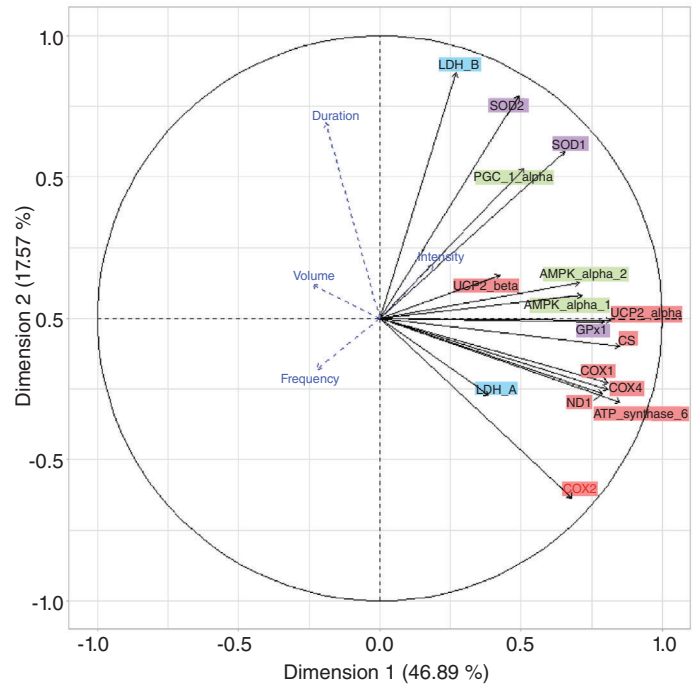
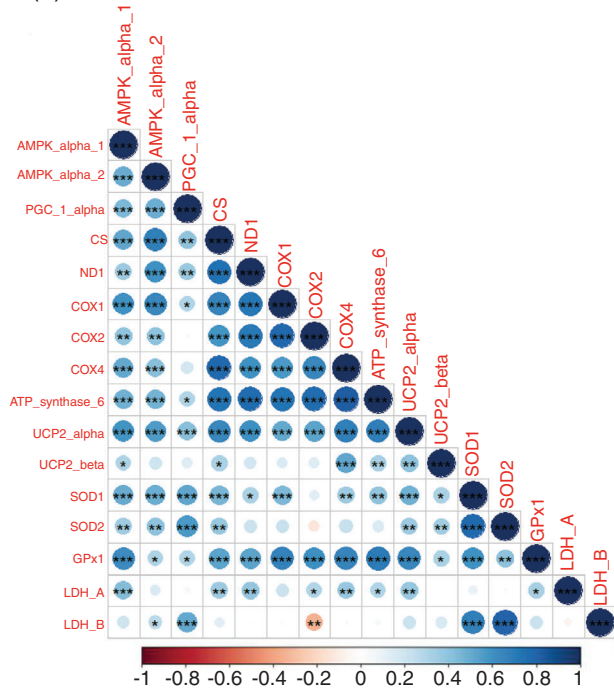
3.2 | Influence of training variables on mRNA levels, enzymatic activities and 8-isoprostane

To analyse the effects of exercise intensity and training volume, we present these results on the same figures (Figures 2–4). MICT (57% U_{crit}) and HIIT (90% U_{crit}) protocols were each pooled for statistical analysis of the exercise intensity effects.

3.2.1 | Exercise intensity

Overall, we observed that 90% U_{crit} tended to increase more transcript types in both muscles compared with 57% U_{crit} (Figures 2 and 3). In RM, 90% U_{crit} significantly increased *Ampk α 1*, *Pgc-1 α* , *Ucp2 α* and *Ldh-a* mRNA contents (Figure 2) and tended to increase SOD activity ($P = 0.10$; Figure 4a). In WM, 90% U_{crit} stimulated more *Pgc-1 α* , *Cs* ($P = 0.06$), *Nd1*, *Ucp2 α* and *Ldh-b* gene transcriptions compared with

(a) Red muscle



(b) White muscle

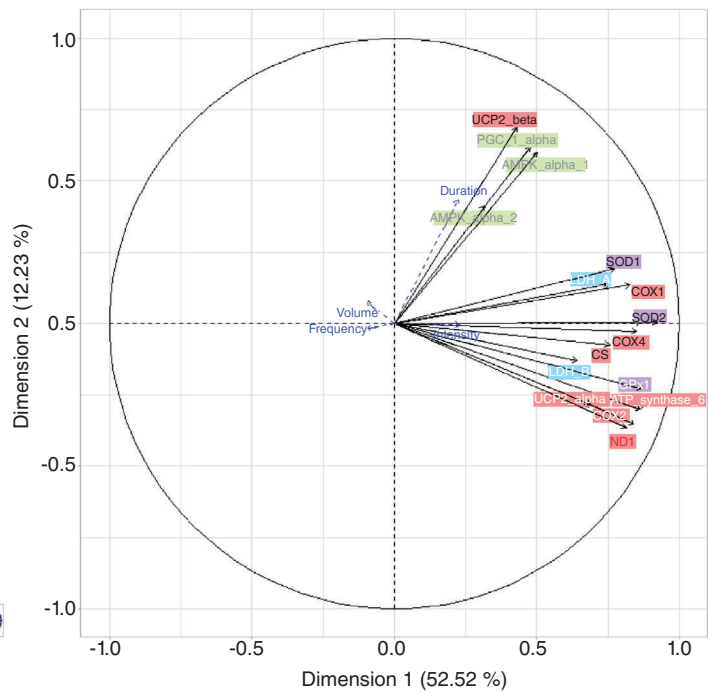
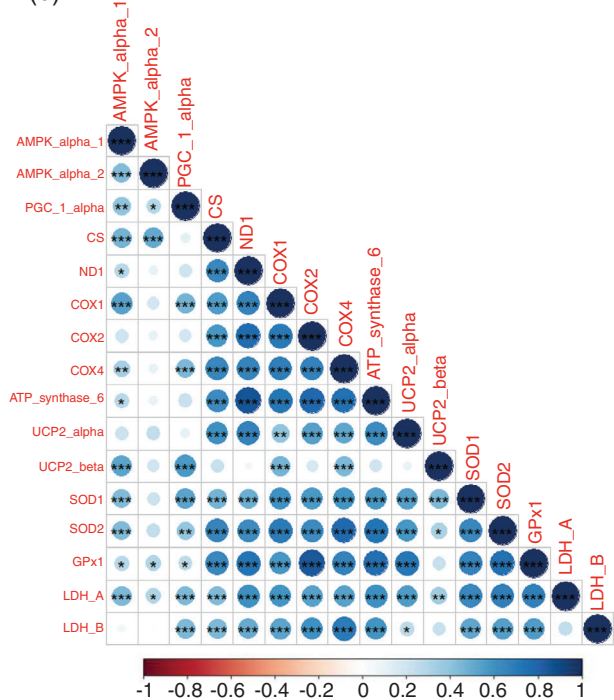


FIGURE 1 Correlations (left) and correlation circles of the first two dimensions of a multiple factor analysis (principal component analysis, PCA) (right) performed using mRNA levels of the AMPK-PGC-1 α signalling pathway (green), mitochondrial functioning (red), antioxidant defences (purple) and lactate dehydrogenase subunits (blue) in red ($n = 62$) (a) and white ($n = 63$) (b) muscles of the six experimental groups (Table 1). For the correlations, the colour scale indicates the degree of correlation; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. For the PCA, exercise intensity, volume, duration and frequency are projected as supplementary variables (in blue, dotted lines)

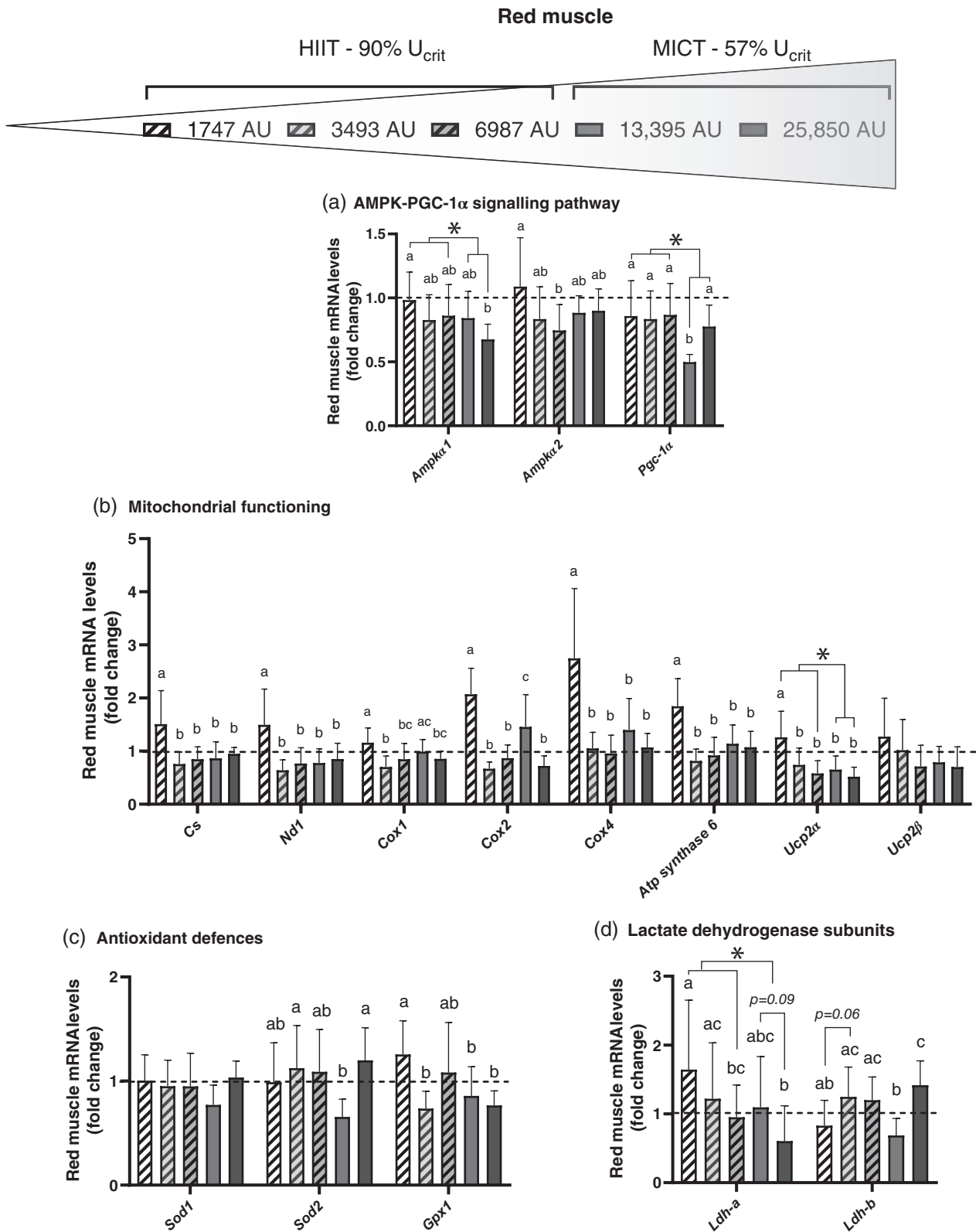


FIGURE 2 Effects of exercise intensity (57% U_{crit} , $n = 22$ and 90% U_{crit} , $n = 40$) and training volume (1747 AU, $n = 11$; 3493 AU, $n = 19$; 6987 AU, $n = 10$; 13,395 AU, $n = 12$ and 25,850 AU, $n = 10$) on mRNA levels of the AMPK-PGC-1 α signalling pathway (a), mitochondrial functioning (b), antioxidant defences (c) and lactate dehydrogenase subunits (d) in red muscle. Hatched bars represent high exercise intensity groups (HIIT, 90% U_{crit}) and non-hatched bars represent moderate exercise intensity groups (MICT, 57% U_{crit}). Results of each experimental group are expressed as fold change compared with the respective untrained group, which was set at 1. Results are shown as means with SD. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between experimental groups. *Significant differences between high and moderate exercise intensity groups

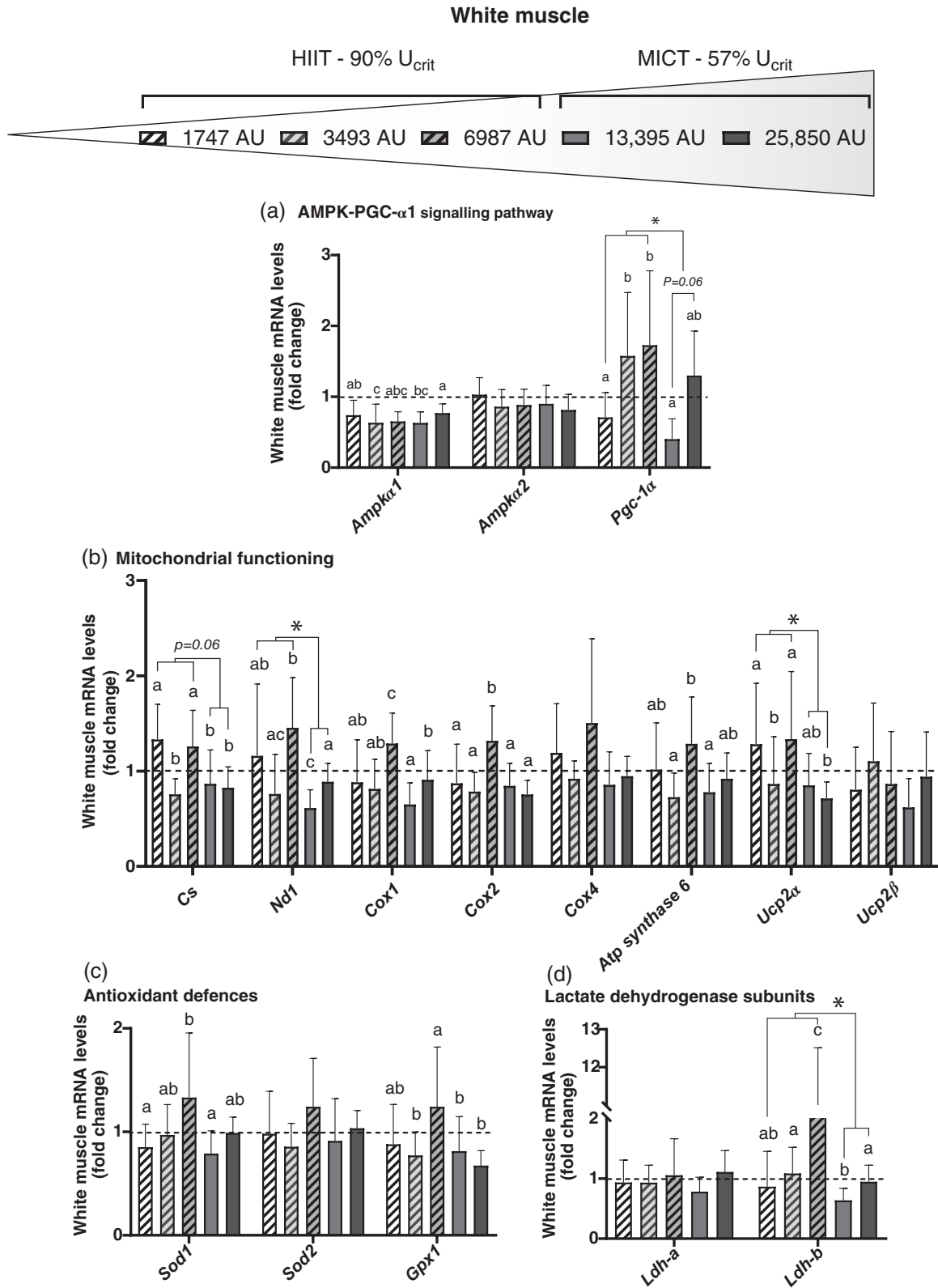


FIGURE 3 Effects of exercise intensity (57% U_{crit} , $n = 21$ and 90% U_{crit} , $n = 42$) and training volume (1747 AU, $n = 12$; 3493 AU, $n = 20$; 6987 AU, $n = 10$; 13,395 AU, $n = 11$ and 25,850 AU, $n = 10$) on the studied mRNA levels in white muscle. Data analysis and presentation details are the same as those given in Figure 2 caption

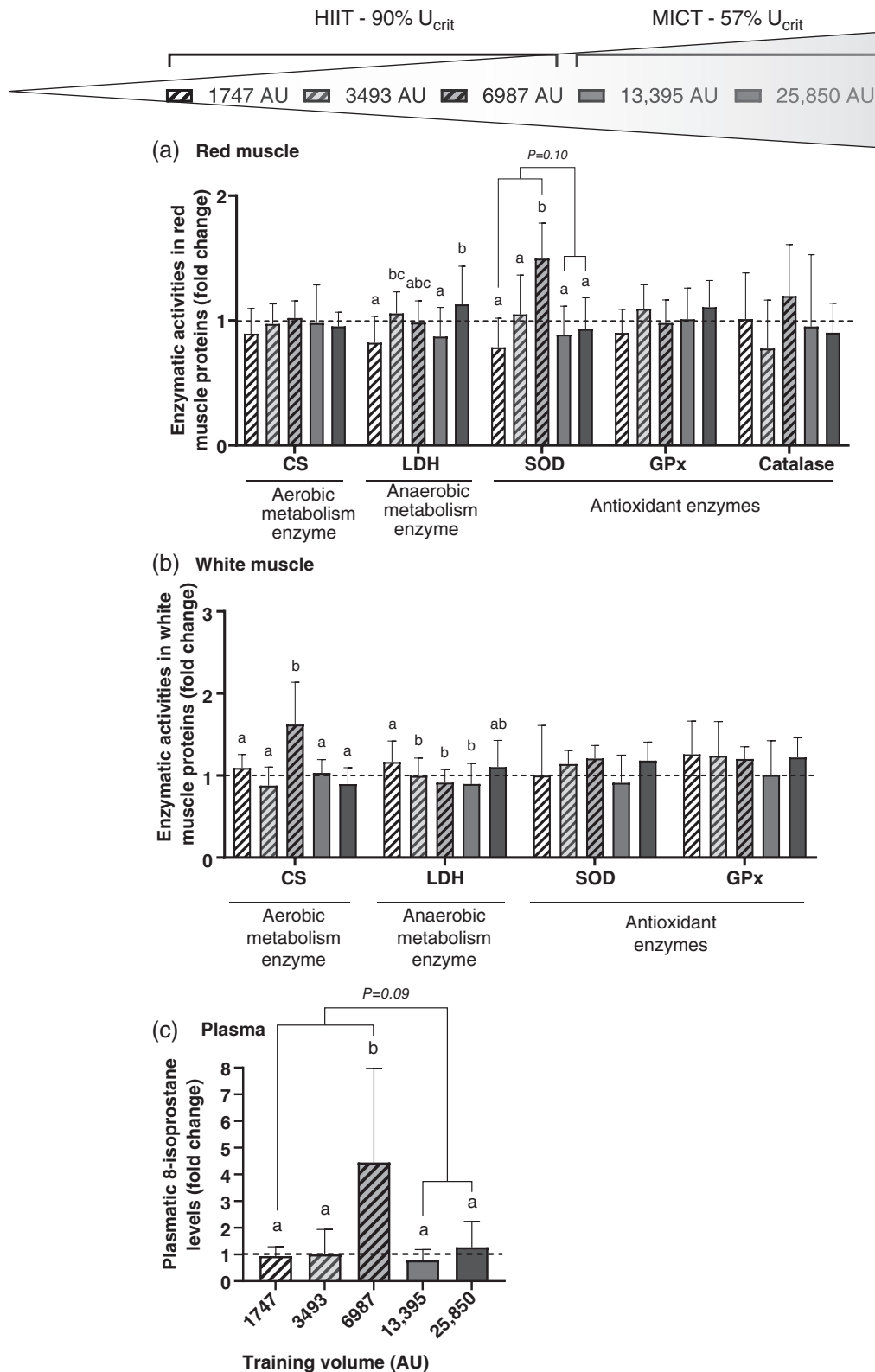


FIGURE 4 (a, b) Effects of exercise intensity (57% U_{crit} , $n = 22$ and 90% U_{crit} , $n = 42$) and training volume (1747 AU, $n = 11$; 3493 AU, $n = 19$; 6987 AU, $n = 10$; 13,395 AU, $n = 12$ and 25,850 AU, $n = 10$) on citrate synthase (CS), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase activities in red (a) and white (b) muscles. (c) Effects of exercise intensity (57% U_{crit} , $n = 22$ and 90% U_{crit} , $n = 38$) and training volume (1747 AU, $n = 11$; 3493 AU, $n = 18$; 6987 AU, $n = 9$; 13,395 AU, $n = 12$ and 25,850 AU, $n = 10$) on plasmatic 8-isoprostane levels. Data analysis and presentation details are the same as those given in Figure 2 caption

57% U_{crit} (Figure 3). Plasmatic 8-isoprostane concentration tended to increase at 90% U_{crit} ($P = 0.09$; Figure 4c).

3.2.2 | Training volume

For the analysis of training volume effects, we pooled the results from the protocols with the same training volume (HIIT1, 20 days and HIIT2, 10 days).

Overall, in RM, a low training volume upregulated mRNA levels (Figure 2). Indeed, the lowest training volume (1747 AU) stimulated *Ampk α* ($\alpha 1$ and $\alpha 2$), mitochondrial compounds (*Cs*, *Nd1*, *Cox 1*, 2 and 4, *Atp synthase 6* and *Ucp2 α*), *Gpx1* and *Ldh-a* mRNAs. The highest MICT training (25,850 AU) only increased *Pgc-1 α* and *Sod2* mRNA levels compared with the lowest MICT volume (13,395 AU). Concerning the enzyme activities, SOD increased significantly at the highest HIIT volume (6987 AU) compared with the other protocols. LDH activity was greater at the highest MICT volume compared with the lowest HIIT and MICT volumes (Figure 4a).

Overall, in WM, an intermediate training volume (6987 AU) stimulated the most mRNA levels (Figure 3). Indeed, the highest HIIT volume (6987 AU) largely stimulated more gene transcription (*Pgc-1 α* , mitochondrial compounds, *Sod1*, *Gpx1* and *Ldh-b*) than the other training protocols. Among the MICT protocols, the highest volume stimulated *Ampk $\alpha 1$* , *Pgc-1 α* ($P = 0.06$), *Nd1*, *Cox1* and *Ldh-b* mRNA levels. CS activity was upregulated by the highest HIIT volume and LDH activity by the lowest HIIT volume (Figure 4b).

The highest volume of HIIT largely increased plasmatic 8-isoprostane concentration while MICT had no effect (Figure 4c).

3.2.3 | Training duration

For each training duration (10 and 20 days), HIIT and MICT results were pooled.

In RM, 10 days of training stimulated some of the mitochondrial functioning mRNAs (including *Nd1*, $P = 0.055$; *Cox2*, *Atp synthase 6* and *Ucp2 α*) and *Ldh-a* mRNA whereas 20 days led to greater upregulation of *Pgc-1 α* , *Sod1*, *Sod2* and *Ldh-b* mRNAs (Figure 5). In RM, 20 days of training stimulated LDH and SOD activities and tended to increase GPx activity ($P = 0.07$) with no change in WM (Figure 6a,b). In WM, 20 days of training increased numerous transcripts (including *Ampk $\alpha 1$* , *Pgc-1 α* , *Cox1*, *Ucp2 β* , *Sod1*, *Sod2* and *Ldh-b*) (Figure 7). No significant training duration effects were shown for plasmatic 8-isoprostane levels (Figure 6c).

3.2.4 | HIIT frequency

In RM, *Ampk $\alpha 2$* , *Cs*, *Cox (1, 2 and 4)*, *Ucp2 α* , *Ucp2 β* and *Sod2* mRNA contents were upregulated by one session of HIIT (HIIT1) (Figure 8), whereas in WM, two sessions of HIIT (HIIT2) increased mRNA levels (*Nd1*, *Cox2*, *Atp synthase 6*, *Gpx1* and *Ldh-b*), except *Ampk $\alpha 1$* and

Ucp2 β mRNAs, which were more stimulated by HIIT1 (Figure 9). HIIT2 stimulated CS and SOD activities more in both muscles, CAT activity in RM ($P = 0.08$) (Figure 10a, b) and also plasmatic 8-isoprostane (Figure 10c).

4 | DISCUSSION

This study explored the effects of six different training protocols, created by manipulating exercise variables (intensity, volume, duration and/or frequency), on molecular mechanisms related to mitochondrial biogenesis in slow and fast muscle fibres of rainbow trout. The primary goal of the present study was to determine the most relevant training variable to stimulate these events. Our main findings were: (i) WM tended to develop aerobic metabolism with a high training volume, confirmed by the mitochondria and LDH responses; (ii) gene transcriptions and enzymatic activities in slow and fast fibres and plasmatic 8-isoprostane concentrations were more stimulated by HIIT than by MICT; (iii) the lowest HIIT volume stimulated mRNA responses in RM whereas the highest HIIT volume stimulated them in WM; (iv) a longer training duration (20 days vs. 10 days) and a higher frequency (2×2 h/day vs. 1×2 h/day) promoted protein expression in trout muscles.

The present study focuses on the effects of training and not of acute exercise on skeletal muscle. So, the time point for muscle sampling after the last exercise is important to define. Recent studies sampled skeletal muscle 48–72 h after the last training session to avoid the acute effects of exercise on the muscle responses (MacInnis et al., 2017; Miyamoto-Mikami et al., 2018). In our study, we chose an intermediary time point of 65 h for tissue sampling with the risk of losing some early mRNA expression but to be sure to explore training effects.

It is a challenge to define a training protocol for humans that improves overall health and is adapted to today's rhythm of life (Gibala et al., 2012). While it is agreed that exercise is a powerful stimulus to improve the processes beneficial to health, such as mitochondrial biogenesis, the optimal training stimulus is still debated (Bishop et al., 2014). The dose responses of exercise variables (intensity, volume, duration and frequency) that maximise molecular and cellular responses are not well known (MacInnis & Gibala, 2017). Several studies demonstrated that high intensity training represents a very time-efficient mode of training to promote mitochondrial biogenesis (Gibala et al., 2012; Gillen et al., 2016; MacInnis et al., 2019), but further study is still needed to gain a better understanding of the cellular process involved in training-induced responses. Fish make relevant experimental animal models for exercise physiology studies because they can be easily prompted to swim against a water flow (Li et al., 2017). Fish have separated slow and fast muscle fibres (McClelland, 2012), which are differently recruited according to the training type as in mammals (Godin et al., 2010; Jayne & Lauder, 1994). Recent studies in fish have shown similarities with mammals in training-activated signalling pathways such as AMPK–PGC-1 α , one of the main pathways involved in cellular energetic state and mitochondrial biogenesis (Magnoni et al., 2014; Morash et al.,

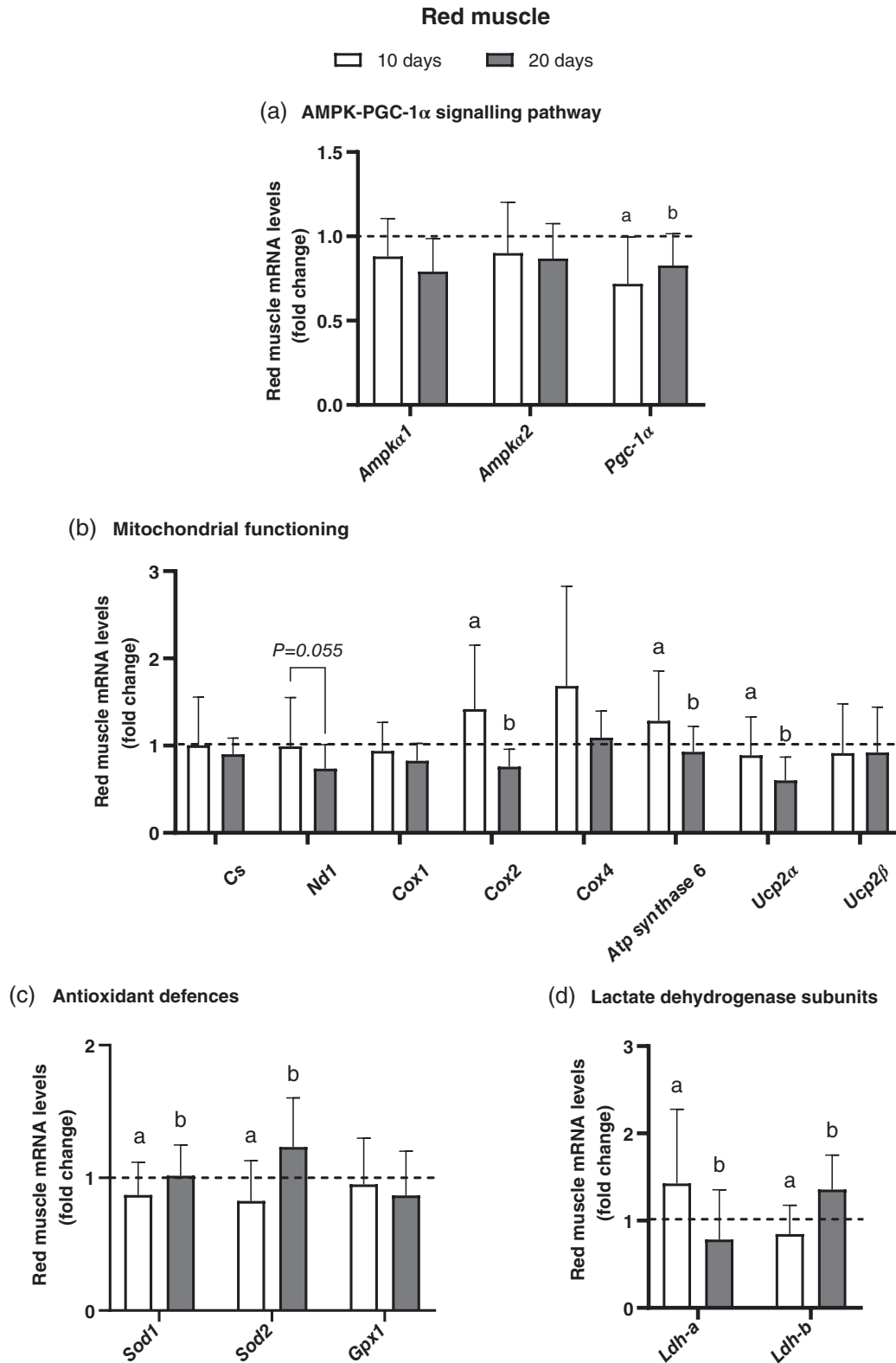


FIGURE 5 Effects of training duration (10 days, $n = 33$ and 20 days, $n = 29$) on mRNA levels of the AMPK-PGC-1 α signalling pathway (a), mitochondrial functioning (b), antioxidant defences (c) and lactate dehydrogenase subunits (d) in red muscle. For each training duration (10 and 20 days), HIIT and MICT results were pooled. Results of each experimental group are expressed in fold change compared with the respective untrained group, which was set at 1. Results are shown as means with SD. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between experimental groups

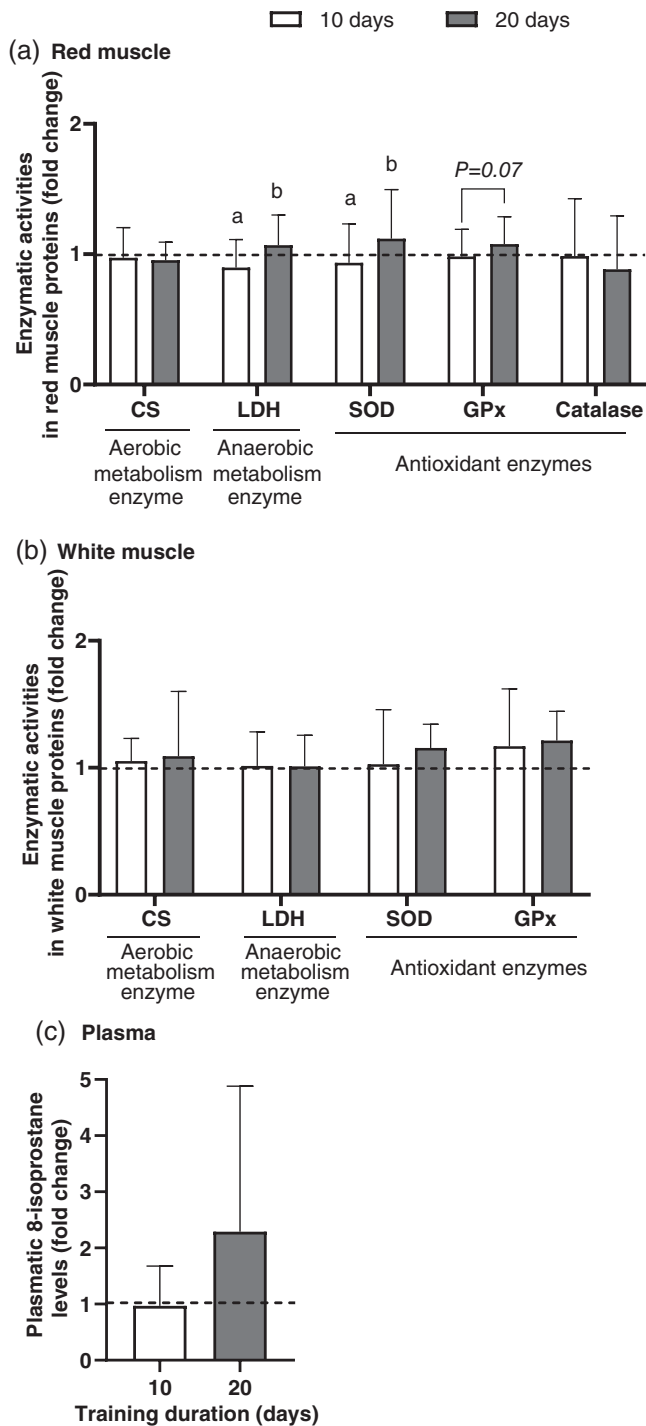


FIGURE 6 (a, b) Effects of training duration (10 days, $n = 34$ and 20 days, $n = 30$) on citrate synthase (CS), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase activities in red (a) and white (b) muscles. (c) Effects of training duration (10 days, $n = 32$ and 20 days, $n = 28$) on plasmatic 8-isoprostane levels. Data analysis and presentation details are the same as those given in Figure 5 caption

2014; Pengam et al., 2020; Trewin et al., 2018). Other signalling pathways stimulating mitochondrial biogenesis, such as p38 mitogen-activated protein kinase and the tumour suppressor p53, are also phylogenetically conserved in fish but studied to a lesser extent than in mammals (Magnoni et al., 2013).

In fish, AMPK-PGC-1 α signalling pathway activation can also be related to environmental stress responses such as hypoxia or anoxia (Craig et al., 2018). In order to verify the relationships between the four explored subsystems (AMPK-PGC-1 α signalling pathway, mitochondrial functioning, antioxidant defences and LDH metabolism) in a physical exercise adaptation context, we assessed the correlations between mRNA levels of these groups. Overall, numerous correlations between quantified mRNAs were demonstrated (Figure 1), suggesting that training adaptations involve these coordinated metabolic processes as in mammals. However, the most correlated subsystems were not strictly the same ones in RM and WM. The strongest and most numerous correlations in RM were established between *Ampk α* ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) mRNAs and both mitochondrial functioning and antioxidant defence subsystems, whereas in WM they were found between mitochondrial functioning, antioxidant defences and LDH metabolism. These differences could be related to the specific metabolism of each muscle and to the difference in the recruitment of fibres according to exercise type (Kristensen et al., 2015). It is known that WM has few mitochondria and relies predominantly on anaerobic metabolism for energy production during high intensity exercise such as burst swimming. RM fibres, which have a high mitochondria content, are mainly involved in aerobic and sustained swimming (Tudorache et al., 2013). So, as in mammals, the AMPK-PGC-1 α signalling pathway should be related to mitochondria functioning (CS and oxidative phosphorylation (OXPHOS)) in the skeletal muscle but should be less evident in WM than in RM. Indeed, *Pgc-1 α* and *Cs* mRNAs were correlated in RM but not in WM. In contrast to mammals (Olesen et al., 2010), PGC-1 α did not play a direct role in CS regulation in zebrafish mixed muscles mainly composed of WM (LeMoine et al., 2010). It is possible that differences in training protocols might explain the differences in training responses between fish and mammals (McClelland et al., 2006). Moreover, it might be interesting to explore other co-transcription factors such as p53 that stimulate mitochondrial content, at least in mammals (Huertas et al., 2019).

To adjust the exercise intensity of the training protocols, the critical swimming speed (U_{crit}) was determined. This represents the indicative maximum aerobic performance of the fish and can thus be assimilated to maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$) in mammals (McClelland, 2012). In salmonids, like rainbow trout, aerobic metabolism, which recruits mainly oxidative fibres (RM), predominates in swimming up to 70–90% of the U_{crit} . Recruitment of glycolytic fibres (WM) is known to be initiated at swimming speeds between 80% U_{crit} (for most of the studies, Hvas & Oppedal, 2017; Jones, 1982) and 86% U_{crit} (Beddow & McKinley, 1999). So, we chose an exercise intensity of 90% U_{crit} for HIIT in order to increase the probability to recruit not only oxidative fibres but also glycolytic fibres.

High exercise intensity upregulated *Ampk $\alpha 1$* , *Pgc-1 α* , *Ucp2 α* and *Ldh-a* mRNAs in RM (Figure 2) and *Pgc-1 α* , *Cs* ($P = 0.06$), *Nd1*, *Ucp2 α* and

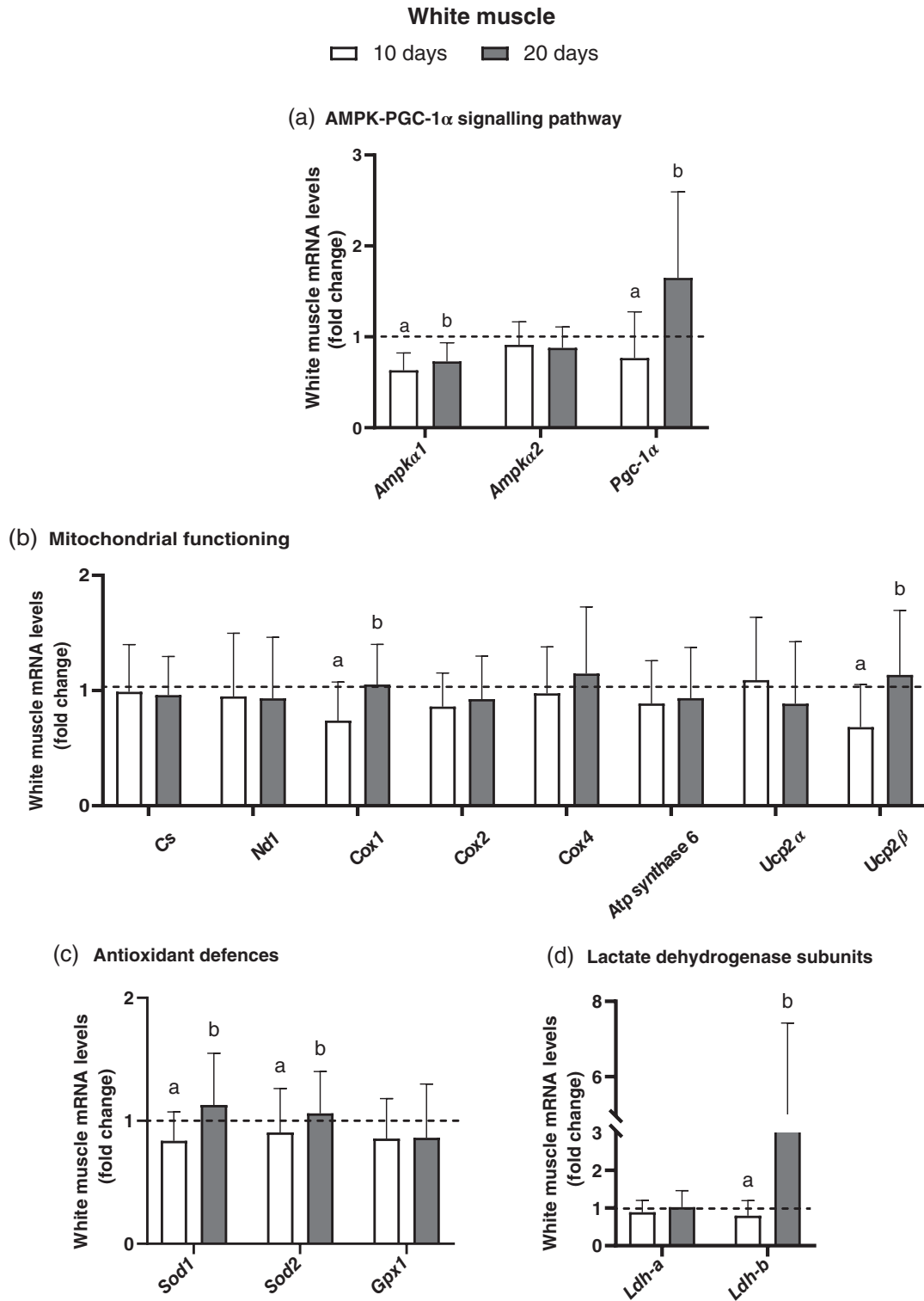


FIGURE 7 Effects of training duration (10 days, $n = 33$ and 20 days, $n = 30$) on studied mRNA levels in white muscle. Data analysis and presentation details are the same as those given in Figure 5 caption

Ldh-b mRNAs in WM (Figure 3). In parallel, RM SOD enzymatic activity ($P = 0.10$) and plasmatic 8-isoprostane levels ($P = 0.09$) (Figure 4a,c) tended to increase. In trout muscles, whatever the exercise protocol, it is clear that high exercise intensity (90% U_{crit}) stimulates more gene transcriptions than moderate exercise intensity (57% U_{crit}), but not

protein expression. PCA also indicated that exercise intensity was the factor most correlated with mRNAs in both muscles (Figure 1). It is known that mitochondrial biogenesis could result from the cumulative effects of transient increases in mRNA transcripts encoding mitochondrial proteins after successive exercise sessions (Perry et al.,

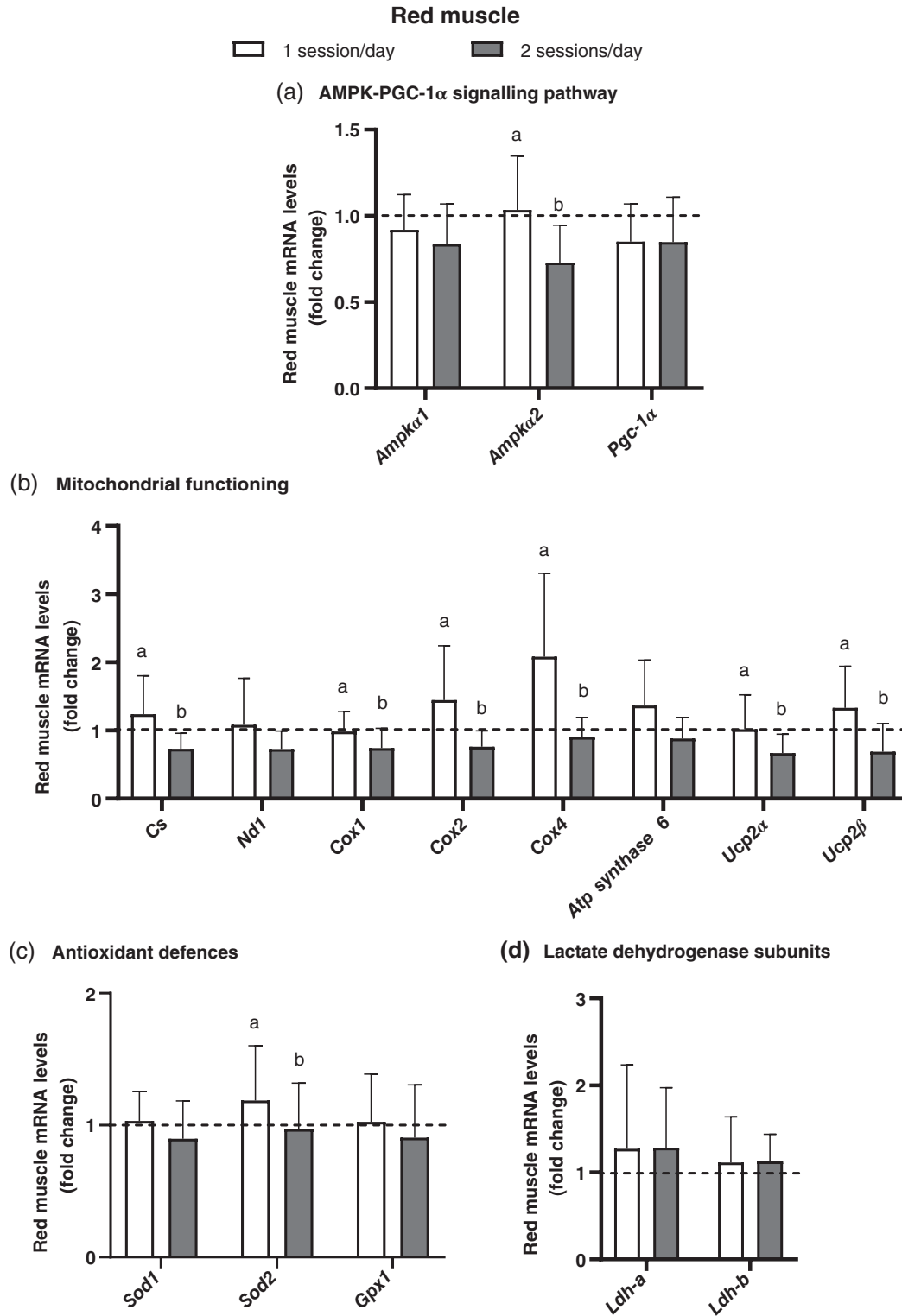


FIGURE 8 Effects of HIIT frequency (1 session/day, $n = 20$ and 2 sessions/day, $n = 20$) on mRNA levels of the AMPK-PGC-1 α signalling pathway (a), mitochondrial functioning (b), antioxidant defences (c) and lactate dehydrogenase subunits (d) in red muscle. Results of each experimental group are expressed as fold change compared with the respective untrained group, which was set at 1. Results are shown as means with SD. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between experimental groups

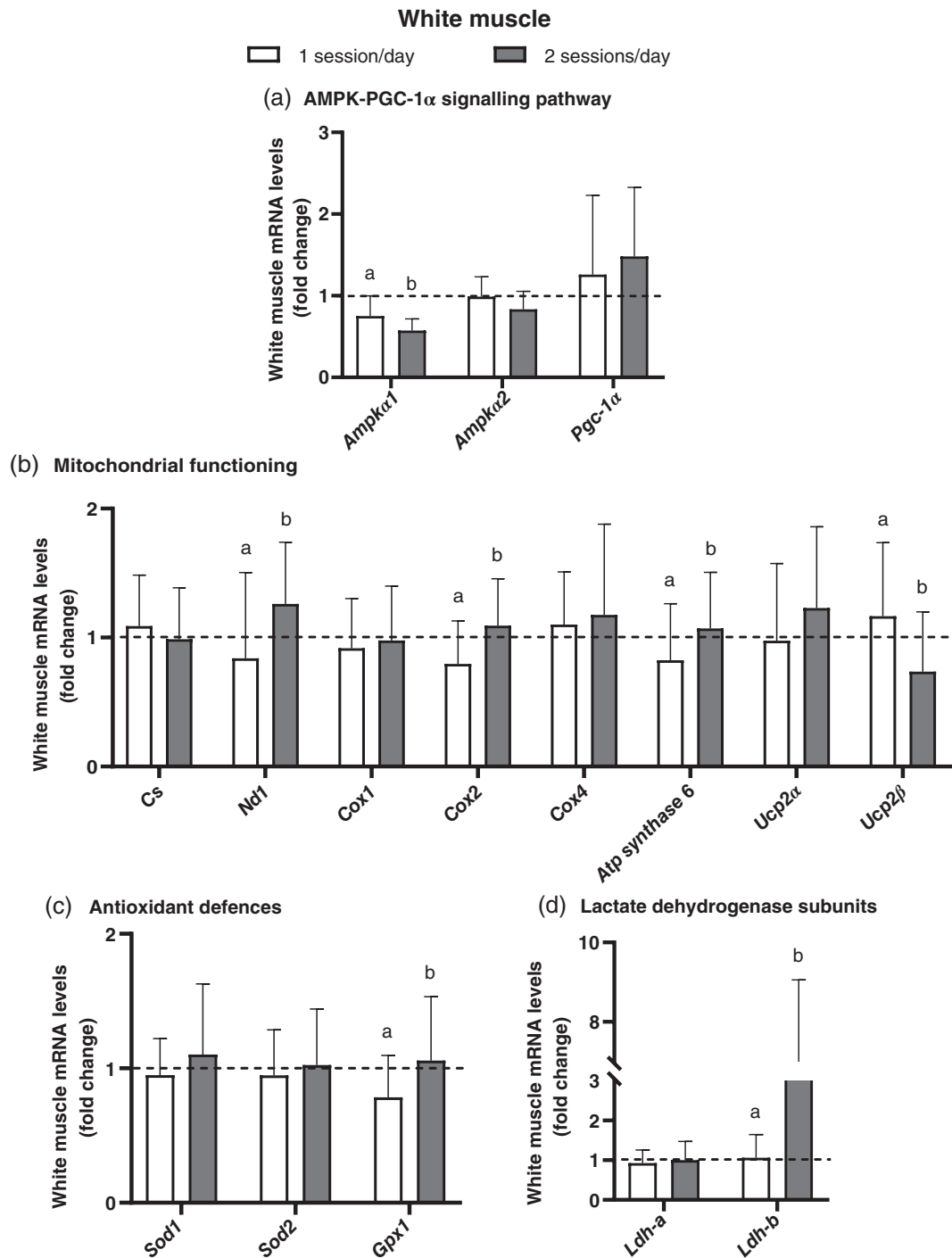


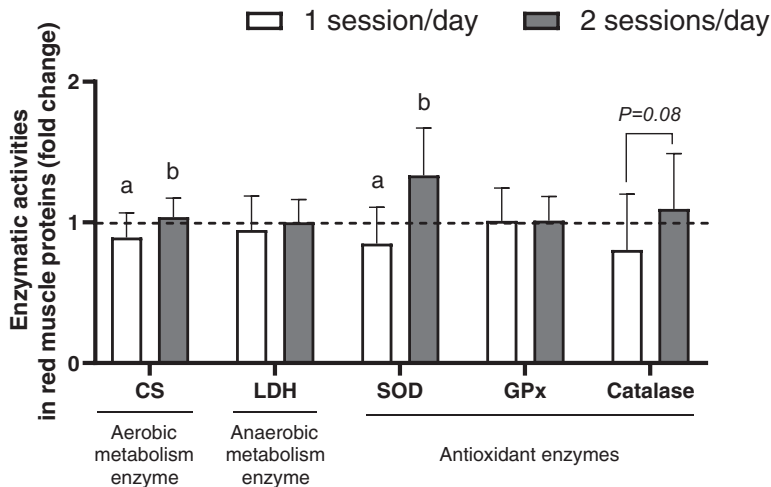
FIGURE 9 Effects of HIIT frequency (1 session/day, $n = 22$ and 2 sessions/day, $n = 20$) on studied mRNA levels in white muscle. Data analysis and presentation details are the same as those given in Figure 8 caption

2010). Our results show that numerous muscle mRNA responses were amplified following HIIT.

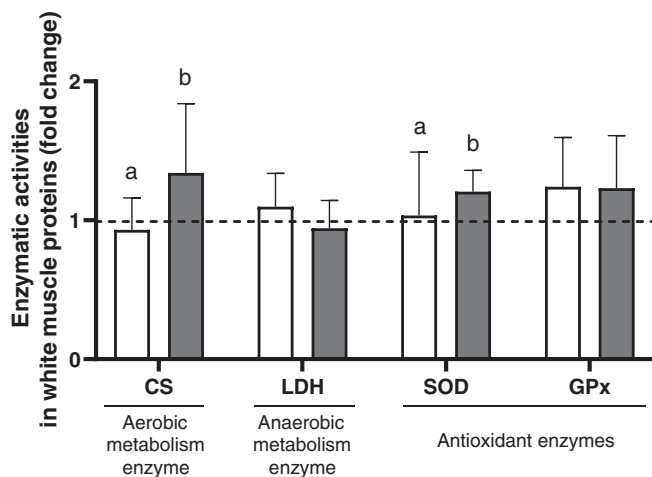
The present data obtained from six training protocols confirm our previous results showing that the signalling pathway cascade involving AMPK-PGC-1 α , OXPHOS complexes and antioxidant enzymatic systems is more stimulated by high exercise intensity than by moderate exercise intensity in trout muscles (Pengam et al., 2020). Only a few studies have compared different exercise intensities in

fish. Among these, Castro et al. (2011) showed that increased exercise intensity improved disease resistance in Atlantic salmon through the stimulation of the immune response, antioxidant defences and cardiovascular function. In mammals, it has been recently shown that high exercise intensity stimulated mitochondrial biogenesis more than moderate exercise intensity through the increase of *Pgc-1 α* mRNA content (MacInnis et al., 2019) and through the stimulation of mitochondrial content and aerobic capacities (Laursen et al., 2007;

(a) Red muscle



(b) White muscle



(c) Plasma

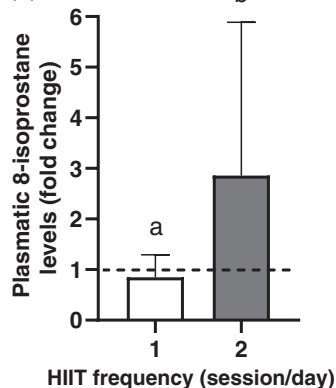


FIGURE 10 (a, b) Effects of HIIT frequency (1 session/day, $n = 22$ and 2 sessions/day, $n = 20$) on citrate synthase (CS), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase activities in red (a) and white (b) muscles. (c) Effects of HIIT frequency (1 session/day, $n = 20$ and 2 sessions/day, $n = 18$) on plasmatic 8-isoprostane levels. Data analysis and presentation details are the same as those given in Figure 8 caption

MacInnis & Gibala, 2017; MacInnis et al., 2017). In mammals, as in fish, the biochemical mechanisms involved for mitochondrial biogenesis in muscle seem to be mediated by a high intensity of exercise.

If minimal exercise intensity is likely required to improve mitochondrial biogenesis (Bishop et al., 2019), training volume may also be a key determinant of training-induced changes in mitochondrial content (Granata et al., 2018). Five training volumes

differing in their intensity, duration and frequency were tested here, consisting more precisely of three HIIT volumes ($<10,000$ AU) and two MICT volumes ($>10,000$ AU). For volumes $<10,000$ AU, the lowest volume induced the most mRNA responses in RM whereas the highest volume had the greatest influence in WM. For volumes $>10,000$ AU, the highest volume stimulated the most mRNA responses in both muscles.

In RM, considering <10,000 AU, the lowest volume (1747 AU) stimulated *Ampk α 2* mRNA and OXPHOS transcripts (*Nd1*; *Cox 1, 2* and *4*; and *Atp synthase 6*) (Figure 2a,b). Cs mRNA was increased by the lowest training volume but its enzymatic activity was not (Figures 2b and 3a). So, aerobic metabolism seems to be initiated at the transcriptional level, with a low training volume in RM, but is not yet reflected at the protein level. Inversely, WM needs the highest volume (6987 AU) to stimulate *Pgc-1 α* , Cs and OXPHOS mRNAs (*Nd1*, *Cox1*, *Cox2* and *Atp synthase 6*) (Figure 3a,b). In contrast to RM, CS activity increased in WM with high training volume (Figure 4b). In zebrafish, McClelland et al. (2006) also showed that a high volume of HIIT stimulated mRNA and CS activity in mixed muscles mainly composed of WM. Considering only volumes >10,000 AU, the highest volume (25,850 AU) increased *Pgc-1 α* in both muscles more than the lowest volume (13,395 AU) (Figures 2a and 3a) and increased *Nd1* and *Cox1* mRNAs in WM (Figures 3b). As shown in human (Fiorenza et al., 2018), high intensity matched with high training volume seems to be required to stimulate mitochondrial biogenesis in fish skeletal muscle.

The development of a more aerobic phenotype in RM and WM with low and high HIIT volumes, respectively, and in both muscles with a high MICT volume is confirmed by the modifications of LDH metabolism. LDH is a tetrameric enzyme composed of the subunits A and/or B, which have distinct functions: the LDH-A isoenzyme transforms pyruvate to lactate in tissues dependent on anaerobic glycolysis and LDH-B permits lactate oxidation in tissues dependent on aerobic metabolism, such as cardiac muscle (Lim et al., 1975; Wieser et al., 1987). In RM, high HIIT and MICT volumes concurrently increased *Ldh-b* mRNA content and LDH activity (transformation pyruvate into lactate), while *Ldh-a* mRNA content decreased (Figures 2d and 4a). It is known that lactate is continuously produced under aerobic conditions, particularly when rates of glycogenolysis and glycolysis are high, as during HIIT (Horii et al., 2017). Thus, in our conditions of high HIIT and MICT volumes, the lactate production was elevated in RM and lactate was more oxidised, supposed by the *Ldh-a* and *Ldh-b* mRNA levels. In WM, *Ldh-b* mRNA increased with high HIIT and MICT volumes (Figure 3d) and LDH activity decreased with high HIIT volume (Figure 4b) suggesting a lower anaerobic capacity. Our results are coherent with those of He et al. (2013), which showed that a training of 4 weeks at moderate intensity tended to increase LDH activity in juvenile common carp RM whereas it tended to decrease it in WM. Together, the overall results detailed above indicate a fibre-dependent volume response of LDH metabolism and suggest that WM tends to develop an aerobic phenotype with a high training volume.

During physical exercise, ROS production is necessary for numerous cellular adaptive events, but can lead to oxidative stress at high concentrations (He et al., 2016; Ljubicic et al., 2010). Among the antioxidant processes involved in the adaptations to exercise, cytosolic and/or mitochondrial antioxidant enzymes such as SOD, GPx and CAT are frequently reported, but also uncoupling proteins (UCPs), which are encased in the inner mitochondrial membrane. By dissipating the proton electrochemical gradient, UCPs would have an indirect antioxidant role by reducing mitochondrial ROS production because of more rapid electron transport throughout the mitochondrial electron transport chain (Ji & Zhang, 2014). In RM the highest HIIT volume

stimulated SOD activity (Figure 4a) while in WM it increased *Sod1*, *Gpx1* and *Ucp2 α* mRNA levels (Figure 3b,c) with no change in enzymatic activities (Figure 4b). The highest level of oxidative stress (quantified by plasmatic 8-isoprostane) was observed with the highest HIIT volume (Figure 4c). In fish, mitochondrial content is ~10-fold greater in RM than in WM (Leary et al., 2003). As mitochondria are often considered to be the main source of ROS production (Powers & Jackson, 2008; Westermann, 2010), they are probably produced to a lesser extent in WM. We can cautiously suppose that the high ROS production during cumulative sessions of exercise induced antioxidant adaptations to prevent deleterious effects of oxidative stress (Steinbacher & Eckl, 2015). Our findings suggest that high HIIT volume increases antioxidant defences in fish muscles.

The training volume also depends on duration and/or frequency of exercise. In RM, when training duration increased, mitochondrial functioning mRNAs (*Nd1*, $P = 0.055$; *Cox2*, *Atp synthase 6* and *Ucp2 α*) and *Ldh-a* mRNAs were down-regulated whereas *Pgc-1 α* and *Ldh-b* mRNAs (Figure 5a, b, d) and LDH activity (Figure 6a) were stimulated. In WM, the longer training duration (20 days) initiated aerobic adaptations through the stimulation of *Ampk α 1*, *Pgc-1 α* , *Cox1*, *Ucp2 β* and *Ldh-b* mRNAs (Figure 7a, b, d). So, aerobic metabolism was initiated in both muscles but earlier in RM than in WM. Davie et al. (1986) also reported that increased training duration promoted aerobic capacities, particularly in the trout WM, through the shift of isoform from LDH-A to LDH-B.

After 20 days of training, antioxidant defences were stimulated, as confirmed by the rise of *Sod1* and *Sod2* mRNAs in both muscles (Figures 5c and 6c) and the stimulation of SOD and GPx ($P = 0.07$) activities in RM (Figure 6a). Supported by the duration effect on plasmatic 8-isoprostane level (Figure 6c), we cautiously hypothesise that antioxidant defences could become efficient after more than 10 days of training.

While one session of HIIT (HIIT1) was sufficient to stimulate most of the mRNA levels in RM (Figure 8), two sessions of HIIT (HIIT2) were required for transcriptional adaptations in WM (Figure 9). Mitochondrial biogenesis seemed to be promoted by HIIT2 through CS activity stimulation in both muscles (Figures 10a, b). After HIIT2, the activation of oxidative processes was also confirmed by the rise of plasmatic 8-isoprostane concentration (Figure 10c), the concomitant increase in SOD activity in both muscles and the upward trend of CAT activity in RM ($P = 0.08$) after HIIT2 (Figure 10a, b). In mammals, more numerous and repeated HIIT sessions influence mitochondrial content and cardiometabolic health-related adaptations (increase of $\dot{V}_{O_2\max}$ and decrease of total body fat) (Ghiarone et al., 2019; Stavrinou et al., 2018). Based on these few data, it would seem that, as in mammals, fish aerobic adaptations including mitochondrial biogenesis could be more stimulated when exercise frequency increases.

5 | CONCLUSION

The present paper investigates the effects of six training protocols on the AMPK-PGC-1 α signalling pathway, mitochondrial compounds, redox state and LDH metabolism molecular mechanisms in trout

oxidative and glycolytic muscles. Exercise intensity appears to be the most relevant training variable to stimulate the studied signalling pathway and its related compounds in both muscles. For a given exercise intensity, the training volume seems to play an important role in the cascade of responses involved in aerobic metabolism with fibre type-specific responses. Indeed, glycolytic fibres need a greater training volume than oxidative fibres for molecular adaptations. Moreover, adaptations seem to occur earlier in RM than in WM. It is important to note that the total muscular mass of rainbow trout is composed of ~4% RM and ~96% WM (Stickland, 1983). Considering the total muscle mass, therefore, just a few WM adaptations could have an important impact on the fish's physiology. In WM, training that combines high-intensity and high-volume could initiate a possible metabolic shift from anaerobic to aerobic metabolism. Data collected on fish skeletal muscles are coherent with those obtained in mammals, which confirms that rainbow trout is a relevant model to study physical exercise physiology. This study provides new insights regarding mitochondrial adaptations induced by different training stimuli and could contribute to the improvement of exercise programme design. In a future study, it would be interesting to explore training protocols with the same exercise volume but combined with different exercise intensities.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Nathalie Guéguéniat and Charlotte Gandubert for their technical assistance. We also thank Helen McCombie of the Bureau de Traduction de l'Université (BTU) of the University of Western Brittany (Brest, France), for her assistance with the improvement of the English of this article.

COMPETING INTERESTS

The authors have no conflicts of interest to declare.




AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.P., C.M., B.S. and A.A. designed the experiment. M.P., B.S. and A.A. collected the fish samples (muscles and plasma) after training. M.P., A.G. and M.I. completed all the biochemical and molecular analyses. M.P., C.M., B.S. and A.A. wrote the initial draft of the manuscript and all authors contributed, reviewed and approved the final version of the submitted manuscript. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

ORCID

Morgane Pengam  <https://orcid.org/0000-0003-0315-4411>
 Aline Amérand  <https://orcid.org/0000-0003-1589-875X>
 Christine Moisan  <https://orcid.org/0000-0002-1611-151X>

REFERENCES

- Altringham, J. D. & Ellerby, D. J. (1999). Fish swimming: patterns in muscle function. *Journal of Experimental Biology*, 202, 3397–3403.
- Bamman, M. M., Cooper, D. M., Booth, F. W., Chin, E. R., Neuffer, P. D., Trappe, S., Lightfoot, J. T., Kraus, W. E. & Joyner, M. J. (2014). Exercise biology and medicine: Innovative research to improve global health. *Mayo Clinic Proceedings*, 89, 148–153.
- Beddow, T. A. & McKinley, R. S. (1999). Importance of electrode positioning in biotelemetry studies estimating muscle activity in fish. *Journal of Fish Biology*, 54, 819–831.
- Bishop, D. J., Botella, J. & Granata, C. (2019). CrossTalk opposing view: Exercise training volume is more important than training intensity to promote increases in mitochondrial content. *Journal of Physiology*, 597, 4115–4118.
- Bishop, D. J., Granata, C. & Eynon, N. (2014). Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1266–1275.
- Brett, J. R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21, 1183–1226.
- Burgetz, I. J., Rojas-Vargas, A., Hinch, S. G. & Randall, D. J. (1998). Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 201, 2711–2721.
- Castro, V., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., Kristensen, T., Jørgensen, S. M., Helgerud, J., Claireaux, G., Farrell, A. P., Krasnov, A. & Takle, H. (2011). Aerobic training stimulates growth and promotes disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 160, 278–290.
- Craig, P. M., Moyes, C. D. & LeMoine, C. M. R. (2018). Sensing and responding to energetic stress: evolution of the AMPK network. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 156–169.
- Davie, P. S., Wells, R. M. G. & Tetens, V. (1986). Effects of sustained swimming on rainbow trout muscle structure, blood oxygen transport, and lactate dehydrogenase isozymes: Evidence for increased aerobic capacity of white muscle. *Journal of Experimental Zoology*, 237, 159–171.
- Eya, J., Ukwuaba, V., Yossa, R., Gannam, A., Eya, J. C., Ukwuaba, V. O., Yossa, R. & Gannam, A. L. (2015). Interactive effects of dietary lipid and phenotypic feed efficiency on the expression of nuclear and mitochondrial genes involved in the mitochondrial electron transport chain in rainbow trout. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 7682–7706.
- Farrell, A. P. (2008). Comparisons of swimming performance in rainbow trout using constant acceleration and critical swimming speed tests. *Journal of Fish Biology*, 72, 693–710.
- Fiorenza, M., Gunnarsson, T. P., Hostrup, M., Iaia, F. M., Schena, F., Pilegaard, H. & Bangsbo, J. (2018). Metabolic stress-dependent regulation of the mitochondrial biogenic molecular response to high-intensity exercise in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 596, 2823–2840.
- Gabriel, B. M. & Zierath, J. R. (2017). The limits of exercise physiology: from performance to health. *Cell Metabolism*, 25, 1000–1011.
- Ghiarone, T., Andrade-Souza, V. A., Learsí, S. K., Tomazini, F., Ataíde-Silva, T., Sansonio, A., Fernandes, M. P., Saraiva, K. L., Figueiredo, R., Tourneur, Y., Kuang, J., Lima-Silva, A. E. & Bishop, D. J. (2019). Twice-a-day training improves mitochondrial efficiency, but not mitochondrial biogenesis, compared with once-daily training. *Journal of Applied Physiology*, 127, 713–725.
- Gibala, M. J., Little, J. P., MacDonald, M. J. & Hawley, J. A. (2012). Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *Journal of Physiology*, 590, 1077–1084.
- Gillen, J. B., Martin, B. J., MacInnis, M. J., Skelly, L. E., Tarnopolsky, M. A. & Gibala, M. J. (2016). Twelve weeks of sprint interval training improves indices of cardiometabolic health similar to traditional

- endurance training despite a five-fold lower exercise volume and time commitment. *PLoS One*, 11, e0154075.
- Godin, R., Ascah, A. & Daussin, F. N. (2010). Intensity-dependent activation of intracellular signalling pathways in skeletal muscle: role of fibre type recruitment during exercise. *Journal of Physiology*, 588, 4073–4074.
- Granata, C., Jamnick, N. A. & Bishop, D. J. (2018). Training-induced changes in mitochondrial content and respiratory function in human skeletal muscle. *Sports Medicine*, 48, 1809–1828.
- Grundy, D. (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology. Experimental Physiology*, 100, 755–758.
- Gunnarsson, L., Kristiansson, E., Rutgeresson, C., Sturve, J., Fick, J., Förlin, L. & Larsson, D. G. J. (2009). Pharmaceutical industry effluent diluted 1:500 affects global gene expression, cytochrome P450 1A activity, and plasma phosphate in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 2639–2647.
- He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C.-C., Yang, W. & Zuo, L. (2016). Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Frontiers in Physiology*, 7, 486.
- He, W., Xia, W., Cao, Z.-D. & Fu, S.-J. (2013). The effect of prolonged exercise training on swimming performance and the underlying biochemical mechanisms in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 166, 308–315.
- Horii, N., Hasegawa, N., Fujie, S., Uchida, M., Miyamoto-Mikami, E., Hashimoto, T., Tabata, I. & Iemitsu, M. (2017). High-intensity intermittent exercise training with chlorella intake accelerates exercise performance and muscle glycolytic and oxidative capacity in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312, R520–R528.
- Huertas, J. R., Casuso, R. A., Agustín, P. H. & Cogliati, S. (2019). Stay fit, stay young: mitochondria in movement: the role of exercise in the new mitochondrial paradigm. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 7058350.
- Hvas, M. & Oppedal, F. (2017). Sustained swimming capacity of Atlantic salmon. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 361–369.
- Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104, 12017–12022.
- Jayne, B. C. & Lauder, G. V. (1994). How swimming fish use slow and fast muscle fibers: implications for models of vertebrate muscle recruitment. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 175, 123–131.
- Ji, L. L., Kang, C. & Zhang, Y. (2016). Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health. *Free Radical Biology and Medicine*, 98, 113–122.
- Ji, L. L. & Zhang, Y. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise: role of redox signaling. *Free Radical Research*, 48, 3–11.
- Jones, D. R. (1982). Anaerobic exercise in teleost fish. *Canadian Journal of Zoology*, 60, 1131–1134.
- Karjalainen, J. J., Kiviniemi, A. M., Hautala, A. J., Piira, O.-P., Lepojärvi, E. S., Perkiömäki, J. S., Juntila, M. J., Huikuri, H. V. & Tulppo, M. P. (2015). Effects of physical activity and exercise training on cardiovascular risk in coronary artery disease patients with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 38, 706–715.
- Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefèvre, F. & Médale, F. (2008). Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294, R1154–R1164.
- Kristensen, D. E., Albers, P. H., Prats, C., Baba, O., Birk, J. B. & Wojtaszewski, J. F. P. (2015). Human muscle fibre type-specific regulation of AMPK and downstream targets by exercise. *Journal of Physiology*, 593, 2053–2069.
- Laursen, P. B., Marsh, S. A., Jenkins, D. G. & Coombes, J. S. (2007). Manipulating training intensity and volume in already well-trained rats: effect on skeletal muscle oxidative and glycolytic enzymes and buffering capacity. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 32, 434–442.
- Leary, S. C., Lyons, C. N., Rosenberger, A. G., Ballantyne, J. S., Stillman, J. & Moyes, C. D. (2003). Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285, R817–R826.
- Leek, B. T., Mudaliar, S. R. D., Henry, R., Mathieu-Costello, O. & Richardson, R. S. (2001). Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280, R441–R447.
- LeMoine, C. M. R., Craig, P. M., Dhekney, K., Kim, J. J. & McClelland, G. B. (2010). Temporal and spatial patterns of gene expression in skeletal muscles in response to swim training in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180, 151–160.
- Li, X.-M., Pang, X., Zheng, H., Li, X.-J., Fu, S.-J. & Zhang, Y.-G. (2017). Effects of prolonged exercise training and exhaustive chasing training on the swimming performance of an endangered bream *Megalobrama pellegrini*. *Aquatic Biology*, 26, 125–135.
- Lim, S. T., Kay, R. M. & Bailey, G. S. (1975). Lactate dehydrogenase isozymes of salmonid fish. Evidence for unique and rapid functional divergence of duplicated H-4 lactate dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 1790–1800.
- Lin, J., Handschin, C. & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1, 361–370.
- Ljubcic, V., Joseph, A.-M., Saleem, A., Ugucioni, G., Collu-Marchese, M., Lai, R. Y. J., Nguyen, L. M.-D. & Hood, D. A. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: Effects of exercise and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800, 223–234.
- MacInnis, M. J. & Gibala, M. J. (2017). Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *Journal of Physiology*, 595, 2915–2930.
- MacInnis, M. J., Skelly, L. E. & Gibala, M. J. (2019). CrossTalk proposal: Exercise training intensity is more important than volume to promote increases in human skeletal muscle mitochondrial content. *Journal of Physiology*, 597, 4111–4113.
- MacInnis, M. J., Zacharewicz, E., Martin, B. J., Haikalis, M. E., Skelly, L. E., Tarnopolsky, M. A., Murphy, R. M. & Gibala, M. J. (2017). Superior mitochondrial adaptations in human skeletal muscle after interval compared to continuous single-leg cycling matched for total work. *Journal of Physiology*, 595, 2955–2968.
- Magnoni, L. J., Crespo, D., Ibarz, A., Blasco, J., Fernández-Borràs, J. & Planas, J. V. (2013). Effects of sustained swimming on the red and white muscle transcriptome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 166, 510–521.
- Magnoni, L. J., Palstra, A. P. & Planas, J. V. (2014). Fueling the engine: induction of AMP-activated protein kinase in trout skeletal muscle by swimming. *Journal of Experimental Biology*, 217, 1649–1652.
- McClelland, G. B. (2012). Muscle remodeling and the exercise physiology of fish. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 40, 165–173.
- McClelland, G. B., Craig, P. M., Dhekney, K. & Dipardo, S. (2006). Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Physiology*, 577, 739–751.
- Miyamoto-Mikami, E., Tsuji, K., Horii, N., Hasegawa, N., Fujie, S., Homma, T., Uchida, M., Hamaoka, T., Kanehisa, H., Tabata, I. & Iemitsu, M. (2018). Gene expression profile of muscle adaptation to high-intensity intermittent exercise training in young men. *Scientific Reports*, 8, 16811.
- Morash, A. J., Vanderveken, M. & McClelland, G. B. (2014). Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. *Frontiers in Physiology*, 5, 452.

- Olesen, J., Kiilerich, K. & Pilegaard, H. (2010). PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 460, 153–162.
- Pengam, M., Moisan, C., Simon, B., Guernec, A., Inizan, M. & Amérand, A. (2020). Training protocols differently affect AMPK–PGC-1 α signaling pathway and redox state in trout muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 243, 110673.
- Perry, C. G. R., Lally, J., Holloway, G. P., Heigenhauser, G. J. F., Bonen, A. & Spriet, L. L. (2010). Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 588, 4795–4810.
- Powers, S. K. & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88, 1243–1276.
- Richards, J. C., Johnson, T. K., Kuzma, J. N., Lonac, M. C., Schweder, M. M., Voyles, W. F. & Bell, C. (2011). Short-term sprint interval training increases insulin sensitivity in healthy adults but does not affect the thermogenic response to β -adrenergic stimulation. *Experimental Physiology*, 588, 2961–2972.
- Stavrinou, P. S., Bogdanis, G. C., Giannaki, C. D., Terzis, G. & Hadjicharalambous, M. (2018). High-intensity interval training frequency: cardiometabolic effects and quality of life. *International Journal of Sports Medicine*, 39, 210–217.
- Steinbacher, P. & Eckl, P. (2015). Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*, 5, 356–377.
- Stickland, N. C. (1983). Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Anatomy*, 137, 323–333.
- Trewin, A. J., Berry, B. J. & Wojtovich, A. P. (2018). Exercise and mitochondrial dynamics: keeping in shape with ROS and AMPK. *Antioxidants*, 7, 7.
- Tudorache, C., de Boeck, G. & Claireaux, G. (2013). Forced and preferred swimming speeds of fish: A methodological approach. In *Swimming Physiology of Fish: Towards Using Exercise to Farm a Fit Fish in Sustainable Aquaculture*, ed. Palstra AP & Planas JV, pp. 81–108. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11, 872–884.
- Wieser, W., Lackner, R., Hinterleitner, S. & Platzer, U. (1987). Distribution and properties of lactate dehydrogenase isoenzymes in red and white muscle of freshwater fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3, 151–162.

How to cite this article: Pengam M, Amérand A, Simon B, Guernec A, Inizan M, Moisan C. How do exercise training variables stimulate processes related to mitochondrial biogenesis in slow and fast trout muscle fibres? *Experimental Physiology* 2021;1-20. <https://doi.org/10.1113/EP089231>

2.3. Approche intégrative des réponses métaboliques au HIIT dans les muscles soléaire et EDL chez le rat

Publication n°3 (en préparation) :

Integrative approach of metabolic responses to high-intensity interval training in *soleus* and EDL rat muscles

Pengam M., Goanvec C., Moisan C., Simon B., Albacète G., Féray A., Guernec A. and Amérand A.

2.3.1. Contexte et objectifs

La pratique régulière d'un exercice physique diminue l'apparition et/ou la progression des facteurs de risque de maladies métaboliques (syndrome métabolique, diabète de type 2). Ces pathologies sont caractérisées au niveau musculaire par des dysfonctions mitochondriales contribuant à l'apparition d'un stress oxydatif (Prasun, 2020). L'entraînement physique peut améliorer ces désordres métaboliques en stimulant entre autres la biogenèse mitochondriale dans laquelle PGC-1 α joue un rôle central (Summermatter et al., 2013). Les effets bénéfiques d'un entraînement de type MICT ne sont plus à démontrer mais une partie de la population reste toutefois inactive par manque de temps et/ou de motivation. Ainsi, le HIIT paraît être un bon compromis puisqu'il est moins chronophage que le MICT et pourrait être plus efficace pour stimuler la biogenèse mitochondriale au niveau musculaire. La comparaison des études déjà référencées dans la littérature reste complexe en raison de la multiplicité des protocoles d'entraînement, des modèles et des types de muscles étudiés (MacInnis and Gibala, 2017).

Cette étude réalisée chez le rat Wistar sain a été menée selon une approche intégrée (de l'organisme aux gènes). **Le principal objectif de cette publication est de déterminer lequel des deux protocoles d'entraînement (MICT et HIIT) stimule le plus les capacités aérobies et antioxydantes. Ainsi, les effets de ces entraînements ont été étudiés parallèlement sur la performance physique, sur des paramètres morphologiques et**

systemiques ainsi que sur les capacités aérobie (biogenèse mitochondriale, défenses antioxydantes) dans deux types de muscles de typologie différente : le soléaire et l'EDL. Ces muscles ont été choisis sur la base de leur composition en fibres ainsi que sur leur utilisation pendant l'effort physique. Le soléaire, principalement composé de fibres lentes de type I, procure l'accélération verticale durant la course (Eng et al., 2008; Sasaki and Neptune, 2006). Ce muscle sera probablement sollicité durant les deux types d'entraînement. L'EDL, exclusivement de type II, stabilise la surface plantaire et le talon durant la course (Eng et al., 2008; Moening et al., 1993). Le HIIT sollicitera probablement ce muscle.



2.3.2. Méthodologie

Les animaux ont été soumis pendant 6 semaines à un type d'entraînement MICT ou HIIT à raison de cinq séances d'exercice par semaine. Le protocole de MICT a déjà été validé au laboratoire dans le cadre de la prévention du syndrome métabolique chez des rats Wistar (Dupas et al., 2018). Les animaux du groupe MICT ont quotidiennement couru à environ 65% de leur VMA durant une heure. Pour mettre au point le protocole HIIT, nous nous sommes basés sur celui développé par Brown et al. (2016). Les rats ont effectué quotidiennement 35 minutes d'exercice incluant 10 minutes d'échauffement et cinq cycles de 5 minutes alternant haute et basse intensité (2 minutes à 85-90% de VMA et 3 minutes à 30% de VMA). La performance physique des individus a été évaluée à trois reprises par la vitesse maximale aérobie (VMA) au cours de l'expérimentation. Les deux premières estimations de VMA ont permis d'ajuster l'intensité d'exercice et la dernière d'évaluer les effets des 6 semaines d'entraînement. L'impact de l'entraînement a été évalué par la mesure de paramètres morphométriques (prise de poids durant l'entraînement, indices indicateurs de l'obésité...) et systémiques (pressions artérielles, fréquence cardiaque et hémocrite). Des dosages d'ARNm de la voie AMPK-PGC-1 α , du fonctionnement mitochondrial et de sa dynamique (fusion-fission), de la LDH et des chaînes lourdes de myosine, des activités enzymatiques liées au métabolisme aérobie (CS et COX) et anaérobie (LDH) ont été réalisés dans les deux muscles. L'état redox a été évalué par le dosage des 8-isoprostanes plasmatiques ainsi que par les taux musculaires d'ARNm et d'activités des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et CAT).

2.3.3. Principaux résultats et conclusions

Les principaux résultats sont résumés dans le Tableau 7. **Au niveau de l'organisme**, la VMA a été améliorée par les deux types d'entraînement MICT et HIIT. **Ce gain étant plus important avec le HIIT, suggère que cet entraînement améliore davantage que le MICT les capacités aérobies.** La diminution de l'indice d'adiposité par le MICT suggère que **la contribution des lipides à la production d'ATP a été plus importante lors de ce type d'entraînement.** Toutefois, aucun des deux entraînements n'a induit d'importantes adaptations au niveau des paramètres morphométriques et systémiques étudiés. Ces résultats ne sont pas surprenants car nos modèles animaux ne présentent aucune dysfonction métabolique et ils s'avèrent cohérents avec la littérature des individus sains. **Au niveau musculaire**, sur la seule base des ARNm, une analyse en composante principale a permis de distinguer deux groupes distincts : l'un correspondant globalement aux ARNm du soléaire et l'autre à ceux de l'EDL. Ainsi, **ces muscles semblent être régulés différemment par l'entraînement.** Contrairement au MICT, le HIIT a stimulé la plupart des transcrits de la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α , du fonctionnement mitochondrial (CS, complexes OXPHOS et dynamique mitochondriale), des défenses antioxydantes, des chaînes lourdes de myosine et de la LDH dans le soléaire. Toutefois, l'augmentation de ces transcrits ne s'accompagne pas de modifications protéiques. Dans l'EDL, seul le contenu en ARNm de *Pgc-1 α* et l'activité de la GPx ont été stimulés par le HIIT. **L'ensemble de ces résultats indique que le HIIT a induit une importante plasticité fonctionnelle et mitochondriale, particulièrement dans le soléaire.** Parallèlement, aucun changement des taux en 8-isoprostanes plasmatiques n'a été observé, suggérant que **les deux types d'entraînement n'ont pas eu d'effet délétère sur l'état redox. Cette approche intégrée indique que le HIIT a stimulé les capacités aérobies à différents niveaux d'organisation (performance physique et dans le soléaire).**

Tableau 7. Effets de 6 semaines d’entraînement de type MICT et HIIT au niveau de l’animal entier (performance physique, paramètres morphométriques et systémiques) et au niveau musculaire (transcrits et activités enzymatiques) chez le rat Wistar.

		MICT 	HIIT 	
Performance physique		↗	↗↗	
Paramètres morphométriques		↘ indice adiposité	→	
Paramètres systémiques		→	→	
Plasma	8-isoprostanes	→	→	
Soléaire	Transcrits	AMPK–PGC-1α et NRF	→	↗
		Fonctionnement mitochondrial (CS, complexes OXPHOS et dynamique mitochondriale)	→	↗
		Défenses antioxydantes	→	↗
		Chaînes lourdes de myosine	↗ IIX et IIb	↗ I, IIX et IIb
		LDH	→	↗ Ldh-b
	Activités enzymatiques (métabolismes aérobie et anaérobie et défenses antioxydantes)	→	→	
EDL	Transcrits	AMPK–PGC-1α et NRF	→	↗ Pgc-1α
		Fonctionnement mitochondrial (CS, complexes OXPHOS et dynamique mitochondriale)	→	→
		Défenses antioxydantes	→	→
		Chaînes lourdes de myosine	→	→
		LDH	→	→
	Activités enzymatiques (métabolismes aérobie et anaérobie et défenses antioxydantes)	→	↗ GPx	

↗ : stimulation significative ; ↘ : diminution significative ; → : pas d’effet significatif.



Article n°3

Integrative approach of metabolic responses to high-intensity interval training in *soleus* and EDL rat muscles

Pengam M., Goanvec C. Moisan C., Simon B., Albacète G., Féray A., Guernec A. and Amérand A.

Université Brest, EA 4324 ORPHY, UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Victor Le Gorgeu, F-29200 Brest, France

Introduction

It is recognized that practicing a regular physical activity induces beneficial health effects through decrease in risk factors for metabolic diseases (such as cardiovascular diseases, type 2 diabetes, metabolic syndrome) or their progression (Weston et al., 2014). In these diseases, metabolic disarrangement such as decreased oxidative capacity and mitochondrial dysfunction are often present in skeletal muscle (Prasun, 2020; Summermatter et al., 2013).

Even if the regular exercise benefits are now well documented, a part of the population remains inactive for lack of time and/or motivation. High-intensity interval training (HIIT) allows to enjoy the benefits of physical exercise without spending as much time to practice as with traditional moderate-intensity continuous training (MICT) (Groussard et al., 2019; MacInnis and Gibala, 2017; Weston et al., 2014). HIIT could be more effective than MICT to stimulate mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation (OXPHOS) in skeletal muscle (MacInnis et al., 2017). In the literature, it remains difficult to compare studies using numerous HIIT and MICT protocols with different training parameters, animal models, muscle types... In human, most of these studies focuses on patients with chronic illnesses and sometime without “control” individuals (Miyamoto-Mikami et al., 2018; Weston et al., 2014).

Among muscular adaptations to training exercise, the stimulation of mitochondrial biogenesis allows to enhance the muscle aerobic capacity (Gabriel and Zierath, 2017). Several cellular pathways are involved in mitochondrial biogenesis adaptation in responses to regular physical exercise (Ji et al., 2016). The depletion of ATP induced by a cellular stress such as exercise increases the AMP:ATP ratio, which activates the AMP-activated protein kinase (AMPK)–peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) signaling pathway, one of the main pathway that increases oxidative capacities (Jäger et al., 2007). AMPK upregulates PGC-1 α which stimulates in turn the expression of mitochondrial and

antioxidant genes (Olesen et al., 2010). Among its numerous functions, PGC-1 α could regulate the dynamics of mitochondrial fission and fusion (Yan et al., 2012). PGC-1 α also could drive fiber type switch from fast-glycolytic towards slow-oxidative fiber (Summermatter et al., 2013). The underlying molecular network of these processes involved in the improvement of oxidative capacity is only partially elucidated.

Thus, the present study proposes through an integrative approach (from the whole animal to gene) to compare a HIIT and a MICT protocol during six weeks using healthy Wistar rats. Our model allows the homogenization of individuals (age, sex and nutrition) as well as the integration into the protocol of a control group (untrained animals). Two muscles of different typology are explored: a postural oxidative muscle: the *soleus* (80% of oxidative fiber type I) and the *extensor digitorum longus* (EDL ; 80% of glycolytic fiber type II and 20% of glycolytic-oxidative fibers type IIa) (Eng et al., 2008). We hypothesize that responses to HIIT and MICT training would be differentially affected in *soleus* and EDL muscles. At the muscle level, the effects of HIIT and MICT are compared on aerobic and anaerobic responses: mitochondrial and antioxidant activities and gene transcriptions (AMPK–PGC-1 α , mitochondrial functioning and dynamics, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and myosin heavy chain). At the systemic and organism levels, parameters have been followed to obtain data in these training conditions with a perspective of future investigation of these processes in metabolic diseases.

Materials and methods

Animals

23 male Wistar rats (21 days, weight 52.1 ± 0.6 g, Janvier labs, Le Genest Saint Ile, France), were housed at least 2 per cage in a light (12h:12h light/dark cycle) and temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) controlled animal facility until the age of 15 weeks. All experiments were approved by local French Ethical Comity (CEFEA, n°74), and authorized by the French “Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation” under the number 17956 (APAFIS#17956-2018120517015356v4).

Experimental procedures

Rats were allowed access to standard chow diet (KLIBA NAFAG®, Kaiseraugst, Germany, Mouse and rat Maintenance, 3.152 kcal/g) and drinking water *ad libitum*. Body weight, food,

drink and total calorie intakes rat were monitored individually once a week. Weight gain (g) and total calorie intake (kcal/day/100 g of rat) were calculated for the training period.

Familiarization on treadmill and maximal aerobic speed (MAS) test

At 8 weeks of age, all rats followed a treadmill familiarization protocol for the first four days of the week. The duration of a session was gradually increased during this period until reaching 45 min of running, for speeds of 8.3-20 m/min. At the end of this week, all rats underwent an evaluation of their maximal aerobic speed (MAS). The protocol consisted of an exercise session where the starting speed of 10 m/min was progressively incremented (every 60 seconds) by 3.33 m/min until reach 26.7 m/min and then by 1.7 m/min until rats were unable to run anymore (Dupas et al., 2018). This last speed was used as their MAS. Then, rats were randomly assigned to one of the three groups at the age of 9 weeks: untrained rats (UNTR, $n = 7$), moderate-intensity continuous trained rats (MICT, $n = 8$) and high-intensity interval trained rats (HIIT, $n = 8$). The last two groups trained for six consecutive weeks (five times per week, each morning, with two consecutive days of rest) and the rats of the UNTR group were brought to the running room each day to undergo the same transport (from the pet store to the laboratory running room) and restraint stress as the trained rats. MAS was re-evaluated twice during the training period in order to adapt training intensity and to evaluate exercise efficiency only on trained groups to avoid acute effect of MAS on untrained group.

Personalized training protocol

After the first MAS evaluation, rats were randomly divided into the three groups defined before: UNTR, MICT and HIIT. In details, the MICT training consisted of a 10-min warm-up to 33-49% of the rat's MAS, followed by 50 uninterrupted min of running at 65% of their MAS. The training ended with an active recovery of 3 min at 20-30% of their MAS, totalling 63 min of exercise. For the rats assigned to the HIIT group, training began with a progressive 10-min warm-up to progressively reach approximately 70% of their MAS, followed by 5 cycles of 5 min alternating between high- and low-intensity intervals: 2 min at 85-90% of their MAS and 3 min of active recovery at 30% of their MAS, totalling 35 min of exercise. The untrained rats remained on the turned-off treadmill.

Arterial blood pressure measurement

Arterial blood pressure (mean (MBP), systolic (SBP) and diastolic (DBP), mmHg) and heart rate (HR, bpm) were determined using the tail-cuff plethysmography. These measurements were conducted before, in the middle and the end of the training period. This method allows

non-invasive measurement of the arterial blood pressure in the tail of conscious rats using volume pressure recording sensor technology (CODA® non-invasive blood pressure system, Kent Scientific, USA). All rats were conditioned to the procedures during one week before data collection. Before starting measurements, rats were placed in a retraining box and preheated on a specific platform at more than 32°C in order to dilate the tail arteries. At least ten consecutive pressure measurements were needed to obtain a representative value of SBP and DBP for each rat.

Sampling

Between 48 and 72 hours after the end of the training period, rats were anaesthetised with Ketamine (Ketamine 100, Virbac, 80 mg/kg) and Xylazine (Rompun 2%, Bayer, 12 mg/kg) injected intraperitoneally. Morphometric measurements were performed: abdominal and thoracic circumference (cm) and the naso-anal body length (cm). Blood was collected intraventricularly into 2 mL sampling tube (pre-coated with EDTA 5%) and hematocrit (% red blood cells) was evaluated. Plasma was obtained after centrifugation for 5 min at 3000g at room temperature. Then rats were sacrificed by cervical dislocation. Adipose tissue (epididymal, omental-retroperitoneal-peritoneal, subcutaneous and total adipose tissue) was weighted before freezing. Right and left *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) muscles were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at – 80 °C for further analysis.

Certain morphometric indices make it possible to characterize obesity (Novelli et al., 2007; Yang et al., 2018). These indices are as follows:

- Body mass index (BMI, g/cm²) = $\frac{\text{Body weight (g)}}{\text{Naso-anal length (cm)}}$
- $\frac{\text{Abdominal circumference (AC)}}{\text{Thoracic circumference (TC)}}$
- Lee index = $\frac{\sqrt[3]{\text{Body weight (g)}}}{\text{Naso-anal length (cm)}} \times 10$
- Adiposity index = $\frac{\text{Total adiposity mass}}{\text{Body weight}} \times 100$

RNA extraction, reverse transcription and real-time Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Total RNA was isolated from 30 mg of frozen muscles using the NucleoSpin® RNA Set for NucleoZOL (Macherey Nagel, Hoerd, France) and stored at –80°C as previously described in (Pengam et al., 2020). RNA concentrations were measured with a SimpliNano™

spectrophotometer (Biochrom Spectrophotometers, Fisher Scientific, Illkirch, France) and their purity was assessed using OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratios. Their integrity was also checked by an electrophoresis on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide.

Each sample RNA was reverse transcribed with the qScript™ cDNA synthesis kit (Quanta BioSciences, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) containing a reaction mix and the Reverse Transcriptase. Complementary DNA was diluted 10-fold for PCR experiments and stored at -20°C.

Real-Time RT-PCR was realized with a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) as previously described in (Pengam et al., 2020). Briefly, target genes were amplified and quantified by SYBR® green incorporation (EurobioGreen® Mix qPCR 2x Lo-Rox ; Eurobio Ingen, Courtaboeuf, France) with specific primers presented in **Table 1**. The cycling conditions consisted in a denaturing step at 95°C for 2 min, followed by 40 to 50 cycles of amplification (denaturation: 95°C for 5 s; annealing/extension: 60°C for 30 s). At the end of amplification, a melting curve program was carried out. A seven-point standard curve was used to determine the PCR efficiency of each primer pair (between 80% and 100%) and the transcript level of the different genes in all samples. Each gene was amplified in a single run from triplicates for standard points and duplicates for sample points. Quantification was normalized using *actin β* mRNA considered as a reference gene. This choice was validated by the absence of significant differences in *actin β* mRNA levels between experimental groups for each muscle (*soleus* and EDL) (p>0.05). All mRNA levels were first calculated with the ratio: $\frac{\text{target gene mRNA}}{\text{actin } \beta \text{ mRNA}}$ and then expressed as fold change with respect to the untrained group, which was set to 1.

Enzymatic activities

All measurements were performed at 37°C and determined using a plate reader (SAFAS Xenius, Monaco). All samples were measured in duplicate. For each muscle (*soleus* and EDL), right and left muscles were ground together to obtain a homogeneous tissue powder.

Aerobic metabolism enzymes activities

Citrate synthase (CS) activity. 25 mg of either frozen muscles were homogenized in a 4°C Tris HCl buffer (0.1 M, pH 8.1) with a Polytron. The homogenate was then collected and used immediately for analysis. Measurements of CS activity were done by an indirect method (Srere, 1969) using 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). CS activity was measured at 412 nm and was expressed in nmol DNTB reduced/min/mg wet tissue.

Cytochrome c oxidase (COX) activity. 70 mg of frozen muscles were homogenized with a Polytron homogenizer in an extraction buffer (100 mM TRIS, 2 mM EDTA and 2 mM DTE, pH 7.4, 4°C). The homogenate was centrifuged at 12,000g for 20 min at 4°C. Cytochrome c oxidase (COX) activity was determined on the supernatant at 550 nm using 2 mM reduced cytochrome c and 330 mM sodium phosphate buffer (Smith and Conrad, 1956). COX activity was expressed in nmol cytochrome c oxidized/min/g wet tissue.

Anaerobic metabolism enzyme activity

Lactate dehydrogenase (LDH) activity. 70 mg of frozen muscles were homogenized with a Polytron in an extraction buffer (100 mM TRIS, 2 mM EDTA and 2 mM DTE, pH 7.4, 4°C). The homogenate was centrifuged at 12,000g for 20 min at 4°C. LDH activity was determined on the resulting supernatant at 340 nm using 40 mM sodium pyruvate and 40 mM nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). Activity was calculated based on oxidation of NADH and expressed in μ mol oxidized NADH/min/g wet tissue.

Antioxidant enzyme activities

70 mg of frozen muscles were homogenized with a Polytron homogenizer in an extraction buffer (75 mM TRIS and 5 mM EDTA, pH 7.4, 4°C). After a centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4°C, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were determined on the resulting supernatant.

SOD activity was assessed at 480 nm using an indirect method that inhibits the adrenaline to adrenochrome reaction with the xanthine/hypoxanthine reaction as a superoxide anion producer (Misra and Fridovich, 1972). One unit (U) of SOD activity corresponds to the amount of sample needed to cause 50% inhibition relative to the control without tissue. SOD activity was expressed in U/g wet tissue.

GPx activity was measured at 340 nm with an indirect method adapted from Ross et al. (2001) by Farhat et al. (2015). Briefly, the activity was determined from the decrease of NADPH induced by a coupled reaction with glutathione reductase. GPx activity was expressed in μ mol NADPH oxidized/min/g wet tissue.

CAT activity was determined at 240 nm through its capacity to transform hydrogen peroxide (H₂O₂) into water and oxygen (Beers and Sizer, 1952). The adding of 200 mM H₂O₂ initiated the reaction. CAT activity was expressed in nmol H₂O₂/min/g wet tissue.

Oxidative stress marker

Total plasmatic 8-isoprostane (free and esterified in lipids) were measured in duplicate using an Elisa kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) according to the manufacturer's protocol. All samples were hydrolyzed using 15% KOH and incubated 60 min at 40 °C and then neutralized with potassium phosphate buffer. Another step of purification was necessary with ethanol. Finally, samples were extracted using ethyl acetate containing 1% methanol and SPE Cartridges (C-18) (Cayman Chemical). After 18 h of incubation, 8-isoprostane plasmatic concentration was measured at 410 nm and expressed in pg/mL of plasma.

Statistics

All results are expressed as means \pm standard error of mean (SEM). All statistics were performed using Statistica v.12 software (StatSoft, Paris, France). Normality of population was tested using the Shapiro-Wilk test. Adapted tests were then performed (Kruskal-Wallis, one-way analyses of variance (ANOVA), two-way ANOVA or ANOVA for repeated measures). Kruskal-Wallis, ANOVA and two-way ANOVA were respectively followed by a Mann and Whitney, HSD for n different and Bonferroni post-hoc tests. Significant threshold was set at $p < 0.05$ and differences between groups were mentioned by different letters (a and b) or by symbols in the tables and figures.

Correlations were calculated and a principal component analysis (PCA) performed using R software and the *FactoMineR* package.

Results

Maximal aerobic speed (MAS)

The MAS of trained animals (MICT and HIIT) was measured thrice both to evaluate training efficiency and to normalize individual training (**Figure 1**). Two-way ANOVA showed a significant time effect ($p < 0.00$) but not training effect ($p = 0.07$) and not interaction between both timing and training ($p = 0.59$). Before starting the treadmill training, both MICT and HIIT groups had similar MAS values: 32.3 ± 0.03 m/min and 34.6 ± 1.2 m/min, respectively. For MICT group, MAS was only significantly increased after three weeks of training (38.8 ± 1.7 m/min; $p = 0.09$) and was stabilized after six training weeks (40.6 ± 2.1 m/min). MAS rose continuously for HIIT group after three (40.4 ± 1.7 m/min; $p = 0.009$) and six (45.2 ± 1.5 m/min;

p=0.049) training weeks. The last evaluated MAS tended to be higher after HIIT than after MICT (p=0.07).

Training rats monitoring, morphometric and systemic measurements

Table 2 summarizes the monitoring during training and the effects of MICT and HIIT on morphometric and systemic measurements. No training effects were shown on the weight gain and total calorie intake of rats during the six weeks of training. MICT induced a decrease of the adipose index compared to UNTR and HIIT regimes. Otherwise, no significant effects of training were observed for the other measurements (weight, length of naso-anal body, BMI, abdominal circumference/thoracic circumference and Lee index). Neither MICT nor HIIT modified hematocrit, heart rate, mean, systolic and diastolic arterial blood pressures of rats.

Myosin heavy chain (MHC) isoform mRNA proportion

Table 3 indicates the myosin heavy chain isoform mRNA percentages in *soleus* and EDL muscles. *Soleus* is mainly composed by oxidative type I MHC mRNA ($83.8 \pm 4.0\%$) whereas glycolytic type IIx ($45.1 \pm 1.8\%$) and type IIb ($48.7 \pm 1.9\%$) MHC mRNAs composed EDL principally.

mRNA correlations in *soleus* and EDL muscles

Based on the mRNA data from the two training protocols, the Principal Component Analysis (PCA) indicated two distinct clusters which globally correspond to *soleus* and EDL muscles (**Figure 2**).

Influence of MICT and HIIT on skeletal muscle transcripts

***AMPK–PGC-1 α* signaling pathway**

In *soleus*, HIIT increased *Ampka1*, *Nrf1* and *Nrf2* mRNA levels compared to UNTR group but no training effects on *Pgc-1 α* mRNA were observed (**Figure 3A**) whereas in EDL, only *Pgc-1 α* mRNA content was significantly up-regulated by HIIT compared to UNTR (p=0.0007) and MICT (p=0.045) rats (**Figure 3B**).

Mitochondrial functioning

In *soleus*, the *Cs* mRNA content was significantly increased almost by 2-fold (p=0.0005) by HIIT. HIIT rose *Nd1* and *Cox2* mRNA contents compare to UNTR and MICT groups. Compared to UNTR rats, the transcription of *Cox4* and *Atp synthase 6* were stimulated by HIIT

(**Figure 4A**). Neither MICT nor HIIT had significant effects on the mRNA levels related to mitochondrial functioning in EDL (**Figure 4B**).

Mitochondrial dynamics

In *soleus*, *Mfn2*, *Opal* and *Drp1* mRNA levels in the HIIT group were at least 50% higher ($p < 0.05$) than in UNTR group. HIIT up-regulated *Fis1* transcription compared to MICT (**Figure 5A**). No training effects on these mitochondrial dynamics genes were observed in EDL (**Figure 5B**).

Antioxidant defenses

In *soleus*, *Sod2* mRNA level was higher in HIIT group than in UNTR ($p = 0.004$) and MICT ($p = 0.04$) groups. HIIT rose the *Cat* mRNA content compared to UNTR ($p = 0.02$) (**Figure 6A**). In EDL, training had no effects on antioxidant defenses mRNAs (**Figure 6B**).

Myosin heavy chain

In *soleus*, HIIT increased the transcription of types I, IIx and IIb myosin heavy chain (MHC) mRNA compared to UNTR group. MICT stimulated the mRNA levels of MHC types IIx and IIb compared to UNTR rats (**Figure 7A**). Neither MICT nor HIIT induced changes in MHC I, IIa, IIx and IIb mRNA compositions in EDL (**Figure 7B**).

Lactate dehydrogenase sub-units

In *soleus*, compared to UNTR rats, HIIT stimulated *Ldh-b* transcription ($p = 0.01$) with no effects on *Ldh-a* mRNA content (**Figure 8A**). In EDL, both types of training did not modify these two genes contents (**Figure 8B**).

Enzymatic activities

In *soleus*, training produces no significant effect on the enzymatic CS, COX, LDH, SOD, GPx and CAT activities (**Table 4**).

In EDL, GPx activity was ~26% higher after HIIT compared to UNTR ($p = 0.006$) (**Table 4**).

Oxidative stress marker

Neither MICT nor HIIT modified the plasmatic 8-isoprostane concentration (**Table 5**), considered as an oxidative stress marker.

Discussion

The main aim of the present study was to optimize training protocols in order to improve aerobic and antioxidant capacities in rat skeletal muscle. More precisely, MICT and HIIT protocols were compared on aerobic (AMPK–PGC-1 α signaling pathway, mitochondrial biogenesis, antioxidant defenses) and anaerobic (lactate dehydrogenase) metabolic processes in two muscles with different typologies: *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL). In order having an integrative approach, the whole organism level was also explored: measurements of maximal aerobic speed (MAS), morphometric and systemic parameters. In a future investigation, the intent is to study the same above training protocols on pathological animal models (as obesity, hypertension, metabolic syndrome).

In our study, the four main findings were: 1) the studied mRNAs were more upregulated with HIIT than MICT, 2) *soleus* muscle was much more activated than EDL in response to both MICT and HIIT, 3) on the only basis of the mRNA changes after training of both muscles, PCA reveals two distinct clusters corresponding to *soleus* and EDL muscles and 4) HIIT stimulated the oxidative capacities at the organism and *soleus* levels. We observed this result through the MAS measurements and through the genes involved in mitochondrial biogenesis and antioxidant defenses.

Today, one of the challenges in human is to define a training protocol, in accordance with the current rhythm of life, which improves overall health benefits through in part oxidative and antioxidant capacities stimulation in skeletal muscle. In human skeletal muscle, studies showed that HIIT would be more efficient than MICT to stimulate mitochondrial biogenesis (MacInnis et al., 2017) and functioning (Daussin et al., 2008).

Exercise intensities between 50 and 70% of the maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$) for MICT and between 85 and 95% $\dot{V}O_{2max}$ for HIIT are commonly applied to improve aerobic capacity in human (Hussain et al., 2016). In the present study, the chosen exercise intensities are in accordance with those recommendations. At the level of whole animal, MICT and mainly HIIT improved physical performance, evaluated through MAS measurements (**Figure 1**), an

indicator of maximal aerobic capacities. These results are consistent with other recent studies. Constans et al. (2021) showed that MAS was greater after training whatever training type, particularly more important with HIIT in healthy rats.

In addition, MICT decreased significantly adiposity index, an indicator of obesity-related disorders (Park et al., 2018) (**Table 2**). It is known that training stimulates fatty acids (FA) and glucose skeletal muscle oxidation but the utilization of these two substrates depends to the training type and particularly to the exercise intensity. Indeed, when exercise intensity is higher than 50-65% $\dot{V}O_{2max}$, FAs oxidation shifts to glucose oxidation (Lundsgaard et al., 2018). Thus, we supposed that MICT increased more than HIIT lipolysis by mobilizing FA for ATP production.

Otherwise, no training effect was observed on cardiovascular and systemic parameters such as heart rate, blood pressures and hematocrit (**Table 2**). Jakovljevic et al. (2019) demonstrated that four weeks of MICT or HIIT had no effects on healthy Wistar rats' systolic and diastolic blood pressures and heart rate. Another study showed that six weeks of MICT did not affect Wistar rats' systolic and diastolic blood pressures (Feng et al., 2019). With supports of our findings and those of the literature, six weeks of training do not seem induce change on cardiovascular parameters in healthy Wistar rats.

To resume, these data obtained at whole organism level show that both MICT and particularly HIIT improved aerobic capacities though MAS measurements and that MICT decreased adiposity index.

These last few years, one of the most potent stimulators of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle is the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α). It can be activate by the AMP-activated protein kinase (AMPK) and the AMPK-PGC-1 α signaling pathway is stimulated when a cellular stress such as physical exercise occurs (Trewin et al., 2018). PGC-1 α is involved in many processes by stimulating the two transcription factors nuclear respiratory factor (NRF) 1 and 2 respectively involved in the regulation of mitochondrial biogenesis and antioxidant systems (Gureev et al., 2019). PGC-1 α is also known to be a regulator of mitochondrial dynamics including fusion and fission processes but these regulations remain still unclear particularly during physical exercise (Joseph et al., 2016). Finally, skeletal muscle fiber type determination is also under the influence of PGC-1 α function (Chabi et al., 2005).

In our study, two muscles have been explored for their distinct fibers composition. The *soleus*, mainly composed in oxidative type I fibers (Eng et al., 2008), is a postural muscle and

provides the vertical acceleration during running (Sasaki and Neptune, 2006). The EDL, mainly composed in type IIb and IIx fibers using mainly anaerobic metabolism, is an ankle dorsiflexor and a digital extensor (Eng et al., 2008). During running, it stabilizes the plantar surface and the hindfoot (Moening et al., 1993).

The parallel exploration of the metabolic processes in *soleus* and EDL muscles showed two different transcriptional training responses revealing substantial differences between both muscles (**Figure 2**). The two clusters related to *soleus* and EDL are established on the only basis of RNA transcripts. It is important to remember that these mRNA responses are related to training effects and not to exercise acute effects because post-training muscle sample were conducted at least 48 hours after the last training session.

One of the most important finding of this paper is the largely more important functional plasticity of the *soleus* muscle and of its mitochondria in comparison to EDL. This suggests that both MICT and HIIT trainings requested more oxidative fibers than glycolytic fibers. Kryściak et al. (2018) also showed that four and eight weeks of endurance training stimulated more transcripts and proteins related to mitochondrial biogenesis in slow *gastrocnemius* fibers than in fast *gastrocnemius* fibers in rats. In *soleus*, HIIT differently from MICT upregulated most of the studied mRNA levels involved in AMPK–PGC-1 α signaling pathway, mitochondrial functioning and dynamics and antioxidant defenses. Among them, *Ampka1*, *Nrf1* and *Nrf2* contents were stimulated but surprisingly not *Pgc-1 α* (**Figure 3A**). PGC-1 α has been described to not be the only mandatory for training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle (Leick et al., 2008). We can suppose that HIIT activated another transcription factor in *soleus* such as the tumor suppressor protein p53 which also induced mitochondrial and antioxidant regulations (Huertas et al., 2019; Sablina et al., 2005). It is also possible that after six weeks of training, the activation of *Pgc-1 α* transcription was achieved and its mRNA content returned to a basal level.

Besides to stimulate PGC-1 α , training exercise activates genes involved in mitochondrial fusion and fission in mammal skeletal muscle (Lee and Song, 2018). These events in response to training are not well understood (Drake et al., 2016). Two weeks of high intensity training increased MFN1, Fis-1, DRP-1 and COX4 protein expressions and *Cs* and *Cox4* transcript levels in the human *vastus lateralis* muscle (Perry et al., 2010). Our results also showed that HIIT stimulated mitochondrial plasticity through genes involved in mitochondrial dynamics (fusion (*Mfn1* and *2* and *Opal*) and fission (*Fis1* and *Drp1*)) and functioning (*Cs*, OXPHOS sub-units complexes encoded by nuclear (*Cox4*) or mitochondrial (*Nd1*, *Cox2*, *Atp synthase 6*)

genome) (**Figures 4A and 5A**). Taken together, all these observations supposed that high intensity training regulates mitochondria quantity and quality in order to increase oxidative capacity in skeletal muscle. However, no changes were observed in CS and COX enzymatic activities (**Table 4**). In the literature, a concomitant increase of *Cs* mRNA and its activity was observed after only 5 and 10 days of moderate training in the rat *gastrocnemius* (Daussin et al., 2008). The difference in CS adaptations between studies could be explained by the variability of training duration, muscle type and timing before sampling.

During physical exercise, mitochondria are among the main sources of reactive oxygen species (ROS; Powers and Jackson, 2008). These molecules are necessary for cellular processes regulation but are harmful at high levels (He et al., 2016). Antioxidant defenses mRNAs (*Gpx1* and mitochondrial *Sod2*) were increased by HIIT (**Figure 6A**). We also determined antioxidant enzyme activities (SOD, GPx and CAT) and no significant changes were observed (**Table 4**). Moreover, no oxidative stress was detected, confirmed by 8-isoprostane level (**Table 5**) suggesting that trainings had no deleterious effects while transcriptional adaptations occurred.

In a same manner, HIIT induced a rise of myosin heavy chain (MHC) aerobic type I and also anaerobic type IIx and IIb mRNA levels in *soleus* (**Figure 7A**). It seems surprising that all MHC mRNAs were stimulated but that confirmed the plasticity of this muscle. Moreover, according to the applied protocol, HIIT can induce adaptations resembling to endurance or strength training, or a mix of the two (MacInnis and Gibala, 2017). Surprisingly, MICT stimulated MHC type IIx and IIb mRNA levels in *soleus* (**Figure 7A**). At the muscle level, these MHC mRNA modifications represent few changes because these two fibers only represented 2.9% of the *soleus* total MHC isoforms (**Table 3**). However, we have to be cautious about these speculative interpretations only based on mRNAs.

In *soleus*, HIIT increased *Ldh-b* mRNA content (**Figure 8A**) with no changes in LDH activity (transformation pyruvate into lactate) (**Table 4**), suggesting higher aerobic capacities. LDH is a tetrameric enzyme composed of the sub-units M and/or H respectively encoded by *Ldh-a* and *Ldh-b* genes. LDH4M reduced pyruvate to lactate in tissues dependent on anaerobic glycolysis whereas LDH4H permits lactate oxidation in tissues dependent on aerobic metabolism (Urbańska and Orzechowski, 2019). In human, three weeks of training (70–85% $\dot{V}O_2\text{max}$) induced an increase of *Ldh-b* mRNA levels and tended to decrease *Ldh-a* transcription in the *vastus lateralis* muscle (Liang et al., 2016).

The PCA analysis puts forward important correlations between the actors involved in AMPK–PGC-1 α signaling pathway, mitochondria functioning and dynamics, antioxidant defenses and LDH sub-units mRNAs in *soleus* (**Figure 2**).

Taken together, these results show that the HIIT protocol induces mitochondrial rearrangement through coordinated aerobic processes in *soleus*.

Moreover, we can observe in *soleus* that MICT often induced similar mRNA levels tendencies as HIIT but not significant. Despite no changes in mRNA levels in EDL, the MAS is increased and also the level of adipose tissue is decreased after MICT. We hypothesized that the MICT intensity was maybe insufficient to induce skeletal muscle adaptations.

Anaerobic metabolism is known to be activated around 75% $\dot{V}O_2\text{max}$, thus we can suppose that this metabolism might be activated during HIIT sessions (85-90% MAS) and requested EDL muscle because of its anaerobic phenotype. This is illustrated by the high LDH activities in EDL in comparison to *soleus* (**Table 4**). But no changes with training were showed in LDH transcripts and its enzymatic activity. However, *Pgc-1 α* mRNA content was stimulated by HIIT suggesting that, probably, it activated aerobic process in this muscle from six weeks (**Figure 3B**). Otherwise, HIIT improved in EDL antioxidant defenses confirmed by GPx activity stimulation (**Table 4**). No changes in 8-isoprostane plasmatic levels were observed suggested that trainings did not induce an oxidative stress at this level (**Table 5**).

In conclusion, this study based on an integrative approach provides new insights regarding oxidative capacities and skeletal muscle antioxidant adaptations training-induced. Our results obtained in Wistar rats clearly showed that the HIIT protocol induces in *soleus* muscle an important mitochondrial functional plasticity stimulating aerobic metabolism. At the organism level, both HIIT and MICT protocols increased MAS, suggesting an increase in oxidative capacities. The present study could contribute to the improvement of exercise program designs used to prevent metabolic diseases often associated to mitochondrial dysfunction (Chabi et al., 2005).

Acknowledgments

We thank the Crédit Agricole for the funding that permits us to acquire the CODA® dispositive. Also, we would like to thank Nathalie Guéguégniat, Manon Inizan and Julia Sanchez for their technical assistance.

Competing interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Beers, R.F.J., and Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* *195*, 276–287.
- Chabi, B., Adhihetty, P.J., Ljubcic, V., and Hood, D.A. (2005). How is mitochondrial biogenesis affected in mitochondrial disease? *Med Sci Sports Exerc* *37*, 2102–2110.
- Constans, A., Pin-Barre, C., Molinari, F., Temprado, J.-J., Briocche, T., Pellegrino, C., and Laurin, J. (2021). High-intensity interval training is superior to moderate intensity training on aerobic capacity in rats: Impact on hippocampal plasticity markers. *Behavioural Brain Research* *398*, 112977.
- Daussin, F.N., Zoll, J., Dufour, S.P., Ponsot, E., Lonsdorfer-Wolf, E., Doutreleau, S., Mettauer, B., Piquard, F., Geny, B., and Richard, R. (2008). Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to aerobic performance improvements in sedentary subjects. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *295*, R264–R272.
- Drake, J.C., Wilson, R.J., and Yan, Z. (2016). Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *The FASEB Journal* *30*, 13–22.
- Dupas, J., Feray, A., Guernec, A., Pengam, M., Inizan, M., Guerrero, F., Mansourati, J., and Goanvec, C. (2018). Effect of personalized moderate exercise training on Wistar rats fed with a fructose enriched water. *Nutr Metab (Lond)* *15*, 69.
- Eng, C.M., Smallwood, L.H., Rainiero, M.P., Lahey, M., Ward, S.R., and Lieber, R.L. (2008). Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *Journal of Experimental Biology* *211*, 2336–2345.
- Farhat, F., Dupas, J., Amérand, A., Goanvec, C., Feray, A., Simon, B., Guegueniat, N., and Moisan, C. (2015). Effect of exercise training on oxidative stress and mitochondrial function in rat heart and gastrocnemius muscle. *Redox Report* *20*, 60–68.
- Feng, B., Qi, R., Gao, J., Wang, T., Xu, H., Zhao, Q., Wu, R., Song, X., Guo, J., Zheng, L., et al. (2019). Exercise training prevented endothelium dysfunction from particulate matter instillation in Wistar rats. *Science of The Total Environment* *694*, 133674.
- Gabriel, B.M., and Zierath, J.R. (2017). The limits of exercise physiology: from performance to health. *Cell Metabolism* *25*, 1000–1011.
- Groussard, C., Maillard, F., Vazeille, E., Barnich, N., Sirvent, P., Otero, Y.F., Combaret, L., Madeuf, E., Sourdrille, A., Delcros, G., et al. (2019). Tissue-Specific Oxidative Stress Modulation by Exercise: A Comparison between MICT and HIIT in an Obese Rat Model (Hindawi).
- Gureev, A.P., Shaforostova, E.A., and Popov, V.N. (2019). Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways. *Frontiers in Genetics* *10*.
- Hashimoto, M., Inoue, T., Katakura, M., Hossain, S., Mamun, A.A., Matsuzaki, K., Arai, H., and Shido, O. (2016). Differential effects of docosaehexaenoic and arachidonic acid on fatty

acid composition and myosin heavy chain-related genes of slow- and fast-twitch skeletal muscle tissues. *Mol Cell Biochem* 415, 169–181.

He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C.-C., Yang, W., and Zuo, L. (2016). Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. *Front. Physiol.* 7.

Huertas, J.R., Casuso, R.A., Agustín, P.H., and Cogliati, S. (2019). Stay Fit, Stay Young: Mitochondria in Movement: The Role of Exercise in the New Mitochondrial Paradigm (Hindawi).

Hussain, S.R., Macaluso, A., and Pearson, S.J. (2016). High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training in the Prevention/Management of Cardiovascular Disease. *Cardiology in Review* 24, 273–281.

Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *PNAS* 104, 12017–12022.

Jakovljevic, B., Nikolic Turnic, T., Jeremic, N., Jeremic, J., Bradic, J., Ravic, M., Jakovljevic, V.Lj., Jelic, D., Radovanovic, D., Pechanova, O., et al. (2019). The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes. *Mol Cell Biochem* 454, 111–121.

Ji, L.L., Kang, C., and Zhang, Y. (2016). Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health. *Free Radic. Biol. Med.* 98, 113–122.

Joseph, A.-M., Adhietty, P.J., and Leeuwenburgh, C. (2016). Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 594, 5105–5123.

Kryściak, K., Majerczak, J., Kryściak, J., Łochyński, D., Kaczmarek, D., Drzymała-Celichowska, H., Krutki, P., Gawedzka, A., Guzik, M., Korostynski, M., et al. (2018). Adaptation of motor unit contractile properties in rat medial gastrocnemius to treadmill endurance training: Relationship to muscle mitochondrial biogenesis. *PLOS ONE* 13, e0195704.

Lee, H., and Song, W. (2018). Exercise and Mitochondrial Remodeling in Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *J Obes Metab Syndr* 27, 150–157.

Leick, L., Wojtaszewski, J.F.P., Johansen, S.T., Kiilerich, K., Comes, G., Hellsten, Y., Hidalgo, J., and Pilegaard, H. (2008). PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 294, E463–E474.

Liang, X., Liu, L., Fu, T., Zhou, Q., Zhou, D., Xiao, L., Liu, J., Kong, Y., Xie, H., Yi, F., et al. (2016). Exercise Inducible Lactate Dehydrogenase B Regulates Mitochondrial Function in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 291, 25306–25318.

Lundsgaard, A.-M., Fritzen, A.M., and Kiens, B. (2018). Molecular Regulation of Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle during Aerobic Exercise. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29, 18–30.

- MacInnis, M.J., and Gibala, M.J. (2017). Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *The Journal of Physiology* 595, 2915–2930.
- MacInnis, M.J., Zacharewicz, E., Martin, B.J., Haikalis, M.E., Skelly, L.E., Tarnopolsky, M.A., Murphy, R.M., and Gibala, M.J. (2017). Superior mitochondrial adaptations in human skeletal muscle after interval compared to continuous single-leg cycling matched for total work. *The Journal of Physiology* 595, 2955–2968.
- Misra, H.P., and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Miyamoto-Mikami, E., Tsuji, K., Horii, N., Hasegawa, N., Fujie, S., Homma, T., Uchida, M., Hamaoka, T., Kanehisa, H., Tabata, I., et al. (2018). Gene expression profile of muscle adaptation to high-intensity intermittent exercise training in young men. *Scientific Reports* 8, 16811.
- Moening, D., Scheidt, A., Shepardson, L., and Davies, G.J. (1993). Biomechanical Comparison of Water Running and Treadmill Running. *Isokinetics and Exercise Science* 3, 207–215.
- Novelli, E.L.B., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M.X., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A.A.H., Cicogna, A.C., and Novelli Filho, J.L.V.B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 41, 111–119.
- Olesen, J., Kiilerich, K., and Pilegaard, H. (2010). PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 153–162.
- Park, Y., Kim, N.H., Kwon, T.Y., and Kim, S.G. (2018). A novel adiposity index as an integrated predictor of cardiometabolic disease morbidity and mortality. *Scientific Reports* 8, 16753.
- Pengam, M., Moisan, C., Simon, B., Guernec, A., Inizan, M., and Amérand, A. (2020). Training protocols differently affect AMPK–PGC-1 α signaling pathway and redox state in trout muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 243, 110673.
- Perry, C.G.R., Lally, J., Holloway, G.P., Heigenhauser, G.J.F., Bonen, A., and Spriet, L.L. (2010). Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 588, 4795–4810.
- Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews* 88, 1243–1276.
- Prasun, P. (2020). Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866, 165838.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine* 11, 1306–1313.
- Sasaki, K., and Neptune, R.R. (2006). Differences in muscle function during walking and running at the same speed. *Journal of Biomechanics* 39, 2005–2013.

- Smith, L., and Conrad, H. (1956). A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 63, 403–413.
- Srere, P.A. (1969). [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 3–11.
- Summermatter, S., Shui, G., Maag, D., Santos, G., Wenk, M.R., and Handschin, C. (2013). PGC-1 α Improves Glucose Homeostasis in Skeletal Muscle in an Activity-Dependent Manner. *Diabetes* 62, 85–95.
- Trewin, A.J., Berry, B.J., and Wojtovich, A.P. (2018). Exercise and mitochondrial dynamics: keeping in shape with ROS and AMPK. *Antioxidants* 7, 7.
- Urbańska, K., and Orzechowski, A. (2019). Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2085.
- Weston, K.S., Wisløff, U., and Coombes, J.S. (2014). High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 48, 1227–1234.
- Yan, Z., Lira, V.A., and Greene, N.P. (2012). Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc Sport Sci Rev* 40, 159–164.
- Yang, C., Li, L., Yang, L., Lü, H., Wang, S., and Sun, G. (2018). Anti-obesity and Hypolipidemic effects of garlic oil and onion oil in rats fed a high-fat diet. *Nutrition & Metabolism* 15, 43.

Tables

Table 1. Primer sequences used for Real-Time RT-PCR analysis. The hybridization temperature was 60°C for all primers. Primers were own designed except those with a subscript number.

Target gene	Abbreviation	Primer sequences (5' to 3')	Data base	Accession number
Actin β	<i>Actin β</i>	(F) CTACAATGAGCTGCGTGTGG (R) GGATGGCTACGTACATGGCT	GenBank	NM_031144.3
Adenosine monophosphate kinase $\alpha 1$	<i>Ampka1</i>	(F) GAAGCATATGCTGCAGGTAGA (R) CGGGTCTTCAGGAAAGAGATA	GenBank	NM_019142.2
Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α	<i>Pgc-1α</i>	(F) ACCCACAGGATCAGAACAAAC (R) TACTTGAGAAAGCTCTGAGCAG	GenBank	NM_031347.1
Nuclear respiratory factor 1	<i>Nrf1</i>	(F) TCACAGACAGTAGTACAGACC (R) TTGGCAGTTCTGAAGCATCAG	GenBank	NM_001100708.1
Nuclear respiratory factor 2	<i>Nrf2</i>	(F) TTAAGCAGCATACAGCAGGAC (R) ATTGCTGTCCATCTCTGTGTCAG	GenBank	NM_031789.2
Citrate synthase	<i>Cs</i>	(F) GCAGAGGGAATAAACCGAACT (R) GGTACAGATTCCGGTAGATCT	GenBank	AF461496.1
NADH dehydrogenase 1	<i>Nd1</i>	(F) CGCCTGACCAATAGCCATAAT (R) TTCGACGTTAAAGCCTGAGAC	GenBank	NC_001665.2
Cytochrome <i>c</i> oxidase 2	<i>Cox2</i>	(F) AATCTCATCCGAAGACGTCCT (R) GTCACGTGAGCTTGTTAGG	GenBank	NC_001665.2
Cytochrome <i>c</i> oxidase 4	<i>Cox4</i>	(F) CCTGAAGGAGAAGGAGAAGG (R) ACTCATTGGTGCCCTTGTTCA	GenBank	NM_017202.1
Adenosine triphosphate synthase 6	<i>Atp synthase 6</i>	(F) CCTATGAGCAGGAGCCGTAA (R) TGGGAATTAGGGAGATGGGG	GenBank	NC_001665.2
Fission protein 1	<i>Fis1</i>	(F) ACGCCTGCCGTTACTTCTTC (R) GCAACCCTGCAATCCTTCAC	GenBank	XM_006249122.3
Optic atrophy protein 1	<i>Opa1</i>	(F) GGCACCTCAAGGTCGTCTCA (R) CACTGCTCTTGGGTCCGATT	GenBank	NM_133585.3
Mitofusin 1	<i>Mfn1</i>	(F) ATCTGGTGGAGATACAGGGCT (R) TCCCACAGCATTGCGTTGAT	GenBank	NM_138976.1
Mitofusin 2	<i>Mfn2</i>	(F) GCTCAGTCGGTTGGAAGTCA (R) GAAAGGAGTGCCTGCCTGAT	GenBank	NM_130894.4
Dynamamin-related protein 1	<i>Drp1</i>	(F) AGGTTGCCCGTGACAAATGA (R) CACAGGCATCAGCAAAGTCG	GenBank	NM_053655.3
Superoxide dismutase 1	<i>Sod1</i>	(F) ATTAAGTGAAGGCGAGCATGG (R) TCCAACATGCCTCTCTTCATC	GenBank	NM_017050.1
Superoxide dismutase 2	<i>Sod2</i>	(F) TGGCTTGGCTTCAATAAGGAG (R) AAGATAGTAAGCGTGCTCCCA	GenBank	NM_017051.2
Glutathione peroxidase 1	<i>Gpx1</i>	(F) TGCAATCAGTTCGGACATCAG (R) TTCACCTCGCACTTCTCAAAC	GenBank	NM_030826.4
Catalase	<i>Cat</i>	(F) CATGAATGGCTATGGCTCACA (R) AAGTCTTCCTGCCTCTTCAAC	GenBank	NM_012520.2
Myosin heavy chain I (H7)	<i>I</i>	(F) ACCTGATGGTGGATGTGGAG (R) CTTCTGCTTCCACTCAACCA	GenBank	NM_017240.2
Myosin heavy chain IIa (H2)	<i>IIa</i>	(F) TGACAACCTCTCGCTTTGG (R) TTAAGCTGGAAGTGACCCGG	GenBank	NM_001135157.1
Myosin heavy chain IIx (H4)	<i>IIx</i>	(F) CAGAAGCGCAATGTTGAAGCT (R) TGAGAACGTTCTTGCGGTCTT	GenBank	NM_001135158.1
Myosin heavy chain IIb (H1)	<i>IIb^l</i>	(F) TGGCAATGCCAAGACTGTGAG (R) AGGTTTCGATATCTGCGGAGG	GenBank	NM_019325.1
Lactate dehydrogenase A	<i>Ldh-a</i>	(F) TCATCCACTGAGCTGTCACG (R) TGCTCCTTGCTGCATCCGT	GenBank	NM_017025.1
Lactate dehydrogenase B	<i>Ldh-b</i>	(F) CAGGAAGTGAACCCAGAGATG (R) CCCAGTTGGTGTAGCCTTTTA	GenBank	NM_001316333.1

(F): Forward, (R): Reverse.

Reference : ¹Hashimoto et al. (2016)

Table 2. Monitoring during training and effects of MICT and HIIT on morphological and systemic parameters.

		UNTR <i>n</i> = 7	MICT <i>n</i> = 8	HIIT <i>n</i> = 8
Monitoring during training	Weight gain (g)	116.29 ± 9.09	95.75 ± 5.65	104.88 ± 7.49
	Total calorie intake (kcal/day/100 g of rat)	23.00 ± 0.75	22.84 ± 0.89	22.46 ± 0.64
Morphological parameters	Body weight (g)	428.71 ± 14.74	390.00 ± 13.12	402.50 ± 12.57
	Body naso-anal length (cm)	24.93 ± 0.46	24.63 ± 0.40	24.88 ± 0.40
	Body mass index (g/cm ²)	0.67 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.02
	Abdominal circumference/thoracic circumference	1.07 ± 0.01	1.03 ± 0.02	1.04 ± 0.01
	Lee index	3.00 ± 0.04	2.92 ± 0.04	3.61 ± 0.28
	Adiposity index	4.11 ± 0.42 a	2.33 ± 0.35 b	3.61 ± 0.28 a
Systemic parameters	Heart rate (bpm)	373.39 ± 12.46	361.32 ± 9.62	377.68 ± 9.21
	Mean arterial blood pressure (mmHg)	122.88 ± 2.02	114.00 ± 4.78	119.57 ± 4.31
	Systolic arterial blood pressure (mmHg)	154.83 ± 2.44	145.31 ± 4.92	154.32 ± 4.34
	Diastolic arterial blood pressure (mmHg)	107.79 ± 1.78	99.26 ± 5.01	103.57 ± 4.14
	Hematocrit (% red blood cells)	47.96 ± 2.27	48.93 ± 3.57	48.24 ± 1.18

The means of weight gain and total calorie intake of rats indicated in this table were measured during the six training weeks. Values are means ± SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups.

Table 3. Myosin heavy chain isoforms mRNA percentages in *soleus* and EDL muscles.

Muscle (<i>n</i> = 21)	Myosin heavy chain isoforms mRNA (%)			
	I	IIa	IIx	IIb
<i>Soleus</i>	83.8 ± 4.0	13.3 ± 3.6	1.1 ± 0.5	1.8 ± 0.4
EDL	0.3 ± 0.1	5.9 ± 0.6	45.1 ± 1.8	48.7 ± 1.9

Values are means ± SEM.

Table 4. Effects of MICT and HIIT on CS, COX, LDH, SOD, GPx and CAT activities in *soleus* and EDL muscles.

	<i>Soleus</i>			EDL		
	UNTR <i>n</i> = 7	MICT <i>n</i> = 8	HIIT <i>n</i> = 8	UNTR <i>n</i> = 7	MICT <i>n</i> = 8	HIIT <i>n</i> = 8
CS (nmol DTNB/min/mg WT)	7.1 ± 0.8	10.1 ± 1.2	8.0 ± 0.7	8.1 ± 0.3	8.6 ± 0.2	7.6 ± 0.3
COX (nmol cyt. <i>c</i> oxidized/min/g WT)	28.5 ± 3.3	35.2 ± 4.2	35.5 ± 4.7	20.7 ± 1.2	15.7 ± 1.5	19.7 ± 3.2
LDH (µmol oxidized NADH/min/g WT)	148.0 ± 6.2	143.9 ± 9.1	157.4 ± 8.5	704.4 ± 88.6	677.9 ± 32.2	694.8 ± 23.4
SOD (U/g WT)	491.6 ± 54.0	513.4 ± 57.4	586.7 ± 50.4	289.0 ± 52.5	356.1 ± 68.8	361.4 ± 58.9
GPx (µmol NADPH/min/g WT)	7.9 ± 0.3	7.4 ± 0.2	7.8 ± 0.4	0.9 ± 0.1 a	1.0 ± 0.04 a	1.2 ± 0.1 b
CAT (nmol H ₂ O ₂ /min/g WT)	1151.1 ± 97.2	1019.9 ± 80.7	944.8 ± 77.0	216.1 ± 22.5	236.9 ± 24.6	209.5 ± 10.2

Results are means ± SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups.

UNTR: untrained; MICT: moderate intensity continuous training; HIIT: high intensity interval training; CS: citrate synthase; COX: cytochrome *c* oxidase; LDH: lactate dehydrogenase; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; WT: weight tissue.

Table 5. Effects of MICT and HIIT on plasmatic 8-isoprostane concentrations.

	UNTR <i>n</i> = 7	MICT <i>n</i> = 8	HIIT <i>n</i> = 8
8-isoprostane (pg/mL)	140.1 ± 32.3	96.4 ± 18.9	110.9 ± 21.5

Results are means ± SEM. No significant differences are observed between groups.

UNTR: untrained; MICT: moderate intensity continuous training; HIIT: high intensity interval training.

Figures

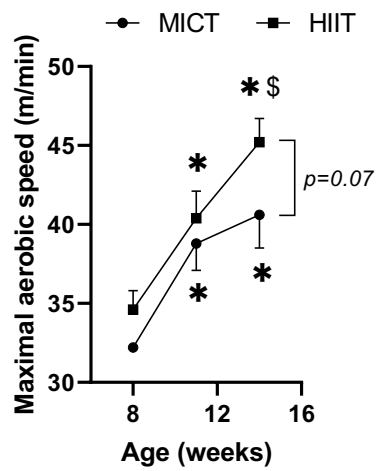


Figure 1. Effect of MICT and HIIT on maximal aerobic speed (MAS). Values of MAS are means \pm SEM. Statistical differences with post-hoc test are observed between groups. * indicates significant differences ($p < 0.05$) with MAS evaluated at 8 weeks and \$ indicates significant differences ($p < 0.05$) with MAS evaluated at 11 weeks. No significant differences between groups at each age are observed.

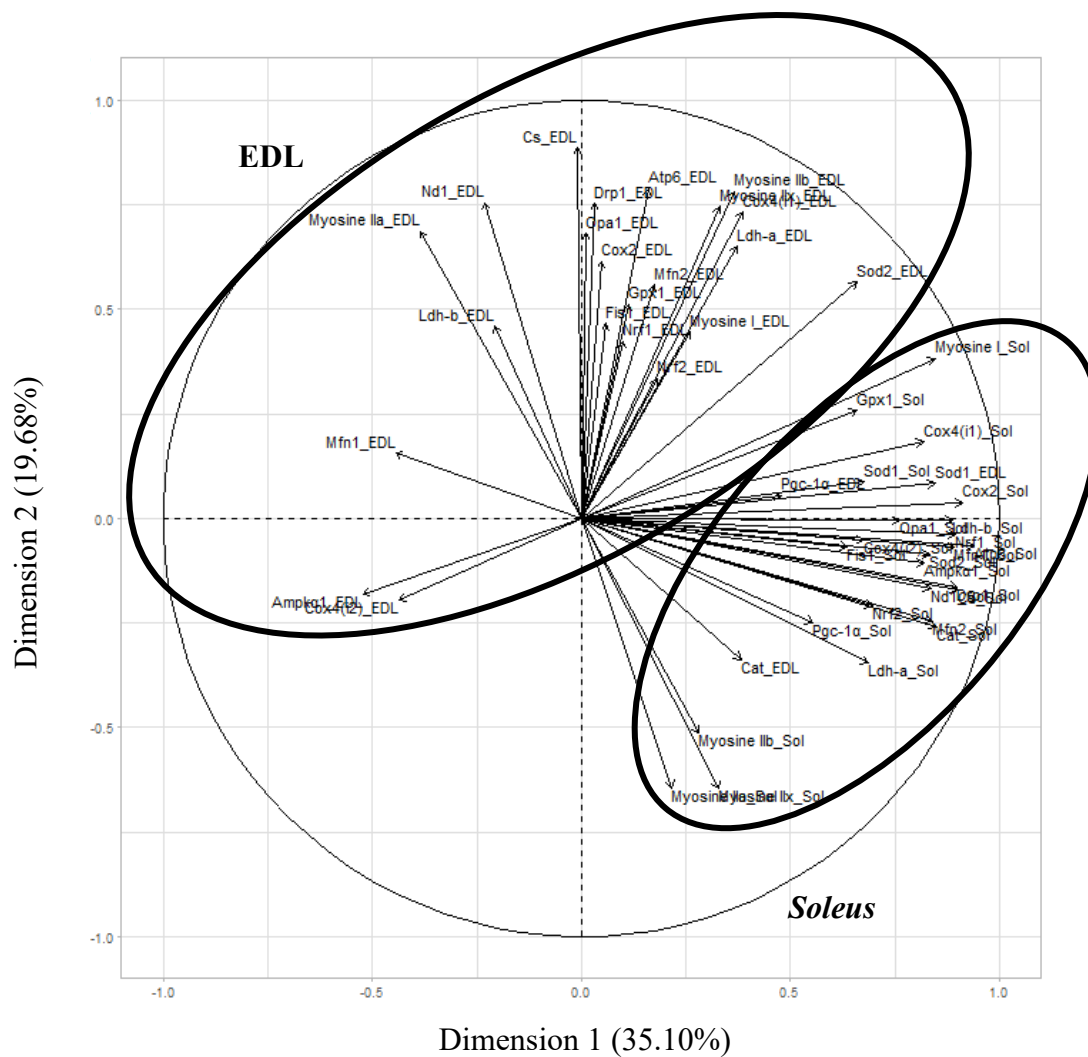


Figure 2. Correlation circle of the first two dimensions (Principal Component Analysis, PCA) performed using all mRNA levels studied in soleus ($n = 21$) and EDL ($n = 21$) muscles of the two training groups.

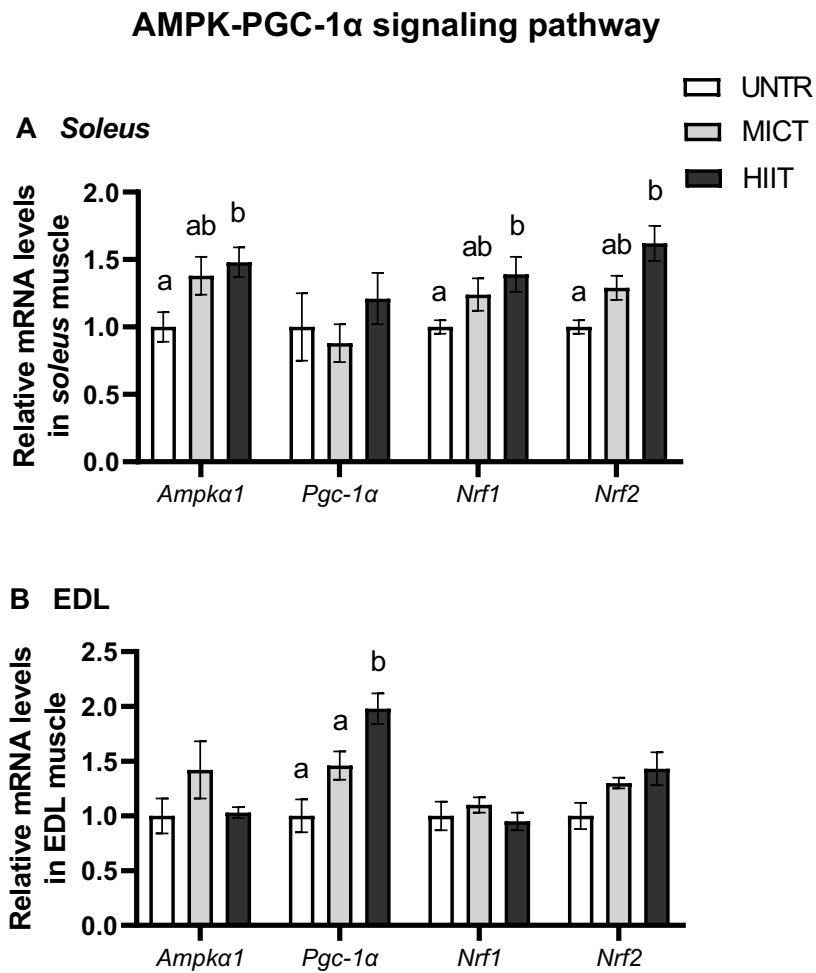


Figure 3. Effects of MICT and HIIT on *Ampka1*, *Pgc-1 α* , *Nrf1* and *Nrf2* mRNA levels in *soleus* (A) and *EDL* (B) muscles. UNTR: $n = 6$; MICT: $n = 7$ and HIIT: $n = 8$. Results are expressed as fold change with the untrained group, which is set to 1. Results are means \pm SEM. Similar letters indicate no significant differences ($p > 0.05$) between groups.

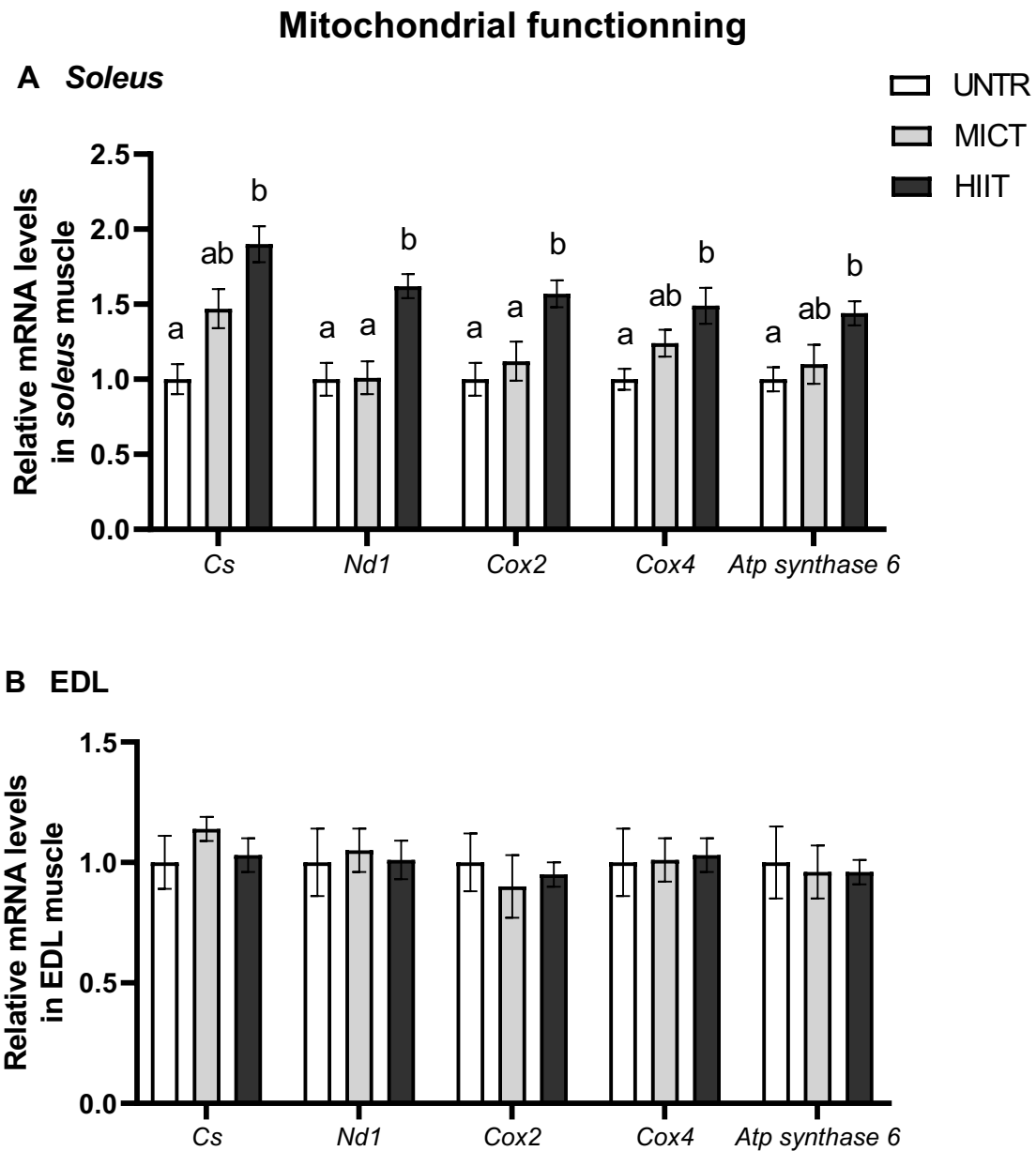


Figure 4. Effects of MICT and HIIT on *citrate synthase (Cs)*, *NADH dehydrogenase 1 (Nd1)*, *cytochrome c oxidase (Cox) 1* and *4* and *Atp synthase 6* mRNA levels in *soleus* (A) and *EDL* (B) muscles. UNTR: $n = 6$; MICT: $n = 7$ and HIIT: $n = 8$. Results are expressed as fold change with the untrained group, which is set to 1. Results are means \pm SEM. Similar letters indicate no significant differences ($p > 0.05$) between groups.

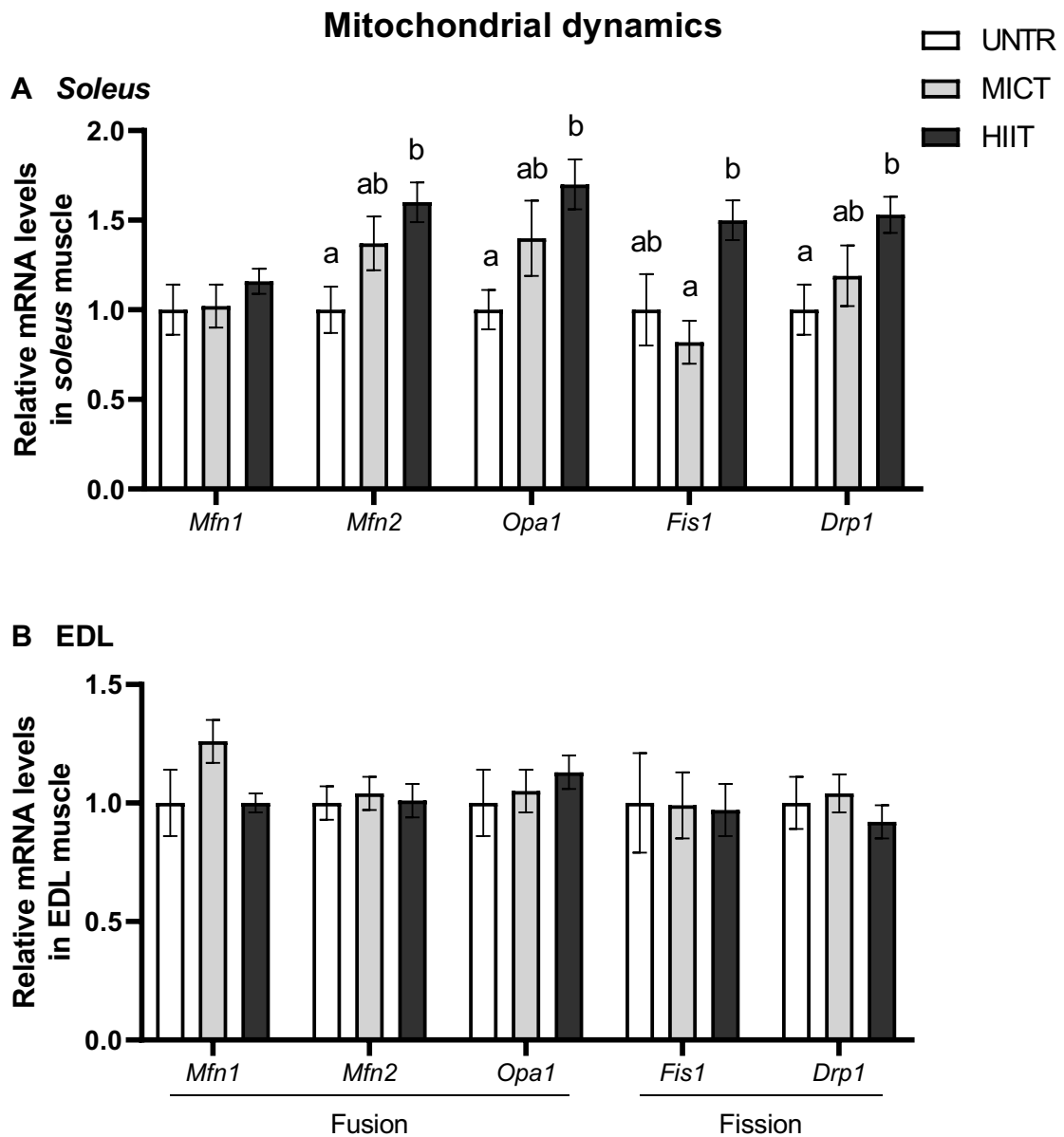


Figure 5. Effects of MICT and HIIT on mRNA levels related to mitochondrial fusion (*mitofusin* (*Mfn*) 1 and 2 and *optic atrophy protein* (*Opa1*)) and fission (*fission protein 1* (*Fis1*) and *dynamin-related protein 1* (*Drp1*)) in *soleus* (A) and *EDL* (B) muscles. UNTR: $n = 6$; MICT: $n = 7$ and HIIT: $n = 8$. Results are expressed as fold change with the untrained group, which is set to 1. Results are means \pm SEM. Similar letters indicate no significant differences ($p > 0.05$) between groups.

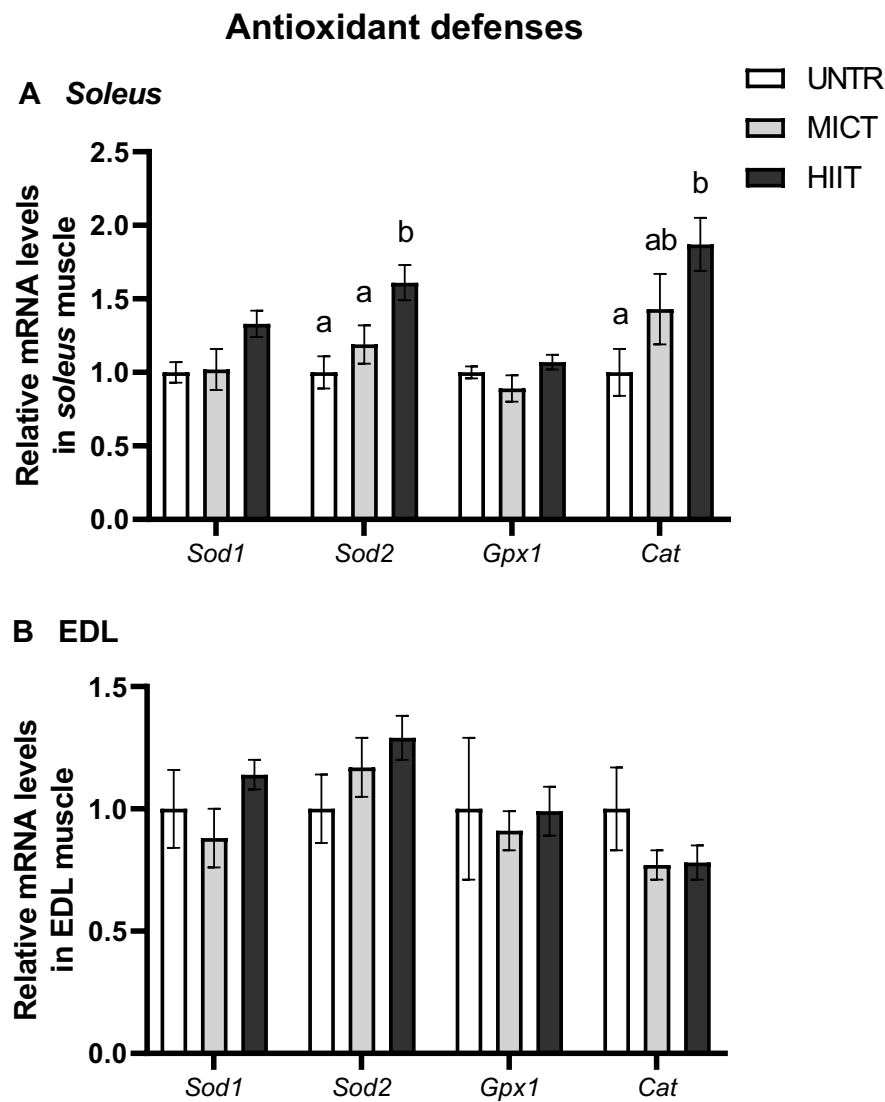


Figure 6. Effects of MICT and HIIT on mRNA levels related to antioxidant defenses (*superoxide dismutase (Sod) 1 and 2, glutathione peroxidase 1 (Gpx1) and catalase (Cat)*) in *soleus* (A) and *EDL* (B) muscles. UNTR: $n = 6$; MICT: $n = 7$ and HIIT: $n = 8$. Results are expressed as fold change with the untrained group, which is set to 1. Results are means \pm SEM. Similar letters indicate no significant differences ($p > 0.05$) between groups.

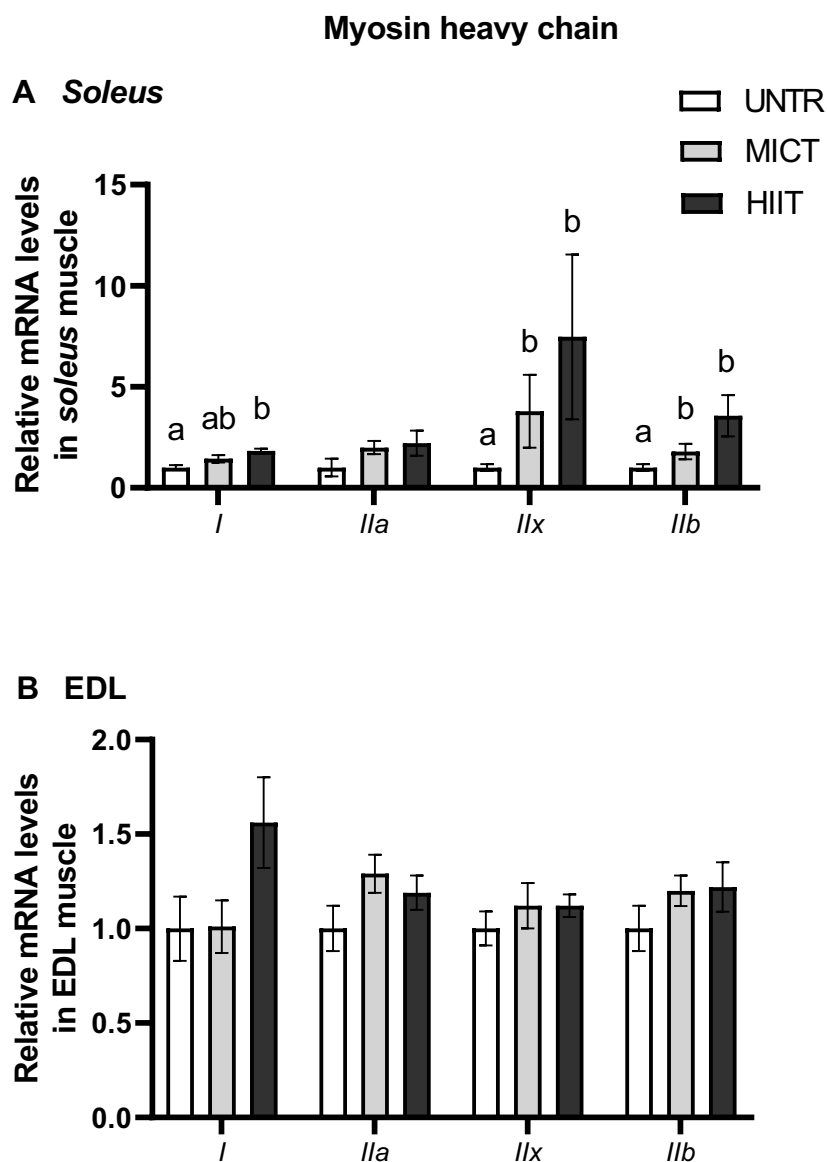


Figure 7. Effects of MICT and HIIT on *myosin heavy chain I, IIa, IIx and IIb* mRNA levels in *soleus* (A) and *EDL* (B) muscles. UNTR: $n = 6$; MICT: $n = 7$ and HIIT: $n = 8$. Results are expressed as fold change with the untrained group, which is set to 1. Results are means \pm SEM. Similar letters indicate no significant differences ($p > 0.05$) between groups.

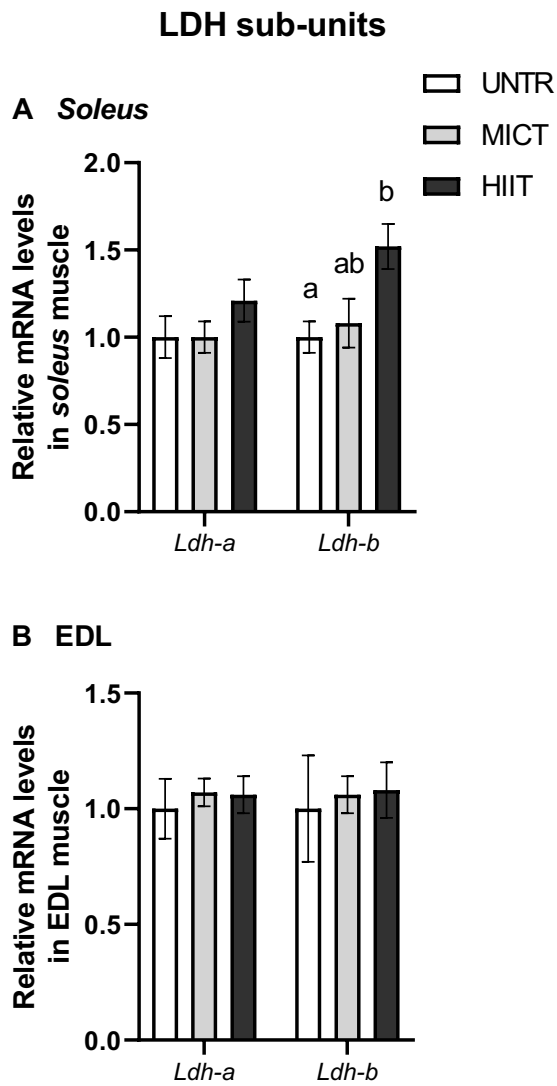


Figure 8. Effects of MICT and HIIT on *lactate dehydrogenase (Ldh)-a* and *-b* sub-units mRNA levels in *soleus* (A) and *EDL* (B) muscles. UNTR: $n = 6$; MICT: $n = 7$ and HIIT: $n = 8$. Results are expressed as fold change with the untrained group, which is set to 1. Results are means \pm SEM. Similar letters indicate no significant differences ($p > 0.05$) between groups.



Chapitre 3 :

Discussion générale

Aujourd'hui, il n'est plus à démontrer que l'exercice physique chronique apporte des bienfaits considérables sur la santé humaine. Pratiqué régulièrement, il stimule entre autres la biogenèse mitochondriale et les capacités antioxydantes au niveau du muscle squelettique limitant ainsi les risques de développer des maladies métaboliques chroniques (Trewin et al., 2018). Parmi les différents types d'entraînement, les effets du MICT et du HIIT sont couramment étudiés et comparés dans le but de déterminer le protocole d'entraînement physique le plus bénéfique pour la santé. Dans la littérature récente, le HIIT s'est majoritairement révélé être l'entraînement le plus efficace pour la stimulation du contenu mitochondrial et des capacités aérobies au niveau musculaire (Constans et al., 2021; MacInnis and Gibala, 2017). **Toutefois, il n'existe actuellement pas de consensus sur le protocole d'entraînement à appliquer. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les régulations cellulaires et moléculaires induites dans le muscle squelettique par l'entraînement.** Pour mettre en œuvre des protocoles d'entraînement et faciliter l'analyse des données, il est important de définir les paramètres qui caractérisent l'entraînement. D'une part, les variables individuelles comprennent, par exemple, les caractères héréditaires, le sexe, l'âge, les pathologies, le niveau d'entraînement, l'état nutritionnel... D'autre part, l'entraînement se définit par un ensemble de paramètres modifiables tels que l'intensité de l'exercice, la fréquence et la durée des séances, la durée totale de l'entraînement, le temps de repos entre chaque séance ou encore le volume (Bishop et al., 2019a). Ces paramètres interagissent entre eux et influent les réponses physiologiques.

Dans le muscle squelettique, une multitude de voies de signalisation est activée par l'entraînement physique mais elles ne sont pas encore toutes élucidées et la chronologie de mise en place des réponses demeure en partie inconnue (Neufer et al., 2015). Parmi celles-ci, la voie AMPK–PGC-1 α est l'une des principales qui stimule la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique (Jäger et al., 2007). Taylor et al. (2005) ont montré que l'expression de PGC-1 α dépend de certains paramètres d'entraînement (durée et intensité) ainsi que du type de fibres musculaires chez le rat. L'exploration des réponses fibres dépendantes est compliquée à réaliser chez les mammifères puisque leurs muscles ont une composition hétérogène en type de fibres. Certaines études ont exploré les effets de l'entraînement sur des fibres isolées mais celles-ci restent rares en raison des contraintes

méthodologiques (MacInnis et al., 2017). L'utilisation de modèles animaux autres que les mammifères, comme le poisson par exemple, constitue une bonne alternative pour pallier à cette limite anatomique (McClelland, 2012).

En comparant les effets du MICT et du HIIT dans les fibres musculaires lentes et rapides, cette thèse a pour objectif de déterminer l'entraînement qui stimule le plus le métabolisme énergétique aérobie. **L'exploration simultanée des régulations de la biogenèse mitochondriale et des défenses antioxydantes dans le muscle squelettique chez deux modèles (la truite arc-en-ciel et le rat Wistar) constitue l'une des originalités de ce travail.**

Dans cette discussion générale, les principaux résultats seront tout d'abord discutés au regard de nos quatre objectifs de départ (cf. page 70), celui relatif à la validation de l'utilisation du modèle poisson dans le champ de la physiologie de l'exercice sera traité de manière transversale tout au long de la discussion. Puis, seront abordées la chronologie de mise en place des réponses et les limites de notre étude. Enfin, cette exploitation menée sur deux modèles animaux en parallèle, nous amènera à aborder les similitudes et les différences des réponses musculaires sous l'angle de la physiologie comparée. Tout au long de cette discussion générale, les termes muscle rouge et muscle blanc feront référence aux résultats présentés chez le poisson et les termes soléaire et EDL à ceux chez le rat.

3.1. Objectif 1. MICT ou HIIT : quel type d'entraînement stimule le plus la biogenèse mitochondriale et les capacités antioxydantes dans le muscle squelettique ?

L'entraînement à l'endurance de type MICT est connu pour améliorer les capacités du métabolisme énergétique aérobie et la résistance à la fatigue tandis que l'entraînement à la force conduit à une hypertrophie musculaire et augmente les capacités de force. Selon le protocole d'entraînement appliqué, les adaptations induites par le HIIT pourraient être comparables à celles induites par un entraînement d'endurance, de force ou une combinaison de ces deux types d'entraînement sollicitant donc à la fois les métabolismes aérobie et anaérobie (MacInnis and Gibala, 2017). Les intensités de nos protocoles d'entraînement ont été pensées de sorte que les résultats soient plus facilement mis en perspective chez nos deux modèles. Pour le MICT, les poissons et les rats ont respectivement

été entraînés à 57% de leur U_{crit} et à 65% de leur VMA et pour le HIIT à 90% de leur U_{crit} et à 85-90% de leur VMA. Ainsi, le muscle rouge et le soléaire (principalement composés des fibres oxydatives) seraient majoritairement recrutés par les deux types d'entraînement alors que le muscle blanc et l'EDL (composés de fibres glycolytiques) le seraient davantage par le HIIT que par le MICT.

Dans notre étude, les réponses transcriptionnelles musculaires de nos modèles se sont révélées être dépendantes du type d'entraînement mais aussi du type de fibres. En effet, contrairement au MICT, le HIIT a induit d'importantes adaptations transcriptionnelles. Dans les fibres oxydatives (muscle rouge et soléaire), le HIIT a stimulé la majorité des transcrits de la voie AMPK–PGC-1 α , du fonctionnement mitochondrial (Cs et complexes de la OXPHOS) et des défenses antioxydantes. Chez le mammifère, il est rapporté que la biogenèse mitochondriale est plus stimulée par un entraînement de haute intensité que par un entraînement d'intensité modérée et qu'elle serait médiée par l'augmentation des taux d'ARNm de *Pgc-1 α* (MacInnis et al., 2019). Cela engendrerait une amélioration du contenu mitochondrial et des capacités aérobies au niveau musculaire (Bexfield et al., 2009; MacInnis et al., 2017). À notre connaissance, il n'existe pas chez le poisson d'étude ayant comparé les effets du MICT et du HIIT sur ces processus. Toutefois, chez le saumon Atlantique, Castro et al. (2011) ont montré qu'un entraînement aérobie par intervalles améliorait davantage qu'un entraînement continu d'intensité plus faible les défenses antioxydantes, la fonction cardiaque et la réponse immunitaire.

Même si les études relatives à l'influence de l'entraînement sur la dynamique mitochondriale sont encore rares, il est probable que l'entraînement améliorerait la quantité et la qualité des mitochondries en stimulant les acteurs impliqués dans la fusion (MFN1 et 2 et OPA1) et la fission mitochondriales (Fis1 et DRP1) (Lee and Song, 2018). À notre connaissance, les effets du MICT et du HIIT sur les gènes codant pour la dynamique mitochondriale n'ont pas encore été comparés chez le mammifère. Perry et al. (2010) ont montré que le HIIT stimulait l'expression protéique de MFN1, OPA1, Fis1 et DRP1 dans le muscle vaste latéral chez l'Homme. **Notre étude est probablement l'une des premières à montrer que le HIIT stimule plus que le MICT cette dynamique mitochondriale au niveau transcriptionnel dans le soléaire** (augmentation des taux en ARNm de *Mfn2*, *Opa1*, *Fis1* et *Drp1*).

Chez le rat, il est intéressant de mettre en perspective les résultats obtenus au niveau musculaire avec la performance physique évaluée par la VMA. Le MICT et plus encore le HIIT ont amélioré la VMA, suggérant que les capacités oxydatives sont d'autant plus améliorées que l'intensité d'exercice est importante. Ces résultats à l'échelle de l'organisme sont conformes à d'autres études menées chez le rat (Constans et al., 2021; Khalafi et al., 2020) et à une méta-analyse menée chez l'Homme indiquant que le HIIT améliore davantage que le MICT la performance physique (Bacon et al., 2013).

L'hormèse mitochondriale repose sur le principe qu'un entraînement conduit à des adaptations cellulaires telles que la stimulation des défenses antioxydantes, afin de lutter contre la production d'ERO induite par de futures séances d'exercice (Steinbacher and Eckl, 2015). **Dans ce travail de thèse, l'état redox a été évalué par une approche multiparamétrique en explorant les réponses enzymatiques antioxydantes transcriptionnelles et protéiques (SOD, GPx et CAT) au niveau musculaire ainsi que le niveau de stress oxydatif au niveau plasmatique.** Nous avons observé une stimulation de la transcription de certaines de ces enzymes antioxydantes par le HIIT dans les fibres oxydatives de poisson et de rat avec peu de changement de leurs activités enzymatiques. En effet, le HIIT a induit une tendance à la hausse de l'activité de la SOD dans le muscle rouge et une augmentation de l'activité de la GPx dans l'EDL. L'absence d'augmentation des 8-isoprostanes plasmatiques confirme que les individus entraînés se sont adaptés à la production d'ERO produites lors des sessions d'exercice. Ainsi, il semble que les enzymes antioxydantes aient assuré leur rôle de défense face à la production d'ERO générée lors des sessions d'exercice (He et al., 2016). Le muscle n'étant pas la seule source d'ERO, l'interprétation des résultats sur l'état redox doit toutefois rester prudente puisque l'activité des défenses antioxydantes témoigne de l'activité musculaire alors que les 8-isoprostanes ont été dosés dans le plasma.

Sur la base des résultats obtenus chez nos deux modèles d'étude, le HIIT paraît être plus bénéfique que le MICT pour stimuler la biogenèse mitochondriale ainsi que les capacités antioxydantes dans le muscle squelettique, et ce principalement dans les fibres oxydatives. La théorie de l'hormèse mitochondriale semble être vérifiée au cours des deux types d'entraînement MICT et HIIT chez nos modèles. Les effets globaux du MICT et du HIIT sont résumés sur la Figure 17.

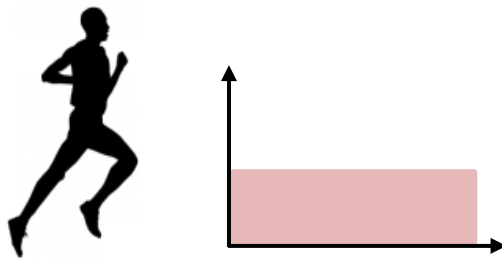
Dès lors, la question du choix de la combinaison de paramètres d'exercice pour optimiser ces processus cellulaires se pose. Elle a été abordée chez le poisson dans notre deuxième publication et fera l'objet de la deuxième partie de cette discussion générale.

3.2. Objectif 2. Quelle combinaison de paramètres d'exercice stimule les réponses au niveau musculaire ?

Les paramètres d'exercice sont des critères importants à prendre en considération pour l'étude des effets de l'entraînement. Cependant, les protocoles d'entraînement, les modèles et les muscles utilisés dans la littérature sont variables, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Dans notre deuxième publication, six protocoles d'entraînement ont été explorés chez la truite arc-en-ciel, différant par des paramètres d'exercice (intensité de l'exercice, durée de l'entraînement, fréquence quotidienne du HIIT et volume total d'entraînement). Cette étude avait pour but de déterminer le paramètre d'exercice et/ou la combinaison de paramètres la plus efficace pour stimuler les capacités oxydatives et antioxydantes.

Des méta-analyses récentes menées chez l'Homme ont présenté l'importance de l'**intensité** de l'exercice et du **volume** d'entraînement sur les adaptations mitochondriales musculaires (Bishop et al., 2019b; MacInnis et al., 2019).

MICT



Fibres oxydatives

~~Fibres glycolytiques~~



Transcrits :

- Voie de signalisation AMPK–PGC-1 α
- Fonctionnement mitochondrial (CS, complexes OXPHOS et dynamique mitochondriale)
- Enzymes antioxydantes

Activités enzymatiques :

- Métabolisme aérobie
- Métabolisme anaérobie
- Défenses antioxydantes



→ 8-isoprostanés



↗ Vitesse maximale aérobie



HIIT



Fibres oxydatives Fibres glycolytiques



Transcrits :

- ↗ Voie de signalisation AMPK–PGC-1 α
- ↗ Fonctionnement mitochondrial (CS, complexes OXPHOS et dynamique mitochondriale)
- ↗ Enzymes antioxydantes

Activités enzymatiques :

- Métabolisme aérobie
- Métabolisme anaérobie
- Défenses antioxydantes



→ 8-isoprostanés



↗↗ Vitesse maximale aérobie



Muscles
squelettiques

Stress oxydatif
plasmatique

Performance
physique

Figure 17. Effets globaux du MICT et HIIT.

↗ : stimulation significative ; → : pas d'effet significatif.

Conformément à notre première étude, l'intensité de l'exercice est apparue dans notre deuxième publication comme déterminante dans la mise en place des réponses transcriptionnelles dans le muscle squelettique. De plus, pour une intensité donnée, le volume d'entraînement paraît être un paramètre pertinent pour la régulation transcriptionnelle et les réponses se sont révélées être dépendantes du type de fibres. En effet, un faible volume de HIIT a stimulé les taux de certains transcrits liés aux métabolismes aérobie (*Ampkα2*, *Cs*, sous-unités des complexes de la OXPHOS) et anaérobie (*Ldh-a*) dans le muscle rouge alors que dans le muscle blanc, seuls les taux de quelques ARNm impliqués dans le métabolisme aérobie (*Pgc-1α*, complexes de la OXPHOS et *Ldh-b*) et dans les défenses antioxydantes (*Sod1* et *Gpx1*) ont été augmentés sous l'effet d'un haut volume de HIIT. En outre, un important volume de MICT semble être requis pour les adaptations transcriptionnelles dans les deux types de muscles. En accord avec MacInnis et al. (2019), une intensité élevée pourrait compenser un faible volume d'entraînement afin de stimuler la biogenèse mitochondriale alors qu'un volume important d'entraînement nécessite une intensité minimale pour stimuler cette biogenèse.

Le volume d'un entraînement peut être modulé par la **durée** et/ou la **fréquence** des séances d'exercice ou de l'entraînement. Chez l'Homme, l'expression de protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale dans le muscle vaste latéral est d'autant plus stimulée que la durée de l'entraînement est importante (Perry et al., 2010). Une augmentation de la fréquence des sessions de HIIT améliore quant à elle la consommation d'O₂ au niveau mitochondrial dans ce même muscle (Ghiarone et al., 2019). Machado et al. (2017) ont décrit l'intérêt de ces deux paramètres d'exercice pour contrecarrer les dysfonctions métaboliques induites par le syndrome métabolique.

Dans notre étude, les réponses sont apparues dépendantes de la durée et de la fréquence. Les régulations transcriptionnelles semblent être dépendantes du type de fibres, le muscle rouge étant plus rapidement stimulé que le muscle blanc.

Dans le muscle rouge, un entraînement de 10 jours a stimulé les taux en ARNm des sous-unités de la OXPHOS et de la *Ldh-a* alors que ceux de *Pgc-1α*, des défenses antioxydantes et de la *Ldh-b* ont été augmentés par 20 jours d'entraînement. Dans le muscle blanc, la transcription de gènes relatifs au métabolisme aérobie (*Ampkα1*, *Pgc-1α*, *Cox1* et *Ldh-b*) et aux capacités antioxydantes (*Sod1* et 2 et *Ucp2β*) est augmentée après 20 jours

d'entraînement. Une augmentation des activités de la LDH et des enzymes antioxydantes (SOD et GPx) a été constatée après 20 jours d'entraînement dans le muscle rouge sans modification dans le muscle blanc.

Une séance quotidienne de HIIT a augmenté les contenus en ARNm impliqués dans le métabolisme aérobie (*Ampka2*, *Cs*, sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale) et dans les défenses antioxydantes (*Sod2*, *Ucp2 α* et *2 β*) dans le muscle rouge alors que dans le muscle blanc, deux séances quotidiennes de HIIT sont requises pour stimuler les transcrits des complexes de la OXPHOS, *Gpx1* et *Ldh-b*. Les activités enzymatiques ont été d'autant plus stimulées que la fréquence du HIIT était importante. En effet, deux séances quotidiennes de HIIT ont induit une stimulation des activités de la CS et de la SOD dans les deux types de muscles. **L'ensemble de ces résultats supposeraient qu'une biogenèse mitochondriale musculaire se soit mise en place sous l'influence d'une plus grande fréquence d'exercice au niveau du muscle squelettique chez la truite arc-en-ciel.**

Ainsi, la combinaison d'une intensité et d'un volume élevés paraît être la plus efficace pour stimuler les réponses transcriptionnelles et protéiques qui sous-tendent la biogenèse mitochondriale et les défenses antioxydantes dans le muscle squelettique chez la truite arc-en-ciel. Une durée et une fréquence élevées semblent être nécessaires pour optimiser les réponses protéiques. Nos résultats, cohérents avec ceux déjà montrés chez l'Homme, confortent l'utilisation de notre modèle poisson dans le champ de la physiologie de l'exercice physique.

3.3. Objectif 3. Les réponses sont-elles dépendantes du type de fibres musculaires ?

Chez le mammifère comme chez le poisson, le recrutement des fibres musculaires dépend de l'intensité de l'exercice (Kristensen et al., 2015; Tudorache et al., 2013). Les fibres lentes sont majoritairement sollicitées lors des contractions musculaires jusqu'à environ 75% de $\dot{V}O_2\text{max}$ pour le mammifère (Sale, 1987) et 80% de U_{crit} pour le poisson (Hvas and

Oppedal, 2017). Lorsque ces intensités sont dépassées, les fibres rapides sont également recrutées. Dans ce travail de thèse, l'un des objectifs était d'aborder les réponses fibres-dépendantes par une approche de physiologie comparée. De ce fait, nous avons prélevé chez le rat des muscles de typologie différente dont l'un est majoritairement constitué de fibres lentes : le soléaire et l'autre composé de fibres rapides : l'EDL (Eng et al., 2008). Chez l'Homme, le muscle le plus couramment exploré est le muscle vaste latéral externe. Ce muscle contient une proportion quasi égale en fibres lentes et rapides (Nederveen et al., 2020) mais qui varie selon plusieurs facteurs inter- et intra-individuels tels que le sexe, l'hérédité, l'âge, le niveau d'entraînement (Pion et al., 2017; Staron et al., 2000). Ces facteurs contribuent à la variabilité des résultats observés et à leur difficulté d'interprétation.

La stimulation des transcrits et des protéines impliqués dans les réponses aérobies et les défenses antioxydantes apparait comme majoritairement dominante dans les fibres oxydatives et plus importante avec le HIIT qu'avec le MICT. Chez le rat, Taylor et al. (2005) ont montré que l'expression protéique de PGC-1 α et l'activité de la CS étaient plus élevées dans les fibres oxydatives et ce d'autant plus que l'intensité de l'exercice est importante. Nous pouvons nous attendre à observer plus de réponses dans les fibres rapides suite aux HIIT qui se situent à 85-90% de la VMA chez le rat et à 90% de l' U_{crit} chez le poisson. Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur ces réponses fibres-dépendantes. L'intensité et/ou la durée des protocoles n'a peut-être pas été assez suffisante pour induire d'importantes adaptations transcriptionnelles et protéiques au niveau des fibres glycolytiques. Toutefois chez le poisson, les réponses dans le muscle blanc peuvent paraître minimales mais avoir un impact non négligeable au niveau de l'organisme compte tenu de la large proportion de muscle blanc. En effet, contrairement à la masse musculaire globale des mammifères constituée d'une part égale en fibres lentes et rapides (Wilson et al., 2012), celle de la truite arc-en-ciel est composée d'environ 96% de muscle blanc (Stickland, 1983). Il est aussi possible que les réponses soient plus précoces dans les fibres oxydatives que dans les fibres glycolytiques. Morash et al. (2014) ont montré que la stimulation de la transcription de l'*Ampk* et de l'activité de la CS par un entraînement de type MICT était plus rapidement mise en place dans le muscle rouge que dans le muscle blanc chez la truite arc-en-ciel.

Par ailleurs, il est envisageable qu'une transition de typologie des fibres rapides vers des fibres lentes ait commencé à s'opérer comme en témoigne certains des résultats chez nos deux modèles. En effet, dans le muscle blanc chez le poisson, les taux de transcrits impliqués dans le métabolisme aérobie tels que *Pgc-1 α* , *Cs*, *Nd1* et *Ldh-b* ont davantage été stimulés par le HIIT que par le MICT. Parallèlement, une stimulation de la biogenèse mitochondriale (activité de la CS augmentée) et une diminution de l'activité de la LDH sous l'influence d'un haut volume de HIIT ont été constatées. He et al. (2013) ont également montré que quatre semaines d'entraînement d'intensité modérée tendent à diminuer l'activité de la LDH dans le muscle blanc de carpe. Chez le rat dans l'EDL, tout comme chez le poisson dans le muscle blanc, la transcription de *Pgc-1 α* est augmentée par le HIIT. Selsby et al. (2012) ont montré qu'une surexpression de PGC-1 α chez la souris induisait un changement de typologie des fibres rapides vers des fibres lentes et améliorait les capacités aérobie dans le soléaire. Enfin, il faut être prudent sur l'interprétation de nos données et le possible changement de typologie dans les fibres rapides. Nos résultats étant seulement basés sur des données obtenues à partir de dosages de transcrits et d'activités enzymatiques ne permettent pas de conclure quant au recrutement des fibres musculaires durant l'entraînement.

Pour conclure sur ces réponses fibres-dépendantes, nous constatons que les entraînements n'ont pas eu les mêmes effets. Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée à partir de tous les ARNm étudiés dans le soléaire et l'EDL chez le modèle murin et conforte ces résultats (Figure 18). Il est intéressant de constater que sur la seule base des ARNm, il est possible de discriminer deux groupes distincts : l'un représentant majoritairement les ARNm du soléaire et l'autre ceux de l'EDL. Ces résultats suggèrent que les réponses transcriptionnelles du soléaire et de l'EDL ne sont pas soumises aux mêmes régulations lors de l'entraînement.

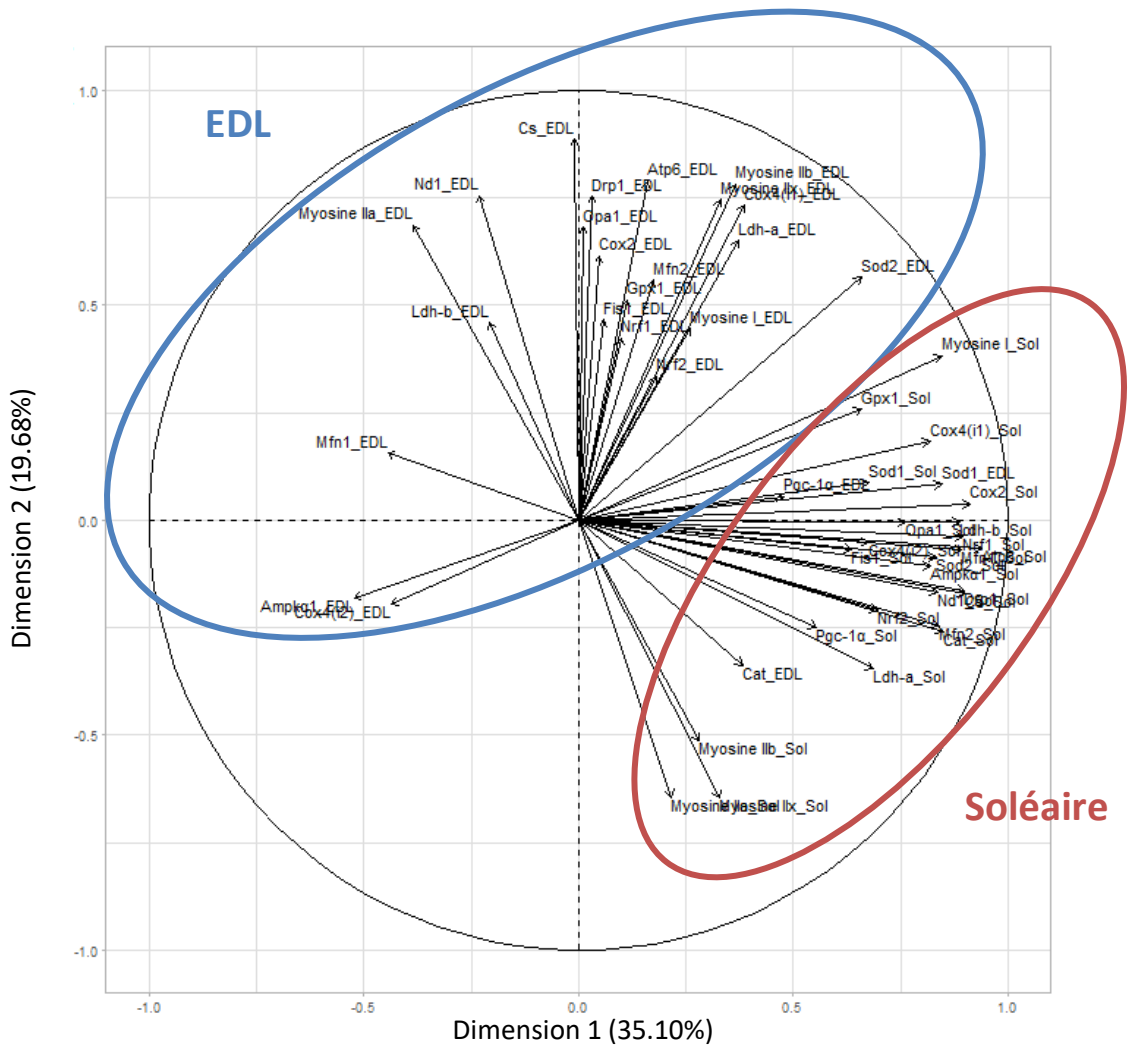


Figure 18. Analyse en composante principale (ACP) représentant les taux d'ARNm étudiés dans le soléaire (en rouge) et dans l'EDL (en bleu) chez le rat.

Nous avons mis en évidence que les réponses transcriptionnelles et protéiques en lien avec la biogenèse mitochondriale et l'état redox sont dépendantes du type d'entraînement mais aussi du type de fibres. En effet, ces réponses ont majoritairement été stimulées dans les fibres oxydatives lors d'un entraînement de type HIIT chez nos deux modèles. Les adaptations musculaires semblent plus rapidement mises en place dans les fibres oxydatives, probablement en raison de la participation plus importante du métabolisme aérobie au cours de ces entraînements. Sous l'effet du HIIT, les fibres glycolytiques tendent à développer un phénotype plus aérobie. L'une des causes possibles serait un changement de typologie de fibres musculaires orienté vers un muscle plus oxydatif. Concernant le changement de typologie, il pourrait être intéressant dans de futures investigations de quantifier les différents types de fibres musculaires.

3.4. PGC-1 α : un élément central

PGC-1 α joue un rôle central dans la régulation de plusieurs voies de signalisation cellulaires et dans la stimulation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique au cours de l'entraînement (Olesen et al., 2010). Dans ce travail, nous observons une variabilité de réponses selon le modèle, le type de fibres et le type d'entraînement.

Le MICT n'a pas induit de variation d'ARNm de *Pgc-1 α* chez nos deux modèles.

Chez le poisson, la participation de PGC-1 α dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale n'est pas toujours évidente. Chez le poisson-zèbre, les taux en ARNm de *Pgc-1 α* ne serait pas associés à la biogenèse mitochondriale (LeMoine et al., 2010). D'autres études ont montré que pendant l'acclimatation au froid l'augmentation des activités enzymatiques et des taux d'ARNm liés au métabolisme mitochondrial s'accompagnaient d'une diminution des taux d'ARNm de *Pgc-1 α* dans le muscle blanc de poisson rouge (Bremer et al., 2012). Dans notre travail chez la truite arc-en-ciel, le HIIT a stimulé plus que le MICT l'ARNm de *Pgc-1 α* dans les deux types de muscles. Cet entraînement a également stimulé d'autres transcrits comme *Ampk α 1* et *Ucp2 α* dans le muscle rouge et *Cs*, *Nd1* et *Ucp2 α* dans le muscle blanc (publication n°2). Ces résultats laissent supposer que le HIIT a activé la cascade de signalisation AMPK–PGC-1 α chez la truite arc-en-ciel. Ainsi, chez le poisson, les réponses de PGC-1 α pourrait différer selon l'espèce et/ou les facteurs exogènes (température, exercice, type d'entraînement).

Chez le rat, le HIIT n'a pas stimulé le contenu en ARNm de *Pgc-1 α* alors qu'il a augmenté ceux des ARNm de *Nrf1* et 2, de la *Cs*, des complexes de la OXPHOS, de la dynamique mitochondriale et des défenses antioxydantes dans le soléaire, tous ces éléments étant reconnus comme pouvant être régulés par PGC-1 α . La notion que PGC-1 α puisse être indispensable à la biogenèse mitochondriale induite par l'entraînement est régulièrement discutée aussi chez le mammifère. En effet, chez des souris *knock-out Pgc-1 α* , il a été montré que la biogenèse mitochondriale induite par l'entraînement était encore possible (Leick et al., 2008). D'autres stimuli existent donc. Il est possible qu'un autre facteur de transcription ait régulé l'ensemble de ces processus, comme par exemple la protéine suppresseur de tumeur p53 (Huertas et al., 2019). Dans l'EDL, seul l'ARNm de *Pgc-1 α* a été stimulé par le HIIT sans autre adaptation transcriptionnelle ni protéique. Il est possible qu'au moins 6

semaines de HIIT soient nécessaires pour stimuler la cascade de réactions impliquant ce cofacteur de transcription dans l'EDL.

La régulation transcriptionnelle du cofacteur de transcription PGC-1 α paraît être dépendante de l'intensité de l'exercice, du modèle animal et du type de fibres. D'autres facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale. Dans le cadre de futures investigations, l'étude de l'expression de PGC-1 α par Western Blot sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée pourrait permettre d'approfondir l'interprétation de ces résultats.

3.5. Chronologie des réponses musculaires

Les voies de signalisation cellulaires qui sous-tendent une biogenèse mitochondriale et la chronologie de ses évènements ne sont pas encore toutes élucidées. Notre travail a apporté quelques éléments de réponses selon le type de fibres musculaires étudié. Chez nos deux modèles, les réponses protéiques mitochondriales et antioxydantes ont été plus rares que les réponses transcriptionnelles supposant donc un délai de mise en place plus long pour les adaptations protéiques.

Nous savons que la majorité des protéines mitochondriales sont traduites à partir du génome nucléaire. Ainsi, plusieurs évènements doivent se dérouler en amont de l'expression protéique d'un gène. Ceux-ci regroupent la transcription génique, la traduction de l'ARNm en protéine, l'importation de la protéine dans la mitochondrie et l'assemblage des complexes enzymatiques multi sous-unités dans la chaîne respiratoire ou dans la matrice mitochondriale. Ces évènements sont suivis par l'activation de kinases sensibles à l'exercice comme l'AMPK, qui phosphorylent à leur tour d'autres protéines telles que PGC-1 α . Ces protéines vont quant à elles se lier aux régions régulatrices de l'ADN afin de modifier les taux de transcription d'autres gènes comme *Nrf1* et *2* par exemple (Hood, 2001). Ces deux facteurs de transcription vont respectivement réguler la transcription de gènes cibles impliqués dans la biogenèse mitochondriale et dans les défenses antioxydantes (Aquilano et al., 2013; Huertas et al., 2019; Popov, 2020). Les mécanismes de régulation qui sous-tendent ces adaptations musculaires peuvent se mettre rapidement en place mais nécessitent une intensité, une durée et une fréquence d'exercice appropriées afin qu'elles soient optimales.

L'exercice physique représente un stimulus aigu qui déclenche, en réponse primaire, une augmentation transitoire de la transcription des gènes cibles (Pilegaard et al., 2000). Chez l'Homme (Perry and Hawley, 2018) comme chez la truite arc-en-ciel (Morash et al., 2014), une succession de sessions d'exercice (comme lors d'un entraînement physique) induit une hausse des taux en ARNm de gènes (*Ampk*, *Ppara* (*peroxisome proliferator-activated receptor- α*)) contribuant aux premières étapes de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique. Ainsi, les effets cumulés d'augmentations transitoires de la transcription sur plusieurs jours voire plusieurs semaines seraient probablement nécessaires pour provoquer des changements durables de l'ARNm et des protéines (Pilegaard et al., 2000).

Le modèle poisson nous a permis d'étudier la mise en place au cours du temps des réponses impliquées dans le métabolisme aérobie et dans l'état redox. Pour cela, une comparaison de ces adaptations sous l'influence de deux durées d'entraînement différentes (10 et 20 jours) a été réalisée dans les deux types de muscles (Figure 19).

Dans le muscle rouge, la transcription des gènes *Cox2* et *Atp synthase 6* codés par l'ADN_{mt} sont stimulés après 10 jours d'entraînement. Par contre, les taux en ARNm de *Pgc-1 α* et de *Ldh-b*, tout comme ceux des enzymes antioxydantes (*Sod1* cytoplasmique et *Sod2* mitochondriale) et de leurs activités (SOD et GPx) ainsi que celle de la LDH sont augmentés après seulement 20 jours d'entraînement. En revanche, même avec une durée d'entraînement augmentée, l'activité de la CS n'est pas modifiée. L'ensemble de ces résultats laisse supposer qu'un entraînement de 20 jours induit une hausse des capacités antioxydantes mais pas du contenu mitochondrial. L'hypothèse serait que des adaptations qualitatives plus que quantitatives aient eu lieu au niveau mitochondrial. La stimulation des défenses antioxydantes (confirmée au niveau transcriptionnel et protéique) serait la réponse à l'augmentation de l'activité métabolique mitochondriale. Cette augmentation s'accompagnerait d'une production d'ERO liée à la fuite d'électrons au niveau de chaîne respiratoire mitochondriale. La stimulation des défenses antioxydantes est en cohérence avec l'absence de stress oxydatif au niveau plasmatique mesuré par les 8-isoprostanes. La théorie de l'hormèse mitochondriale est vérifiée puisque les défenses antioxydantes mis en place sont efficaces pour contrecarrer la production d'ERO induite par les séances d'exercice répétées.

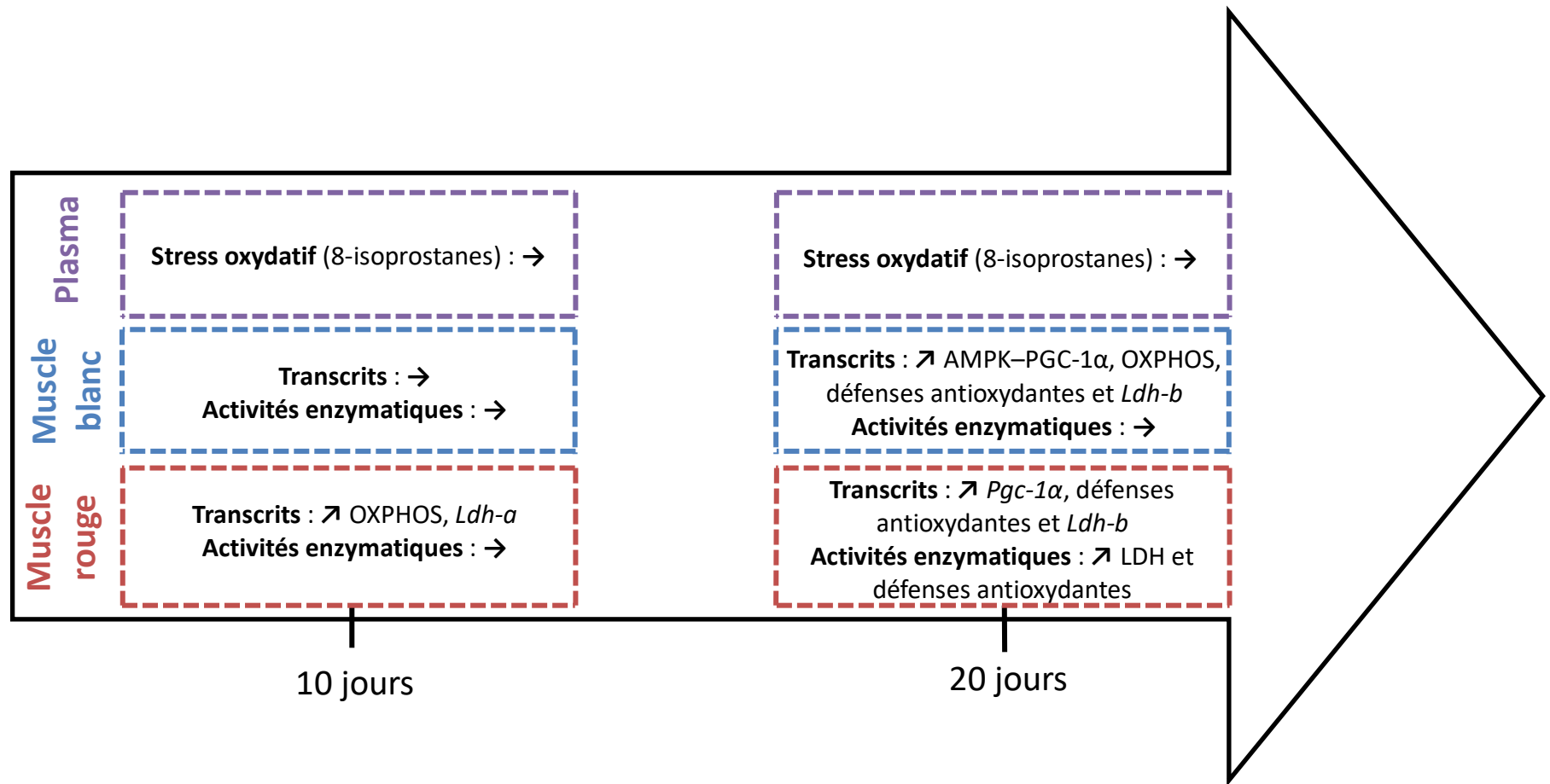


Figure 19. Chronologie de la mise en place des réponses chez la truite-arc-en-ciel.

↗ : stimulation significative ; → : pas d'effet significatif.

Dans le muscle blanc, les taux en ARNm de la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α , de *Cox1*, des défenses antioxydantes (*Sod1* et *2* et *Ucp2 β*) et de la *Ldh-b* témoignent que l'ensemble de ces mécanismes impliqués dans le métabolisme aérobie nécessitent plus de 10 jours d'entraînement pour être activé. Une durée d'entraînement supérieure 20 jours semble être requise pour induire des adaptations protéiques mitochondriales et antioxydantes (pas d'effet significatif sur les activités enzymatiques). Morash et al. (2014) ont étudié la chronologie de mise en place des réponses liées au métabolisme et ont montré que dans le muscle blanc de la truite arc-en-ciel, l'ARNm de *Ppara* était d'autant plus stimulé que la durée d'entraînement était longue.

Dans notre étude, les réponses transcriptionnelles résulteraient probablement des stimuli cumulés induits par les séances d'exercice et représenteraient une modification durable liée à l'entraînement. Tous les éléments discutés ci-dessus confirment qu'une durée plus élevée aurait probablement conduit à des adaptations protéiques mitochondriales et antioxydantes plus nombreuses chez la truite arc-en-ciel ainsi que chez le rat.

Afin d'explorer la cinétique des réponses transcriptionnelles et protéiques impliquées dans la biogenèse et la dynamique mitochondriales, il est prévu au laboratoire de mettre au point prochainement des microbiopsies musculaires chez le poisson. Ces analyses permettront de réaliser des études fonctionnelles longitudinales. En plus d'étudier les réponses transcriptionnelles et protéiques, il s'agira d'explorer la fonction mitochondriale (consommation d'O₂, production d'ERO, production d'ATP) à partir de tissu frais.

3.6. Limites de notre étude

Notre travail de thèse apporte des éléments innovants, pertinents et cohérents en termes de stimulation des réponses transcriptionnelles et protéiques relatives à la biogenèse mitochondriale et à l'état redox au niveau musculaire par l'entraînement. Toutefois, des limites, majoritairement méthodologiques (protocoles, modèles), doivent être évoquées.

L'un des intérêts d'utiliser des modèles animaux est la facilité d'obtenir des populations homogènes et standardisées (mêmes souche, âge, sexe, alimentation). Toutefois, chacun de ces modèles présente ses propres limites. Dans le champ de la physiologie de l'exercice, l'un des principaux inconvénients du mammifère y compris l'Homme est la composition hétérogène de ses muscles squelettiques. Le poisson, possédant des muscles anatomiquement distincts, représente donc une bonne alternative et nous a permis d'étudier plus facilement les réponses spécifiques aux types de fibres.

Une des différences majeures entre nos deux modèles est le métabolisme du poisson directement dépendant de la température environnementale puisque cette espèce est un organisme ectotherme (Boyles et al., 2011). La température ambiante de l'eau doit donc être rigoureusement contrôlée dans nos études expérimentales. Par ailleurs, cette différence ectotherme/endothème peut être un atout méthodologique en physiologie de l'exercice. En effet, au cours de l'exercice physique, la température musculaire augmente chez le mammifère et beaucoup moins chez le poisson. Ainsi, il serait intéressant de dissocier les réponses métaboliques musculaires liées à l'augmentation de température de celles liées à l'exercice proprement dit. Enfin, il est évident que les modèles murins sont plus proches de l'Homme. Le modèle poisson doit donc être envisagé comme une alternative parmi d'autres permettant d'aborder une problématique dans le domaine de la physiologie de l'exercice en offrant la possibilité de modifier de nombreux paramètres d'un point de vue méthodologique (multiplication des protocoles d'entraînement, expérimentations *in vitro*...).

Certaines des limites de notre travail tiennent au choix des paramètres d'exercice utilisés chez les deux espèces. Même si nous avons tenté d'utiliser des protocoles d'entraînement comparables, des différences persistent.

Les durées d'entraînement appliquées à nos modèles sont différentes : 10 ou 20 jours pour le poisson et 6 semaines pour le rat. Ces durées ont été établies sur la base de données répertoriées par la littérature. Chez le rat, des durées d'entraînement de 6 à 8 semaines sont communément utilisées et nécessaires pour observer des adaptations persistantes. Par contre chez le poisson, les effets de l'entraînement pourraient être plus rapides. Des travaux menés au laboratoire ont montré que quelques jours d'entraînement suffisaient pour améliorer sa performance physique (Farhat et al., 2020).

Le modèle poisson offre des atouts méthodologiques que le rat ne possède pas comme la simplicité de mise en œuvre des protocoles d'entraînement et la possibilité d'avoir des effectifs d'individus relativement importants pour une même étude expérimentale. Ainsi, dans ce travail de thèse, six combinaisons de paramètres d'exercice ont été étudiées chez le poisson. En revanche, seuls les effets de deux protocoles d'entraînement (MICT et HIIT) ont été explorés chez le rat. Il est important de noter que le volume d'entraînement du MICT était deux fois plus important que celui du HIIT chez ce modèle. Ainsi, nous ne pouvons pas certifier que les effets observés sont uniquement dus à l'intensité de l'exercice. Dans de futures études, il serait intéressant de comparer deux entraînements d'un même volume mais d'une intensité différente afin de discriminer ces deux paramètres.

Un autre point limite est l'évaluation indirecte de la $\dot{V}O_2\text{max}$ par la VMA chez le rat et par U_{crit} chez le poisson, ce qui a pu représenter un biais dans l'estimation de l'intensité de l'exercice. En effet, cette performance est plus fréquemment estimée par une mesure directe de $\dot{V}O_2\text{max}$ dans la littérature (Poole et al., 2020). De ce fait, il est possible que l'intensité appliquée dans notre protocole de HIIT ait été sous-estimée et donc insuffisante pour initier le recrutement des fibres glycolytiques chez nos deux modèles. De plus, la motivation de l'animal fait partie intégrante de la bonne réalisation du test d'effort. Ce facteur est relativement complexe à maîtriser, surtout chez des modèles animaux.

Le délai du prélèvement tissulaire après la dernière séance d'exercice suscite de réelles interrogations et diverge selon les études. Au cours des révisions des articles 1 et 2 concernant les effets de l'entraînement chez le poisson, les reviewers ont été surpris par le délai de 65 heures qu'ils considéraient comme long. Notre objectif était d'évaluer des modifications liées à l'entraînement dont on sait qu'elles peuvent durer plusieurs semaines. Il est cependant probable que ce temps de récupération relativement élevé soit une source de pertes d'informations de certaines régulations précoces des ARNm par exemple. Ce délai a été justifié par plusieurs études dont une qui a démontré que chez plusieurs espèces de mammifères l'effet d'un exercice aigu sur l'activité de la CS persistait jusqu'à 24 heures et qu'elle ne retrouvait une valeur basale qu'à partir de 72 heures de repos (Leek et al., 2001). Chez l'Homme, un délai de 48 à 72 heures a aussi été appliqué dans une étude récente portant sur l'expression des gènes dans le muscle squelettique après entraînement (Miyamoto-Mikami et al., 2018).

Une autre limite de notre étude repose sur le peu de protéines ciblées par rapport aux transcrits. Il est intéressant d'observer qu'après un temps de repos relativement important mais nécessaire pour atténuer les effets de l'exercice aigu, les transcrits n'ont pas atteint leur valeur basale. Même si la stimulation des ARNm a été décrite comme transitoire et moins persistante que les adaptations protéiques induisant une biogenèse mitochondriale, cette dernière pourrait résulter des augmentations transitoires cumulées après les sessions d'exercice des ARNm codant pour des protéines mitochondriales (Perry and Hawley, 2018). Ici, quel que soit le modèle utilisé, la majorité d'entre eux a maintenu un taux significativement plus élevé sous l'influence de l'entraînement et en particulier celui du HIIT. Ce phénomène s'observe principalement dans les fibres oxydatives. Ces dosages reflètent donc véritablement les effets chroniques de l'exercice. D'un point de vue fonctionnel, il aurait été pertinent d'étudier davantage de protéines comme les expressions de l'AMPK et de PGC-1 α par Western Blot, l'activité de l'AMPK ou encore des complexes de la OXPHOS par exemple.

Dans notre travail, la mesure de l'activité de la CS, enzyme en lien étroit avec le contenu mitochondrial, a permis d'estimer la biogenèse mitochondriale. Cette approche est largement utilisée en physiologie de l'exercice physique en raison de la corrélation entre le contenu mitochondrial et l'entraînement physique. Aucune augmentation de l'activité de la CS n'a été constatée dans les fibres oxydatives ni chez la truite arc-en-ciel ni chez le rat. Elle a par contre été activée dans le muscle blanc sous l'influence d'un haut volume de HIIT. Toutefois, la transcription de la Cs a été augmentée sous l'effet du HIIT dans les fibres oxydatives chez les deux modèles signifiant donc que le processus de biogenèse mitochondriale est en cours d'activation. D'autres méthodes, comme l'analyse fonctionnelle des mitochondries sur fibres ou mitochondries isolées ou le dosage des cardiolipines, permettraient de quantifier la biogenèse mitochondriale. Les cardiolipines représentent 20% des lipides de la membrane interne mitochondriale et sont ubiquitaires aux poissons et aux mammifères. Ces lipides sont aussi connus pour être de puissants marqueurs de la biogenèse mitochondriale, au même titre que la CS (Larsen et al., 2012).



Conclusion générale et perspectives

Dans la littérature, peu d'études ont comparé à la fois les effets du MICT et HIIT sur les réponses liées à la biogenèse mitochondriale et aux défenses antioxydantes dans deux types de muscles de typologie différente. Ce travail mené sur deux modèles animaux s'inscrit dans une démarche pour la prévention des maladies métaboliques. Actuellement, l'absence de consensus d'entraînement complique sa prescription afin de prévenir les facteurs de risque ou limiter le développement de ces maladies. Un entraînement non chronophage de type HIIT est apparu comme plus bénéfique que le MICT en termes de stimulation des capacités aérobies et antioxydantes dans le muscle squelettique chez nos modèles poisson et murin. L'entraînement physique, et notamment le HIIT, s'est avéré être un bon stimulus pour activer la cascade de réactions qui serait médiée par PGC-1 α ou par un autre facteur de transcription et a conduit à un nouvel état d'équilibre de la production des ARNm dans le muscle squelettique. Les réponses spécifiques à chaque type de fibres se sont révélées être globalement similaires chez nos deux modèles avec une prédominance des réponses dans les fibres oxydatives. De plus, les fibres glycolytiques tendraient à développer un métabolisme aérobie sous l'influence du HIIT.

Les nombreux points communs mis en évidence entre le poisson et le rat permettent de valider la pertinence de l'utilisation du modèle truite arc-en-ciel pour l'exploration des effets de l'entraînement physique sur la voie de signalisation aérobie AMPK-PGC-1 α et l'état redox au niveau du muscle squelettique.

Si notre étude chez le poisson a été effectuée dans une perspective de santé humaine, elle peut aussi intéresser le domaine de l'aquaculture pour l'amélioration de la santé du poisson. Nos projets de mise au point de microbiopsies chez le poisson ont pour objectif de mieux connaître la mise en place des réponses au cours du temps dans une perspective d'application future chez l'Homme. Cela dans l'objectif d'optimiser les programmes d'entraînement afin de déterminer la combinaison de paramètres d'exercice la plus pertinente pour la santé.

Dans les prochains mois, un projet du laboratoire consistera à étudier les effets du HIIT chez un modèle murin atteint de syndrome métabolique. Les réponses induites par l'entraînement mises en évidence durant cette thèse pourraient protéger des désordres métaboliques et de l'obésité. Dans ce contexte de prévention, il serait intéressant de

poursuivre notre approche intégrée afin de mettre en lien les connaissances au niveau musculaire avec celles de l'organisme entier.

Enfin, l'utilisation de cultures cellulaires pourrait être pertinente afin d'étudier l'impact de molécules mimétiques de l'exercice physique sur cette voie AMPK-PGC-1 α . La découverte d'acteurs potentiels de cette voie fait partie aujourd'hui des enjeux de la recherche en physiologie de l'exercice dans une perspective santé (Dial et al., 2018).



Références

- A**lami Durante, H., and Rescan, P.-Y. (2003). Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez les poissons. *Productions Animales* 2 16, 145-155.
- Amoretti, R., Bigard, X., Monod, H., Rivière, D., Rochcongar, P., and Rodineau, J. (2020). *Médecine du sport: Pour le Praticien* (Elsevier Health Sciences).
- Aoi, W. (2017). Characteristics of Skeletal Muscle as a Secretory Organ. In *The Plasticity of Skeletal Muscle: From Molecular Mechanism to Clinical Applications*, K. Sakuma, ed. (Singapore: Springer), pp. 195–210.
- Aon, M.A., Cortassa, S., and O'Rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 865–877.
- Aquatias, S., Duche, P., Rivière, D., Bilard, J., Callede, J.-P., Casillas, J.-M., Choquet, M., Cohen-Salmon, C., Courteix, D., Duclos, M., et al. (2008). *Activité physique. Contextes et effets sur la santé. Expertise collective* (Paris: Inserm).
- Aquilano, K., Baldelli, S., Pagliei, B., Cannata, S.M., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2013). p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 386–399.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R., et al. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435–439.
- Attardi, G. (1985). Animal Mitochondrial DNA: An Extreme Example of Genetic Economy. In *International Review of Cytology*, G.H. Bourne, J.F. Danielli, and K.W. Jeon, eds. (Academic Press), pp. 93–145.
- Audiffren, M., André, N., and Albinet, C. (2011). Effets positifs de l'exercice physique chronique sur les fonctions cognitives des seniors : bilan et perspectives. *Revue de neuropsychologie* Volume 3, 207–225.
- B**acon, A.P., Carter, R.E., Ogle, E.A., and Joyner, M.J. (2013). VO₂max Trainability and High Intensity Interval Training in Humans: A Meta-Analysis. *PLOS ONE* 8, e73182.
- Bedford, T.G., Tipton, C.M., Wilson, N.C., Oppliger, R.A., and Gisolfi, C.V. (1979). Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *Journal of Applied Physiology*.
- Bennett, J.E., Stevens, G.A., Mathers, C.D., Bonita, R., Rehm, J., Kruk, M.E., Riley, L.M., Dain, K., Kengne, A.P., Chalkidou, K., et al. (2018). NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. *The Lancet* 392, 1072–1088.

- Bertucci, J.I., Blanco, A.M., and Unniappan, S. (2019). Nesfatin-1 regulates glucoregulatory genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 235, 121–130.
- Bexfield, N.A., Parcell, A.C., Nelson, W.B., Foote, K.M., and Mack, G.W. (2009). Adaptations to high-intensity intermittent exercise in rodents. *Journal of Applied Physiology* 107, 749–754.
- Bigard, A.-X. (2004). Réponses du muscle à l'exercice et récupération. *Science & Sports* 19, 246–263.
- Billat, V. (2017). *Physiologie et méthodologie de l'entraînement* (De Boeck Supérieur).
- Billat, V., Berthoin, S., Blondel, N., and Gerbeaux, M. (2001). La vitesse à VO₂ max, signification et applications en course à pied. *Staps no 54*, 45–61.
- Birceanu, O., Sorensen, L.A., Henry, M., McClelland, G.B., Wang, Y.S., and Wilkie, M.P. (2014). The effects of the lampricide 3-trifluoromethyl-4-nitrophenol (TFM) on fuel stores and ion balance in a non-target fish, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 160, 30–41.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S., and G. Willmore, W. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish and Fisheries*.
- Bishop, D.J., Bartlett, J., Fyfe, J., and Lee, M. (2019a). Methodological Considerations for Concurrent Training. In *Concurrent Aerobic and Strength Training: Scientific Basics and Practical Applications*, M. Schumann, and B.R. Rønnestad, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 183–196.
- Bishop, D.J., Botella, J., and Granata, C. (2019b). CrossTalk opposing view: Exercise training volume is more important than training intensity to promote increases in mitochondrial content. *J. Physiol. (Lond.)* 597, 4115–4118.
- Black, E.C., Connor, A.R., Lam, K.-C., and Chiu, W.-G. (1962). Changes in Glycogen, Pyruvate and Lactate in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) During and Following Muscular Activity. *Journal of the Fisheries Board of Canada*.
- Bo, H., Jiang, N., Ma, G., Qu, J., Zhang, G., Cao, D., Wen, L., Liu, S., Ji, L.L., and Zhang, Y. (2008). Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: Role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radical Biology and Medicine* 44, 1373–1381.
- Boncompagni, S., Pozzer, D., Viscomi, C., Ferreiro, A., and Zito, E. (2020). Physical and Functional Cross Talk Between Endo-Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria in Skeletal Muscle. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Bonnet, M., Louveau, I., Cassar-Malek, I., Lefaucheur, L., and Rescan, P.-Y. (2015). Comprendre le développement des muscles et des tissus adipeux : un préalable pour

maîtriser les qualités des carcasses et des produits des animaux d'élevage. *INRA Productions Animales* 28, 137–150.

Boushel, R., Lundby, C., Qvortrup, K., and Sahlin, K. (2014). Mitochondrial Plasticity with Exercise Training and Extreme Environments. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 42, 169–174.

Bouزيد, M.A., Filaire, E., McCall, A., and Fabre, C. (2015). Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports Med* 45, 1245–1261.

Boyles, J.G., Seebacher, F., Smit, B., and McKechnie, A.E. (2011). Adaptive Thermoregulation in Endotherms May Alter Responses to Climate Change. *Integrative and Comparative Biology* 51, 676–690.

Brand, M.D., and Esteves, T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism* 2, 85–93.

Bremer, K., Monk, C.T., Gurd, B.J., and Moyes, C.D. (2012). Transcriptional regulation of temperature-induced remodeling of muscle bioenergetics in goldfish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303, 150–158.

Brett, J.R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 21, 1183–1226.

Brown, M.B., Neves, E., Long, G., Graber, J., Gladish, B., Wiseman, A., Owens, M., Fisher, A.J., Presson, R.G., Petrache, I., et al. (2016). High-intensity interval training, but not continuous training, reverses right ventricular hypertrophy and dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 312, 197–210.

Bury, T. (2012). Bases énergétiques de l'activité physique Communication présentée au colloque annuel de la Société Royale des Sciences de Liège le 30 novembre 2012. *Bull. Soc. Roy. Sc. de Liège*.

Cantó, C., and Auwerx, J. (2012). Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD+? *Pharmacol Rev* 64, 166–187.

Carminatti, L.J., Possamai, C.A.P., de Moraes, M., da Silva, J.F., de Lucas, R.D., Dittrich, N., and Guglielmo, L.G.A. (2013). Intermittent versus Continuous Incremental Field Tests: Are Maximal Variables Interchangeable? *J Sports Sci Med* 12, 165–170.

Caspersen, C.J., Powell, K.E., and Christenson, G.M. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100, 126–131.

Castro, V., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Kristensen, T., Jørgensen, S.M., Helgerud, J., Claireaux, G., Farrell, A.P., Krasnov, A., and Takle, H. (2011). Aerobic training stimulates growth and promotes disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 160, 278–290.

Chan, D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 79–99.

Chang, C.-H., Zhou, X.-W., Wang, Y.-C., and Lee, T.-H. (2020). Differential effects of hypothermal stress on lactate metabolism in fresh water- and seawater-acclimated milkfish, *Chanos chanos*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 248, 110744.

Constans, A., Pin-Barre, C., Molinari, F., Temprado, J.-J., Briocche, T., Pellegrino, C., and Laurin, J. (2021). High-intensity interval training is superior to moderate intensity training on aerobic capacity in rats: Impact on hippocampal plasticity markers. *Behavioural Brain Research* 398, 112977.

Coulibaly, I., Gahr, S.A., Palti, Y., Yao, J., and Rexroad, C.E. (2006). Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 7, 203.

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

Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K., and Grinton, S. (1993). High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 25, 1135–1140.

Daussin, F.N., Rasseneur, L., Bouitbir, J., Charles, A.-L., Dufour, S.P., Geny, B., Burelle, Y., and Richard, R. (2012). Different timing of changes in mitochondrial functions following endurance training. *Med Sci Sports Exerc* 44, 217–224.

Daya, A., Donaka, R., and Karasik, D. (2020). Zebrafish models of sarcopenia. *Disease Models & Mechanisms* 13.

Dial, A.G., Ng, S.Y., Manta, A., and Ljubicic, V. (2018). The Role of AMPK in Neuromuscular Biology and Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29, 300–312.

Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., and Lithgow, T. (2006). Evolution of the Molecular Machines for Protein Import into Mitochondria. *Science* 313, 314–318.

Drake, J.C., Wilson, R.J., and Yan, Z. (2016). Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *The FASEB Journal* 30, 13–22.

Dudley, G.A., Abraham, W.M., and Terjung, R.L. (1982). Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*.

Dupas, J., Feray, A., Guernec, A., Pengam, M., Inizan, M., Guerrero, F., Mansourati, J., and Goanvec, C. (2018). Effect of personalized moderate exercise training on Wistar rats fed with a fructose enriched water. *Nutr Metab (Lond)* 15, 69.

Egan, B., and Zierath, J.R. (2013). Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metabolism* 17, 162–184.

Ekker, M., and Akimenko, M.A. (1991). Le poisson zèbre (*Danio rerio*), un modèle en biologie du développement. *Med. Sci.* 7, 553-560.

Eng, C.M., Smallwood, L.H., Rainiero, M.P., Lahey, M., Ward, S.R., and Lieber, R.L. (2008). Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *Journal of Experimental Biology* 211, 2336–2345.

Falkmer, S. (1961). Experimental diabetes research in fish. *European Journal of Endocrinology* 37, 7–122.

Farhana, A., and Lappin, S.L. (2020). Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing).

Farhat, F., Simon, B., Amérand, A., Devaux, J., Belhomme, M., Calves, P., and Moisan, C. (2020). Exercise training changes mitochondrial function and its vulnerability to reactive oxygen species exposure differently in male and female silver European eels. *Environ Biol Fish* 103, 363–375.

Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L., and Viollet, B. (2006). Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK - Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques. *Med. Sci. (Paris)* 22, 381–388.

Francois, M.E., and Little, J.P. (2015). Effectiveness and Safety of High-Intensity Interval Training in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Spectrum* 28, 39–44.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité Chimique* 91–96.

Gautier, J.-F., and Mauvais-Jarvis, F. (2008). Activité physique et insulinosensibilité. *Diabetes & Metabolism* 27, 255.

Ghiarone, T., Andrade-Souza, V.A., Learsy, S.K., Tomazini, F., Ataide-Silva, T., Sansonio, A., Fernandes, M.P., Saraiva, K.L., Figueiredo, R.C.B.Q., Tourneur, Y., et al. (2019). Twice-a-day training improves mitochondrial efficiency, but not mitochondrial biogenesis, compared with once-daily training. *Journal of Applied Physiology* 127, 713–725.

Gibala, M.J., Little, J.P., MacDonald, M.J., and Hawley, J.A. (2012). Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *The Journal of Physiology* 590, 1077–1084.

Godin, R., Ascah, A., and Daussin, F.N. (2010). Intensity-dependent activation of intracellular signalling pathways in skeletal muscle: role of fibre type recruitment during exercise. *The Journal of Physiology* 588, 4073–4074.

Goldman, S.J., Taylor, R., Zhang, Y., and Jin, S. (2010). Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion* 10, 309–315.

Gomes, E.C., Silva, A.N., and de Oliveira, M.R. (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 756132.

Gomez-Huelgas, R., Jansen-Chaparro, S., Baca-Osorio, A.J., Mancera-Romero, J., Tinahones, F.J., and Bernal-López, M.R. (2015). Effects of a long-term lifestyle intervention program with Mediterranean diet and exercise for the management of patients with metabolic syndrome in a primary care setting. *European Journal of Internal Medicine* 26, 317–323.

Granata, C., Jamnick, N.A., and Bishop, D.J. (2018a). Principles of Exercise Prescription, and How They Influence Exercise-Induced Changes of Transcription Factors and Other Regulators of Mitochondrial Biogenesis. *Sports Med* 48, 1541–1559.

Granata, C., Jamnick, N.A., and Bishop, D.J. (2018b). Training-Induced Changes in Mitochondrial Content and Respiratory Function in Human Skeletal Muscle. *Sports Med* 48, 1809–1828.

Gureev, A.P., Shaforostova, E.A., and Popov, V.N. (2019). Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways. *Frontiers in Genetics* 10.

Hackney, A.C. (2019). Molecular and Physiological Adaptations to Endurance Training. In *Concurrent Aerobic and Strength Training: Scientific Basics and Practical Applications*, M. Schumann, and B.R. Rønnestad, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 19–34.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., and Chapelle, J.P. (2007). Oxidative stress. *Rev Med Liege* 62, 628–638.

Harel, I., and Brunet, A. (2015). The African Turquoise Killifish: A Model for Exploring Vertebrate Aging and Diseases in the Fast Lane. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 80, 275–279.

Hawley, J.A., Hargreaves, M., Joyner, M.J., and Zierath, J.R. (2014). Integrative Biology of Exercise. *Cell* 159, 738–749.

He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C.-C., Yang, W., and Zuo, L. (2016). Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. *Front. Physiol.* 7.

He, W., Xia, W., Cao, Z.-D., and Fu, S.-J. (2013). The effect of prolonged exercise training on swimming performance and the underlying biochemical mechanisms in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166, 308–315.

Herodek, K., Simonović, C., Pavlović, V., and Stanković, R. (2014). High intensity interval training. *Activities in Physical Education and Sport* 4, 205–207.

Hill, A.V., and Lupton, H. (1923). Muscular Exercise, Lactic Acid, and the Supply and Utilization of Oxygen. *QJM* 16, 135–171.

Holloszy, J.O. (1967). Biochemical adaptations in muscle effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242, 2278–2282.

Hong, A.R., and Kim, S.W. (2018). Effects of Resistance Exercise on Bone Health. *Endocrinol Metab (Seoul)* 33, 435–444.

Hood, D.A. (2001). Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 90, 1137–1157.

Huertas, J.R., Casuso, R.A., Agustín, P.H., and Cogliati, S. (2019). Stay Fit, Stay Young: Mitochondria in Movement: The Role of Exercise in the New Mitochondrial Paradigm (Hindawi).

Hug, F. (2018). Le mouvement humain - De l'unité motrice à la force musculaire. *Med Sci (Paris)* 34, 6–8.

Hvas, M., and Oppedal, F. (2017). Sustained swimming capacity of Atlantic salmon. *Aquaculture Environment Interactions* 9, 361–369.

Hyatt, H.W., Smuder, A.J., Sollanek, K.J., Morton, A.B., Roberts, M.D., and Kavazis, A.N. (2016). Comparative changes in antioxidant enzymes and oxidative stress in cardiac, fast twitch and slow twitch skeletal muscles following endurance exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 8, 160–168.

INSERM (2019). *Activité physique: prévention et traitement des maladies chroniques*.

Ishihara, N., Eura, Y., and Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of Cell Science* 117, 6535–6546.

Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *PNAS* 104, 12017–12022.

Jang, J.H., Lee, H.M., Kim, H., and Cho, J.H. (2020). Molecular cloning and functional analysis of deubiquitinase CYLD in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology* 101, 135–142.

Johnston, I.A. (2001). *Fish Physiology: Muscle Development and Growth* (Gulf Professional Publishing).

Johnston, I.A. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 209, 2249–2264.

Jones, D.R. (1982). Anaerobic exercise in teleost fish. *Canadian Journal of Zoology*.

Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 47, 69–84.

Joseph, A.-M., Adhihetty, P.J., and Leeuwenburgh, C. (2016). Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 594, 5105–5123.

Kawahara, G., Karpf, J.A., Myers, J.A., Alexander, M.S., Guyon, J.R., and Kunkel, L.M. (2011). Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *PNAS* 108, 5331–5336.

Khalafi, M., Mohebbi, H., Symonds, M.E., Karimi, P., Akbari, A., Tabari, E., Faridnia, M., and Moghaddami, K. (2020). The Impact of Moderate-Intensity Continuous or High-Intensity Interval Training on Adipogenesis and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Obese Male Rats. *Nutrients* 12, 925.

Kieffer, J.D. (2010). Perspective--Exercise in fish: 50+years and going strong. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 156, 163–168.

Kim, S.-H., Choi, C.-Y., Hwang, J.-Y., Kim, Y.-Y., Park, C., Oh, B.-S., Kimm, K.-C., Gahr, S.A., and Sohn, Y.-C. (2004). Uncoupling Protein 3 in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* Sequence, Splicing Variants, and Association with the Avalll SINE element. *Journal of Aquaculture* 17, 1–7.

Kristensen, D.E., Albers, P.H., Prats, C., Baba, O., Birk, J.B., and Wojtaszewski, J.F.P. (2015). Human muscle fibre type-specific regulation of AMPK and downstream targets by exercise. *The Journal of Physiology* 593, 2053–2069.

Kuksal, N., Chalker, J., and Mailloux, R.J. (2017). Progress in understanding the molecular oxygen paradox – function of mitochondrial reactive oxygen species in cell signaling. *Biological Chemistry* 398, 1209–1227.

Laplaud, D. (2001). Endurance aérobie : état de l'art et contribution à sa détermination indirecte. Thèse. Poitiers.

Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F., et al. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of Physiology* 590, 3349–3360.

Lee, H., and Song, W. (2018). Exercise and Mitochondrial Remodeling in Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *J Obes Metab Syndr* 27, 150–157.

Leek, B.T., Mudaliar, S.R.D., Henry, R., Mathieu-Costello, O., and Richardson, R.S. (2001). Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280, 441–447.

Leick, L., Wojtaszewski, J.F.P., Johansen, S.T., Kiilerich, K., Comes, G., Hellsten, Y., Hidalgo, J., and Pilegaard, H. (2008). PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* *294*, 463–474.

LeMoine, C.M.R., Craig, P.M., Dhekney, K., Kim, J.J., and McClelland, G.B. (2010). Temporal and spatial patterns of gene expression in skeletal muscles in response to swim training in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* *180*, 151–160.

Li, S., Pozhitkov, A., Ryan, R.A., Manning, C.S., Brown-Peterson, N., and Brouwer, M. (2010). Constructing a fish metabolic network model. *Genome Biology* *11*, 115.

Listrat, A., Le Bret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., and Bugeon, J. (2015). Comment la structure et la composition du muscle déterminent la qualité des viandes ou chairs ? *INRAE Productions Animales* *28*, 125–136.

Machado, M.V., Vieira, A.B., Conceição, F.G. da, Nascimento, A.R., Nóbrega, A.C.L. da, and Tibirica, E. (2017). Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. *Experimental Physiology* *102*, 1716–1728.

MacInnis, M.J., and Gibala, M.J. (2017). Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *The Journal of Physiology* *595*, 2915–2930.

MacInnis, M.J., Zacharewicz, E., Martin, B.J., Haikalis, M.E., Skelly, L.E., Tarnopolsky, M.A., Murphy, R.M., and Gibala, M.J. (2017). Superior mitochondrial adaptations in human skeletal muscle after interval compared to continuous single-leg cycling matched for total work. *The Journal of Physiology* *595*, 2955–2968.

MacInnis, M.J., Skelly, L.E., and Gibala, M.J. (2019). CrossTalk proposal: Exercise training intensity is more important than volume to promote increases in human skeletal muscle mitochondrial content. *The Journal of Physiology* *597*, 4111–4113.

MacKenzie, J.A., and Payne, R.M. (2007). Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1772*, 509–523.

Maetzke, A., and Knak Jensen, S.J. (2006). Reaction paths for production of singlet oxygen from hydrogen peroxide and hypochlorite. *Chemical Physics Letters* *425*, 40–43.

Magnoni, L.J., Palstra, A.P., and Planas, J.V. (2014). Fueling the engine: induction of AMP-activated protein kinase in trout skeletal muscle by swimming. *Journal of Experimental Biology* *217*, 1649–1652.

Maire, P. (2015). Diversité des fibres musculaires squelettiques, rôle des homéoprotéines Six. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* *199*, 21–31.

- Mannella, C.A., Lederer, W.J., and Jafri, M.S. (2013). The connection between inner membrane topology and mitochondrial function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *62*, 51–57.
- Martin, C.I., and Johnston, I.A. (2005). The role of myostatin and the calcineurin-signalling pathway in regulating muscle mass in response to exercise training in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Journal of Experimental Biology* *208*, 2083–2090.
- Martin-Krumm, C. (2016). *Les diplômes des activités physiques et sportives: anatomie, physiologie, neuroscience du sport et entraînement* (Paris: Dunod).
- McClelland, G.B. (2012). Muscle remodeling and the exercise physiology of fish. *Exerc Sport Sci Rev* *40*, 165–173.
- McCracken, E., Monaghan, M., and Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology* *36*, 14–20.
- Medeiros, D.M. (2008). Assessing mitochondria biogenesis. *Methods* *46*, 288–294.
- Meeker, N.D., and Trede, N.S. (2008). Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev. Comp. Immunol.* *32*, 745–757.
- Merry, T.L., and Ristow, M. (2016). Mitohormesis in exercise training. *Free Radical Biology and Medicine* *98*, 123–130.
- Millet, G. (2006). *L'endurance* (Revue EPS).
- Miyamoto-Mikami, E., Tsuji, K., Horii, N., Hasegawa, N., Fujie, S., Homma, T., Uchida, M., Hamaoka, T., Kanehisa, H., Tabata, I., et al. (2018). Gene expression profile of muscle adaptation to high-intensity intermittent exercise training in young men. *Scientific Reports* *8*, 16811.
- Moening, D., Scheidt, A., Shepardson, L., and Davies, G.J. (1993). Biomechanical Comparison of Water Running and Treadmill Running. *Isokinetics and Exercise Science* *3*, 207–215.
- Montuschi, P., Barnes, P.J., and Roberts, L.J. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal* *18*, 1791–1800.
- Morash, A.J., Vanderveken, M., and McClelland, G.B. (2014). Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. *Front Physiol* *5*, 452.
- Moss, R.L., and Solaro, R.J. (2019). The enduring relationship between myosin enzymatic activity and the speed of muscle contraction. *J Gen Physiol* *151*, 623–627.
- N**ederveen, J.P., Ibrahim, G., Fortino, S.A., Snijders, T., Kumbhare, D., and Parise, G. (2020). Variability in skeletal muscle fibre characteristics during repeated muscle biopsy sampling in human vastus lateralis. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*.
- Neufer, P.D., Bamman, M.M., Muoio, D.M., Bouchard, C., Cooper, D.M., Goodpaster, B.H., Booth, F.W., Kohrt, W.M., Gerszten, R.E., Mattson, M.P., et al. (2015). Understanding the

cellular and molecular mechanisms of physical activity-induced health benefits. *Cell Metabolism* 22, 4–11.

O'Brien, K.M., and Mueller, I.A. (2010). The Unique Mitochondrial Form and Function of Antarctic Channichthyid Icefishes. *Integr Comp Biol* 50, 993–1008.

Olesen, J., Kiilerich, K., and Pilegaard, H. (2010). PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 153–162.

OMS (2010). *Recommandations mondiales sur l'activité physique pour la santé* (Genève: OMS).

Otto, D.M.E., and Moon, T.W. (1996). Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. *Fish Physiol Biochem* 15, 349–358.

Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem.* 1, 188–211.

Papa, S., Martino, P.L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmio, D., Signorile, A., and Petruzzella, V. (2012). The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. In *Advances in Mitochondrial Medicine*, R. Scatena, P. Bottoni, and B. Giardina, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 3–37.

Pedersen, B.K. (2011). Muscles and their myokines. *Journal of Experimental Biology* 214, 337–346.

Perry, C.G.R., and Hawley, J.A. (2018). Molecular Basis of Exercise-Induced Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis: Historical Advances, Current Knowledge, and Future Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a029686.

Perry, C.G.R., Lally, J., Holloway, G.P., Heigenhauser, G.J.F., Bonen, A., and Spriet, L.L. (2010). Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 588, 4795–4810.

Pette, D. (1980). *Plasticity of Muscle* (Berlin ; New York: De Gruyter).

Picard, B., Jurie, C., Cassar Malek, I., Hocquette, J.-F., Lefaucheur, L., Berri, C., Alami Durante, H., and Rescan, P.-Y. (2003). Typologie et ontogénèse des fibres musculaires chez différentes espèces d'intérêt agronomique. *Productions Animales* 2 16, 117-123.

Pilegaard, H., Ordway, G.A., Saltin, B., and Neufer, P.D. (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 279, 806–814.

Pion, C.H., Barbat-Artigas, S., St-Jean-Pelletier, F., Chevalier, S., Gaudreau, P., Gouspillou, G., Morais, J.A., Bélanger, M., and Aubertin-Leheudre, M. (2017). Muscle strength and force

development in high- and low-functioning elderly men: Influence of muscular and neural factors. *Experimental Gerontology* 96, 19–28.

Pisoschi, A.M., and Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97, 55–74.

Planas, J.V., Martín-Pérez, M., Magnoni, L.J., Blasco, J., Ibarz, A., Fernandez-Borras, J., and Palstra, A.P. (2013). Transcriptomic and Proteomic Response of Skeletal Muscle to Swimming-Induced Exercise in Fish. In *Swimming Physiology of Fish: Towards Using Exercise to Farm a Fit Fish in Sustainable Aquaculture*, A.P. Palstra, and J.V. Planas, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 237–256.

Poole, D.C., Copp, S.W., Colburn, T.D., Craig, J.C., Allen, D.L., Sturek, M., O’Leary, D.S., Zucker, I.H., and Musch, T.I. (2020). Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 318, 1100–1138.

Poortmans, J., and Boisseau, N. (2017). *Biochimie des activités physiques et sportives* (De Boeck Supérieur).

Popov, L.-D. (2020). Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24, 4892–4899.

Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews* 88, 1243–1276.

Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., and Dudley, G. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.

Prasun, P. (2020). Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866, 165838.

Pryor, W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 657–667.

Qaisar, R., Bhaskaran, S., and Van Remmen, H. (2016). Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine* 98, 56–67.

Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H., and Atalay, M. (2012). Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 1208–1246.

Rasouri, S., Lagouge, M., and Auwerx, J. (2007). SIRT1/PGC-1 - Un axe neuroprotecteur ? *Med Sci (Paris)* 23, 840–844.

Reischl, E., Dafre, A.L., Franco, J.L., and Wilhelm Filho, D. (2007). Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 22–53.

Reiss, D., Prévost, P., and Cazorla, G. (2013). *La bible de la préparation physique - Le guide scientifique et pratique pour tous* (Paris: AMPHORA).

Sahlin, K. (1986). Metabolic changes limiting muscle performance. *Biochemistry of Exercise* 6, 323–343.

Sale, D.G. (1987). Influence of Exercise and Training on Motor Unit Activation. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 15, 95–152.

Sasaki, K., and Neptune, R.R. (2006). Differences in muscle function during walking and running at the same speed. *Journal of Biomechanics* 39, 2005–2013.

Sauvanet, C., Arnauné-Pelloquin, L., David, C., Belenguer, P., and Rojo, M. (2010). Dynamique et morphologie mitochondriales - Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle. *Med Sci (Paris)* 26, 823–829.

Schiaffino, S. (2018). Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *The FEBS Journal* 285, 3688–3694.

Selsby, J.T., Morine, K.J., Pendrak, K., Barton, E.R., and Sweeney, H.L. (2012). Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 α involves a fast to slow fiber type shift in the mdx mouse. *PLOS ONE* 7, e30063.

Shiraev, T., and Barclay, G. (2012). Evidence based exercise: Clinical benefits of high intensity interval training. *Australian Family Physician* 41, 960.

Staron, R.S., Hagerman, F.C., Hikida, R.S., Murray, T.F., Hostler, D.P., Crill, M.T., Ragg, K.E., and Toma, K. (2000). Fiber Type Composition of the Vastus Lateralis Muscle of Young Men and Women. *J Histochem Cytochem.* 48, 623–629.

Stavrinou, P.S., Bogdanis, G.C., Giannaki, C.D., Terzis, G., and Hadjicharalambous, M. (2018). High-intensity Interval Training Frequency: Cardiometabolic Effects and Quality of Life. *Int J Sports Med* 39, 210–217.

Steinbacher, P., and Eckl, P. (2015). Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 5, 356–377.

Stepito, N.K., Benziane, B., Wadley, G.D., Chibalin, A.V., Canny, B.J., Eynon, N., and McConell, G.K. (2012). Short-Term Intensified Cycle Training Alters Acute and Chronic Responses of PGC1 α and Cytochrome C Oxidase IV to Exercise in Human Skeletal Muscle. *PLOS ONE* 7, e53080.

Stickland, N.C. (1983). Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Anat.* 137 (Pt 2), 323–333.

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., et al. (2006). Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* 127, 397–408.

Summermatter, S., Shui, G., Maag, D., Santos, G., Wenk, M.R., and Handschin, C. (2013). PGC-1 α Improves Glucose Homeostasis in Skeletal Muscle in an Activity-Dependent Manner. *Diabetes* 62, 85–95.

Summers, A.P., and Koob, T.J. (2002). The evolution of tendon — morphology and material properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133, 1159–1170.

Taylor, E.B., Lamb, J.D., Hurst, R.W., Chesser, D.G., Ellingson, W.J., Greenwood, L.J., Porter, B.B., Herway, S.T., and Winder, W.W. (2005). Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1 α protein abundance: effects of time and intensity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 289, E960–E968.

Tjønnå, A.E., Lee, S.J., Rognmo, Ø., Stølen, T.O., Bye, A., Haram, P.M., Loennechen, J.P., Al-Share, Q.Y., Skogvoll, E., Slørdahl, S.A., et al. (2008). Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome. *Circulation* 118, 346–354.

Trewin, A.J., Berry, B.J., and Wojtovich, A.P. (2018). Exercise and mitochondrial dynamics: keeping in shape with ROS and AMPK. *Antioxidants* 7, 7.

Tsintzas, K., Williams, C., Constantin-Teodosiu, D., Hultman, E., Boobis, L., Clarys, P., and Greenhaff, P. (2001). Phosphocreatine degradation in type I and type II muscle fibres during submaximal exercise in man: effect of carbohydrate ingestion. *The Journal of Physiology* 537, 305–311.

Tudorache, C., de Boeck, G., and Claireaux, G. (2013). Forced and Preferred Swimming Speeds of Fish: A Methodological Approach. In *Swimming Physiology of Fish: Towards Using Exercise to Farm a Fit Fish in Sustainable Aquaculture*, A.P. Palstra, and J.V. Planas, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 81–108.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol. (Lond.)* 552, 335–344.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO Journal* 27, 433–446.

Urbańska, K., and Orzechowski, A. (2019). Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2085.

Venditti, P., Gomez-Cabrera, M.C., Zhang, Y., and Radak, Z. (2015). Oxidant antioxidants and adaptive responses to exercise. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 290190.

Ventura-Clapier, R., Piquereau, J., Veksler, V., and Garnier, A. (2019). Estrogens, Estrogen Receptors Effects on Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondria. *Front. Endocrinol.* 10.

Vidal-Puig, A.J., Grujic, D., Zhang, C.Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., et al. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16258–16266.

Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 685–698.

Wang, C., and Youle, R. (2016). Form follows function for mitochondria. *Nature* 530, 288–289.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 872–884.

Weston, K.S., Wisløff, U., and Coombes, J.S. (2014). High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 48, 1227–1234.

Wilmore, J.H., Costill, D.L., and Kenney, L. (2017). *Physiologie du sport et de l'exercice* (De Boeck Supérieur).

Wilson, J.M., Loenneke, J.P., Jo, E., Wilson, G.J., Zourdos, M.C., and Kim, J.-S. (2012). The Effects of Endurance, Strength, and Power Training on Muscle Fiber Type Shifting. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 26, 1724–1729.

Zardoya, R., Garrido-Pertierra, A., and Bautista, J.M. (1995). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Mol Evol* 41, 942–951.

(2016). Décret n° 2016-1990 du 30 décembre 2016 relatif aux conditions de dispensation de l'activité physique adaptée prescrite par le médecin traitant à des patients atteints d'une affection de longue durée.

Titre : Biogenèse mitochondriale et état redox : adaptations musculaires à l'entraînement physique d'intensité modérée et élevée chez des modèles poisson et murin

Mots clés : entraînement continu d'intensité modérée, entraînement par intervalles de haute intensité, muscle squelettique, biogenèse mitochondriale, état redox

Résumé : L'activité physique régulière est reconnue pour ses effets bénéfiques sur la santé, médiés, en partie par la stimulation de la biogenèse mitochondriale et des capacités antioxydantes du muscle squelettique. Cependant, certains mécanismes cellulaires impliqués dans ces adaptations restent encore à élucider. À partir de deux modèles animaux (truite arc-en-ciel et rat Wistar), les effets de deux entraînements physiques d'intensité modérée (MICT, *Moderate-intensity continuous training*) et élevée (HIIT, *High-intensity interval training*) ont été comparés. Les réponses transcriptionnelles et protéiques impliquées dans les processus aérobie ont été évaluées dans le muscle squelettique. Quel que soit le modèle, deux types de muscles de typologie différente ont été étudiés. L'un composé majoritairement de fibres lentes oxydatives et l'autre de fibres rapides glycolytiques. Nos résultats montrent que le HIIT a eu plus d'impact que le MICT sur la voie de signalisation AMPK–PGC-1 α ainsi que sur la biogenèse mitochondriale et les systèmes antioxydants. Ces modifications sont plus importantes dans les fibres oxydatives que dans les fibres glycolytiques. Les réponses interspécifiques fibres-dépendantes (globalement similaires chez les deux modèles) confortent l'utilisation du poisson dans ce champ d'investigation. Enfin, les résultats obtenus chez le rat sain ouvrent des perspectives intéressantes pour la prévention primaire des maladies métaboliques.

Title: Mitochondrial biogenesis and redox state: muscular adaptations to moderate and high-intensity training in fish and murine models

Keywords: moderate-intensity continuous training, high-intensity interval training, skeletal muscle, mitochondrial biogenesis, redox state

Abstract: Regular physical activity is recognized for its benefic effects on health, mediated, in part, by the mitochondrial biogenesis and the oxidative capacities in skeletal muscle. However, some cellular mechanisms involved in these adaptations are not still elucidated. From two animal models (rainbow trout and Wistar rat), the effects of moderate-intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT) were compared. Transcript and protein responses involved in aerobic processes were evaluated in skeletal muscle. Whatever the model, two muscles of different typology were studied. One mainly composed of slow-oxidative fibers and another of fast-glycolytic fibers. Our results showed that HIIT had more impact than MICT on AMPK–PGC-1 α signaling pathway, mitochondrial biogenesis and antioxidant systems. These modifications were more important in oxidative fibers than in glycolytic ones. The interspecific fiber-dependent responses (globally similar for the two models) encourage the use of the fish in this investigation scope. Finally, the results obtained in healthy rat offer interesting perspectives for primary prevention in metabolic diseases.