

UNIVERSITE DE STRASBOURG I – LOUIS PASTEUR

Année universitaire 2002/2003
N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Banga Benoit N'GUESSAN

Le 03 octobre 2003

Traitement immunosuppresseur et muscles striés : Evaluation
et adaptation de la fonction mitochondriale du sujet
transplanté cardiaque

Membres du jury

Directeur : M. Jean Lonsdorfer, Professeur, Strasbourg

Rapporteur interne : M. Alain Beretz, Professeur, Strasbourg

Rapporteur externe : M. Valdur Saks, Professeur, Grenoble

Rapporteur externe : M. François Carré, Professeur, Rennes

Examineur : M. Bertrand Mettauer, HDR, Strasbourg

REMERCIEMENTS

A Mr Jean Lonsdorfer: merci de m'avoir accueilli dans votre service, de m'avoir fait confiance en m'associant au projet "PROGRESS" et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail. Merci d'avoir d'avoir été bien plus qu'un directeur de thèse, un "père" et un "compatriote". Merci pour les journaux "Jeune Afrique" qui m'ont permis de garder un pied en Côte d'Ivoire.

A Eliane Lampert: merci d'avoir activement participé à la réalisation de ce travail. Tu as su me soutenir et me motiver pendant ces années passées à l'UPEBM au sein de laquelle tu as fait régner une bonne ambiance familiale. Tu m'as permis de réaliser l'importance du moral dans la performance intellectuelle. Le mérite de ce travail te revient. Je t'en suis très reconnaissant.

A Bertrand Mettauer: merci de m'avoir fait partager tes compétences et ton goût pour la recherche. Tu as su éveiller mon "orgueil scientifique" par la rigueur de ton jugement et tu m'as permis de croire en mes capacités intellectuelles. Merci également pour tes nombreuses qualités humaines.

A Mr Alain Beretz: merci d'avoir participé à mon initiation à la recherche et de m'avoir mis en contact avec Mr Jean Lonsdorfer pour réaliser ce travail de thèse. Merci également d'avoir accepté d'en être le rapporteur interne.

A Mr François Carré: merci d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'en être rapporteur externe.

A Mr Valdur Saks: merci d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'en être rapporteur externe.

A Joffrey, Florence, Elodie et Hervé, les actuels et ex-stars de l'UPEBM: les mots me manquent pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Je garderai un très bon souvenir de vous. Merci pour le travail que nous avons réalisé ensemble et pour les réponses que nos études ont pu apporter à la science. Cependant à la question "Vaut-il mieux deux

mitochondries qui fonctionnent à 50% qu'une seule qui fonctionnent à 100%?", je n'ai toujours pas de réponse...

Aux doctorants Stéphane, Valérie, Hadami, Samuel et Paul-Camille: merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Merci pour le soutien que vous m'avez apporté dans les moments difficiles. Je vous souhaite une bonne continuation.

A l'ensemble du personnel des EFR: merci votre sympathie. Merci à Jacques, Christine, Sabine, Mireille, Nacéra, Jean-Pierre...

A Renée Ventura-Clapier : merci d'avoir cru en moi et de m'avoir aidé à prendre confiance en mes capacités. Tu as toujours été disponible et prête à m'aider dans mon travail et mes projets. J'ai été très heureux de travailler avec toi. Merci à toute ton équipe et surtout à Vladimir Veksler pour son aide précieuse à l'avancée de mon travail, à Elvira, Marjorie, Iman, Anne, Lahoucine...pour leur gentillesse.

A Xavier Bigard: merci d'avoir participé à faire avancer mon travail de façon aussi efficace (3 papiers en trois mois). Je garde un très bon souvenir de mon passage à Grenoble qui a été une étape importante pour moi. Merci également pour ton soutien dans les moments difficiles. A toute ton équipe, Bernard, Nathalie, Nadine, Emmanuel, Birot, ... je dis également merci.

A mes ami(e)s d'ici et d'ailleurs: merci de m'avoir soutenu, encouragé et aidé à atteindre cet objectif que je m'étais fixé. Je vous en suis reconnaissant.

A ma bien-aimée: merci pour ton soutien et pour tes prières.

A ma famille: merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenu aussi bien financièrement, moralement que spirituellement pendant ces si longues années. Merci pour votre patience. Le mérite de ce travail est aussi le vôtre.

A toi mon père...

Voici ma reconnaissance

Entends là mon amour pour toi

Mon trop tôt disparu.

Ton souvenir m'envahit et m'étreint ce jour

De bonheur et de joie.

Toi mon être exceptionnel

Ta générosité et ton amour pour les tiens

Me sont restés fidèles,

Et de ton absence,

Me consolent jour après jour

Me parlent de toi sans répit.

Merci de m'avoir donné le goût des études

De m'avoir appris à donner le meilleur de moi.

Fier de moi tu l'as toujours été

En ce jour tu l'aurais encore été.

Merci de m'avoir fait connaître ton Dieu

De m'avoir appris à compter sur lui

En toute chose, merci.

Je t'aime pour toujours...

Ton fils unique.

A toi mon Dieu...

Fidèle parmi les fidèles
Qui m'a guidé et comblé de toute espèce de bienfaits
Tu m'as fait reposer dans de verts pâturages
Dirigé près des eaux paisibles
Restauré mon âme
Conduit dans les sentiers de la justice
A cause de ton nom.
Quand j'étais dans l'impasse
Je ne craignais rien
Ta houlette et ton bâton
Me rassuraient.
Tu dresses devant moi une table
En face de mes adversaires
Tu oins d'huile ma tête
Ma coupe déborde.
Oui, le bonheur et la grâce m'accompagnent
Tous les jours de ma vie
J'habiterai dans ta présence
Pour toujours
Je taime

RESUME

Malgré la quasi-normalisation de sa fonction cardiaque, le sujet transplanté cardiaque présente généralement une limitation à l'effort physique. Ce handicap a été attribué en partie à des altérations du métabolisme énergétique musculaire périphérique, dont les causes précises restent encore à élucider. Cependant, le traitement immunosuppresseur (la ciclosporine en particulier) et le déconditionnement physique, ont été fortement suspectés d'être à l'origine des anomalies musculaires du transplanté. L'objectif de ce travail de thèse était donc de déterminer les parts respectives de la ciclosporine et du déconditionnement dans cette limitation physique. Pour ce faire, nous avons étudié les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de leurs muscles squelettique et cardiaque, et évalué les effets d'un entraînement en endurance sur ces divers paramètres.

Nos résultats démontrent que les capacités oxydatives musculaires du sujet transplanté cardiaque ne varient pas significativement près d'un an après transplantation et demeurent similaires à celles de sujets sédentaires sains appariés en âge. Cependant, *in vitro*, la CsA (Sandimmun), entraîne une diminution de ces capacités oxydatives, entièrement attribuable au composant majeur de son excipient, le Crémophor. Cet effet délétère est tissu-spécifique et s'exerce via une altération spécifique de l'activité fonctionnelle de certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par ailleurs, l'administration chronique de la molécule active de CsA, sans son excipient, entraîne au contraire, une augmentation de la capacité oxydative du muscle squelettique lent oxydatif.

L'entraînement en endurance de ces sujets induit une augmentation significative de la capacité oxydative du muscle squelettique (dont la valeur devient même similaire à celle du sujet sain sportif) associée à une activation fonctionnelle de la créatine kinase mitochondriale. L'ensemble de notre travail suggère que la fonction mitochondriale musculaire et ses mécanismes de régulation soient préservés *in vivo*, malgré le traitement immunosuppresseur clinique. D'autres acteurs, extramitochondriaux, tels que le réseau capillaire et certaines voies de signalisation impliquées dans la transition phénotypique musculaire, seraient les cibles préférentielles des immunosuppresseurs.

Mots clés : muscle strié, mitochondrie, créatine kinase, compartimentation cellulaire, MHC, insuffisance cardiaque, transplantation cardiaque, ciclosporine, entraînement physique.

ABSTRACT

Despite a near-normalization of their cardiac function, heart transplant recipient displayed a limited physical capacity, at maximal exercise. This physical limitation has been in part attributed to altered energetical metabolism in peripheral muscle, which precise mechanisms are still undetermined. However, immunosuppressive treatment, particularly cyclosporin A, and deconditioning have been closely suspected to be the major causes of muscular abnormalities after cardiac transplantation. The aim of this study was to determine the respective contribution of cyclosporin A and deconditioning in physical limitation of heart transplant recipient. To this end, we have characterized the phenotypic and functional properties of their skeletal and cardiac muscles, and have determined the effects of an endurance training program on these various parameters.

Our results demonstrate that the intrinsic properties of muscular mitochondria, remain normal in heart transplant recipient, long after transplantation, either at the level of quantitative functional characteristics than at their adaptative mechanisms of regulation of cellular energy production and transfer.

This study suggests that the muscular mitochondrial function and its adaptative mechanisms are not directly affected *in vivo* by clinical immunosuppressive treatment. Others non-mitochondrial actors such as the capillary network and some signaling pathways implicated in phenotypic muscular transition, should represent preferential targets of immunosuppressive drugs in peripheral muscle of heart transplant recipient.

Key words: striated muscle, mitochondria, creatine kinase, cellular compartmentation, MHC, Heart failure, cardiac transplantation, cyclosporin, endurance training.

SOMMAIRE

<i>Liste des publications faisant l'objet de ce mémoire</i>	14
<i>Autres publications</i>	15
<i>Abréviations</i>	16
<i>Préambule</i>	19
ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES	22
I. FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE DU SUJET TRANSPLANTE CARDIAQUE (TC) ET TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS	22
<i>A. Handicap physique et altérations des caractéristiques musculaires de l'insuffisant cardiaque (IC) et du transplanté cardiaque (TC)</i>	22
1. L'insuffisance cardiaque (IC), généralités	22
1.1. Définition et rappels.....	22
1.2. Altérations du muscle squelettique de l'IC	24
1.3 Origines des anomalies du muscle squelettique.....	27
2. La transplantation cardiaque (TC).....	31
2.1. Histoire des greffes d'organes	31
2.2. La transplantation cardiaque.....	31
2.3. Le handicap physique du TC.....	32
2.4. Altérations centrales : dénervation et reinnervation cardiaque	33
2.5. Altérations périphériques : Le muscle squelettique du TC	35
<i>B. Les traitements immunosuppresseurs</i>	38
1. Les immunosuppresseurs	38
1.1. La ciclosporine.....	38
2. Les traitements antirejet	44
2.1. Traitement préventif du rejet.....	44
2.2. Traitement curatif du rejet	45
II. EVALUATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE STRIE HUMAIN	46
<i>A. L'appareil contractile</i>	46
1. Les filaments fins	47
1.1 L'actine	47
1.2 La tropomyosine (TM).....	47
1.3 Le complexe troponine (Tn)	48
1.4 Autres protéines associées aux filaments fins	49
2. Les filaments épais	49

2.1 La myosine.....	49
2.2 Les protéines associées à la myosine	52
B. Réticulum sarcoplasmique (RS) et mouvements calciques	53
1. Structure et fonction du RS	53
2. Les mouvements calciques	54
2.1 La libération du calcium	54
2.2 Le repompage du calcium	55
C. Les voies métaboliques de production d'énergie	58
1. La glycolyse anaérobie.....	58
2. La voie aérobie et les mitochondries.....	59
2.1. Mitochondries. Généralités.....	59
2.2. Le réseau mitochondrial.....	60
2.3. Structure et organisation.....	61
2.4. La Respiration mitochondriale.....	64
2.5. Interactions mitochondriales.....	69
D. Les systèmes de transfert d'énergie	71
1. Le système créatine kinase	71
1.1. La compartimentation du système CK	72
1.2. Les différents rôles attribués au système CK	73
2. Le système adénylate kinase (AK).....	75
III. ADAPTATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE SQUELETTIQUE DU	
SUJET TC A UN PROGRAMME D'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE	76
A. Contrôle et adaptation du phénotype musculaire	76
1. Rappels des modalités du typage histochimique des fibres musculaires	76
2. Notion de phénotype musculaire.....	77
2.1. Phénotype contractile.....	77
2.2. Phénotype métabolique	77
3. Contrôle du phénotype musculaire et notion de plasticité musculaire.....	78
3.1. Les hormones thyroïdiennes.....	78
3.2. Innervation et activité neuromusculaire	80
3.3. Régulation moléculaire de l'expression du phénotype musculaire	81
B. Modifications induites sur le phénotype musculaire par l'entraînement en	
endurance	84
1. Les facteurs limitant la consommation maximale d'oxygène (VO _{2max}).....	84

1.1. Les facteurs centraux	84
1.2. Les facteurs périphériques	86
2. Modifications du phénotype musculaire après un entraînement en endurance.....	87
2.1. Les effets sur le phénotype contractile	87
2.2. Les effets sur le phénotype métabolique.....	88
C. Adaptation du transplanté cardiaque à l'entraînement en endurance.....	90
1. Effets de l'entraînement en endurance sur la capacité à l'exercice.....	90
2. Effets de l'entraînement en endurance sur le phénotype musculaire	92
OBJECTIFS SCIENTIFIQUES	96
MATERIEL ET METHODES.....	99
I. DESCRIPTION DES EXPERIMENTATIONS.....	99
A. Les animaux.....	99
B. Sujets	99
1. Normaux.....	99
2. Patients insuffisants valvulaires cardiaques et patient myopathe.....	99
3. Sujets transplantés cardiaques	99
C. Mesures des paramètres à l'exercice	100
D. Programme d'entraînement personnalisé en créneaux (PEP'C).....	101
E. Biopsies musculaires	101
II. TECHNIQUES D'ETUDE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE	102
A. Principe de la polarographie	102
B. Matériel	103
C. Technique des fibres musculaires perméabilisées à la saponine.....	103
III. METHODES D'ETUDE IN VITRO.....	103
A. Caractérisation du profil métabolique	103
B. Caractérisation du profil contractile.....	103
C. Détermination des effets aigus de la ciclosporine A et de son excipient	104
RESULTATS	106
I. EVALUATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES MUSCLES SQUELETTIQUE ET	
CARDIAQUE HUMAINS.	106
A. Présentation	106
B. Résultats	107

<i>C. Discussion</i>	107
II. EFFET MITOCHONDRIAL D'UN TRAITEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR PAR UNE FORMULATION DE CICLOSPORINE A SUR LES MUSCLES SQUELETTIQUE ET CARDIAQUE DU SUJET TC	109
<i>A. Présentation</i>	109
<i>B. Résultats</i>	110
<i>C. Discussion</i>	110
III. DETERMINATION DES EFFETS PROPRES DE LA MOLECULE DE CICLOSPORINE A SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE DE RATS	112
<i>A. Présentation</i>	112
<i>B. Résultats</i>	112
<i>C. Discussion</i>	112
IV. ADAPTATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE A UN PROGRAMME D'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE DES SUJETS TC	114
<i>A. Présentation</i>	114
<i>B. Résultats</i>	114
<i>C. Discussion</i>	114
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	117
I. DISCUSSION GENERALE	117
<i>A. Etude de la fonction mitochondriale par la technique des fibres perméabilisées à la saponine</i>	<i>118</i>
1. Importance du choix des différents protocoles de respiration mitochondriale	118
2. Limites de la technique des fibres perméabilisées	120
<i>B. Caractérisation des propriétés fonctionnelles des mitochondries dans les muscles striés du sujet TC</i>	<i>121</i>
<i>C. Toxicité mitochondriale musculaire de la ciclosporine A</i>	<i>122</i>
1. Effets aigus d'une formulation de CsA sur la fonction mitochondriale musculaire chez le sujet TC	123
2. Effets propres de la molécule de ciclosporine A, sur la fonction mitochondriale musculaire	124
<i>D. Adaptation et régulation de la fonction mitochondriale musculaire des sujets TC</i>	<i>125</i>
II. PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE	127

A. Perspectives	127
1. Par rapport aux limites de notre méthodologie	127
2. Par rapport à la fonction mitochondriale musculaire des sujets TC.....	129
2.1. Rejets aigus et fonction mitochondriale	129
2.2. Suivi à long terme de la fonction mitochondriale	129
2.3. Corticoïdes et fonction mitochondriale.....	130
3. Par rapport à l'hypothèse d'une atteinte extramitochondriale.....	130
B. Conclusion générale	131
BIBLIOGRAPHIE	133

LISTE DES PUBLICATIONS FAISANT L'OBJET DE CE MEMOIRE

1. **Benoit N'Guessan**, Joffrey Zoll, Florence Ribera, Elodie Ponsot, Eliane Lampert, Renée Ventura-Clapier, Vladimir Veksler, and Bertrand Mettauer: *Evaluation of quantitative and qualitative aspects of mitochondrial function in human cardiac and skeletal muscles*. Mol Cell Biochem (sous presse)
2. **Benoit N'guessan**, Hervé Sanchez, Joffrey Zoll, Florence Ribera, Eliane Lampert, Bertrand Mettauer, Renée Ventura-Clapier. *Oxidative capacities of cardiac and skeletal muscles of heart transplant recipients: mitochondrial effects of immunosuppressive treatment by a formulation of cyclosporin A*. J Am Coll Cardiol (soumis)
3. Hervé Sanchez, **Benoit N'Guessan**, Florence Ribera, Renée Ventura-Clapier, and Xavier Bigard. *Cyclosporin A treatment increases rat soleus muscle oxidative capacities*. Muscles & Nerves (sous presse)
4. Joffrey Zoll, **Benoit N'Guessan***, Florence Ribera, Eliane Lampert; Dominique Fortin, Vladimir Veksler, Xavier Bigard, Bernard Serrurier, Bernard Geny, Jean Lonsdorfer, Renée Ventura-Clapier; Bertrand Mettauer. *Preserved response of mitochondrial function to short time endurance training in skeletal muscle of Heart Transplant Recipients*. J Am Coll Cardiol 2003; 42: 126-32. *J Zoll et B N'Guessan ont contribué à part égale à ce travail.

AUTRES PUBLICATIONS

F. Ribera, **B. N'Guessan**, J. Zoll, H. Sanchez, D. Fortin, B.Serrurier, X. Ducrocq, B. Mettauer, J. Lonsdorfer, X. Bigard, R. Ventura-Clapier, E. Lampert. *The intrinsic oxidative capacity of inspiratory muscles is increased in emphysematous patients*. Am J Respir R Crit Care Med (2003) Mar 15, 167(6) :873-9.

DeSouza E., Lechene P., Fortin D., **N'Guessan B.**, Belmadani S., Bigard X., Veksler V., Ventura-Clapier R. *Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity*. Cardiores (2002) 56: 260-268

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

M'Bouh S, Belmont S, Lampert E, Epailly E, Zoll J, **N'Guessan B**, Ribera F, Geny B, Oyono S, Arnold P, Lonsdorfer J, Mettauer, B. *An impaired cardiodynamic phase contributes to the abnormal $\dot{V}O_2$ kinetics at exercise onset in both congestive heart failure and heart transplant patients but results from differing mechanisms*. Transplant Proc. (2001) Nov;33(7-8):3543-5.

ABREVIATIONS

ACR :	Accepteur control ratio = rapport entre les oxydations et les phosphorylations mitochondriales
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AMP :	Adénosine monophosphate
AMPK :	AMP-activated protein kinase
ATP :	Adénosine triphosphate
ANT :	Adénine Nucléotide Translocase
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ARNr :	Acide Ribonucléique ribosomique
CK :	Créatine Kinase
CnA :	Calcineurine
COX :	Cytochrome c Oxidase
CS :	Citrate Synthase
CsA :	Ciclosporine A
Cr :	Créatine
CsA :	Ciclosporine A
DHRP :	Récepteur à la Dihydropyridine
FADH ₂ :	Flavine Adénine Dinucléotide réduit
GLUT :	Transporteur du glucose
[Hb] :	Concentration en Hémoglobine
IC :	Insuffisance Cardiaque ; patient IC = patient insuffisant cardiaque
IEC :	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
K ⁺ :	Ion potassium
KCl :	Chlorure de potassium
K _M ADP :	K _m apparent de la mitochondrie pour l'ADP
LDH :	Lactate Déshydrogénase
mi-CK :	Créatine Kinase mitochondriale
MLC :	Myosine Light Chain = chaîne légère de myosine
MHC :	Myosine heavy Chain = chaîne lourde de myosine
MRF :	myogenic regulatory facteur = facteur de régulation myogénique

MtADN :	ADN mitochondriale
mTFA :	facteur de transcription A mitochondrial
Na ⁺ :	Ion sodium
NaCl :	Chlorure de Sodium
NAD ⁺ :	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NFAT :	nuclear factor of activated T cells = facteur nucléaire des cellules T activées
NRE :	NFAT Response Element = élément de réponse au NFAT
NRF :	facteurs respiratoires nucléaires
O ₂ :	Oxygène
³¹ P :	Phosphore 31
Pb :	Paire de base
PCr :	Phosphocréatine
PEP'C :	Programme d'entraînement personnalisé en créneau
PHOSPHOX :	Phosphorylation Oxydative
Pi :	Phosphate inorganique
pO ₂ :	Pression partielle en oxygène
RMN :	Raisonnance Magnétique nucléaire
RS :	Réticulum Sarcastiquement
SERCA :	Zarco Endos Réticulum Calcium ATPase = calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique
T3 :	3, 3', 5-tri-iodo-thyronine
TC :	Transplantation cardiaque ; sujet TC = sujet transplanté cardiaque
TN :	Troponine
TOM :	Translocase of Outer Membrane = translocase de la membrane externe
TIM :	Translocase of Inner Membrane = translocase de la membrane interne
TM :	Tropomyosine
UCP :	Uncoupling Protein = protéine découplante
V ₀ :	Vitesse basale de respiration des fibres
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor = Facteur de croissance endothélial vasculaire
VD :	Ventricule droit
VE :	Vaste externe
VDAC :	Voltage-Dependant Anion Channel = canal à anion voltage dépendant

Vmax : vitesse maximale de respiration des fibres musculaire
VO₂max : Consommation Maximale d'Oxygène
VO₂SL : VO₂ mesurée au seuil lactique

PREAMBULE

L'insuffisance cardiaque (IC) constitue un enjeu majeur de santé publique dans les pays industrialisés, où elle reste encore à l'origine d'un taux élevé de mortalité, malgré des avancées thérapeutiques spectaculaires. Sa fréquence de survenue ne cesse d'augmenter, en raison des nombreux facteurs de risques, du vieillissement de la population et d'une meilleure prise en charge des syndromes coronaires aigus. Les patients souffrant de cette affection se plaignent souvent d'une incapacité à l'exercice physique, d'une fatigue anormale et d'une dyspnée, plus ou moins importantes selon le degré de sévérité de la maladie. Au fil du temps, ces symptômes finissent par compromettre la qualité de vie et les conditions de travail de ces sujets. L'insuffisance cardiaque n'est pas une simple maladie du cœur mais une maladie complexe qui implique de nombreux systèmes de régulation cardiocirculatoire au premier rang desquels les systèmes neurohormonaux. Elle provoque des modifications non seulement au niveau de la géométrie et de la fonction cardiaques, mais également au niveau des muscles locomoteurs avec d'importantes altérations de leurs propriétés intrinsèques. Ces anomalies musculaires périphériques persistent après la transplantation cardiaque. En effet, si la transplantation cardiaque permet en ultime recours le remplacement du cœur défaillant et la restauration de la fonction cardiaque, elle ne remplace cependant pas les muscles périphériques pourtant très altérés par l'évolution chronique de la maladie. Ces anomalies musculaires périphériques restent également associées, chez les sujets transplantés cardiaques, à une persistance du handicap physique, malgré l'amélioration de cette limitation à l'exercice après la greffe. Les mécanismes physiopathologiques des modifications musculaires, induites lors de la longue période d'insuffisance cardiaque ou à l'origine de leur persistance après transplantation, ne sont pas encore bien établis. Leur élucidation est aujourd'hui l'objectif de nombreux fundamentalistes désirant comprendre les causes du handicap physique de ces sujets, mais aussi celui de nombreux cliniciens y voyant l'opportunité d'une meilleure approche thérapeutique et d'une meilleure prise en charge de ces patients.

Depuis 1998, un programme de recherche (projet PROGRES de l'INSERM), créant une étroite collaboration entre l'Unité 446 INSERM de Châtenay-Malabry, le service des Explorations Fonctionnelles Respiratoires et de l'Exercice(EFR, EA 3072) et le service de Chirurgie Cardio-vasculaire des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, ainsi que l'équipe de Bioénergétique et Environnement du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de la Tronche (CRSSA), a eu pour objectif de réaliser une étude fonctionnelle et phénotypique

des propriétés des muscles squelettiques et ventriculaires de patients insuffisants et transplantés cardiaques. Une attention particulière a été portée sur le rôle du traitement immunosuppresseur dans les altérations musculaires des greffés cardiaques. Les propriétés contractiles, mitochondriales et métaboliques ont été étudiées pour caractériser les atteintes fonctionnelles induites dans ces deux pathologies.

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire représente une partie des résultats de ce projet, concernant en particulier la caractérisation du phénotype musculaire du sujet transplanté cardiaque, les effets musculaires d'un programme d'entraînement en endurance, et le rôle de l'immunosuppression par la ciclosporine sur la fonction des muscles striés, à la fois chez l'homme et l'animal.

Dans le chapitre 1 de l'état des connaissances actuelles, nous commencerons par exposer les handicaps physiques et les altérations des caractéristiques musculaires de l'insuffisant et du transplanté cardiaques. Nous aborderons ensuite les immunosuppresseurs, en insistant particulièrement sur la ciclosporine A et sur les arguments en faveur de sa toxicité musculaire et ceux en faveur de la toxicité de son excipient, le Crémophor EL. Nous terminerons enfin ce premier chapitre par les traitements préventifs et curatifs du rejet.

Le chapitre 2 abordera la question de l'évaluation de la fonction mitochondriale des muscles striés humains permettant de caractériser leur phénotype métabolique. Nous développerons d'abord les propriétés contractiles du muscle, le couplage excitation-contraction et les voies métaboliques de production d'énergie, particulièrement la voie aérobie et les mitochondries. Nous exposerons pour finir, les principaux systèmes de transfert d'énergie depuis leurs sites de production jusqu'à leurs sites d'utilisation.

Dans le dernier chapitre, nous aborderons le contrôle du phénotype musculaire et les adaptations induites sur ce dernier par l'entraînement en endurance, avec pour exemple le cas particulier de l'adaptation du transplanté cardiaque à un programme d'entraînement en endurance.

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES

I. FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE DU SUJET TRANSPLANTE CARDIAQUE (TC) ET TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS

A. HANDICAP PHYSIQUE ET ALTERATIONS DES CARACTERISTIQUES MUSCULAIRES DE L'INSUFFISANT CARDIAQUE (IC) ET DU TRANSPLANTE CARDIAQUE (TC)

Le sujet transplanté étant généralement un ancien insuffisant cardiaque, nous avons dans un premier temps voulu exposer les connaissances relatives aux diverses altérations musculaires périphériques de ces patients IC, acquises grâce aux nombreuses études réalisées pendant ces dernières décennies. Elles nous permettront, en partie, de comprendre un certain nombre d'anomalies musculaires « persistantes » observées après la transplantation cardiaque et ainsi d'expliquer, avec d'autres facteurs propres à l'état de « transplanté » lui-même, le handicap physique mis en évidence chez ces sujets TC. A ce jour, le nombre d'études réalisées sur le muscle périphérique du sujet TC reste limité, contrairement à celui portant sur l'insuffisance cardiaque. Toutefois, "le passé insuffisant cardiaque" ne saurait être la seule cause du handicap physique des transplantés cardiaques.

1. L'INSUFFISANCE CARDIAQUE (IC), GENERALITES

1.1. Définition et rappels

L'insuffisance cardiaque est un syndrome complexe qui se définit par l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant lui permettant de répondre aux besoins métaboliques et fonctionnels de l'organisme. Cette diminution du débit sanguin peut être due soit à des anomalies de remplissage du ventricule (dysfonction diastolique), soit à un trouble de l'éjection ventriculaire (dysfonction systolique) ou le plus souvent, aux deux à la fois.

L'IC est l'aboutissement d'une atteinte primitive du myocarde ou d'une atteinte secondaire d'origine valvulaire ou coronarienne. Elle débute par une période de latence pendant laquelle la dysfonction ventriculaire gauche (VG) est asymptomatique. Au cours de cette période, d'importantes modifications de la géométrie et de la fonction cardiaques, appelées aussi « remodelage ventriculaire » et caractérisées par une dilatation des cavités et une baisse de la fonction contractile, ont lieu. Apparaissent ensuite les premiers signes cliniques à l'effort puis au repos, caractérisés par une incapacité à l'effort physique, qui se traduit par une diminution de la consommation maximale de l'oxygène (pic de VO_2) par l'organisme, une fatigue musculaire précoce et une dyspnée. C'est sur la base de ces deux signes fonctionnels que la

classification de la New York Heart Association (NYHA), a distingué quatre classes fonctionnelles caractérisant les patients IC (voir tableau 1).

Au niveau cardiaque, différents mécanismes sont mis en jeu pour palier au dysfonctionnement ventriculaire. Le premier résulte de la loi de Franck-Starling : l'étirement des sarcomères, secondaire à une surcharge en volume ou, dans les autres cas, secondaire à l'augmentation de la précharge (notamment due à la rétention hydrosodée), provoque une augmentation de la force de contraction ventriculaire. La dilatation ventriculaire permet ainsi de maintenir le volume d'éjection systolique, face à une diminution de la fraction d'éjection. Le second mécanisme résulte quant à lui de l'activation du système nerveux sympathique (SNS) responsable d'une augmentation de la fréquence cardiaque et de la contractilité. Cette activation sympathique permet également de maintenir le débit cardiaque face à une baisse du volume d'éjection systolique, à court et moyen terme. Ses effets sur le cœur sont délétères à long terme par un phénomène de « désensibilisation » des β -récepteurs myocardiques et par la survenue d'arythmies.

Au niveau périphérique, les mécanismes d'adaptation sont surtout mis en jeu lorsque le débit cardiaque et la pression de perfusion systémique tendent à diminuer. Ces adaptations se traduisent par une vasoconstriction artériolaire hétérogène, une augmentation de l'extraction périphérique de l'oxygène et une rétention hydrosodée. La vasoconstriction artériolaire est sous la dépendance de l'activation du SNS et des autres systèmes hormonaux vasoconstricteurs (angiotensine II, endothéline). D'autres mécanismes comme la baisse du tonus vasodilatateur d'origine endothéliale, peuvent également intervenir. La redistribution des débits régionaux est une caractéristique importante de l'IC. Cette redistribution survient d'abord à l'effort mais elle sera ensuite également présente au repos. Elle permet de maintenir une pression de perfusion suffisante et de maintenir les débits sanguins au niveau de certains organes vitaux comme le cerveau et le cœur, au détriment de la circulation musculaire et rénale. Au cours de l'effort, le sujet normal peut multiplier par 5 son débit cardiaque et distribuer environ 80% de ce débit au niveau des muscles. Chez l'insuffisant cardiaque, l'augmentation du débit cardiaque est moindre et les débits musculaires sont diminués, en valeur absolue et relative. La redistribution du débit entraîne à l'effort une hypoperfusion marquée de certains tissus (peau, rate, rein...) alors que le débit coronaire et cérébral sont relativement épargnés. A long terme, la vasoconstriction périphérique contribue à augmenter la postcharge et le travail du VG, et joue un rôle délétère sur l'évolution de la cardiopathie.

La baisse du débit cardiaque à l'effort puis au repos s'accompagne d'une augmentation de la différence artérioveineuse en oxygène ; il existe une baisse de l'affinité de l'hémoglobine

pour l'oxygène liée à une augmentation du 2,3-diphosphoglycérate, qui facilite le transport de l'oxygène, du fait du déplacement de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. Ce mécanisme agit conjointement avec l'acidose tissulaire et la diminution de la vitesse de circulation pour maintenir l'apport en oxygène au niveau des tissus.

Tableau 1 : La classification fonctionnelle de la New York Heart Association (NYHA)

Classe	Signes fonctionnels
I	Patients porteurs d'une maladie cardiaque n'entraînant aucune limitation de l'activité physique. Les activités ordinaires n'entraînent aucune fatigue anormale, aucune palpitation, dyspnée ou douleur angineuse.
II	Patients porteurs d'une maladie cardiaque limitant modérément l'activité physique. Absence de symptomatologie au repos. L'activité physique ordinaire entraîne fatigue, palpitation, dyspnée ou douleur angineuse.
III	Patients porteurs d'une maladie cardiaque limitant sévèrement leur activité. Les activités physiques moins intenses que les activités ordinaires entraînent fatigue, palpitation, dyspnée ou douleur angineuse.
IV	La moindre activité physique s'accompagne de symptômes. Ils peuvent être présents même au repos. Ils sont exagérés par le moindre effort.

1.2. Altérations du muscle squelettique de l'IC

L'intolérance à l'exercice et la fatigue musculaire précoce, symptômes caractéristiques de l'IC, sont très partiellement corrélés aux indices de performance myocardique (Franciosa et al. 1981; Myers & Froelicher 1991). « L'hypothèse musculaire » propose une participation majeure des altérations spécifiques du muscle squelettique périphérique (tableau 2) dans l'apparition de ces symptômes (Coats 1996; Poole-Wilson & Ferrari 1996).

1.2.1. Altérations intrinsèques des fibres musculaires

De nombreuses études réalisées sur des muscles squelettiques de patients IC et de modèles animaux d'IC démontrent d'importantes modifications. Ces anomalies concernent à la fois le métabolisme énergétique, le profil contractile et la structure même du muscle ainsi que le couplage excitation-contraction (Lunde et al. 2001).

a) Anomalies du métabolisme énergétique

Les changements métaboliques se caractérisent, lors d'un exercice à charge faible, par une déplétion anormalement rapide des réserves en phosphocréatine (PCr), suivie lors de la récupération, par une diminution de la vitesse de resynthèse de la PCr. Ceci reflète une sollicitation précoce du métabolisme glycolytique et une diminution du processus de la phosphorylation oxydative (Wilson et al. 1985; Massie et al. 1987; Massie et al. 1988). Par ailleurs, une acidose et une augmentation de la lactatémie précoces, associés à une augmentation d'enzymes glycolytiques (Schaufelberger et al. 1997), indiquent une prédominance du métabolisme glycolytique. A l'opposé, une diminution du volume mitochondrial, de la surface des crêtes (Drexler et al. 1992) et des enzymes du métabolisme oxydatif (Mancini et al. 1989; Sullivan et al. 1990; Arnolda et al. 1991; Wilson et al. 1993a; Simonini et al. 1996b) témoignent d'une altération du métabolisme oxydatif. Récemment, dans un modèle d'IC provoqué par sténose aortique chez le rat, De Souza et collaborateurs ont montré que la respiration mitochondriale et le système de transfert d'énergie des créatines kinases (CK) sont fortement altérés dans les muscles squelettiques rapides et lents (De Souza et al. 2000). Ceci suggère donc que les altérations musculaires observées chez des patients IC soient plutôt dues à une pathologie d'origine mitochondriale (De Souza et al. 2000). Cependant, Mettauer et collaborateurs ont montré une préservation des propriétés fonctionnelles des mitochondries du muscle Vaste externe de patients IC (Mettauer et al. 2001). D'autres facteurs systémiques ou circulatoires peuvent également affecter les muscles squelettiques.

b) Anomalies du profil contractile

Le muscle squelettique des IC se caractérise par une augmentation de la proportion des fibres de type IIx (rapide/glycolytique/sensible à la fatigue), une diminution de la proportion de fibres de type I (lent/oxydatif/résistant à la fatigue) et une atrophie des fibres de type IIa, IIx (Mancini et al. 1989; Sullivan et al. 1990; Massie et al. 1996; Schaufelberger et al. 1997). Cette redistribution des fibres squelettiques pourrait être due aux changements d'expression des chaînes lourdes de myosine observés chez les patients IC. Ces modifications d'expression de protéines contractiles sont caractérisées par une augmentation de l'expression de MHC-2x (Duscha et al. 1999) et une diminution, voir une inhibition totale de l'expression des MHC-1 chez certains patients (Mancini et al. 1989; Sullivan et al. 1997). D'autre part, la mise en évidence chez les patients IC, d'une corrélation positive entre la diminution du pic de VO₂ et

la réduction de la proportion des fibres de type I suggère que ces modifications des propriétés contractiles participeraient à leur intolérance à l'exercice (Mancini et al. 1989; Sullivan et al. 1997; Vescovo et al. 1998).

Des résultats similaires ont été retrouvés dans les modèles animaux d'IC, avec une diminution de la proportion des fibres de type I associée à une augmentation des fibres de type II (Sabbah et al. 1993; Simonini et al. 1996a) et à des changements de l'expression des chaînes lourdes de myosines (Simonini et al. 1996a; Simonini et al. 1996b). Toutefois, la diminution de la proportion des fibres de type I est controversée (Delp et al. 1997). Par ailleurs, une atrophie musculaire des fibres de type I, IIa et IIb dans les modèles animaux a aussi été rapporté (Delp et al. 1997).

c) Modifications morphologiques

Il a été observée une diminution de la masse musculaire des patients IC, associée notamment une atrophie des fibres musculaires (Wilson & Mancini 1990; Harrington et al. 1997; Shephard 1997; Vescovo et al. 2000). L'origine précise de cette diminution de la masse musculaire n'est pas encore bien établie. Elle pourrait être due à l'apoptose des fibres musculaires, du fait de l'observation d'une augmentation du nombre de noyaux à ADN fragmenté au sein de myocytes du vaste externe de patients IC (Vescovo et al. 2000) et du fait de l'existence d'une corrélation inverse entre le nombre de noyaux apoptotiques et le degré d'atrophie (Vescovo et al. 2000). La perte de noyaux entraînerait ainsi une atrophie plutôt qu'une destruction cellulaire (Allen et al. 1997). D'autre part, l'observation d'une augmentation de l'activité de la phosphatase acide, une enzyme protéolytique, suggère que cette dernière contribuerait également à cette atrophie musculaire (Lipkin et al. 1988).

Les observations concernant la densité capillaire demeurent toujours contradictoires. Une diminution de cette dernière a été rapportée par certains auteurs (Lipkin et al. 1988; Sullivan et al. 1990; Schaufelberger et al. 1996; Schaufelberger et al. 1997) mais elle n'a cependant pas été retrouvée dans d'autres études (Mancini et al. 1989; Schieffer et al. 1995; Magnusson et al. 1996). De même, les données sur le nombre de capillaires / fibre sont hétérogènes tant chez les patients que dans les modèles animaux d'IC (Mancini et al. 1989; Sullivan et al. 1990; Sabbah et al. 1993; Schieffer et al. 1995; Massie et al. 1996; Schaufelberger et al. 1996; Schaufelberger et al. 1997; Duscha et al. 1999).

Enfin, des études ont montré que la densité mitochondriale des muscles squelettiques des patients IC est diminuée par rapport à celle de sujets contrôles (Drexler et al. 1992; Hambrecht et al. 1997) (voir tableau 2).

1.2.2. Propriétés mécaniques du muscle squelettique dans l'IC

La contraction isométrique maximale du muscle quadriceps des patients IC est inférieure à celle des sujets contrôles (Lipkin et al. 1988; Magnusson et al. 1996), ce qui n'est pas le cas pour l'extenseur du genou et du coude (Minotti et al. 1991; Harridge et al. 1996; Massie et al. 1996). D'autre part, le muscle squelettique des patients IC est moins résistant à la fatigue (Minotti et al. 1991; Harridge et al. 1996; Magnusson et al. 1996; Massie et al. 1996; Schaufelberger et al. 1997) et plus rapide à se contracter et à se relaxer (Harridge et al. 1996). Ces observations sont en accord avec une augmentation de la proportion de fibres de type rapide en particulier de type IIX.

Dans les modèles animaux d'IC, il a été montré une augmentation de la fatigabilité des muscles lents et rapides, accompagnée parfois d'une diminution de la tension maximale développée pour différentes fréquences de stimulation, d'une diminution de l'activation et de la prolongation de la contraction. Ceci est en apparente contradiction avec la transition du profil contractile dans les muscle des animaux IC (Perreault et al. 1993; Lunde et al. 2001).

De même, De Souza et collaborateurs n'ont pas montré de changement des propriétés mécanique des muscles squelettiques lents et rapides (De Sousa et al. 2000)

1.3 Origines des anomalies du muscle squelettique

Trois facteurs à l'origine des anomalies du muscle squelettique dans l'IC peuvent être proposés. D'abord une réduction de l'approvisionnement du muscle en oxygène et nutriments, consécutif à une diminution du flux sanguin musculaire et/ou des altérations des propriétés des capillaires des fibres squelettiques. D'autre part, ces anomalies du muscle squelettique peuvent aussi être, comme cela a été observé chez les sujets sains désentraînés, une conséquence de la réduction de l'activité musculaire.

1.3.1 Densité capillaire et flux sanguin du muscle squelettique

Comme nous l'avons précédemment noté, la perfusion du muscle squelettique est réduite au repos et à l'effort suite à la réduction du débit cardiaque, la stimulation excessive des systèmes vasoconstricteurs et la diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante. Les données chez les patients et modèles animaux d'IC, concernant le flux sanguin sont hétérogènes et montrent tant une diminution de ce dernier (Wilson et al. 1984b; Drexler et al. 1987; Sullivan et al. 1989; Toussaint et al. 1996) qu'une absence d'altérations de la perfusion musculaire ou de lien entre ce paramètre et les anomalies du muscle squelettique (Wiener et al. 1986; Massie et al. 1988; Minotti et al. 1991).

La distribution des substrats énergétiques et de l'oxygène intra-tissulaire dépend des propriétés des capillaires bordant les fibres musculaires. Des changements de l'ultrastucture de la microvascularisation du muscle squelettique pouvant altérer la diffusion des substrats ont été décrits chez les patients IC (Longhurst et al. 1975; Lindsay et al. 1994). La détermination de la désoxygénation de l'hémoglobine et de la myoglobine lors d'un exercice ou pendant la récupération permet d'évaluer l'hypoxie tissulaire. Ces paramètres ne sont pas altérés ou ne semblent pas impliqués dans les anomalies du muscle squelettique de patients IC (Mancini et al. 1994; Hanada et al. 2000). Il ressort de ces études que le défaut majeur serait une incapacité du muscle à utiliser l'oxygène plutôt qu'une altération de l'apport de cet oxygène.

1.3.2. Le déconditionnement musculaire

Parce que les changements du profil contractile et métabolique peuvent être partiellement restaurés par un entraînement physique, le déconditionnement a été proposé comme facteur causal important de la diminution de la performance musculaire. En effet, une amélioration significative de la tolérance maximale à l'exercice après un entraînement d'intensité modérée, s'accompagne d'une amélioration du métabolisme énergétique (Adamopoulos et al. 1993; Hambrecht et al. 1995; Hambrecht et al. 1997) et d'une redistribution des fibres de type II vers I (Hambrecht et al. 1997). Du fait de l'invalidité due à la maladie et de la fatigue musculaire précoce, les patients IC réduisent considérablement leurs activités physiques. Dès lors, il n'est pas étonnant que les caractéristiques du muscle squelettique dans l'IC soient proches de celles décrites chez des sujets sédentaires (Chati et al. 1996) ou immobilisés sur une longue période (Ferretti 1997). Cependant, le modèle de déconditionnement musculaire chez le rat par suspension du train arrière induit des changements identiques à ce qui est décrit dans l'IC, uniquement pour les propriétés contractiles (Desplanches et al. 1991; Bigard et al. 1998). Il n'a aucun effet sur le compartiment mitochondrial (Desplanches et al. 1991; Bigard et al. 1998). D'autre part des études de mesure de l'activité locomotrice de rats IC rejette l'hypothèse d'une inactivité responsable des altérations du muscle squelettique (Simonini et al. 1996a; Michel et al. 1998).

L'ensemble de ces données démontre clairement que le muscle squelettique périphérique est altéré dans l'insuffisance cardiaque (Tableau 2). Cette altération s'explique en partie par des changements du phénotype musculaire qui consistent en une transition de l'expression des myosines de type I vers le type II et d'une diminution du métabolisme

oxydatif au profit d'une augmentation du métabolisme glycolytique. Cette altération des caractéristiques du muscle pourrait être en partie à l'origine de l'incapacité à l'effort des ces patients.

Tableau 2 : Altérations musculaires dans l'insuffisance cardiaque

	Marqueurs	Effets	Références
Surface de section des fibres	Type IIa et IIb	↓	Mancini et al 1989
	Type IIb	↓	Sullivan et al 1990
	Type I et Type IIa	=	Sullivan et al 1990
	Type IIa, IIab, IIb	=	Massie et al 1996
	Type I	↓	Schaufelberger et al 1997
	Type IIb	↑	Schaufelberger et al 1997
	Type IIa, IIc	=	Schaufelberger et al 1997
Protéines contractiles	Fibres type IIb	↑	Mancini et al 1989
	Type IIb	↑	Sullivan et al 1990
	Type I	↓	Sullivan et al 1990
	Type I	↓	Drexler et al 1992
	Type I	↓	Massie et al 1996
	Type IIab	↑	Massie et al 1996
	MHC1	↓	Sullivan et al 1997
	MHC2a	↓	Sullivan et al 1997
	MHC2x	=	Sullivan et al 1997
	MHC2x	↑	Schaufelberger et al 1997
	MHC2x	↑	Duscha et al 1999
	MHC1, 2a, 2x	↑	Mettauer et al 2001
		=	
Capillarisation	Capillaires/fibre	↓	Sullivan et al 1990
	Densité capillaire	=	Sullivan et al 1990
	Densité capillaire	↓	Drexler et al 1992
	Capillaires/fibre	=	Massie et al 1996
	Capillaires/fibre	↓	Schaufelberger et al 1997
	Densité capillaire	=	Schaufelberger et al 1997
	Capillaires/fibre	↓	Duscha et al 1999
Mitochondries	HADH	↓	Mancini et al 1989
	CS	=	Mancini et al 1989
	SDH, CS, HADH	↓	Sullivan et al 1990, 1991
	V. mitochondrial, COX	↓	Drexler et al 1992
	SDH	↓	Massie et al 1996
	CS, HADH	↓	Schaufelberger et al 1997
	HADH, SDH	↓	Duscha et al 1999
	CS, MDH, COX	↓	Duscha et al 1999
	mi-CK	=	Hambrecht et al 1999
	CS, CK	↓	Mettauer et al 2001
	V ₀ , V _{max} , Km, ACR	↓	Mettauer et al 2001
	=		
Glycolyse	PFK, LDH	=	Mancini et al 1989
	CK, LDH, PFK, HK, PK	=	Sullivan et al 1990
	Lactate	↑	Sullivan et al 1991
	LDH, lactate	↑	Schaufelberger et al 1997
	LDH, HK, PFK	=	Duscha et al 1999
	LDH	↓	Mettauer et al 2001

MHC : chaînes lourde de myosine; HADH : hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; CS : citrate

synthase; SDH : succinate déshydrogénase; V. : densité volumique; COX : cytochrome oxydase; MDH : malonate déshydrogénase; mi-CK : créatine kinase mitochondriale; PFK : phosphofructokinase; LDH : lactate déshydrogénase; CK : créatine kinase; HK : hexokinase; PK : pyruvate kinase; V_0 V_{max} , Km, ACR : caractéristiques fonctionnelles de la respiration mitochondriale (voir matériel et méthodes).

2. LA TRANSPLANTATION CARDIAQUE (TC)

2.1. Histoire des greffes d'organes

L'histoire de la transplantation d'organes est jalonnée d'étapes essentielles, témoignant d'une intense activité de recherche :

- En 1908, les travaux d'Alexis Carrel jettent les bases de la transplantation en réalisant la première greffe de rein chez l'animal.
- En 1933, la première greffe de rein chez l'homme est contemporaine des progrès de la recherche sur le système immunitaire et les principes du traitement anti-rejet.
- En 1960, on commence à utiliser de manière systématique des médicaments anti-rejet ou immunosuppresseurs.
- En 1967, la réflexion éthique et la définition de la "mort cérébrale" permettent de surmonter l'obstacle moral du prélèvement d'organe. La première greffe cardiaque humaine est réalisée le 3 décembre de cette même année en Afrique du Sud par le professeur Christian Barnard.
- En 1968, quelques mois seulement après Christian Barnard, le chirurgien français Jean-Paul Cachera réalise la première transplantation cardiaque en Europe.
- En 1980, l'utilisation d'un puissant immunosuppresseur, la ciclosporine, fait le succès de la transplantation dont la pratique, sans être banalisée, se généralise.

2.2. La transplantation cardiaque

Aujourd'hui, la greffe cardiaque représente un traitement de choix de l'insuffisance cardiaque terminale. La survie moyenne annuelle des sujets TC est passée de 40% à plus de 80% à 1 an et à 65% à 5 ans (Hosenpud et al. 1999; John et al. 1999). Cependant, la mise en place d'un organe à priori normal ne corrige pas totalement incapacités fonctionnelles des sujets greffés. Ils ont en effet une capacité maximale à l'exercice qui reste limitée à environ 60% de celle de sujets contrôles sédentaires appariés et qui retentit sur leur qualité de vie (Braith & Edwards 2000). Longtemps mis sur le seul compte de la dénervation cardiaque induite par l'opération

(Pope SE 1980), ce handicap est progressivement apparu d'origine plus complexe, combinant des anomalies centrales des échanges et du transport de l'oxygène, et les anomalies périphériques microvasculaires et/ou musculaires (Braith & Edwards 2000). Ces mécanismes restent encore mal connus. Pourtant ce handicap est, au moins partiellement, accessible à des actions thérapeutiques, notamment au réentraînement (Braith 1998).

2.3. Le handicap physique du TC

L'ensemble des auteurs s'accorde sur une limitation de la capacité aérobie maximale des sujets TC se situant entre 50 et 65% de la capacité normale de sujets sédentaires appariés. Cette capacité évolue au cours des mois suivant la transplantation, avec une puissance maximale tolérée plus importante à un an (où elle se stabilise) qu'à trois mois (Labovitz et al. 1989; Quigg et al. 1989; Rudas et al. 1992; Mandak et al. 1995). Au-delà d'un an, aucune modification de la capacité aérobie maximale n'est observée sans réentraînement jusqu'à quatre et cinq ans après l'opération, malgré la réduction associée des doses de ciclosporine.

Des travaux de notre équipe (Mettauer et al. 1991; Geny et al. 1996; Lampert et al. 1996b; Lampert et al. 1996c; Mettauer et al. 1996; Mettauer et al. 2000) ont déterminé cette capacité à l'exercice de sujets TC et montrent un pic de VO_2 limité à 67% de celui des sujets sédentaires sains. Ces études montrent également que le seuil ventilatoire ou le seuil lactate apparaît précocement chez le greffé cardiaque. Ceci témoigne d'un niveau important de désentraînement chez ces sujets et d'un recours précoce aux mécanismes glycolytiques de production d'énergie.

Cependant, dans de rares cas de sujets TC très entraînés, des performances sportives remarquables ont été rapportées après transplantation cardiaque (Richard et al. 1999), avec un pic de VO_2 atteignant, voir dépassant, les valeurs prédites pour des sujets sains sédentaires (Kao et al. 1994).

Le remplacement du cœur défaillant par un greffon fonctionnellement satisfaisant n'entraîne pas un retour à la normale de la capacité à l'exercice. Cette dernière reste limitée à environ 60-65% de celle d'un sujet sédentaire sain apparié, avec des conséquences sur leur qualité de vie. Parmi les hypothèses avancées pour expliquer l'origine de cette limitation physique, on peut citer:

- *la persistance des anomalies musculaires de l'insuffisance cardiaque sévère,*
- *la dénervation cardiaque initiale et une réinnervation fonctionnelle incertaine,*
- *la toxicité potentielle du traitement immunosuppresseur.*

2.4. Altérations centrales : dénervation et reinnervation cardiaque

2.4.1. Réinnervation du cœur transplanté

La transplantation cardiaque orthotopique a posé le problème de la dénervation chirurgicale du cœur et par conséquent le problème de l'absence totale, du moins pendant les premiers temps suivant la greffe, du contrôle nerveux de l'activité cardiaque. La question d'une éventuelle réinnervation au cours du temps chez l'homme, a suscité un intérêt considérable de la part des cliniciens et des physiologistes en raison des observations faites chez l'animal. En effet, dans la majorité des modèles animaux, une réinnervation anatomique fonctionnelle a été mise en évidence entre le troisième et le douzième mois après transplantation (Kontos et al. 1970; Kaye et al. 1977). Chez l'homme, l'évidence d'une réinnervation cardiaque est plus équivoque. Cependant, plusieurs études ont évoqué la possibilité d'une réinnervation cardiaque (Schwaiger et al. 1991; Wilson et al. 1991; Wilson et al. 1993b; Guertner et al. 1995); (Bernardi et al. 1995), mais sans répercussion positive sur la capacité à l'exercice (Mandak et al. 1995). Si pour plus de 50% des patients, l'existence d'une réinnervation orthosympathique parcellaire ne fait plus de doute, notamment au niveau de la base du cœur à distance du nœud sinusal du greffon (Schwaiger et al. 1991; Wilson et al. 1991), la question de la signification fonctionnelle de cette réinnervation reste également controversée (Mancini 1997; Braith & Edwards 2000). Chez le transplanté cardiaque à plus de deux ans de greffe, une réponse sinusale à la stimulation sympathique a été rapportée (Wilson et al. 1993b; Bernardi et al. 1995).

2.4.2. Physiologie du cœur transplanté

a) La mesure du débit cardiaque

Le débit cardiaque de repos des sujets TC a généralement été rapporté comme étant normal (Pflugfelder et al. 1987; Kavanagh et al. 1988; Mettauier et al. 1991; Kao et al. 1994; Geny et al. 1996; Mettauier et al. 1996). Cette normalisation est obtenue grâce à une fréquence cardiaque relativement élevée, proche de la fréquence de décharge intrinsèque du nœud sinusal, et d'un volume d'éjection systolique abaissé (Cohen-Solal et al. 1994), en raison de l'altération de la fonction diastolique (Paulus et al. 1992; Kao et al. 1994).

A l'effort maximal, le débit cardiaque apparaît 20 à 50% inférieur à celui habituellement observé chez des sujets sédentaires normaux (Pflugfelder et al. 1987; Pflugfelder et al. 1988; Rudas et al. 1990; Rudas et al. 1992; Kao et al. 1994; Braith & Edwards 2000). Sa valeur

répond cependant à celle de la charge maximale ou du pic de VO_2 correspondant. Initialement, la plupart des auteurs attribuaient à ce débit cardiaque maximal réduit, le principal rôle limitant dans la capacité à l'exercice des sujets TC (Savin et al. 1980; Cohen-Solal et al. 1994), notamment en raison de l'incompétence chronotrope à l'exercice (Gullestad et al. 1996). Cependant le caractère limitant du débit cardiaque pour la capacité à l'exercice est actuellement discuté. En effet, des fréquences maximales avoisinant la fréquence maximale théorique ont pu être enregistrées, soit après un entraînement (Kavanagh et al. 1988; Richard et al. 1999), soit lors de pratiques sportives (Richard et al. 1999).

Malgré la dysfonction diastolique ventriculaire du greffon (Cohen-Solal et al. 1994), l'ensemble des auteurs s'accorde à attribuer un rôle important au mécanisme de Franck-Starling pour expliquer l'augmentation du débit cardiaque à l'effort (Mettauer et al. 1991; Geny et al. 1996; Mettauer et al. 1996; Braith & Edwards 2000).

b) La fonction chronotrope

La fonction chronotrope qui échappe au contrôle nerveux, a été abondamment étudiée après transplantation cardiaque. Au repos le rythme cardiaque est plus rapide et se rapproche de la fréquence propre du nœud sinusal, car le cœur dénervé n'est plus soumis au tonus vagal freinateur (Savin et al. 1980; Quigg et al. 1989; Mandak et al. 1995). A l'effort, la fréquence cardiaque augmente mais de façon retardée (Pope SE 1980) pour atteindre une fréquence maximale qui reste cependant inférieure à celle du sujet sain (Savin et al. 1980; Kavanagh et al. 1988; Bussières et al. 1995). La réponse chronotrope semble provoquée initialement par une stimulation mécanique du pacemaker sinusal, résultant de la distension initiale de la paroi auriculaire due à l'augmentation du retour veineux (Bernardi et al. 1989). Puis le pacemaker réagit aux catécholamines circulantes avec une augmentation de la fréquence cardiaque proportionnelle à la concentration sanguine de noradrénaline (Pope SE 1980; Degre et al. 1987; Quigg et al. 1989; Perini et al. 1993), elle-même dépendante de la masse musculaire mise en jeu par l'effort (Savard et al. 1989). Cette fréquence cardiaque maximale augmente avec les mois suivant la transplantation (Mandak et al. 1995; Mercier et al. 1996) et avec l'entraînement (Kavanagh et al. 1988; Keteyian et al. 1991).

La fonction chronotrope reste sous contrôle neurohormonal. Au repos, l'administration d'un β -bloquant diminue la fréquence cardiaque (Bexton et al. 1983; Leenen 1995). La densité des récepteurs β adrénergiques qui transmettent à la cellule le stimulus catécholamine n'augmente pas après la dénervation cardiaque chez l'homme (Zerkowski et al. 1991), contrairement à ce

qui a été observé chez le chien (Vatner et al. 1985). Au niveau des protéines impliquées dans la transmission du signal adrénérgique, une diminution de la transcription de la protéine G activatrice a été mise en évidence. A l'arrêt de l'effort, la fréquence cardiaque ne diminue pas immédiatement ou continue même d'augmenter pendant une à deux minutes (Labovitz et al. 1989), contrairement au sujet normal. Par la suite, la diminution de la fréquence semble plutôt linéaire (Savin et al. 1980) et sa cinétique de décroissance est significativement prolongée.

2.5. Altérations périphériques : Le muscle squelettique du TC

Les altérations musculaires des patients IC, précédemment décrites, ne semblent pas restaurées après la transplantation cardiaque. De plus, le traitement immunosuppresseur, particulièrement la ciclosporine, pourrait jouer un rôle important dans cette altération périphérique et ainsi contribuer à maintenir le handicap physique observé chez les sujets TC (Braith & Edwards 2000).

2.5.1. L'ultrastructure et le métabolisme du muscle squelettique du TC

Une augmentation précoce de la lactatémie (Mettauer et al. 1996; Schaufelberger et al. 2001) et une diminution de la différence artérioveineuse en oxygène (Bussières et al. 1995; Kao et al. 1995; Mettauer et al. 1996), ont suggéré l'existence d'une insuffisance métabolique dans le muscle squelettique du transplanté cardiaque. Stratton et collaborateurs ont montré, par RMN au phosphore 31, un rapport PCr/(PCr+Pi) diminué, une vitesse de resynthèse de la PCr réduite, et un pH réduit, dans la période postopératoire précoce (Stratton et al. 1994). Ceci reflète, comme chez le patient IC, une sollicitation précoce du métabolisme glycolytique et une diminution du processus de la phosphorylation oxydative. Toutefois, ces modifications s'améliorent avec le temps mais restent limitées par rapport aux sujets sains (Stratton et al. 1994). D'autre part, une diminution de l'activité de la citrate synthase a été montrée par Schaufelberger et collègues (Schaufelberger et al. 2001), ce qui suggère une diminution du métabolisme oxydatif.

Des travaux de notre équipe ont analysé en microscopie électronique quantitative (Lampert et al. 1996b), des échantillons de muscle Vaste Externe chez des sujets TC stabilisés (plus de six mois après la greffe). Nous avons montré que : 1) la densité volumétrique mitochondriale des transplantés est similaire à celle des sujets sains sédentaires, 2) la capillarité, en terme de densité capillaire et de rapport capillaires/ fibre, est diminuée chez les transplantés, 3) la densité volumétrique des mitochondries n'est pas corrélée à la VO₂ pic chez les transplantés, contrairement à ce qui est observé chez les sujets sains témoins, 4) la relation entre la densité

mitochondriale et la densité capillaire est conservée chez les transplantés, mais elle est déplacée vers des valeurs plus basses de capillarité. Une autre étude plus récente a également confirmé la persistance des anomalies de la capillarité du muscle squelettique de ces sujets TC (Schaufelberger et al. 2001).

2.5.2. La circulation périphérique

En plus de la diminution de la capillarité, la capacité vasodilatatrice significativement altérée chez les patients IC, n'est également pas restaurée après transplantation cardiaque. On observe plutôt une augmentation de la résistance vasculaire périphérique (Braith & Edwards 2000). La vasodilatation endothélium-indépendante (sensible aux donneurs de NO) est bien préservée chez les sujets TC, ce qui indique que la réduction de la capacité vasodilatatrice résulte d'un défaut de synthèse ou de disponibilité de NO, plutôt que d'une altération propre du muscle lisse vasculaire (Andreassen et al. 1998a; Andreassen et al. 1998b). Les mécanismes à l'origine de l'altération de la synthèse du NO ou de sa disponibilité sont encore mal connus mais les atteintes endothéliales provoquées par CsA ont été désignées comme les principales causes (Hornig et al. 1996). De plus, la CsA affecte également l'équilibre des autres agents vasoactifs, en empêchant la production endothéliale de la prostacycline, un puissant vasodilatateur, et en stimulant la production d'endothéline, un puissant vasoconstricteur (Drexler 1997; Hambrecht et al. 1998). Deux études ont rapporté que la capacité vasodilatatrice des sujets TC est significativement corrélée à leur capacité à l'exercice. Andreassen (Andreassen et al. 1998b) a démontré que les réponses vasodilatatrices à l'acétylcholine dans les membres supérieurs (réponses endothélium-dépendante) étaient significativement corrélées à la VO_2 max de ces sujets TC, mais pas chez les sujets sains contrôles. Ceci suggère que l'altération de la production de NO endothéliale, observée chez ces sujets, contribue à leur incapacité à l'exercice (Andreassen et al. 1998b). Bussières et collaborateurs (Bussieres et al. 1995) ont rapporté chez les TC, des corrélations significatives entre la diminution du pic de VO_2 et la résistance vasculaire périphérique à l'exercice maximal d'une part, et la différence artérioveineuse d'autre part (Braith & Edwards 2000).

2.5.3. Les propriétés mécaniques du muscle squelettique du sujet TC

Comme nous l'avons déjà souligné dans une section précédente, les sujets TC présentent une VO_2 pic diminuée par rapport à celle de sujet sains contrôles appariés en âge. Les mécanismes suspectés d'être à l'origine de cette atténuation sont:

- la diminution de l'index cardiaque au maximum de l'effort,

- la diminution de la capacité oxydative du muscle périphérique,
- l'altération de la capacité de diffusion pulmonaire.

Cependant, il faut signaler la participation de l'atrophie et de la fatigue musculaire, qui sont des déterminants particulièrement importants dans la mesure de la capacité à l'exercice de ces sujets. En effet, la faiblesse musculaire peut entraver la mesure de la VO_2 pic, du fait que les tests d'effort réalisés sur ergocycle et sur tapis roulant, sont des tests qui sollicitent une forte participation de la musculature des jambes. Dans le cas des sujets TC, une douleur, une faiblesse et une fatigue musculaire des membres inférieurs ont fréquemment été rapportés au cours de tests d'effort ou d'activités physiques quotidiennes (Savin et al. 1980; Mercier et al. 1996). La mesure de la force musculaire développée au cours d'un test d'extension du genou (quadriceps) chez des sujets TC, a montré des valeurs qui ne représentent que 60 à 70% de celles de sujets sédentaires sains appariés en âge, mais qui sont plutôt identiques à celles de sujets désentraînés et sédentaires âgés de 70 à 79 ans (Braith et al. 1993). De plus, il a été montré dans la même étude que cette force musculaire est étroitement corrélée à la VO_2 pic, avec un coefficient plus important chez les sujets TC ($r=0.90$) que chez les sujets sains contrôles ($r=0.65$). D'autre part, Schauffelberger et collaborateurs ont également montré cette diminution de la force musculaire qui persiste plusieurs mois après la transplantation (Schauffelberger et al. 2001). Ces données montrent que chez les sujets normaux, la VO_{2max} est plutôt limitée par la fonction cardiovasculaire, contrairement aux sujets TC chez lesquels l'atrophie et la faiblesse musculaire, probablement induites par les immunosuppresseurs, pourraient représenter le premier facteur limitant de la capacité aérobie et de la performance physique (Braith & Edwards 2000).

Les données actuelles des études réalisées chez le sujet transplanté cardiaque suggèrent que les propriétés métabolique et contractile du muscle squelettique ne soient pas normalisées même après restauration de la plupart des paramètres hémodynamiques, et demeurent anormales longtemps après transplantation (tableau 3). Cependant, la densité mitochondriale est similaire à celle du sujet normal. Toutefois, on ne peut conclure quant à la fonctionnalité de ces mitochondries musculaires, déjà préservée dans l'insuffisance cardiaque terminale (Mettauer et al., 2001).

Tableau 3 : Altérations musculaires du sujet transplanté cardiaque

	Marqueurs	Effets	normalisation	Références
Surface de section des fibres	Type I et IIa	↑↑	<	Bussièrès et al 1997
	Type IIb	↑↑	<	Bussièrès et al 1997
Protéines contractiles	Fibres type II	↑↑	<	Bussièrès et al 1997
	Type IIb	=	>	Schaufelberger et al 2001
	Type I	=	=	Schaufelberger et al 2001
	Type IIa, IIc	=	=	Schaufelberger et al 2001
Capillarisation	Capillaires/fibre	↓↓	<	Lampert et al 1996
	Densité capillaire	↓↓	<	Lampert et al 1996
	Capillaires/fibre	↓↓	<	Bussièrès et al 1997
	Capillaires/fibre	↓↓	<	Schaufelberger et al 2001
	Densité capillaire	↓↓	<	Schaufelberger et al 2001
Mitochondries	PCr/(PCr+Pi)	↑↑	>	Stratton et al 1994
	Synthèse PCr	↓	<	Stratton et al 1994
	CS, HADH	↑↑	<	Bussièrès et al 1997
	V. mitochondrial	=	=	Lampert et al 1996
	CS	↓	<	Schaufelberger et al 2001
	HADH	=	=	Schaufelberger et al 2001
	Vmax	↑↑	=	Stratton et al 1994
Glycolyse	PFK	↑↑		Bussièrès et al 1997
	Lactate, LDH	=	=	Schaufelberger et al 2001

B. LES TRAITEMENTS IMMUNOSUPPESSEURS

1. LES IMMUNOSUPPESSEURS

Après la transplantation d'organes, la reconnaissance des cellules allogéniques du donneur par les lymphocytes du receveur aboutit à la réaction de rejet. Lors de la différenciation cellulaire et de l'expansion clonale induites par l'antigène, les cellules T inducteurs/auxiliaires sécrètent différentes cytokines, notamment l'interleukine 2 (IL-2), nécessaires à l'amplification de la réponse immune et à la prolifération des cellules T et B effectrices du rejet. Les traitements immunosuppresseurs ont pour but d'inhiber cette réaction et chaque agent utilisé peut avoir une action prédominante, sinon sélective, sur l'une des étapes de la réponse immune. Nous nous limiterons dans cette étude à la ciclosporine (chef de file des immunosuppresseurs), son mode d'action immunosuppresseur, et aux arguments en faveur ou non de sa toxicité musculaire.

1.1. La ciclosporine

1.1.1. Structure et activité

La ciclosporine A (CsA) est un polypeptide cyclique, d'origine fongique (*Tolyplocadium inflatum gams*), et doué d'une activité immunosuppressive découverte par Borel en 1976 (Borel et al. 1994). Elle est composée de onze acides aminés dont un est unique, avec un poids moléculaire total de 1203 Da (voir figure 1). Au niveau de ses propriétés physiques, la CsA est insoluble dans l'eau (hydrophobe) mais soluble dans l'huile (lipophile) et dans l'alcool. Cette propriété lipophile facilite son passage à travers les membranes cellulaires, ce qui lui permet d'atteindre et de se lier à son récepteur cytosolique. Le récepteur de la CsA est une protéine cytosolique ubiquitaire de 17-kDa appelée cyclophiline, premier membre de la famille des immunophilines dont l'activité peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase est inhibée par la fixation de la CsA. L'introduction depuis 1983 de la CsA dans le domaine de la transplantation d'organes, en tant qu'agent immunosuppresseur, a considérablement amélioré la survie des organes transplantés. Son application clinique s'est par la suite étendue au traitement d'un certain nombre d'affections auto-immunes telles que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome néphrotique. Outre ce succès thérapeutique, la CsA a largement été utilisée comme outil pharmacologique en recherche fondamentale, par exemple pour étudier les voies de transduction de certains signaux cellulaires.

1.1.2. Mécanismes d'actions des immunosuppresseurs

L'effet immunosuppresseur de cette molécule est liée à sa capacité à bloquer de façon sélective, à un stade précoce, l'activation des lymphocytes T auxiliaires ("helpers"). La CsA agit donc principalement sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

a) action sur la voie de signalisation calcineurine/NFAT

Il a été montré que le complexe CsA-cyclophiline inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine des cellules T (voir figure 2). La calcineurine appartient à la superfamille des phosphatases de protéines renfermant un sérine/thréonine et son activité est étroitement régulée par la calcium-calmoduline (Klee et al. 1988; Shenolikar 1994). Elle est formée de deux sous-unités codées par deux gènes différents, une sous-unité catalytique (calcineurine A, CnA) et une sous-unité régulatrice (calcineurine B, CnB). Il existe deux isoformes de la CnA, la CnA α , qui est l'isoforme majoritairement exprimée dans les cellules T (Zhang et al. 1996), et la CnA β . La liaison des récepteurs des cellules T (RCT) avec leurs ligands va induire une élévation intracellulaire de la concentration de calcium qui va entraîner l'activation de la calmoduline. La calmoduline active va ensuite interagir avec la CnA pour libérer son site inhibiteur de son site actif, conduisant à l'activation de son activité phosphatase. Le complexe

CsA-cyclophiline se lie directement à la CnA et inhibe son activité phosphatase. La calcineurine active déphosphoryle les facteurs de transcription de la famille NFAT, ce qui leur permet de se transloquer dans le noyau où il se fixe à l'ADN sur une séquence NRE (NFAT Response Element) correspondant à son site de liaison, pour activer l'expression des gènes (Flanagan et al. 1991; Timmerman et al. 1996). Ce sont les isoformes NFAT1, NFAT2, et NFAT4 qui sont impliqués dans l'activation de la transcription des gènes codant pour certaines cytokines telles que l'interleukine-2 (IL-2) et l'interleukine-4 (IL-4). IL-2 est produite exclusivement par les cellules T "helpers" actives et elle permet notamment : 1) l'expansion des lymphocytes T actives (précurseurs des lymphocytes cytotoxiques); 2) la prolifération et la différenciation des lymphocytes B; 3) l'augmentation de la capacité cytotoxique des lymphocytes T_{cytotoxiques} et des monocytes. Par ailleurs, la CsA agit aussi, mais à un degré moindre, sur la réponse immunitaire à médiation humorale en inhibant la formation d'anticorps (IgM, IgG), en réponse aux antigènes thymo-dépendant, mais elle n'influence pas, ou peu, la production d'anticorps contre les antigènes thymo-indépendants. Toutefois, la CsA est dépourvue d'effet sur l'hématopoïèse, la phagocytose et les cellules tumorales. Outre l'avantage de n'atteindre qu'une catégorie de cellules immunocompétentes, le blocage de la production d'IL-2 est réversible. Ainsi, la suspension du traitement immunosuppresseur par la CsA peut déclencher une réaction de rejet du greffon ou la reprise de la maladie initiale.

En empêchant la déphosphorylation des facteurs NFAT par la calcineurine (figure 2), la ciclosporine inhibe leur translocation dans le noyau et par conséquent, l'activation de leurs gènes dans les cellules T actives. L'inhibition de la voie de la calcineurine/NFAT est sans contexte l'un des mécanismes de l'immunosuppression médiée par la CsA.

b) Action sur la voie de signalisation JNK/ p38

l'activation de la transcription des gènes de IL-2 nécessite une interaction coopérative de plusieurs facteurs de transcription tels que AP-1, NF- κ B et NFAT (Crabtree 1989; Matsuda & Koyasu 2000). Il a été montré que la CsA affecte les activités de AP-1 et NF- κ B, en plus de NFAT, ce qui implique la présence d'autre(s) cible(s) de la CsA, tout comme la voie de la calcineurine/NFAT (Mattila et al. 1990; Rincon & Flavell 1994). Il a également été montré que la CsA pouvait inhiber une réponse antigène-spécifique et calcium-indépendante (Metcalf et al. 1994). En effet, des études récentes ont pu démontrer que la CsA, en plus de la voie de la calcineurine/NFAT, inhibait à la fois les voies de signalisation de JNK et p38 (Su

& Karin 1996). Par ailleurs, il a été montré que JNK et p38 sont tous deux activés lorsque les réponses des cellules T sont déclenchées par l'intermédiaire des RCTs et des récepteurs CD28 et que ces voies sont sensibles à la CsA (Su et al. 1994; Matsuda et al. 1998). L'existence des deux voies de signalisation cibles de la CsA (calcineurine et JNK/p38) dans les cellules T, pourrait expliquer la grande spécificité des effets immunosuppresseurs de la CsA.

1.1.3. Arguments en faveur d'une toxicité musculaire de la ciclosporine A

a) Le muscle squelettique

Après les premières descriptions de Goy et collaborateurs (Goy et al. 1989), plusieurs auteurs ont rapporté l'apparition de myopathies chez des patients sous ciclosporine (Fernandez-Sola et al. 1990; Arellano & Krupp 1991). Fernandez-Sola et collaborateurs (1990) décrivent une atrophie des fibres de type II, des zones de nécroses segmentaires, une segmentation des myofibrilles, des dépôts glycogéniques et des mitochondries anormales chez des patients sous ciclosporine (Fernandez-Sola et al. 1990). Biring et collègues ont montré chez le rat que la ciclosporine induit une altération du profil métabolique, avec des diminutions de l'activité de certains enzymes oxydatifs comme la succinate déshydrogénase (SDH), et de la capillarité. Le profil contractile en terme de proportion, de surface de section et de contenu en chaîne lourde de myosine des fibres musculaire squelettique, n'était pas modifié (Biring et al. 1998). Récemment, Bigard et collaborateurs ont étudié les effets propres de la molécule active de ciclosporine (CsA *per se*) et de son excipient sur la phénotype musculaire de rat (Bigard et al. 2000). Au niveau du phénotype contractile, ils ont observé dans le soléaire d'animaux traités par la ciclosporine, une diminution de la proportion des myosines lourdes de type 1 (MHC-1) et une augmentation de la proportion de myosine lourdes de type 2A (MHC-2A), contrairement au muscle plantaris qui ne présente aucun changement d'isoforme de MHC. La typologie des fibres confirme cette tendance dans le soléaire des animaux traités à la ciclosporine, avec une diminution des fibres de type I et une augmentation des fibres de type IIA. Ces mêmes modifications sont également retrouvées pour les isoformes de SERCA (SERCA1 l'isoforme rapide et SERCA2a l'isoforme lente). De plus, de fortes corrélations ont été observées entre les pourcentages de fibres exprimant MHC-1 et celui des fibres exprimant SERCA 2a, de même qu'entre MHC-2A et SERCA1. Ces résultats semblent indiquer une corégulation de l'expression de ces deux familles de protéines de la calcineurine et suggèrent que dans les muscles oxydatifs tels que le soléaire, la ciclosporine *per se*, en inhibant la voie de la calcineurine, induit une transition vers un phénotype contractile plus rapide. En ce qui

concerne les propriétés métaboliques de ces muscles, cette étude montre une augmentation de l'activité de la créatine kinase (CK), de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la citrate synthase (CS), exclusivement dans les muscles lents (soléaire) des animaux traités par la ciclosporine. Tous ces résultats montrent qu'alors que la ciclosporine *per se* entraîne, dans le soléaire, une transition vers un phénotype contractile plus rapide, c'est à dire de MHC-1 vers MHC-2A, les propriétés métaboliques de ce dernier deviennent plus oxydatives. En effet, chez le rat, les fibres squelettique de type IIA possèdent un potentiel oxydatif supérieur à celui des fibres de type I (Smith et al. 1988). L'excipient de la ciclosporine quant à lui n'a aucun effet ni sur le phénotype métabolique ni sur le phénotype contractile. Cependant, les effets de la ciclosporine *per se* et/ou de son excipient n'ont pas été étudiées sur la fonction mitochondriale des muscles striés et sur sa régulation.

b) Le muscle cardiaque

La possibilité d'une toxicité cardiaque de la ciclosporine a déjà été évoquée devant des anomalies histologiques du myocarde chez le rat. Des cas de fibroses interstitielles myocardiques (Karch & Billingham 1985), voir de défaillance cardiaque (Laczkovics et al. 1987) ont été imputés à la ciclosporine. Des études *in vitro* ont montré que la ciclosporine augmente le calcium libre cytosolique (Olbrich et al. 1993), au moins partiellement par inhibition de la Ca^{2+} ATPase et par une libération accrue du Ca^{2+} sarcoplasmique (Banijamali et al. 1993). Les effets néfastes de la ciclosporine sur le myocyte pourraient aussi provenir d'une diminution d'activité de l'adénine nucléotide translocase (Crompton et al. 1992; Novgorodov et al. 1992). Par contre, la ciclosporine a montré *in vitro* un effet protecteur lors de la reperfusion après ischémie en inhibant la formation des pores de perméabilité au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Duchen et al. 1993; Griffiths & Halestrap 1993). Chez l'homme, la toxicité myocardique éventuelle de la ciclosporine n'a jamais été spécifiquement explorée. Pourtant, les données de Paulus et collaborateurs pouvaient indirectement suggérer la présence d'une diminution de la recapture diastolique du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (Paulus et al. 1992). Bien que cette diminution ait été imputée par ces auteurs à la diminution du tonus orthosympathique due à la dénervation, elle pourrait aussi résulter des perturbations des mouvements calciques intracellulaires provoqués par la ciclosporine.

D'autre part, une toxicité de la CsA a été suspectée dans le dysfonctionnement du métabolisme énergétique cardiaque, et dans l'induction d'une fibrose interstitielle associée à

une altération des structures mitochondriales du greffon (Crompton et al. 1992; Millane et al. 1994; Jurado et al. 1998).

c) Effets de la ciclosporine sur la mitochondrie

Effets protecteurs

Les mitochondries sont équipées, sur leur membrane interne, d'un pore de transition voltage-dépendant dont le rôle physiologique reste incertain (Bernardi & Petronilli 1996). Il est bien connu que la ciclosporine et l'ADP jouent un rôle inhibiteur sur l'ouverture de ce pore de transition (Novgorodov et al. 1992; Duchen et al. 1993; Petronilli et al. 1994). Les conséquences délétères de l'ischémie de reperfusion sur la fonction mitochondriale pourraient être en partie liées à l'ouverture de ce pore de transition et à la perturbation de l'homéostasie calcique dans la mitochondrie (Ferrari 1996). Les effets spécifiques de la ciclosporine sur le pore de transition sont, dans ces conditions, potentiellement bénéfiques pour la survie de la mitochondrie. Ceci a été démontré expérimentalement sur des cellules cardiaques étudiées *in vitro* (Duchen et al. 1993). De même, les conséquences du stress oxydatif sur la fonction de mitochondries isolées du tissu hépatique sont minimisées par l'administration de ciclosporine (Takeyama et al. 1993). Par ailleurs, en inhibant l'ouverture du pore de transition, la ciclosporine pourrait empêcher le déclenchement des mécanismes apoptotiques.

Effets délétères

Chez l'homme, il a été montré que l'administration répétée de CsA avait des effets "toxiques" sur la fonction de mitochondries isolées du rein (Lemmi et al. 1990), du foie (Fournier et al. 1987), du tissu cardiaque (Altschuld et al. 1992). Chez le rat, le traitement par la CsA altère la consommation maximale d'oxygène de mitochondries isolées du muscle squelettique (Hokanson et al. 1995). Les résultats de Mercier, Hokanson et Brooks suggèrent que la diminution du temps d'endurance à l'exercice, observée chez les animaux traités à la ciclosporine pourrait être liée à l'altération de la fonction des mitochondries du tissu musculaire (Hokanson et al. 1995; Mercier et al. 1995). Pour ces auteurs, ceci proviendrait d'une diminution de perméabilité du pore de transition ciclosporine-sensible de la membrane interne de la mitochondrie (Fournier et al. 1987; Crompton et al. 1992), avec pour conséquence une diminution du gradient protonique transmembranaire et une accumulation de Ca^{2+} intramitochondriale (Crompton et al. 1992). Dans leurs études réalisées *in situ* chez l'animal, Sanchez et collaborateurs ont également montré un effet délétère de la ciclosporine (sous sa formulation Sandimmun) sur la régulation par l'ADP, de la fonction mitochondriale

des muscles striés (cœur, diaphragme et soléaire), avec une forte diminution du Km apparent pour l'ADP(Sanchez et al. 2000).

1.1.4. Arguments en faveur d'une toxicité du Crémophor EL

Dans presque toutes les études antérieures, la CsA été dissoute dans de l'huile ou de l'éthanol, à cause de ses propriétés hydrophobes. La formulation galénique de la ciclosporine, le Sandimmun, contient du Crémophor. Ce dernier est un dérivé polyoxyéthyléné d'huile de ricin, utilisé comme émulsifiant pour dissoudre les composants lipophiliques. Sa toxicité n'est plus à démontrer car elle a déjà largement été décrite dans la littérature:

- néphrotoxicité (Sokol et al. 1990),
- hépatotoxicité (Roman et al. 1989),
- effets hypertensifs (Mehring et al. 1992),
- neurotoxicité (Windebank et al. 1994).

Curieusement, tous ces effets sont les mêmes que les effets secondaires attribués à la CsA affectant principalement le foie et les reins mais aussi le pancréas, le système nerveux central, les os, et les muscles.

Il est donc impératif de déterminer séparément, les effets dus à l'excipient et ceux dus à la molécule active de CsA elle-même, ce qui n'a pas toujours été le cas dans ces études. Deux études de notre équipe ont démontré, *in vitro* et *in vivo*, que les effets délétères de la ciclosporine sur la fonction mitochondriale des muscles cardiaque et squelettique de rats, étaient principalement médiés par son excipient, le Crémophor (Sanchez et al. 2000; Sanchez et al. 2001). Ces travaux ont montré une altération à la fois de la respiration mitochondriale et de sa régulation par l'ADP, et ont déterminé les sites d'action de l'excipient au niveau des complexes de la chaîne respiratoire (Sanchez et al. 2001).

Il semble donc que le traitement par la ciclosporine dans les suites de greffe cardiaque pourrait posséder à la fois des effets bénéfiques sur la survie du tissu en cas d'ischémie-reperfusion, et des effets délétères pour la respiration mitochondriale. Toutefois les effets spécifique de la ciclosporine per se et/ou de son excipient restent à déterminer chez l'homme.

2. LES TRAITEMENTS ANTIREJET

2.1. Traitement préventif du rejet

C'est au cours des premiers mois que les crises de rejet sont les plus fréquents et les plus sévères (Hutter et al. 1990). En conséquence, les protocoles préventifs du rejet consistent à utiliser différents immunosuppresseurs en traitement associé, d'abord à forte dose dans la période per et postopératoire immédiate, puis à des doses plus faibles, à mesure qu'on s'éloigne de la transplantation.

2.1.1. Traitement à court terme

Le traitement à court terme consiste pour de nombreuses équipes, en une triple immunosuppression comportant glucocorticoïdes, ciclosporine et azathioprine, associée à une induction par anticorps polyclonal ou monoclonal, ce qui permet une survie à moyen terme très élevée. Les résultats de la littérature concernant l'utilisation des globulines antilymphocytaires ou de l'OKT3 en postopératoire immédiat sont variables selon les séries. Pour certains, il n'existerait aucune différence dans les deux cas (Kirklin et al. 1990; Laske et al. 1992; Menkis et al. 1992), alors que pour d'autres l'OKT3 en immunoprophylaxie serait moins efficace et plus mal tolérée (Kormos et al. 1990) que les globulines antilymphocytaires.

2.1.2. Traitement à long terme

Le traitement à long terme consiste à maintenir une triple association comportant azathioprine, corticoïdes et ciclosporine, dans le but de donner la dose minimale de chaque médicament afin d'en diminuer les effets secondaires (Hutter et al. 1990). D'autres auteurs recommandent des faibles doses de ciclosporine et de corticoïdes, n'utilisant l'azathioprine que de façon sélective, après avoir constaté un plus grand pourcentage d'infection avec ce médicament. A l'inverse, certains préconisent le sevrage complet de corticoïdes après le sixième mois postgreffe afin de diminuer le pourcentage de dyslipidémie, d'hypertension artérielle et d'infection (Keogh et al. 1992a; Keogh et al. 1992b), bien que ces effets secondaires aient été plutôt rapportés à des doses cumulatives qu'à de faibles doses d'entretien (Miller et al. 1992).

2.2. Traitement curatif du rejet

Le traitement des crises de rejet aigu est guidé par une confrontation des données à la fois cliniques, échocardiographiques et anatomopathologiques. Il est donc adapté à la sévérité du grade histologique révélé par la biopsie myocardique, mais aussi à l'état hémodynamique et à l'altération de la fonction ventriculaire. Le choix du traitement est aussi fonction du délai d'apparition du rejet par rapport à la transplantation, et fonction de l'évolution immunologique pour un patient donné (McAllister 1990; Miller 1990).

Le traitement idéal du rejet cardiaque reste mal défini, et en général basé sur les habitudes de chaque équipe plus que sur des données objectives : toutefois l'attitude commune est de réserver les agents les plus puissants mais aussi les plus toxiques aux formes les plus sévères et les plus réfractaires.

II. EVALUATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE STRIE HUMAIN

En occupant environ la moitié du poids du corps, le tissu musculaire, formé par l'ensemble des muscles striés (squelettiques et cardiaque) et des muscles lisses, représente le tissu le plus important de l'organisme. Parmi ces muscles, les muscles squelettiques ou locomoteurs forment à eux seuls, environ 40% du poids du corps de l'homme et 32% de celui de la femme. La principale propriété des muscles est la contraction. Elle leur permet d'assurer des fonctions aussi essentielles que variées, à savoir, le déplacement de segments corporels pour les muscles striés squelettiques, la modification des pressions et des volumes et/ou le déplacement de fluides pour les muscles lisses et le muscle cardiaque. Dans notre étude nous nous intéresserons particulièrement aux muscles striés squelettique et cardiaque. Ces derniers possèdent une organisation structurelle et fonctionnelle très complexe et précise. Leur structure très organisée (voir figure 3), est formée d'un ensemble de faisceaux constitué de fibres musculaires, elles-mêmes composées de myofilaments (ou myofibrilles) organisées en une succession de sarcomères limités par les lignes Z. C'est cette organisation qui donne son aspect strié à la fibre musculaire. Des particularités fonctionnelles importantes du muscle squelettique ont notamment été observées au niveau des vitesses de contraction, de la force développée et de la résistance à la fatigue. De plus, ils présentent une plasticité élevée en réponse aux contraintes environnementales, basée sur le potentiel de la fibre musculaire à subir des changements dans sa cytoarchitecture et dans sa composition en protéines. Au nombre de ces facteurs environnementaux susceptibles d'induire ces modifications, on peut citer l'exercice, et de manière plus indirecte, certains agents pharmacologiques. Nous évaluerons dans cette étude, les effets de l'entraînement, de la ciclosporine A (CsA) et/ou de son excipient, le Crémophor EL, sur le métabolisme de ces fibres musculaires.

A. L'APPAREIL CONTRACTILE

L'appareil contractile est constitué par un ensemble de protéines organisées en des structures bien définies, les myofilaments, dont l'unité morphologique et fonctionnelle est le sarcomère.

Le sarcomère est formé par l'interconnexion des filaments fins d'actine et des filaments épais de myosine, associés à des protéines de structure et de régulation. La contraction musculaire résulte du glissement des filaments d'actine et des filaments de myosine les uns par rapport aux autres, entraînant ainsi un raccourcissement du sarcomère. C'est la répétition de ce phénomène au niveau de l'ensemble des sarcomères qui est responsable d'un raccourcissement significatif du muscle.

1. LES FILAMENTS FINS

Outre l'actine, les composants majeurs des filaments fins sont la tropomyosine et le complexe de troponines qui constituent les régulateurs de la contraction musculaire en variant la sensibilité au calcium (voir figure 4).

1.1 L'actine

Dans le sarcomère, des monomères d'actine globulaire (actine G) s'associent en deux brins filamenteux (actine F) qui s'organisent en une structure hélice α pour former le filament fin. Il existe deux isoformes d'actine dans le muscle strié: l'actine α -squelettique et l'actine α -cardiaque. Leur expression varie, au cours du développement, selon le tissu et l'espèce considéré. Ces deux isoformes diffèrent par la structure de l'extrémité N-terminal les liant à la myosine. Cependant, l'actine retrouvée dans le muscle lent est identique à celle identifiée dans les muscles rapides.

1.2 La tropomyosine (TM)

Les tropomyosines sont des protéines dimériques allongées, constituées de sous-unités de structure α -hélicoïdale et disposées dans une orientation parallèle. Les filaments de TM sont liés de façon stœchiométrique à l'actine, aux creux de la double hélice, conférant une rigidité structurale aux filaments et régulant les interactions actine-myosine (Murray et al. 1982). Dans le muscle strié, la TM est constituée de deux sous unités α et β associées en homodimères $\alpha\alpha$ et $\beta\beta$ ou en hétérodimères $\alpha\beta$. Quatre isoformes, TM- β , TM- α fast, TM α slow et TM4sk ont été caractérisés chez les mammifères. La proportion relative des isoformes α et β est plus élevée dans le muscle rapide que dans le muscle lent (Bronson & Schachat 1982), mais varie également en fonction du muscle rapide considéré. Il n'y a pas d'isoforme cardiaque de TM car le cœur de mammifère contient principalement l'isoforme TM- α fast et en faible proportion l'isoforme TM- β dont le contenu chez de nombreuses espèces est inversement proportionnel à la fréquence cardiaque et augmente au cours du développement (Humphreys & Cummins 1984).

1.3 Le complexe troponine (Tn)

Le complexe de troponines est responsable de la régulation cytoplasmique de la contraction musculaire. Ce complexe est constitué de 3 protéines : la troponine T, liant la TM aux complexes des Tn ; la troponine I, inhibant les interactions actine-myosine ; et la troponine C, contenant le site de fixation du calcium et contrôlant la contraction musculaire.

1.3.1. La troponine T (TnT)

C'est une protéine asymétrique qui lie le complexe de troponines, à la tropomyosine et à l'actine. Trois gènes de la troponine T, TnT-f (fast), TnT-s (slow) et TnT-c (cardiaque) ont été caractérisés (Schiaffino & Reggiani 1996). Chacun de trois gènes peut générer une variété d'isoformes par épissage alternatif. Leur expression présente une spécificité tissulaire et est régulée au cours du développement. On dénombre chez le rat quatre isoformes rapides (TnT-1f, TnT-2f, TnT-3f et TnT-4f), deux isoformes lentes (TnT-1s, et TnT-2s) et quatre isoformes cardiaques (TnT-1c, TnT-2c, TnT-3c et TnT-4c). Cette variété des isoformes TnT peut expliquer les différences de sensibilité des myofilaments pour le calcium, d'activation de la myosine ATPase et aussi de la coopérativité de l'activation cardiaque, au sein des différents types musculaires (Gordon et al. 2000).

1.3.2. La troponine I (TnI)

La troponine I peut se lier à l'actine et inhiber l'activité ATPasique du complexe myosine-actine. Cette inhibition est plus importante en présence de la TM et devient réversible et sensible au calcium en présence du complexe intact de Tn. Les muscles striés contiennent trois isoformes de TnI (Schiaffino & Reggiani 1996). Les isoformes TnI-f (fast), TnI-s (slow) et TnI-c (cardiaque) sont respectivement exprimées au niveau du muscle squelettique rapide, lent et du cœur. Ce dernier exprime également TnI-s au cours des stades précoces du développement. C'est la région N-terminale de ces séquences qui présente le plus de divergence. Une région très conservée située entre les résidus 105-114 contient toutes les propriétés inhibitrices des TnI et interagit avec le TnC.

1.3.3. La troponine C (TnC)

La troponine C appartient à la superfamille des protéines liant le calcium. Deux isoformes, codées par deux gènes distincts ont été caractérisées dans les muscles striés, TnC-f (fast), dans le muscle squelettique rapide et TnC-sl/c (slow/cardiac), dans le muscle squelettique lent et le

muscle cardiaque (Schiaffino & Reggiani 1996). L'isoforme TnC-f contient 4 sites de liaison au calcium : deux sites de basse affinité situés au niveau de l'extrémité N-terminale (site I et II) qui lient le calcium uniquement quand sa concentration intracellulaire augmente après libération par le réticulum sarcoplasmique, et deux sites de haute affinité, au niveau de l'extrémité C-terminale (sites III et IV), qui sont toujours occupés par le calcium ou le magnésium de façon compétitive. L'isoforme TnC-s/c ne possède qu'un seul des deux sites de faible affinité, mais qui ne correspondant au site I de l'isoforme TnC-f (Takahashi & Tonomura 1975).

1.4 Autres protéines associées aux filaments fins

D'autres protéines telles que la tropomoduline, la nébuline (ou son homologue cardiaque, la nébulette) et la myopalladine sont également associées aux filaments fins et sont impliquées dans le maintien et la stabilisation de leur longueur. La tropomoduline est associée à la tropomyosine et à l'actine ; il existe des isoformes spécifiques des muscles squelettiques de type lent et rapide (Gregorio et al. 1995; McElhinny et al. 2001). La nébuline est une protéine géante du muscle squelettique (800kDa) et avec son homologue cardiaque, la nébulette (100kDa), elles interagissent avec la tropomoduline et l'actine (Moncman & Wang 1995; McElhinny et al. 2001). Elles présentent différentes isoformes contribuant à la diversité des disques Z (Millevoi et al. 1998). La myopalladine est une nouvelle protéine sarcomérique (145 kDa) qui est impliquée dans la structure de la ligne Z via l' α -actinine du cytosquelette et la nébuline ou la nébulette (Bang et al. 2001).

2. LES FILAMENTS EPAIS

Les filaments épais sont composés majoritairement par des molécules de myosine sarcomérique auxquelles sont associées d'autres protéines telles que la protéine C, la protéine H, la protéine M, la myoméline, le filament de titine et la protéine MM-CK.

2.1 La myosine

La myosine sarcomérique appartient à la classe II des myosines et est constituée de deux chaînes lourdes (MHCs) auxquelles sont attachées deux paires de chaîne légères (MLCs). Les chaînes de MHC s'enroulent l'une autour de l'autre en hélice α au niveau de leur extrémité C-terminale pour former la queue de la molécule. Ces deux chaînes se séparent à leur extrémité N-terminale et forment des tête globulaires auxquelles se combinent deux chaînes légères (MLCs), l'une dite alcaline ou essentielle et l'autre chaîne appelée régulatrice ou phosphorylable. Les MHCs et les MLCs appartiennent à des familles multigéniques et

comprennent plusieurs isoformes (voir figure 5).

2.1.1 Les chaînes lourdes de myosine (MHCs)

Les MHCs sont doués d'une activité ATPasique, localisée au niveau de la tête de la molécule, qui détermine la vitesse de raccourcissement du muscle *in vivo*. C'est aussi dans cette région que s'établissent les liaisons myosine-actine. Deux grandes classes d'isoformes de MHCs caractérisent les propriétés cinétiques de contraction des cellules musculaires différenciées, à savoir, les isoformes de type lent (MHC- β dans le myocarde, identique à l'isoforme MHC-1 dans le muscle squelettique) et les isoformes de type rapide (MHC- α pour le myocarde et MHC-2 pour le muscle squelettique). Les isoformes MHC-emb (embryonnaire) et MHC-neo (néonatale) caractérisent les muscles squelettiques en développement. Les trois isoformes rapides, MHC-2A, MHC-2X (ou MHC-2D) et MHC-2B ont été identifiés dans le muscle squelettique de rat et de souris tandis que chez l'homme il n'a été retrouvé que les isoformes MHC-2A et MHC-2X (Schiaffino & Reggiani 1994; Schiaffino & Reggiani 1996). Le cœur de rat et de souris de même que l'oreillette de l'homme expriment l'isoforme.

MHC- α alors que le ventricule de ce dernier exprime MHC- β . Certaines fibres squelettiques appelées fibres hybrides, co-expriment deux ou plusieurs de ces isoformes. La composition en MHCs est un bon indicateur du profil contractile du muscle et en particulier de sa vitesse de contraction. Des différences entre espèces ont été rapportées pour un muscle donné (Talmadge 2000). En effet, tandis que la majorité des muscles squelettiques sont mixtes chez l'homme, il existe des muscles de type lent (soléaire), rapide (gastrocnémien) et mixte/rapide (le plantaris). Dans le cœur, les isoformes ventriculaires MHC- α et MHC- β s'associent pour former trois combinaisons possibles d'isomyosine : V1 (MHC- α /MHC- α) V2 (MHC- α /MHC- β) et V3 (MHC- β /MHC- β). Le profil MHC ventriculaire chez l'homme adulte est essentiellement de type V3 tandis que celui de petits rongeurs est majoritairement de type V1 (voir tableau 3).

Tableau 3 : Isoformes des chaînes lourdes de la myosine identifiées chez le mammifère et leur distribution au sein des différentes fibres musculaires. (Pette & Staron 1990)

Désignation	Nomenclature	Distribution
Embryonnaire	MHC _{emb}	Myotubes, muscles extraoculaires, fibres intrafusales, fibres régénérées
	MHC _{néo}	Muscles néonataux, muscles extraoculaires, fibres intrafusales, fibres régénérées
Rapide	MHC I b	Fibres de types I B , I BD , I AB
	MHC I a	Fibres de types I A , I AB , I DA , I C
	MHC I x	Fibres de types I D ou I X , I BD , I DA
	MHC _{com}	Fibres « super-fast » des muscles moteurs de l'œil
	MHC I m	Fibres musculaires dérivées du premier arc branchial, identifiées chez les primates
Lente	MHC I ou MHC β cardiaque	Fibres de types I, I C , I C
	MHC I _{ton}	Fibres lentes toniques intrafusales, et des muscles extraoculaires

2.1.2 Les chaînes légères de myosine (MLCs)

A la tête de chaque chaîne lourde de myosine se trouve associée une chaîne légère alcaline ou essentielle (MLC-1) et une chaîne légère phosphorylable (MLC-2). Le rôle fonctionnel des MLCs n'est pas parfaitement défini, mais elles auraient probablement une fonction de régulation de l'interaction actine-myosine. En effet, la vitesse de contraction des fibres musculaires ne s'explique pas que par la présence des isoformes des MHCs, mais aussi en partie par celle des MLCs (Bottinelli et al. 1994). Les MLCs sont codées par une famille de gènes qui permettent la synthèse de plusieurs isoformes, lentes et rapides. Les isoformes de type rapide étant le plus souvent retrouvées au sein des fibres à secousse rapide alors que les isoformes lentes sont retrouvées au sein des fibres à secousse lente.

Dans les muscles striés, les chaînes légères phosphorylables exercent uniquement un rôle modulateur en augmentant la sensibilité au calcium (Sweeney et al. 1993). Deux isoformes ont été caractérisées au niveau du muscle squelettique, MLC-2s (lent) et MLC-2f (rapide).

MLC-2s est également exprimée au niveau du ventricule cardiaque alors que l'oreillette exprime une forme atriale.

Cinq isoformes de MLCs alcalines ont été identifiées au niveau des muscles striés de mammifères (Barton & Buckingham 1985). MLC-1f et MLC-3f sont exprimées dans le muscle squelettique rapide, alors que MLC-1s/v est exprimée dans le muscle squelettique lent et le cœur. MLC-1sa est exprimée dans les tissus non musculaires. Une cinquième isoforme MLC-1emb/atrial est exprimée dans les muscles squelettiques en développement ainsi que dans l'oreillette.

2.1.3 Les isomyosines

La combinaison de différentes isoformes au sein de la molécule de myosine à partir des deux paires de MLCs et de la paire de MHCs permet de donner naissance à une grande variété d'isomyosine, dites « myosine native ». Un grand nombre d'isoformes de la myosine est ainsi théoriquement envisageable, ce d'autant que les MHCs peuvent être présentes non pas à l'état d'homo- mais d'hétérodimères. Seul un nombre restreint de ces isomyosines, parmi toutes les combinaisons possibles ont été isolé de manière reproductible : 3 isoformes rapides (Fm1, Fm2, Fm3), une lente Sm et une intermédiaire Im.

2.2 Les protéines associées à la myosine

Ces protéines sont importantes pour la structure ordonnée du sarcomère et régulent la longueur du filament épais. La titine joue un rôle dans le maintien de l'alignement des filaments épais, dans la génération d'une tension passive de l'appareil contractile et pourrait être senseur de la longueur cellulaire pour moduler l'activité contractile (Le Guennec et al. 2000). La protéine C qui est phosphorylée lors de stimulation β -adrénergique aurait un rôle dans la régulation de la contraction des muscles cardiaque et squelettiques (Winegrad 2000). D'autre part, la protéine MM-CK myofibrillaire associée à la bande M joue un rôle structural mais aussi un rôle de transfert d'énergie vers l'ATPase myofibrillaire lequel sera exposé ultérieurement.

En résumé, il existe une grande diversité des protéines contractiles permettant à la fois une spécialisation fonctionnelle des muscles et une capacité d'adaptation importante. Chacune des protéines majeures du sarcomère (myosine, actine, tropomyosine, et troponine) participe aux interactions permettant au muscle strié de se contracter et de se relaxer . Ces interactions peuvent être divisées en deux étapes avec une étape permettant la contraction et une autre étape contrôlant cette contraction. L'interaction entre les filaments fins et

épais de myosine et la contraction musculaire qui s'en suit est contrôlée par la concentration intracellulaire des ions calcium libres . En effet les protéines régulatrices sont inhibitrice en absence de calcium qui induit la contraction en annulant cet effet inhibiteur. La fixation du calcium au niveau de la TnC provoque des changements de conformation des protéines régulatrices, ce qui expose les sites actifs d'actine qui interagissent alors avec les têtes de myosine. L'entrée du calcium au niveau du cytoplasme se fait à partir de l'espace extracellulaire via les canaux calciques membranaires voltage-dépendant ainsi qu'à partir de structures cytoplasmiques spécialisées, le réticulum sarcoplasmique. A ce stade aussi, on retrouve une grande diversité des protéines et de leur organisation caractérisant les différents types musculaires.

B. RETICULUM SARCOPLASMIQUE (RS) ET MOUVEMENTS CALCIQUES

1. STRUCTURE ET FONCTION DU RS

Le RS est un réticulum endoplasmique particulier qui forme un réseau de fins tubules entourant de ses mailles chaque myofibrille tout en étant discontinu. D'un point de vue structural et fonctionnel, le RS peut être divisé en deux régions qui sont les citernes subsarcolemmales (RS terminal) et le réseau sarcotubulaire (RS longitudinal). Les citernes subsarcolemmales viennent au contact du sarcolemme et du système de tubules T et contiennent les canaux calciques sensibles à la ryanodine et à la caféine, responsables du flux de calcium qui initie la contraction. Les tubules T sont des invaginations de la membrane cellulaire qui pénètrent à travers les myofilaments aux niveaux des disques Z en formant des triades. Le réseau sarcotubulaire entoure l'appareil contractile et contient les pompes à calcium. Ainsi le RS longitudinal assure la fonction de recaptage du calcium autour des myofilaments via une pompe calcium-ATPase (les protéines Sarco Endo Reticulum Calcium ATPase, les SERCA) et joue donc un rôle déterminant dans le phénomène de relaxation. Ainsi, le RS pourrait être considéré comme un réservoir dans lequel le calcium est séquestré grâce à une glycoprotéine appelé de ce fait, la calséquestrine. Le muscle squelettique possède un RS plus développé que celui du muscle cardiaque. Ce muscle présente des différences, au niveau du recaptage du calcium , entre les fibres de type lent et rapide. Ces différences sont essentiellement liées aux différences de surface du RS, à la présence des isoformes de la pompe à calcium, ainsi qu'au contenu par unité de surface de ces isoformes. Au niveau du cœur de souris, les oreillettes présentent un RS longitudinal plus développé par rapport au ventricule (Bossen et al. 1981). D'autre part, les cellules atriales présentent peu ou pas de

tubules transverses, elles contiennent seulement du RS jonctionnel périphérique lié au sarcolemme et une proportion plus importante de RS corbulaire, c'est à dire de vésicules de RS qui ne sont pas en contact avec les tubules T (Jorgensen et al. 1985).

2. LES MOUVEMENTS CALCIQUES

2.1 La libération du calcium

Le couplage excitation-contraction (E-C) est le lien fonctionnel entre la stimulation électrique de la cellule musculaire et sa contraction. La dépolarisation du sarcolemme et de la membrane des tubules (T) transverses est détectée par les récepteurs aux dihydropyridines (DHPRs), qui représentent la majorité des canaux calciques de type L. Des interactions fonctionnelles entre les DHPRs et les récepteurs à la ryanodine (RyRs) du RS sont à la base d'une libération rapide et massive de calcium. Le mécanisme d'E-C diffère entre les muscles cardiaque et squelettique. Pour le myocarde, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire résulte d'un influx de calcium à travers le plasmalemme qui active les RyRs: c'est le phénomène « calcium induced calcium release » ou CICR (Fabiato 1983). Pour les muscles squelettiques, par contre, c'est le mouvement de charge intramembranaire, lors de la dépolarisation, qui induit les changements de conformation des DHPRs directement transduit aux RyRs pour déclencher la libération de calcium par le RS: ce mécanisme est appelé « voltage activated calcium release » ou VACR. En réalité, il semblerait que ces deux mécanismes de couplage E-C coopéreraient dans ces deux types de muscles mais avec toutefois une prédominance de CICR dans le muscle cardiaque et de VACR dans le muscle squelettique (Lewartowski 2000). Des techniques de microscopie confocale à haute résolution temporelle et spatiale ont permis de montrer que la vidange du RS dans les muscles cardiaque et squelettique, sont en fait la sommation spatiale et temporelle de multiples phénomènes élémentaires qui sont des variations localisée et transitoire de concentration de calcium à travers quelques RyRs, appelées « spark ». Il existe des évènements encore plus petits que les « sparks », il s'agit des « quarks » qui résulteraient de l'ouverture d'un unique RyR (Niggli 1999).

2.1.1 Les récepteurs-canaux Ca^{2+} : les DHPRs et les RyRs

Les différences de couplage E-C entre les muscles cardiaque et squelettique s'expliquent par la diversité des isoformes des différents constituants impliqués, de la régulation de l'activité de ces constituants et de leur organisation spatiale respective. Les DHPRs, complexes de cinq sous-unités protéiques, sont organisés en tétrade dans le muscle squelettique et comprennent

les sous-unités $\alpha 1s$ tandis que dans le muscle cardiaque, ces structures sont moins organisées et se composent de la sous-unité $\alpha 1c$ (Wrzosek 2000). La variété des isoformes $\alpha 1$ est responsable des paramètres électrophysiologiques caractéristiques des canaux DHPRs voltage-dépendant et de la capacité d'interaction avec les canaux RyRs.

Les récepteurs à la ryanodine existent sous forme d'homotétramère et trois isoformes RyRs, RyR1, RyR2 et RyR3 ont été identifiés chez les mammifères. L'isoforme RyR1 est exprimé dans tous les muscles squelettiques et aussi dans le cerveau, RyR2 est spécifique du muscle cardiaque, et RyR3 est majoritairement exprimé dans le soléaire et absente du muscle rapide suggérant que cette isoforme est spécifique des fibres de type lent (Otsu et al. 1990; Conti et al. 1996). RyR1 est électro-mécaniquement couplée à la surface de la membrane, alors que les autres isoformes sont activées uniquement par des seconds messagers endogènes et cytoplasmiques, incluant le calcium lui-même (Shoshan-Barmatz & Ashley 1998). Les RyRs contiennent un large domaine cytoplasmique et sont associées avec d'autres protéines de structures ou régulatrices, comme la calmoduline et les immunophilines, qui peuvent avoir des effets marqués sur la fonction de canal de ces récepteurs.

2.1.2 Le stockage du Ca^{2+} dans la RS

La calséquestrine, localisée dans les citernes terminales du RS, est la principale protéine de stockage du calcium dans tous les muscles striés. Cette glycoprotéine interagit avec les RyRs, suggérant un rôle dans la modulation de la libération du calcium à partir du RS (Ikemoto et al. 1989). Il existe deux isoformes : l'isoforme cardiaque (calsq_{card}) exprimée dans le myocarde, et l'isoforme squelettique (calsq_{sq}) exprimée dans les muscles squelettiques et unique isoforme dans le muscle rapide tandis que le muscle squelettique lent exprime les deux isoformes. Ces deux isoformes diffèrent par leur extrémité N-terminale et auraient un rôle modulateur distinct sur la libération du calcium (Yano & Zarain-Herzberg 1994).

2.2 Le repompage du calcium

La baisse de la concentration cytosolique en calcium à un niveau basal est réalisée essentiellement par le recaptage (ou repompage) du cation par des systèmes de stockage intracellulaires et par l'extrusion du calcium hors de la cellule. Cette extrusion du calcium hors de la cellule est réalisée par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) et minoritairement par la calcium ATP-ase du sarcolemme. La participation respective de ces deux systèmes dans la relaxation de la contraction dépend de l'espèce et aussi du type de muscle strié de par la présence d'isoformes spécifiques du myocarde et des muscles squelettiques (Bassani et al. 1994; Fraysse et al. 2001).

2.2.1 La pompe à Ca²⁺ du RS: les protéines SERCA

Les protéines SERCAs représentent plus de 80% des protéines membranaires du RS. Chaque sous-unité transmembranaire catalytique transporte deux ions calcium par molécule d'ATP hydrolysé. Dans le cytosol des myocytes, le calcium libre peut atteindre une concentration allant de 10⁻⁷ M (au repos) à plus de 10⁻⁵ M (lors de la contraction), tandis que la concentration en calcium dans le lumen du RS peut atteindre 10⁻² M. Les SERCAs ont une très haute affinité pour le calcium (Km de 10⁻⁷ M), permettant à la pompe de le transporter du cytosol vers l'intérieur du RS contre le gradient de concentration. L'activité des SERCAs est régulée de sorte que quand la concentration de calcium libre dans le cytosol devient trop élevée, la vitesse de pompage va s'accroître pour permettre de réduire la concentration de calcium à moins de 1 µM. Trois gènes différents codent pour cinq isoformes : SERCA1a, SERCA1b, SERCA2a, SERCA2b et SERCA3. L'expression de ces protéines varie au cours du développement et présente une spécificité tissulaire. SERCA 1 est spécifique du muscle squelettique rapide, et les isoformes SERCA1a et SERCA1b correspondent à l'isoforme adulte et néonatale respectivement. SERCA2a est spécifique du myocarde, du muscle squelettique lent et des muscles lisses. SERCA 2b est exprimée dans les tissus non musculaires et dans les cellules des muscles lisses. SERCA3 est exprimée dans les cellules endothéliales, et dans des cellules hématopoïétiques et lymphocytaires (Berchtold et al. 2000). Ces isoformes sont très différentes d'un point de vue structural et fonctionnel, notamment en ce qui concerne leur vitesse de repompage. La dépendance au calcium est la même pour SERCA1a et SERCA2a.

Il a été montré que SERCA 2 forme une unité fonctionnelle avec le phospholamban à la fois dans le cœur et dans le muscle lent. Cette unité fonctionnelle est contrôlée par la phosphorylation/ déphosphorylation du phospholamban (Tada et al. 1978). La forme déphosphorylée représente un cofacteur inhibant la calcium-ATPase, alors que la forme phosphorylée augmente la vitesse de recaptage du calcium dans le RS (Tada 1992). Ainsi, l'augmentation de l'AMPc et donc l'activation de la protéine kinase A (PKA) due à une stimulation β-adrénergique permet par exemple, de phosphoryler le phospholamban et donc d'accélérer la relaxation musculaire, notamment dans le myocarde.

Il a été mis en évidence que la régulation de l'expression des SERCAs a lieu en parallèle à celle des MHCs lors des transitions phénotypiques des muscles squelettiques (Schulte et al. 1993). Une étude récente a démontré que la coexpression des isoformes SERCA et MHCs pouvait être modulée par la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase Calcium/calmoduline dépendante (Bigard et al. 2000).

2.2.2 La parvalbumine

La parvalbumine est une protéine cytoplasmique soluble à haute affinité calcique, qui est présente à fortes concentrations dans les muscles squelettiques rapides de vertébrés. Il y a peu ou pas de parvalbumine dans le muscle squelettique de type lent et dans le myocarde. Cette protéine agit comme un tampon calcique et participerait à la relaxation du muscle squelettique rapide en fixant le calcium et en facilitant son transfert à partir des protéines contractile vers le RS (Heizmann et al. 1982; Berchtold et al. 2000).

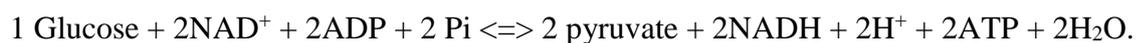
En résumé, le mécanisme moléculaire de la contraction commence avec la dépolarisation de la membrane plasmique et se poursuit avec la fixation du calcium sur la troponine C, entraînant le glissement des têtes de myosine par rapport aux filaments d'actine et provoquant ainsi le raccourcissement musculaire. L'activité ATPasique des têtes de myosine permet l'hydrolyse de l'ATP et donc la libération de l'énergie chimique nécessaire aux changements physico-chimiques des filaments et entraînant le développement de la tension et la contraction du muscle strié. Le calcium joue un rôle central dans les processus entraînant la contraction et la relaxation des muscles striés. La concentration intracellulaire de calcium libre est finement régulée via le RS. Cet organite, en remplissant à la fois les rôles de stockage et de source de calcium, constitue le système membranaire le plus important dans le processus de contraction-relaxation au niveau des muscles squelettiques et du muscle cardiaque. Le RS assure ces fonction grâce aux RyRs et aux SERCAs. Le flux du calcium via les membranes du RS est régulé différemment selon qu'il s'agit du muscle cardiaque ou du muscle squelettique rapide. En effet, au niveau du muscle squelettique rapide où la contraction répond à la loi du « tout ou rien », la régulation est assurée en grande partie par le système nerveux central, sur les éléments moteurs de la contraction. Au niveau du muscle cardiaque, d'importants changements dans la contraction sont causés par des variations de la quantité de calcium se liant à la troponine C, ce qui explique l'importance de la régulation de la libération du calcium par le RS par rapport au muscle squelettique rapide. Les sources d'ATP utilisées par les ATPases des muscles striés varient elles aussi suivant les spécialisations fonctionnelles de chaque type musculaire. Ainsi, au niveau du muscle squelettique rapide, la synthèse de l'ATP est assurée principalement par les enzymes de la glycolyse anaérobie alors qu'au niveau du muscle squelettique lent et du muscle cardiaque, le synthèse d'ATP est assurée en grande partie par la phosphorylation oxydative qui a lieu au niveau de structures spécialisées que sont les mitochondries.

C. LES VOIES METABOLIQUES DE PRODUCTION D'ENERGIE

La contraction et les autres processus associés, utilise 90% de la dépense énergétique de la cellule musculaire. La fourniture de cet énergie se fait grâce aux principales voies métaboliques de synthèse de l'ATP que sont la glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative. La prédominance de l'une ou l'autre de ces voies est différente en fonction du type de muscle et de son activité contractile. Schématiquement, le myocarde et le muscle squelettique lent ont un métabolisme essentiellement oxydatif aérobie alors que le muscle squelettique rapide a un métabolisme plutôt glycolytique anaérobie.

1. LA GLYCOLYSE ANAEROBIE

La glycolyse anaérobie a lieu dans le cytoplasme (voir figure 6) et son bilan final de production d'ATP est relativement faible, avec un gain net de seulement 2 ATP :



Les enzymes de la glycolyse sont associées à différentes structures cellulaires avec lesquelles elles forment des « complexes glycolytiques ». Ces derniers sont localisés au niveau du sarcolemme (ou adjacents au cytosquelette), au niveau du réticulum sarcoplasmique et au niveau des myofilaments faiblement associés aux filaments fins (Bronstein & Knull 1981). Cette proximité préférentielle permet de couvrir les besoins en ATP, respectivement, des canaux ioniques (Weiss & Lamp 1987) et du transport calcique par les protéines SERCA (Xu et al. 1995; Boehm et al. 2000)(Kai et al., 1995). Cette compartimentation des enzymes est donc responsable d'une compartimentation de l'ATP aux sites utilisateurs d'énergie.

Le pyruvate et le NADH^+ vont être respectivement réduits et oxydés grâce à la lactate déshydrogénase (LDH), pour donner le produit terminal de la glycolyse anaérobie, le lactate, suivant la réaction :



La LDH est une enzyme tétramérique formée par l'assemblage de deux types de sous-unités, H (Heart) et M (Muscle), générant 5 isoformes H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃ et M₄. Ces sous-unités sont plus ou moins inhibées par le pyruvate, la forme H étant la plus sensible à l'inhibition par le pyruvate et favorisant son oxydation plutôt que sa transformation en lactate. Dans le muscle, un profil isoenzymatique majoritaire en LDH H reflète un métabolisme de type oxydatif tandis qu'une majorité en sous-unité M indique une prédominance de la glycolyse anaérobie.

Le muscle squelettique représente le principal lieu de la production de lactate. Cette production est souvent associée à une diminution de l'oxygénation du muscle durant la contraction, et à l'apparition de la fatigue musculaire. Dans ces conditions, le lactate apparaît comme un déchet métabolique. Cependant, depuis les travaux de Cori (1931), le lactate est également considéré comme un précurseur de la néoglucogenèse et serait une source importante d'hydrates de carbone pour l'oxydation et la néoglucogenèse au repos et à l'effort chez l'homme, contredisant la notion de déchet métabolique qui lui était attribuée.

2. LA VOIE AEROBIE ET LES MITOCHONDRIES

En condition aérobie, l'oxydation du pyruvate va se poursuivre dans la mitochondrie via les réactions du cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques) et de la phosphorylation oxydative (PHOSPHOX) (figure 7). Le bilan de la production d'ATP devient plus important puisque 36 molécules sont produites à partir de l'oxydation complète d'une molécule de glucose. D'autres substrats mitochondriaux tels que les acides gras, constituent, via la β -oxydation, une importante source énergétique. L'étape ultime de toutes ces réactions mitochondriales est la réduction de l'oxygène et la production d'ATP.

2.1. Mitochondries. Généralités

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé dans la fourniture de l'énergie cellulaire. Il s'agirait d'un organite d'origine bactérienne, devenu l'hôte symbiotique des ancêtres des cellules eucaryotes. Elle est semi-autonome car disposant de son propre génome (ADNmt) et d'un code génétique modifié. Ce génome ne code cependant que pour 10% environ des protéines mitochondriales totales correspondant à des sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire. Les autres protéines nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie et celles permettant le maintien de son génome sont codées par le noyau et importées par la mitochondrie. Le transport de ces protéines est un processus endergonique réalisée grâce à des protéines chaperonnes à travers des complexes de translocation situés dans la membrane mitochondriale externe (TOM, Translocase of Outer Membrane) (Schatz 1996; Voos et al. 1999).

Les mitochondries sont également impliquées dans plusieurs autres fonctions cellulaires vitales telles que l'homéostasie calcique, la régulation du pH intracellulaire, la synthèse d'hormone stéroïdes et des hèmes, la thermogenèse, la nécrose (ou mort cellulaire accidentelle), et l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) (von Harsdorf et al. 1999).

L'apoptose est déclenchée par de nombreux stimuli tels que les composés ROS (espèces réactives de l'oxygène), les facteurs pro-apoptotiques (capsades, Bax, etc...), l'excès de calcium cytosolique et les facteurs qui altèrent le transport des électrons de la membrane mitochondriale interne. Les radicaux libres sont produits au niveau du complexe I et III de la chaîne respiratoire sous forme de superoxyde et lorsque la production de ces superoxydes dépasse les capacités antioxydantes de la cellule, des dommages peuvent apparaître dans la cellule au niveau de ses protéines, ses lipides et de son ADN. Les inducteurs de l'apoptose induisent l'ouverture du pore de transition mitochondrial (MTP), complexe multiprotéique, dont la nature exacte des composants est encore controversée, et dont la conformation ouvert/fermée peut être modulée par diverses molécules (Crompton et al. 1992). La porine, également appelée canal anionique voltage dépendant ou VDAC) est située dans la membrane mitochondriale externe et l'ADP/ATP translocase (ou ANT) dans la membrane mitochondriale interne seraient les principales composantes du MTP en association avec d'autres protéines localisées dans les différents compartiments mitochondriaux. Il s'en suit une cascade d'événements incluant la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome-c et le facteur AIF (Apoptosis Inducible Factor) et l'activation de capsases (protéases) d'endonucléases (qui dégradent l'ADN).

2.2. Le réseau mitochondrial

Des observations en microscopie confocale, après marquage par des sondes fluorescentes, ont montré dans divers types cellulaires que les mitochondries sont organisées en réseau réticulaire ou réseau dynamique et continu, au sein duquel elles entrent constamment en fusion (ou fission) (Bereiter-Hahn & Voth 1994). Les mécanismes à l'origine de ce phénomène, la force motrice et la nature des protéines impliquées restent encore mal connus. Cependant, on sait aujourd'hui que la morphologie du réseau réticulaire mitochondrial et la structure interne des mitochondries est dépendante de l'intégrité de l'ADNmt. D'autre part, on sait aussi que les mitochondries sont ancrées dans la cellule grâce à des protéines du cytosquelette telles que les filaments d'actine et les microtubules, et qu'elles peuvent se déplacer grâce à des « protéines motrices » telles les myosines, la dynéine et la kinésine. Les mitochondries des muscles cardiaque et squelettiques sont localisées dans la région subsarcolemmale et la région intermyofibrillaire. Ces deux sous-populations mitochondriales sont distinctes en terme de capacité respiratoire, de composition protéique et lipidique, de capacité d'importation des protéines et d'adaptation à des situations physiologiques et pathologiques. La densité volumétrique des mitochondries sarcolemmales est plus importante

dans les fibres oxydatives que dans les fibres glycolytiques. Ainsi, dans les muscles oxydatifs, les mitochondries, incorporées dans des complexes fonctionnels (Kaasik et al. 2001; Saks et al. 2001; Seppet et al. 2001), seraient réparties au niveau des différents sites d'utilisation de l'énergie, permettant de faciliter les échanges entre, par exemple, la mitochondrie et le RS d'une part, et entre la mitochondrie et les myofilaments d'autre part.

2.3. Structure et organisation

La mitochondrie se compose de quatre compartiments majeurs qui diffèrent par leur composition, leurs activités et leur fonction. La membrane externe (M_{ext}) perméable aux molécules de poids moléculaire inférieur à 6 kDa délimite la mitochondrie et le cytosol. La membrane interne (M_{int}) parallèle à la membrane externe et délimite d'une part avec M_{ext} , l'espace intermembranaire où sont localisées diverses protéines, et d'autre part la matrice mitochondriale contenant l'ADNmt et diverses enzymes de voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, la β -oxydation et le cycle de l'urée (figure 8).

2.3.1. La membrane mitochondriale externe

La membrane mitochondriale externe est une membrane relativement rigide dans laquelle sont enchâssées un nombre important de protéines. Ces protéines forment des pores qui permettent des échanges entre le cytosol et la mitochondrie, de molécules de petit poids via les porines, ou la translocation de protéines via les translocases (TOM). La porine est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale (ADP, ATP, phosphate inorganique, créatine, phosphocréatine, etc...) ; elle pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la fonction mitochondriale. Par ailleurs, plusieurs enzymes de diverses voies métaboliques peuvent être fortement associées à la M_{ext} (du côté cytoplasmique) via les interactions avec la porine. Ainsi, l'hexokinase (HK), la glycérol kinase (GK) et l'acyl-coA synthase (ACS) peuvent réguler la fonction mitochondriale par l'intermédiaire de VDAC (Brdiczka & Wallimann 1994). Initialement, la porine avait été décrite comme étant un large canal (≈ 3 nm de diamètre) perméable aux molécules non chargées inférieures à 5000 Da (Mannella 1992), ce qui avait emmené certains auteurs à considérer que la membrane mitochondriale externe ne constituait pas une barrière lorsque la porine était dans sa conformation ouverte. Il a cependant, été démontré in vitro que la porine pouvait adopter des niveaux de conductance différents (Colombini 1989). En présence d'un potentiel transmembranaire positif ou négatif VDAC adopte in vitro, une configuration fermée. Ces

variations de conductance pourraient avoir des implications importantes dans le contrôle de l'énergétique cellulaire et la régulation de l'apoptose (Vander Heiden et al. 2000). Chez les mammifères, au moins trois isoformes différentes de VDAC, qui consistent en un unique polypeptide de 30 kDa organisé en une structure « tonneau β », ont été caractérisées : VDAC1, VDAC2, VDAC3 (Anflous et al. 1998). Ces isoformes présentent des différences de perméabilité, ce qui suggère qu'elles jouent des rôles différents dans la régulation de la fonction mitochondriale en couplant plus ou moins la demande énergétique cellulaire à la production d'énergie mitochondriale (Xu et al. 1999). Les propriétés des VDACs ont généralement été étudiées après reconstitution dans des bicouches lipidiques artificielles. Leur sélectivité pour les cations et les anions dépend entre autre du potentiel membranaire et du pH qui influence la conformation « fermé versus ouvert » du pore (Colombini 1989). Si de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in situ* permettent de caractériser les fonctions et la régulation de VDAC, leurs rôles exacts *in vivo* ne sont pas encore complètement élucidés. Une étude récente qui a montré que l'absence de VDAC1 altère différemment la fonction mitochondriale de différents muscles striés, suggère que cette isoforme est impliquée dans le transport de l'ADP à travers la Mext (Anflous et al. 2001). La participation de VDAC à l'apoptose via la libération de facteurs apoptogéniques tels que le cytochrome c, depuis l'espace intermembranaire vers le cytosol, a été mise en évidence (Shimizu et al. 1999), de même que la possibilité pour les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille de bcl-2 de se lier directement sur VDAC et de moduler son activité. D'autre part, une étude plus récente suggère que VDAC joue aussi un rôle dans l'homéostasie calcique mitochondriale, en contrôlant le transport bidirectionnel du calcium au niveau de la Mext (Gincel et al. 2001).

2.3.2. L'espace intermembranaire

Des études réalisées sur des mitochondries de cerveau, de foie et de muscles ont montré que l'espace intermembranaire contient de nombreuses kinases mitochondriales telles que la créatine kinase (mi-CK), l'adénylate kinase (AK2) et la nucléotide diphosphate kinase (NDPK) (Brdiczka & Wallimann 1994). Voir également la section sur les systèmes de transfert de l'énergie.

2.3.3. La membrane mitochondriale interne

La membrane mitochondriale interne contient de nombreux complexes protéiques spécifiques jouant un rôle important dans plusieurs processus liés au fonctionnement de la mitochondrie :

- Le potentiel membranaire :

La perméabilité de la membrane étant réduite, des transporteurs sélectifs sont nécessaires aux échanges de protéines, d'ions (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+) et de métabolites, entre la matrice et l'espace intermembranaire. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration et un potentiel de membrane, grâce à la conversion du potentiel rédox en un gradient électrochimique de protons (force proton-motrice, Δp), au niveau de la chaîne respiratoire. Ce gradient protonique permet, entre autres, la production d'ATP grâce à l'influx de protons au travers de l'ATP synthase (Figure 7).

- La chaîne respiratoire :

La chaîne respiratoire est constituée, avec l'ATP synthase, de cinq complexes multiprotéiques. Ces complexes, ancrés dans la membrane mitochondriale interne, permettent le maintien du gradient protonique et la formation d'ATP au niveau du complexe V (voir plus loin au paragraphe 2.4.1).

- L'adénine nucleotide translocase (ANT):

L'ANT est également une protéine enchâssée dans la membrane interne. Elle est constituée de deux sous-unités identiques de 32 kDa avec un site de liaison unique pour l'ATP et l'ADP. Ce site fait alternativement face à la matrice ou à l'espace intermembranaire. Suivant le changement de conformation, l'ATP mitochondriale est échangé par l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1. L'ANT est la seule translocase pour les nucléotides, et joue donc un rôle capital dans les échanges entre les sites de production et de consommation de l'énergie. Il existe au moins trois différents gènes humains codant pour l'ANT (ANT1, ANT2, ANT3) (Cozens et al. 1989; Ku et al. 1990). Les 3 gènes ont des structures similaires consistant en quatre exons de taille identique avec une séquence nucléotidique ayant entre 77 et 79% d'homologie. Par contre la région 5' adjacente comporte des éléments du promoteur qui sont différents (Cozens et al. 1989), ce qui suggère l'existence de mécanismes régulateurs différents afin de réguler l'expression des trois isoformes en fonction du développement et/ou du type de métabolisme cellulaire. Doerner et al. ont démontré qu'il y a une tissu-spécificité d'expression des isoformes de l'ANT qui est fortement reliée au stade de différenciation cellulaire (Doerner et al. 1997). L'importance de l'ANT1 a été démontrée dans un modèle de souris knock-out pour l'ANT1, montrant que ces souris avaient les caractéristiques biochimiques, histologiques et métaboliques d'une myopathie et d'une cardiopathie mitochondriale (Graham et al. 1997).

- Les protéines découplantes (UCPs) :

Durant le processus de la PHOSPHOX, une partie de l'énergie contenue dans les substrats est

perdue sous forme de chaleur. Le couplage entre les phosphorylations et les oxydations est donc incomplet, majoritairement dû à des fuites de protons à travers la membrane mitochondriale interne : c'est le phénomène de la respiration mitochondriale découplée. Dans les muscles perfusés de rat, cette respiration représente entre 35 et 50% de la respiration totale. Une famille de protéines a été identifiée comme étant des protéines découplantes : les UCPs (uncoupling proteins). Ce sont des transporteurs mitochondriaux enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie. Trois isoformes différentes ont été isolées à ce jour (UCP1, UCP2 et UCP3). UCP1 est préférentiellement exprimée dans la graisse brune, et bien connue pour jouer un rôle important dans la thermogénèse en découplant la respiration mitochondriale afin de produire de la chaleur (Klingenberg & Huang 1999). Récemment l'isoforme UCP-3 a été identifiée et s'exprime majoritairement dans le muscle squelettique (Boss et al. 1997). On peut se poser la question du rôle de ces UCPs dans ces muscles. Une hypothèse serait que ce cycle des protons permettrait de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone, et donc minimiserait le stress oxydatif ainsi que les dégâts au niveau de l'ADN (Brand 2000). Récemment, l'équipe de Brand a démontré que les superoxydes augmentent la conductance des protons dans la mitochondrie par un effet sur UCP1, UCP2 et UCP3 puisque cet effet est absent dans les souris knock-out pour UCP3. Ces résultats confirmeraient donc les hypothèses sur ce rôle des UCPs comme protecteurs contre le stress oxydatif (Echtay et al. 2002).

2.4. La Respiration mitochondriale

2.4.1. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire (voir figure 9) est la voie finale de l'oxydation de tous les substrats énergétiques (sucres et graisses). Elle est composée des complexes NADH-CoQ-réductase (complexe I), le succinate-CoQ-réductase (complexe II), CoQH₂ cytochrome c-réductase (complexe III), cytochrome c oxydase (complexe IV), et l'ATP synthase (complexe V). Deux complexes mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome c, assurant un rôle de navette entre les complexes I (ou II) et III pour l'ubiquinone et entre les complexes III et IV pour le cytochrome c. L'ATP-synthase mitochondriale est constituée d'une partie membranaire (F₀), canal à protons et d'une partie matriciel (F₁), qui possède l'activité catalytique d'hydrolyse ou de synthèse de l'ATP selon qu'elle utilise ou génère le gradient électrochimique de H⁺.

Les molécules de NADH produites par la β -oxydation et le cycle de Krebs, sont oxydées par le complexe I de la chaîne respiratoire. D'autres composés réduits sont également oxydés par

la chaîne respiratoire. Le complexe II oxyde le succinate produit par le cycle de Krebs et la β -oxydation. La chaîne des oxydoréductions aboutit finalement à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau par le complexe IV de la chaîne respiratoire et notamment le complexe de la cytochrome oxydase. Le gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne est créé par l'extrusion de protons, vers l'espace intermembranaire, au niveau des complexes I, III et IV. Cette extrusion est couplée au transfert des électrons à travers ces mêmes complexes. Ce gradient va permettre de créer une force proton-motrice utilisée par l'ATP synthase pour la phosphorylation des molécules d'ADP en ATP (voir figure 7), assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP.

2.4.2. La phosphorylation oxydative (PHOSPHOX) et sa régulation

La PHOSPHOX est le principal processus responsable de la production d'énergie sous forme d'ATP. La demande en ATP d'un muscle n'est pas constante dans le temps et passe régulièrement par des phases de transition d'un état de repos à un état actif où la demande en énergie peut s'accroître de 10 à 100 fois dans le muscle squelettique (Dudley et al. 1987). Par conséquent, la PHOSPHOX doit être « informée » de la demande énergétique afin d'y adapter sa production. Il se pose donc la question de l'élucidation du (des) mécanisme(s) permettant l'activation de la PHOSPHOX. Un certain nombre d'études ont été réalisées, notamment sur des préparations de mitochondries isolées, mais aucune d'elles n'a permis de comprendre clairement les mécanismes régulant le métabolisme énergétique (Saks et al. 1995). Il a été démontré que la concentration cytosolique en ADP ne varie pas avec l'élévation du travail musculaire dans le cœur, ce qui implique qu'un simple mécanisme de feedback par l'élévation de la concentration en ADP cytosolique n'est pas à l'origine de la régulation de la PHOSPHOX. D'autre part, il existe plusieurs sites potentiel de contrôle de la PHOSPHOX, qui se situent globalement à trois niveaux différents : 1) au niveau de la vitesse de délivrance des équivalents réducteurs à la chaîne respiratoire, 2) au niveau de la vitesse de production de l'ATP à partir de l'ADP et P_i , et 3) au niveau de la formation d'eau à partir de l'oxygène et du cytochrome aa3 (Balaban 1990). Il a finalement été proposé, grâce à un modèle de régulation de la PHOSPHOX simulé par ordinateur, que chaque étape de la PHOSPHOX serait directement activée par des effecteurs externes (Korzeniewski 2001).

a) Les équivalents réducteurs et le calcium

L'énergie nécessaire pour produire l'ATP provient de l'énergie contenue dans les substrats énergétiques qui vont être oxydés tout au long des différentes étapes du métabolisme cellulaire. Cette énergie est ensuite transmise à la chaîne respiratoire via le NADH et le FADH₂. L'augmentation de la synthèse d'ATP nécessite donc l'augmentation de l'apport en équivalent réducteur. Ainsi, cet apport du cytosol à la chaîne respiratoire est un site potentiel de régulation de la PHOSPHOX. Il a été démontré que la concentration en NADH mitochondrial est un facteur important pour déterminer la vitesse maximale de la PHOSPHOX dans les conditions physiologiques (Balaban 1990). L'augmentation de la concentration en NADH pourrait donc être un moyen d'augmenter la vitesse de la PHOSPHOX et donc la vitesse de synthèse de l'ATP. Le mécanisme qui permet d'augmenter la vitesse de la PHOSPHOX par l'augmentation des apports en substrats n'est pas clairement défini, mais pourrait également faire intervenir le potentiel de membrane ou simplement la cinétique d'augmentation de NADH et de FADH. Il y a une multitude de réactions enzymatiques, de processus de transfert de l'énergie qui pourraient limiter l'apport en équivalents réducteurs. Les réactions enzymatiques du cycle de Krebs ou de la β -oxydation ainsi que les étapes de transport à travers les membranes mitochondriales sont sous la dépendance des concentrations en ADP, Pi, ATP, calcium ou magnésium, métabolites intermédiaires tels que le citrate ou l'acétyl CoA, ainsi que de l'état redox du NAD, du potentiel de membrane et du pH. Au niveau du cycle de Krebs, les déshydrogénases sont généralement désignées comme étant les principales cibles de la régulation du cycle. En effet, l'activité de certaines de ces enzymes est, *in vitro*, extrêmement sensible au calcium, au magnésium, à l'ATP, ADP, AMP, au Pi, NADH, NAD⁺, ainsi qu'aux métabolites intermédiaires du cycle de Krebs. Il semble toutefois que l'augmentation de la concentration de calcium dans la matrice mitochondriale joue un rôle crucial dans l'activation des déshydrogénases, notamment la glycérol 3-phosphate déshydrogénase, le complexe de la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et l'oxoglutarate déshydrogénase, permettant de maintenir ou d'augmenter le rapport NADH/NAD mitochondrial (Denton & McCormack 1980; Denton & McCormack 1985). De plus, il a été démontré que le calcium stimulait la production d'ATP en activant directement l'ATP synthase (Territo et al. 2000). Le calcium est donc un activateur de la production d'ATP et participe au contrôle des flux à différents niveaux dans la mitochondrie. Il est intéressant de noter que cette activation fait suite à une augmentation de calcium cytosolique qui va permettre d'activer l'ATPase de la myosine. Le calcium permet donc de participer au couplage entre la production et la consommation d'énergie.

Cependant il reste à démontrer jusqu'à quel niveau l'apport en équivalents réducteurs peut représenter une étape limitant le processus de la PHOSPHOX dans les muscles squelettiques et cardiaques.

b) L'ADP et le Pi

Plus récemment, la respiration mitochondriale mesurée in situ, grâce à la technique des fibres musculaires perméabilisées à la saponine (Veksler et al. 1987) a permis de mettre en évidence que dans le cœur, il existait une barrière de diffusion de l'ADP au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Saks et al. 1993; Saks et al. 1995; Saks et al. 1996b). Cette barrière se traduit par une diminution de la perméabilité à l'ADP externe et se caractérise par un K_m apparent pour l'ADP élevé ($\approx 300 \mu\text{M}$, supérieur à la concentration libre cytosolique de l'ADP estimé à $30\text{-}50 \mu\text{M}$). Les mesures faites sur des préparations de mitochondries isolées, donnent un K_m apparent pour l'ADP très bas ($\approx 20 \mu\text{M}$) (Saks et al. 1991; Saks et al. 1993). Ceci suggère que l'environnement intracellulaire et les interactions des mitochondries avec le réseau cytosquelettique et les autres organites tels que les myofilaments et le réticulum sarcoplasmique sont préservés in situ mais pas in vitro, et participent à la barrière de diffusion pour l'ADP. Un facteur de nature protéique (facteur X) pourrait être impliqué dans la régulation de la perméabilité de cette membrane en interagissant avec la porine et en limitant le transport de l'ADP vers l'espace intermembranaire (Saks et al. 1995). D'autres protéines, telles la desmine et la dystrophine semblent aussi exercer un rôle régulateur sur la fonction mitochondriale des muscles oxydatifs (Kay et al. 1997; Milner et al. 2000). Une étude récente a montré que l'interaction actine-VDAC constitue un mécanisme par lequel l'actine régulerait le métabolisme énergétique en modulant les propriétés du VDAC (Xu et al. 2001). La barrière de diffusion à l'ADP n'est trouvée que dans les muscles oxydatifs et est inexistante dans les muscles de type glycolytique (Veksler et al. 1995). L'ADP pourrait donc participer à la régulation de la PHOSPHOX par une simple augmentation de sa concentration cytosolique dans les muscles glycolytiques, ce qui n'est pas le cas dans les muscles oxydatifs, où l'entrée et la sortie de l'ADP et l'ATP sont plus finement régulées. Il y a donc une tissu-spécificité mitochondriale de la régulation de la PHOSPHOX. Dans les muscles glycolytiques, la PHOSPHOX est directement stimulée par l'augmentation de la concentration en ADP alors que dans les muscles oxydatifs, elle est dépendante du couplage avec la mi-CK qui va permettre son activation. Cette barrière de diffusion montre d'une part l'importance des interactions architecturales dans le fonctionnement des organites intracellulaires (Saks et al.

1998) et d'autre part la compartimentation fonctionnelle avec la création d'un microenvironnement au niveau de la mitochondrie (Saks et al. 2001).

c) Le cytochrome oxydase et l'oxygène

La cytochrome c oxydase (COX), accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire (Weibel et al. 1991), est une enzyme cruciale pour la respiration mitochondriale. Cette enzyme fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire, et permet de catalyser la réaction suivante : $2\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$. Cette réaction représente une étape limitante de la vitesse de PHOSPHOX. Ainsi, il est capital que la pression partielle en oxygène ($p\text{O}_2$) au niveau du microenvironnement cellulaire satisfasse les conditions cinétiques et thermodynamiques pour le bon fonctionnement de la PHOSPHOX. Un déficit en oxygène (hypoxie) a des conséquences physiologiques et physiopathologiques allant de l'altération des fonctions aérobies à des dommages ischémiques et à la mort cellulaire. La compréhension du contrôle de la respiration mitochondriale par l'oxygène est donc d'une importance fondamentale pour la bioénergétique et la mise en place de thérapeutiques. Lors d'un exercice à VO_2max , la $p\text{O}_2$ au niveau du cytochrome aa3 est très faible (<1 kPa) et pourrait expliquer la réduction de la respiration mitochondriale maximale (Severinghaus 1994; Richardson et al. 1999). Ceci va dans le sens de la théorie d'une limitation de la VO_2max par l'apport en O_2 au muscle. Le principal site de résistance à la diffusion de l' O_2 se situe entre la surface du globule rouge et le sarcolemme (Honig et al. 1992). Le flux à travers la chaîne de transport d'électron dépend de 3 forces relatives: l'oxygène libre, le potentiel redox et l'état de phosphorylation (Honig et al. 1992). Plus le turnover de la COX augmente et plus il y a un effet positif sur ces 3 forces. A l'effort, le potentiel redox et l'état de phosphorylation doivent compenser la faible $p\text{O}_2$ pour maintenir un flux en O_2 dans la mitochondrie. Un déficit de cette enzyme est connu pour provoquer un nombre important de pathologies diverses.

d) Les kinases mitochondriales

Les kinases associées à la Mext ou situées dans l'espace intermembranaire des mitochondries peuvent réguler la respiration mitochondriale (Brdiczka & Wallimann 1994). Une interaction de ces kinases avec la porine, au niveau des sites de contact, permettrait que la pore devienne moins dépendante du potentiel et acquiert une meilleure perméabilité pour les nucléotides adényliques. Un autre avantage majeur résultant de l'étroite interaction entre les kinases, la porine et l'ADP/ATP translocase formant des complexes au niveau des sites de contact, est

une diminution des distances de diffusion et une canalisation de l'ADP vers la matrice mitochondriale. De plus de par la diversité de ces kinases, la respiration mitochondriale peut-être régulée par différents signaux métaboliques. Ainsi, lorsque dans les conditions basales, la phosphorylation oxydative génère de l'énergie nécessaire entre autre pour la synthèse du glycogène et des protéines, la mitochondrie serait activée par des métabolites utilisés dans ces voies de synthèse tels que le glucose, l'UDP et le GDP par l'intermédiaire de l'hexokinase (HK) et de la nucléoside-diphosphate kinase (NDPK) qui sont fonctionnellement couplées à l'ADP/ATP translocase : elles utilisent l'ATP transloqué par l'ADP/ATP translocase et génère de l'ADP qui va stimuler la chaîne respiratoire. L'adénylate kinase mitochondriale (AK2) régule aussi la respiration mitochondriale en étant couplé à la translocase et permet la stimulation de la chaîne respiratoire par l'acyl-coA synthase (ACS) activée par des acides gras. De cette façon la PHOSPHOX peut-être régulée par différents métabolites activant les kinases spécifiques des voies métaboliques cellulaires. Ainsi, chaque type cellulaire adapte sa fonction mitochondriale à ses besoins via ses kinases spécifiques.

La production, le transport et l'utilisation de l'énergie sont des processus fondamentaux qui sont facilités par des voies métaboliques impliquant de multiples réactions enzymatiques qui sont finement régulées. La capacité aérobie d'un muscle est directement dépendante de la capacité à produire de l'énergie lors du processus de la phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. La mitochondrie est une organelle composée d'une multitude de complexes protéiques qui sont tous finement régulés en fonction des besoins et des conditions du milieu cellulaire. La mitochondrie joue un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire, non seulement par sa fonction de production d'énergie, mais aussi par son implication dans les processus de mort cellulaire et d'interactions fonctionnelles qu'elle établit avec les différentes structures intracellulaires telles que le cytosquelette, les myofilaments, la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique. Il reste à présent à comprendre comment la voie de signalisation peut se faire entre les sites d'utilisation de l'énergie et le site de production qu'est la mitochondrie. Nous savons depuis une dizaine d'années qu'il existe des systèmes permettant d'optimiser l'efficacité de la production, du transfert et de l'utilisation de l'énergie évitant une large fluctuation des concentrations en substrats et en produits.

2.5. Interactions mitochondriales

Les mitochondries sont physiquement connectées à d'autres structures subcellulaires via les interactions entre la Mext, impliquant le plus souvent la porine, et des protéines du réseau cytosquelettique, du réticulum endo- et sarcoplasmique et des myofilaments.

2.5.1. Mitochondries et cytosquelette

Les mitochondries interagissent avec les trois principales structures cytosquelettiques, les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine (Letellier et al. 1994). Ces connections sont essentielles pour la mobilité et la localisation des mitochondries. De plus, les contraintes imposées par ces interactions peuvent influencer la morphologie des mitochondries et probablement aussi le processus de fusion et de division de ces organites. Il a été montré que des protéines associées au cytosquelette, les kynésines et les dynamines, jouent un rôle important pour la localisation, les mouvements et la morphologie des mitochondries. Des altérations de la forme et de la distribution des mitochondries sont associées à diverses pathologies telles que des maladies hépatiques, la dystrophie musculaire, les cardiomyopathies et les cancers. D'autre part, il a été suggéré que la fonction mitochondriale elle-même est dépendante d'interactions spécifiques entre la Mext et certaines protéines du cytosquelette (Saks et al. 1995; Saks et al. 1996a; Milner et al. 2000; Braun et al. 2001).

2.5.2. Mitochondries et réticulum endo- et sarcoplasmique

Une étroite association entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique via des microdomaines spécifiques des deux organelles (les sites de contact des mitochondries et une sous fraction du réticulum) est à l'origine de la capacité des mitochondries à importer les phospholipides qu'elles ne peuvent synthétiser. Cette association fonctionnelle joue alors un rôle déterminant pour la biogenèse mitochondriale. D'autre part, il a été montré pour divers types cellulaires que l'augmentation de la concentration calcique cytosolique résultant de la stimulation par un agoniste est accompagnée par une augmentation de la concentration calcique dans la matrice mitochondriale. Un contact étroit entre les sites libérant le calcium (sarcolemme, réticulum endo et sarcoplasmique) et la mitochondrie est à l'origine de microdomaines où la concentration cytosolique de calcium est suffisamment élevée pour activer rapidement le transport de calcium à l'intérieur de la mitochondrie via l'uniport calcique mitochondrial. Ces interactions permettent donc la régulation de l'activité mitochondriale (et donc de la production d'énergie) par l'intermédiaire des déshydrogénases du cycle de Krebs sensibles au calcium, et la modulation locale du signal calcique

cytoplasmique par la mitochondrie. D'autre part, ces interactions structurelles et fonctionnelles entre les mitochondries, le RS et les myofilaments, permettent une canalisation directe ADP/ATP entre les sites de production de l'énergie (les mitochondries) et les sites d'utilisation d'énergie (la pompe calcique du RS et la myosine-ATPase des myofilaments) (Kaasik et al. 2001; Saks et al. 2001).

2.5.3. Mitochondries et myofilaments

Les mitochondries des muscles striés forment un réseau enchevêtré autour des myofibrilles. De même que pour le RS, il a été montré que l'ATP produit par les mitochondries est préférentiellement utilisé par les myofilaments plutôt que l'ATP externe et réciproquement, c'est l'ADP généré par l'activité de la myosine-ATPase plutôt que l'ADP externe qui sert de substrat aux mitochondries (Kaasik et al. 2001; Saks et al. 2001). Ainsi, grâce à ces étroites relations entre les mitochondries et les sites consommateurs d'ATP (ou producteur d'ADP), l'ensemble de ces structures (mitochondries, myofilaments et RS) constituent des complexes fonctionnels unitaires appelés « unités énergétiques intracellulaires » (Saks et al. 2001).

D. LES SYSTEMES DE TRANSFERT D'ENERGIE

La régulation du transfert énergétique dans les cellules musculaires est un concept essentiel qui concerne l'organisation, la compartimentation et les fonctions cellulaires ainsi que les complexes multienzymatiques. Les enzymes impliqués dans la production, l'utilisation et le transfert de l'énergie musculaire sont caractéristiques du type de métabolisme du muscle.

1. LE SYSTEME CREATINE KINASE

La famille des isoenzymes de la CK est présente chez tous les vertébrés. Elle est capable de catalyser le transfert réversible d'une liaison riche en énergie entre la créatine et l'ATP. La créatine et la CK sont présentes en quantité variable dans les différents types de muscle. Chez les mammifères, quatre isoformes différentes de CK sont exprimés de façon tissu spécifique. La majeure partie des CK existent sous la forme dimérique, composée de deux sous unités, M et B, donnant trois isoenzymes, MM, BB et MB. Il existe une quatrième isoenzyme dans la mitochondrie (mi-CK), qui diffère biochimiquement et immunochimiquement des formes cytosoliques et peut former des structures dimérique ou octamérique (Wyss et al. 1992). Cette mi-CK est codée, de façon tissu spécifique par deux gènes différents. Une forme (mi-CK_s ou mi_b-CK) est présente dans les tissus présentant des structures sarcomériques (muscles striés)

et co-exprimée avec la M-CK, alors que l'autre forme (mi-CK_u ou mi_a-CK) est ubiquitaire et co-exprimée avec la B-CK. Il n'existe pas de différence de cinétique marquante entre les quatre isoformes. Ils diffèrent essentiellement par leur distribution à l'intérieur de la cellule. En effet, une caractéristique importante de ce système est la variabilité de son activité totale et la distribution de ces isoenzymes (compartimentation) suivant les espèces et les tissus (Ventura-Clapier et al. 1998). Ces isoenzymes sont soit présentes dans le cytoplasme, soit attachées aux compartiments intracellulaires. L'isoenzyme MM-CK est essentiellement cytoplasmique mais elle est également associée au sarcolemme, aux myofilaments et au réticulum sarcoplasmique. La mi-CK se trouve ancrée au niveau de la face externe de la membrane interne de la mitochondrie. Il reste à présent à définir le rôle fonctionnel de chacune de ces isoenzymes dans les différents compartiments intracellulaires de la fibre musculaire squelettique.

Le système des CK participe activement au concept d'un système métabolique organisé, où les enzymes sont contrôlées par leur micro environnement, ainsi que par d'autres composants du même système. Un mécanisme de canalisation direct des substrats et des produits se met en place, permettant de diminuer les distances de diffusion entre les intermédiaires et le temps de transit entre les différentes séquences de réactions enzymatiques grâce à une organisation structurale en complexes multienzymatiques. Cette vitesse de réaction élevée peut-être atteinte dans ces systèmes de couplage indépendamment de la concentration moyenne des substrats ou des intermédiaires. Ainsi, la cellule possède plusieurs micro-compartiments métaboliques qui sont, par définition, des situations dans lesquelles le métabolite passe d'un enzyme à l'autre et ne se mélange pas avec la réserve totale en métabolites du même macro-compartiment. Ces problèmes de compartimentation intracellulaire sont directement reliés au problème de la diffusion intracellulaire. Il a été prouvé qu'il existe des micro compartiments au niveau sous sarcolemmal et myofibrillaire, mais il n'est pas exclu que des micro compartiments dynamiques existent également grâce à des associations transitoires des enzymes cytoplasmiques incluant le système glycolytique et les CK (Saks et al. 1994).

1.1. La compartimentation du système CK

1.1.1. La créatine kinase myofibrillaire

Par le fractionnement subcellulaire ou par la localisation histochimique, la MM-CK a été trouvée dans les myofibrilles et décrite comme une protéine de structure de la bande M participant à la connexion entre les filaments de myosine à l'intérieur des fibres musculaires (Wallimann & Eppenberger 1985). Cette MM-CK est également fonctionnellement couplée à

la myosine ATPase, utilisant la PCr pour rephosphoryler l'ADP produit par la myosine ATPase. Elle fournit suffisamment d'énergie pour atteindre la force maximale et une cinétique de contraction adéquate tout en contrôlant localement le pH (Ventura-Clapier et al. 1994; Veksler et al. 1997).

1.1.2. La créatine kinase du réticulum sarcoplasmique

La MM-CK est fortement liée aux membranes du RS dans le muscle squelettique et le cœur, où elle est fonctionnellement couplée à la calcium ATPase. Son rôle est donc d'assurer un approvisionnement en énergie efficace en régénérant l'ATP localement et également de maintenir, comme la MM-CK myofibrillaire, un rapport ATP/ADP élevé à proximité de l'ATPase, optimisant le recaptage du calcium et donc la relaxation musculaire (Minajeva et al. 1996). Il est montré que les enzymes glycolytiques associées au RS ne sont pas aussi efficaces que la MM-CK pour régénérer de l'ATP nécessaire à la calcium ATPase, mais sont capables de suppléer le système CK lorsque le système des CK est altéré (Boehm et al. 2000).

1.1.3. La créatine kinase mitochondriale

La mi-CK est trouvée sur la surface externe de la membrane interne de la mitochondrie. Elle est fonctionnellement et structurellement couplée à l'adénine nucléotide translocase (ANT) de la membrane interne. En présence de créatine, l'ATP généré par la phosphorylation oxydative, après passage par l'ANT, est transphosphorylé en PCr (Wyss et al. 1992; Saks et al. 1994). En échange, l'ADP produit par la réaction sera recapté à l'intérieur de la mitochondrie par l'ANT et stimulera la respiration mitochondriale, tandis que la PCr sera exportée à l'extérieur de la mitochondrie via la porine (Saks et al. 1994).

1.2. Les différents rôles attribués au système CK

Le système CK peut remplir différents rôles en fonction du type de métabolisme prédominant. Généralement le système CK/PCr est décrit comme étant un système de « tampon énergétique temporel et spatial ». Mais il est maintenant clairement établi que le système CK a une deuxième fonction extrêmement importante de « système navette » permettant le transport de l'énergie. Cette fonction fait intervenir les différentes isoenzymes de la CK qui vont permettre le couplage entre les sites de production et les sites d'utilisation de l'énergie. Le couplage entre la mitochondrie, l'ANT et la mi-CK permet la production de PCr tandis que les CK cytosoliques, myofibrillaires et du RS, permettent le transfert quasi instantané du groupement phosphorylé et du signal métabolique entre la mitochondrie et les sites d'utilisation de l'énergie. Les CK myofibrillaires et du RS permettant la rephosphorylation locale de l'ADP et

donc de maintenir un rapport ATP/ADP élevé au voisinage du site actif des ATPases pour un captage de calcium et des cinétiques de contractions optimaux (Wallimann et al. 1992; Saks et al. 1994). Le signal métabolique, en retour, est transmis entre les ATPases et les mitochondries par les CK cytosoliques. Le système CK/PCr peut ainsi jouer un rôle d'intégration entre les fonctions de production et d'utilisation d'énergie et n'est présent que dans les muscles oxydatifs, tels le cœur et les muscles posturaux, qui nécessitent un apport régulier en énergie. Dans ces muscles dit « oxydatifs », la fonction navette du système CK permet une adéquation rapide entre utilisation et production d'énergie sans variations notables des concentrations cytosoliques des produits et des substrats, pour assurer une contractilité soutenue (figure 10).

De même que la régulation de la respiration mitochondriale par l'ADP présente une spécificité tissulaire, le couplage fonctionnel de la mi-CK avec la respiration mitochondriale n'est présent que dans les muscles de type oxydatif (Veksler et al. 1995; Kuznetsov et al. 1996). Cela se traduit par une augmentation de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP (diminution du K_m apparent pour l'ADP) en présence de créatine lors d'expériences réalisées sur des fibres perméabilisées à la saponine. L'expression de l'isoforme de mi-CK est abondante dans les fibres oxydatives cardiaques et squelettiques de type I et IIa et pratiquement absente dans les fibres de type IIb (Qin et al. 1999).

Dans le muscle rapide, la navette du système CK n'est pas fonctionnelle. Le système des CK joue un simple rôle de tampon énergétique temporel et est couplé aux complexes glycolytiques. La respiration mitochondriale est sous la dépendance de l'ADP cytosolique et non de celui produit localement par la mi-CK. Au niveau des myofilaments, la vitesse élevée de raccourcissement des fibres rapides est possible grâce à une activité élevée des ATPase de la myosine qui sont associées à une activité élevée de la MM-CK afin d'apporter l'énergie suffisante sous forme d'ATP. Ainsi le système CK a une fonction de tampon spatio-temporel, permettant d'alimenter les ATPases, et de répondre à une demande intense, rapide et brève de la contraction musculaire (figure 11).

La CK constitue l'un des marqueurs du phénotype musculaire. Ce système semble s'adapter aux différentes conditions d'activités contractiles ce qui explique les différences rencontrées en fonction des différents types de muscles. Le système CK peut avoir à la fois un rôle de tampon énergétique temporel et spatial et permet la production de PCr qui constitue une forme de réservoir d'énergie rapidement mobilisable. Sa présence en quantité importante dans les compartiments cellulaires assure une distribution spatiale de l'ATP.

Dans les muscles oxydatifs, le système des CK joue donc un rôle de transfert des groupements phosphate, c'est à dire une fonction de navette entre les sites de production et d'utilisation de l'énergie permettant une intégration efficace entre production et utilisation de l'énergie

2. LE SYSTEME ADENYLATE KINASE (AK)

L'adénylate kinase ou myokinase est une enzyme clé dans la synthèse et l'homéostasie des adényl nucléotides. Elle catalyse de façon réversible la réaction suivante :



Plusieurs isoformes de l'AK ont été identifiées et sont exprimées différemment selon les tissus considérés : ils sont localisés dans différents compartiments subcellulaires.

AK1 est majoritairement trouvée dans les tissus à forte demande énergétique tels que le muscle squelettique et le myocarde. Il est localisée dans le cytosol, associée aux myofilaments au niveau de la bande I, ou au sarcolemme à proximité des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) dont la fonction semble être régulée par l'AK. Les autres isoformes AK2 et AK3 sont moins abondantes dans les muscles et sont confinés respectivement à l'espace intermembranaire et à la matrice mitochondriale.

Comme la créatine kinase, la présence de l'AK en divers sites subcellulaires suggère que cette enzyme est impliquée dans les transferts d'énergie et la communication entre les sites producteurs et consommateurs d'ATP. Il apparaît que l'AK est essentielle pour la fonction contractile musculaire, en rephosphorylant localement l'ADP produit lors de la contraction; il apparaît également qu'elle peut transférer des phosphates à haute énergie générés par le métabolisme glycolytique et la phosphorylation oxydative vers des sites utilisateurs d'ATP tels que les myofilaments.

La localisation intracellulaire commune de l'AK et la CK semble mettre en évidence un lien et probablement une interdépendance de ces deux kinases. Le rôle fonctionnel de l'AK dans les transferts d'énergie devient plus important quand le système CK/PCr est déficient (Veksler et al. 1995). Il est proposé, comme pour la CK, une fonction navette de l'AK avec l'AMP pour signal métabolique (pour la CK il s'agit de la créatine). De plus, l'AK assure également un rôle déterminant dans la transduction du signal mitochondrial (signal énergétique) vers le sarcolemme via le canal K_{ATP} et probablement d'autres transporteurs sensibles à l'ATP avec pour effet une modulation du potentiel membranaire (réponse électrique).

Les systèmes AK et CK ne sont pas les seuls systèmes cellulaires assurant la fonction de transfert de groupement phosphate à haute énergie. Des enzymes de la glycolyse et des nucléosides mono- et diphosphate kinases également localisées en divers sites subcellulaires peuvent aussi participer à l'homéostasie énergétique cellulaire dans les conditions normales et pathologiques.

III. ADAPTATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE SQUELETTIQUE DU SUJET TC A UN PROGRAMME D'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE

A. CONTROLE ET ADAPTATION DU PHENOTYPE MUSCULAIRE

1. RAPPELS DES MODALITES DU TYPAGE HISTOCHIMIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES

Dès la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, Ranvier évoqua l'hétérogénéité du tissu musculaire en distinguant des muscles blancs et des muscles rouges. Ce n'est que vers la fin des années 50 qu'une méthode objective de typage des fibres musculaires fut proposée, basée sur une analyse histochimique de l'activité enzymatique de l'ATPase de la myosine (Pette & Staron 1990). Cette méthode permettait de caractériser les fibres musculaires en fibres de type I (faible activité ATPasique), ou de type II (activité ATPasique élevée).

Plus tard, les propriétés physico-chimiques de l'ATPase, et sa sensibilité à différents pH fut exploitée pour proposer une classification histochimique qui permet de prendre en considération deux sous-types de fibres rapides, IIA et IIB, et une catégorie de fibres (IIC) prenant une coloration intermédiaire entre les grands sous-groupes (Brooke & Kaiser 1970). De nombreuses modifications et ajustements ont été proposés, permettant non seulement de définir différents sous-groupes de fibres rapides (Staron & Pette 1986), mais aussi de souligner l'extrême sensibilité de cette méthode de typage. Il existe une bonne corrélation entre le typage des fibres par la technique de la myosine ATPase et le type d'isoforme de la myosine et il est admis que le typage histochimique est un bon reflet de la composition du muscle en myosine (Staron & Pette 1986).

Il est cependant important de rappeler que ce mode de typage des fibres musculaires ne repose que sur l'étude de la sensibilité de l'activité ATPasique à différents pH ; il ne représente qu'une approche indirecte de l'équipement du muscle en myosine et ne laisse rien augurer *a priori* de ses propriétés métaboliques. Cette dernière remarque permet d'expliquer pourquoi différents types de fibres musculaires ont été identifiés sur la base de réactions histochimiques impliquant les activités d'enzymes du métabolisme aérobie (succinate déshydrogénase, SDH,

nicotinamide adénine dinucléotide, NADH).

2. NOTION DE PHENOTYPE MUSCULAIRE

Chaque type musculaire présente des caractéristiques fonctionnelles, structurelles, biochimiques et métaboliques qui lui sont propres et qui définissent son phénotype. Par ailleurs, les différentes familles de protéines qui entrent dans la constitution de la fibre musculaire peuvent être schématiquement subdivisées en protéines contractiles et en protéines enzymatiques sarcoplasmiques ou mitochondriales. On peut ainsi définir un phénotype contractile et un phénotype métabolique qui représentent les deux grandes caractéristiques du muscle, complémentaires l'une de l'autre, mais qui ne sont pas toujours co-régulés.

2.1. Phénotype contractile

Les propriétés contractiles d'un muscle correspondent principalement à sa vitesse de contraction, sa vitesse de relaxation, le pic de force développée et sa résistance à la fatigue. Ces propriétés sont déterminées par l'agencement des différentes isoformes des protéines contractiles et régulatrices. Toutes ces protéines n'ont pas le même poids dans la détermination du mode de contraction du muscle. C'est essentiellement la répartition des isoformes de MHC, et plus accessoirement celles des MLC qui a une traduction fonctionnelle importante sur la vitesse de contraction du muscle. La composition en MHC est donc un bon marqueur du phénotype contractile d'un muscle.

2.2. Phénotype métabolique

Le phénotype métabolique peut être caractérisé par détermination des activités enzymatiques clés de différentes voies métaboliques et par la mesure de la respiration mitochondriale qui représente l'aboutissement final de toutes les voies métaboliques. Le muscle strié est constitué d'une variété de fibres ayant des propriétés fonctionnelles, structurales, biochimiques et métaboliques adaptées à leur activité contractile (Schiaffino & Reggiani 1994).

2.2.1. Le muscle rapide glycolytique

Le muscle rapide glycolytique est adapté à un besoin énergétique intense et bref grâce à une disponibilité immédiate du stock d'énergie cytosolique (phosphocréatine et ATP), grâce à un effet tampon important et dépendant de la réaction catalysée par la créatine kinase et enfin grâce à une activité glycolytique importante (Kushmerick et al. 1992). Il est également caractérisé par la prédominance de fibres contractiles rapides de type IIb (Brooke & Kaiser

1970), contenant peu de mitochondries et pauvres en myoglobine et en capillaires (ce qui leur donnent un aspect blanc), mais riches en glycogène. Ce type de muscle a donc une fatigabilité importante et une récupération décalée dans le temps et assez lente.

2.2.2. Le muscle lent oxydatif

Les muscles lents à activité soutenue (muscle postural) ou cyclique (cœur) sont essentiellement composés de fibres à contraction lente de type I et à activité ATPasique lente. Ces muscles sont riches en myoglobine (aspect rouge), présentent un réseau capillaire bien développé, une faible réserve en PCr et un métabolisme essentiellement oxydatif puisque les phosphorylations oxydatives sont la source principale d'énergie chimique utilisée par les myofibrilles durant la contraction. Il est apte à soutenir un effort prolongé, ce qui implique un couplage efficace entre l'utilisation et le renouvellement énergétique et permet un flux énergétique stable et bien ajusté (Ventura-Clapier et al. 1998; Kay et al. 2000; Saks et al. 2001). Il existe également des phénotypes intermédiaires comme le muscle rapide-oxydatif composé de fibres IIa et riche en mitochondries.

En conclusion nous pouvons dire qu'à une fonction musculaire lente ou rapide correspond une organisation cellulaire et un phénotype métabolique particulier, incluant les systèmes enzymatiques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Le phénotype musculaire dépend de l'expression de nombreuses familles multigéniques de protéines. Le contrôle de l'expression des nombreuses isoformes de ces protéines participe à la diversité structurale et fonctionnelle des fibres musculaires squelettiques qui sont donc hautement adaptatives et capables de faire évoluer à la fois leur phénotype métabolique et contractile en fonction des besoins.

3. CONTROLE DU PHENOTYPE MUSCULAIRE ET NOTION DE PLASTICITE MUSCULAIRE

3.1. Les hormones thyroïdiennes

Les actions physiologiques des hormones thyroïdiennes sont multiples. Elles sont indispensables à la maturation et à la croissance du système nerveux et du système osseux. Ce sont des hormones catabolisantes qui activent les trois métabolismes : lipidique, glucidique et protidique ; elles augmentent la consommation d'oxygène et sont impliquées dans la thermogénèse. Enfin, elles ont des impacts viscéraux multiples sur le cœur, le muscle

squelettique, le système nerveux, le système digestif et le tissu médullaire. Elles représentent également un des plus importants régulateurs de l'expression des isoformes des protéines myofibrillaires. L'hormone thyroïdienne est donc une composante importante de la mise en place à la fois du phénotype contractile et du phénotype métabolique.

3.1.1. Effets sur le phénotype contractile

L'hormone 3,5,3 -triiodothyronine (T3) exerce un effet important sur la plasticité de muscle strié et notamment sur l'expression de la famille de gènes qui codent pour les MHC. T3 permet la transition de l'isoforme de MHC embryonnaire ou fœtal en MHC adulte (Gambke et al. 1983). Chez l'adulte, une altération du niveau de T3 provoque des variations dans l'expression des gènes des MHC dans le muscle squelettique. Chez le rat l'hypothyroïdie induit une transition vers un phénotype musculaire métabolique plus lent, l'importance de cette transition variant en fonction du type de muscle. A l'inverse, il a été montré que l'hyperthyroïdie induit une transformation des muscles vers un phénotype plus rapide impliquant la répression de l'expression des MHC 1 et l'augmentation des isoformes rapides MHC 2x/2b (Caiozzo & Haddad 1996). Il existe une expression coordonnée entre les MHC lentes et les SERCA2a ainsi qu'entre les MHC rapides et les SERCA1a, aussi bien dans l'hypothyroïdie que dans l'hyperthyroïdie, (Hamalainen & Pette 1997).

3.1.2. Effets sur le phénotype métabolique

L'hormone thyroïdienne a un effet important sur les capacités oxydatives musculaires (Gollnick & Ianuzzo 1972; Winder & Holloszy 1977; Wiles et al. 1979). L'hypothyroïdie provoque une diminution des activités enzymatiques oxydatives telles que la succinate déshydrogénase, la citrate synthase ou la cytochrome oxydase dans le soléaire et le quadriceps (Gollnick & Ianuzzo 1972; Bouhnik et al. 1975; Baldwin et al. 1978; Zoll et al. 2001). Récemment, une étude de notre équipe a montré que l'affinité des mitochondries pour l'ADP est plus élevée dans le soléaire de rats hypothyroïdiens (diminution du K_m), comparativement aux rats euthyroïdiens (Zoll et al. 2001). Ainsi, la régulation de la perméabilité mitochondriale à l'ADP est affectée par la déficience en hormone thyroïdienne dans le muscle squelettique, ce qui n'est pas le cas dans le cœur (Seppet et al. 1991), confirmant le rôle moins important joué par l'hormone thyroïdienne dans la régulation de la fonction mitochondriale cardiaque.

D'autre part, cette étude montre que la créatine kinase mitochondriale (mi-CK) reste fonctionnelle dans le muscle soléaire des rats hypothyroïdiens. Puisque l'activité de la mi-CK n'est pas modifiée, les auteurs ont suggéré que l'expression de la mi-CK n'est pas sous le contrôle de l'hormone thyroïdienne (Zoll et al. 2001).

A l'opposé, l'hyperthyroïdie provoque une augmentation des capacités oxydatives du soléaire (Capo & Sillau 1983; Nelson et al. 1995; Dummler et al. 1996; Craig et al. 1998). L'action de l'hormone thyroïdienne passe par le contrôle de facteurs de transcription faisant partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Enriquez et collaborateurs ont observé que T3 peut agir directement sur le génome mitochondrial (Enriquez et al. 1999). En plus de son contrôle sur l'expression des protéines mitochondriales, la T3 a des effets immédiats sur la mitochondrie en stimulant directement la respiration mitochondriale ainsi que la synthèse d'ATP (Sterling et al. 1977; Sterling et al. 1980).

3.2. Innervation et activité neuromusculaire

L'activité neuromusculaire joue un rôle important dans l'expression et le maintien du phénotype musculaire au cours du développement et de la maturation des fibres (Pette & Vrbova 1985). Ainsi, en absence d'innervation, le muscle lent devient plus rapide avec une diminution de la proportion de MHC I, et le muscle rapide plus lent avec une diminution de MHC IIB. Ces modifications sont associées à une augmentation concomitante de MHC IIA et MHC IIX (Huey & Bodine 1998). De la même manière, le modèle d'innervation croisée a mis en évidence l'importance de l'activité neuronale en démontrant la capacité du muscle à transformer son phénotype musculaire. Les muscles rapides se transforment en muscles lents quand ils sont réinnervés avec un motoneurone lent et les muscles lents deviennent rapides lorsqu'ils sont réinnervés par un motoneurone rapide (Pette & Vrbova 1985), démontrant toute l'importance du type d'activité neuronale délivré au muscle. Par stimulation électrique, l'application d'une activité neuronale de basse fréquence tonique (muscle lent) ou de haute fréquence phasique (muscle rapide), provoque également des transformations phénotypiques conséquentes (Pette & Staron 1997). En effet, une stimulation chronique permet de transformer un muscle rapide fatigable en un muscle lent, résistant à la fatigue, grâce à des changements quantitatifs et qualitatifs de quasiment tous les éléments du muscle. Il y a ainsi un remaniement des protéines myofibrillaires, membranaires et solubles impliquées dans l'homéostasie calcique, ainsi que des enzymes cytosoliques et mitochondriales du métabolisme énergétique (Pette & Vrbova 1999). Des changements dans les enzymes du métabolisme énergétique, notamment de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs, sont

parmi les premières adaptations à se mettre en place suite à une stimulation chronique du muscle rapide (Pette et al. 1973).

3.3. Régulation moléculaire de l'expression du phénotype musculaire

3.3.1. Les voies de contrôle du phénotype contractile

a) Régulation calcium-dépendante

Il a récemment été montré que la voie de la calcineurine-NFAT (nuclear factor of activated T cells) joue un rôle régulateur dans l'expression de différents gènes spécifiques des fibres musculaires. Cette voie met en jeu les variations de la concentration cytosolique en calcium induites par les motoneurones, et une enzyme cytoplasmique sensible à ces variations : la calcineurine (CnA). La calcineurine n'est pas sensible à de brusques élévations transitoires de la concentration de calcium intracellulaire, mais à des variations de plus longues durées et de basses amplitudes (Timmerman et al. 1996). Cette voie de transduction du signal qui aboutit à l'expression de gènes cibles est inhibée par la ciclosporine A (CsA) et le FK506 (Liu et al. 1991). En effet, la CsA se lie à la cyclophiline, alors que le FK506, lui, se lie au FKBP diminuant l'activité phosphatase de la CnA, ce qui empêche la déphosphorylation de NFAT et par conséquent l'activation de la transcription des gènes cibles (voir figure 12). L'implication de la calcineurine a été démontrée dans le muscle squelettique où elle se trouve en quantité importante (Chin et al. 1998). Cette voie serait importante pour la spécialisation des fibres lentes. L'activité des motoneurones toniques (10-15 Hz) entraîne des élévations faibles de calcium (100 à 300 nM) mais de façon durable, ce qui permettrait d'activer la CnA et donc NFAT. Par contre, l'activité des motoneurones phasiques, provoque des élévations importantes de calcium (~1µM), mais pendant des périodes très brèves, qui sont insuffisantes pour stimuler la CnA. Ainsi, Chin et collaborateurs proposent que dans les muscles lents, sous l'action de l'activité tonique de leur motoneurone, l'élévation de calcium soutenue est suffisante pour activer la voie de la CnA-NFAT (Chin et al. 1998). Le NFAT est donc déphosphorylé et vient se fixer dans le noyau sur l'ADN en collaboration avec d'autres régulateurs transcriptionnels, tel MEF2. Ces sites de liaison sont groupés dans les régions promotrices/enhancers contrôlant les gènes codant pour les protéines spécifiques des fibres lentes. Dans les fibres rapides, le NFAT ne peut donc pas se transloquer à l'intérieur du noyau, et n'est donc pas disponible pour participer aux interactions avec l'ADN et les autres protéines, provoquant une diminution de la transcription des protéines spécifiques aux fibres lentes et une augmentation de la transcription des protéines spécifiques aux fibres rapides.

Récemment, Wu et collaborateurs ont décrit l'implication de MEF2 dans le contrôle de l'expression des gènes spécifiques aux fibres lentes des muscles squelettiques, aboutissant à un nouveau modèle de régulation du phénotype lent, impliquant la CnA mais également d'autres protéines comme la protéine kinase calmoduline dépendante (Wu et al. 2000).

b) Régulation par les facteurs de transcription de la famille MRF (myogenic regulatory factor)

Cette famille se compose de quatre protéines bHLH (« basic helix loop helix ») : MyoD, myogénine, myf-5 et MRF4. Ces facteurs de transcription jouent un rôle clé dans la myogenèse et n'ont été trouvés que dans les muscles squelettiques où ils participent à la transcription de protéines spécifiques (Olson 1993). Ils forment des hétérodimères avec d'autres bHLH, comme la protéine E, et sont alors capables de se lier à l'ADN au niveau d'une séquence spécifique, la « E-box ». Ils sont capables d'entraîner la conversion de divers types de cellules en myoblastes et myotubes. MyoD, myogénine, myf-5 sont exprimés dans le fœtus plutôt que chez l'adulte alors que les transcrits MRF-4 apparaissent dans le fœtus tardif et sont prédominants chez l'adulte. Dans la patte postérieure de rat adulte, il a été observé une accumulation sélective de MyoD et myogénine respectivement dans les muscles rapides et lents. De plus, l'innervation croisée ou l'hormone thyroïdienne induisent une altération du rapport fibres rapides/lentes parallèlement au rapport MyoD/Myogénine. De la même manière, MyoD est capable de se fixer en amont du gène qui code pour la M-CK, enzyme principalement exprimée dans les fibres rapides. Dans le muscle adulte, MyoD et myogénine pourraient avoir des rôles distincts et médier les effets de facteurs intrinsèques sur l'expression des gènes spécifiques d'un type de fibre et donc participer à la mise en place du phénotype contractile (Hughes et al. 1993). Cependant, chez la souris adulte dépourvue de MyoD, il n'y a pas de déficience dans le développement des muscles rapides, suggérant que Myf-5 peut suppléer à MyoD (Rudnicki et al. 1992).

3.3.2. Les voies de contrôle de la mitochondriogenèse

Le muscle est capable d'ajuster ses capacités à produire et à distribuer les composés riches en énergie de manière adéquate et suffisante en fonction de la demande. L'initiation de la biogenèse mitochondriale dans la cellule musculaire débute avec l'arrivée de signaux

extérieurs initiés, par exemple, lors de la contraction musculaire. Ces signaux peuvent ainsi :

- 1) activer ou inhiber les facteurs de transcriptions, affectant la vitesse de transcription,
- 2) activer ou inhiber les facteurs de stabilité des ARNm, influençant leur vitesse de dégradation,
- 3) altérer l'efficacité de la traduction,
- 4) modifier les mécanismes post-traductionnels des protéines,
- 5) changer la cinétique d'import des protéines mitochondriales,
- 6) Altérer la vitesse d'incorporation ou d'assemblage des protéines dans les complexes multienzymatiques (Hood 2001).

La majorité des protéines mitochondriales proviennent du génome nucléaire, ce qui nécessite la transcription des gènes, la traduction des ARNm en protéines, la distribution des protéines dans leur compartiment mitochondrial via la machinerie d'importation, et enfin l'assemblage des complexes multienzymatiques au sein de la chaîne respiratoire ou de la matrice. Puisque seulement 13 protéines de la chaîne respiratoire sont codées par l'ADN mitochondriale, il est nécessaire de synchroniser l'expression des gènes du génome nucléaire et mitochondrial. On sait aujourd'hui que le « facteur de transcription mitochondrial A » (mTFA) est un activateur clé de la transcription mitochondriale, tout en étant une protéine mitochondriale codée par le noyau, et en constituant un point de contrôle de la synchronisation de l'expression des deux génomes. Le mTFA se fixe sur des éléments de séquences des promoteurs des deux brins de l'ADN mitochondrial, au niveau de la D-loop, et stimule la transcription mitochondriale *in vitro* (Fisher & Clayton 1988). L'initiation de la transcription produit également un primer pour la réplication de l'ADN mitochondrial, ce qui fait également de mTFA un point de contrôle du nombre de copie de l'ADN mitochondrial (Clayton 1992).

L'activation de mTFA est hautement dépendante des « facteurs respiratoires nucléaires » NRF-1 et NRF-2, qui sont des facteurs de transcription nucléaires (Virbasius & Scarpulla 1994). NRF-1 et NRF-2 sont également nécessaires à l'activation de plusieurs protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire (Scarpulla 1997). Il a été démontré que l'exercice physique provoque une augmentation de l'expression des ARNm de NRF-1 dans le muscle squelettique de rat, et peut donc être une réponse précoce à l'adaptation à l'exercice en endurance, permettant d'accroître les capacités oxydatives musculaires (Scarpulla 1997; Murakami et al. 1998). Cependant, le site de fixation de NRF-1 n'a pas été retrouvé dans l'ensemble des séquences promotrices des protéines mitochondriales codées par le noyau, comme par exemple certaines sous unités de la COX (Lenka et al. 1998). Cependant, NRF-2 a été montré comme étant un activateur de la sous-unité IV de la COX chez le rat (Virbasius & Scarpulla 1994). NRF-1 ne peut donc pas expliquer à lui tout seul une augmentation stœchiométrique de la synthèse de chaque sous-unité de la COX permettant de produire une

COX fonctionnelle. Récemment, la découverte de PGC-1, un co-activateur de PPAR- γ , a été révélée comme un coordinateur potentiel des deux génomes (Wu et al. 1999). De fait, la surexpression de ce facteur induit une augmentation du nombre de mitochondries, ainsi que l'augmentation d'ARNm d'un certain nombre de gènes nucléaires de la cellule musculaire, incluant NRF-1, NRF-2 α , mTFA, UCP-2, des sous unités de la COX et le cytochrome c. Il semblerait toutefois que NRF-1 soit nécessaire pour que PGC-1 ait un effet sur la biogenèse mitochondriale. Il a également été démontré dans un modèle de souris transgéniques, que le facteur de transcription myogénine influençait l'activité des enzymes métaboliques en induisant une transition du métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif, mimant les effets d'un entraînement en endurance (Hughes et al. 1999). Ces auteurs ont suggéré que la myogénine pourrait servir de lien entre les signaux de l'activité contractile et NRF-1, mais elle pourrait également avoir un effet direct sur les gènes codant pour des enzymes mitochondriales et cytoplasmiques spécifiques du muscle.

En conclusion, la modification de la biogenèse mitochondriale est le résultat d'une série d'événements physiologiques et biochimiques. Etant donné la diversité des régions promotrices des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales, ainsi que celles de l'ADN mitochondrial, il reste à savoir si la coordination entre toutes ces protéines est toujours assurée ou bien s'il existe des hétérogénéités mitochondriales répondant à des adaptations plus fines.

B. MODIFICATIONS INDUITES SUR LE PHENOTYPE MUSCULAIRE PAR L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE

1. LES FACTEURS LIMITANT LA CONSOMMATION MAXIMALE D'OXYGENE (VO_{2MAX})

Le passage de l'oxygène atmosphérique des poumons à la mitochondrie comporte une série d'étapes au niveau desquelles une entrave au flux d'oxygène peut avoir lieu. La consommation maximale d'oxygène de l'organisme (VO_{2max}) peut être limitée par plusieurs facteurs physiologiques : 1) La capacité de diffusion pulmonaire, 2) le débit cardiaque maximal, 3) la capacité du sang à transporter l'O₂, 4) la capillarisation et les capacités oxydatives du muscle. Les trois premiers facteurs peuvent être regroupés comme facteurs centraux, alors que le quatrième est un facteur périphérique.

1.1. Les facteurs centraux

1.1.1. Le système pulmonaire

Pour la plupart des individus réalisant un exercice exhaustif au niveau de la mer, les capacités pulmonaires sont suffisantes et même excessives, pour maintenir la saturation du sang artériel en O₂ supérieure à 95% (Weibel et al. 1991). Seuls des athlètes d'élites en endurance ont montré une désaturation en O₂ durant un exercice maximal (Dempsey et al. 1984). Ces athlètes ayant un débit cardiaque extrêmement important, le temps de transit des globules rouges diminue fortement dans les capillaires pulmonaires et par conséquent, la durée pendant laquelle le sang se trouve dans les capillaires pulmonaires est insuffisante pour le restaurer entièrement en O₂.

1.1.2. Le débit cardiaque maximum

Depuis les travaux de Hill du début du siècle, nous savons qu'il existe une relation linéaire entre le débit cardiaque maximum et la VO₂max des sujets (Hill & Lupton 1923). L'adaptation du débit cardiaque aux variations de VO₂max que l'on peut observer entre un sujet sédentaire et un sujet de même âge entraîné en endurance est principalement due aux variations du volume d'éjection systolique maximal, plutôt qu'aux variations de la fréquence cardiaque maximale et de l'extraction maximale de l'oxygène. La quantité d'oxygène contenue dans le sang artériel est d'environ 200 ml d'O₂.L⁻¹. Dans le sang veineux quittant les muscles actifs, la quantité d'O₂ n'est plus que de 20 mL d'O₂.L⁻¹. Ainsi, au maximum de l'exercice, quasiment tout l'oxygène disponible est extrait du sang qui perfuse les muscles actifs. Le mécanisme permettant d'augmenter la VO₂max suite à un entraînement découle d'une augmentation du débit cardiaque et donc de l'apport en oxygène au muscle. Il a été estimé que 70-85% de la limitation de la VO₂max est liée au débit cardiaque maximum (Bassett & Howley 2000).

1.1.3. La capacité du sang à transporter l'O₂

Au repos, la concentration en hémoglobine ([Hb]) des athlètes en endurance se situe au niveau des valeurs trouvées chez les sédentaires. Par ailleurs, cette [Hb] ne change pas après entraînement et n'est pas corrélée avec la VO₂max. La question qui se pose est de savoir si une augmentation de la [Hb] lors d'un exercice exhaustif pourrait provoquer une augmentation de la VO₂max. Des études de réinjection de globules rouges (1000-2000 ml de sang) et d'administration d'érythropoïétine ont permis de répondre à cette question en démontrant que la VO₂max et le temps de maintien avant épuisement, durant un exercice maximal, augmentent (Ekblom 2000). D'autre part, pour un exercice sous maximal, la VO₂

reste inchangée, avec un seuil ventilatoire inchangé ou faiblement augmenté, alors que la fréquence cardiaque et la concentration en lactate sont réduites. Ces expériences démontrent ainsi que l'augmentation de l'apport en O₂ par une augmentation des capacités de transport de l'oxygène permet d'améliorer la VO₂max.

1.2. Les facteurs périphériques

1.2.1. La densité capillaire

La microcirculation, les capillaires en particulier, jouent un rôle capital dans la délivrance de l'O₂ aux fibres musculaires. Dans le muscle squelettique, les capillaires se situent le long de l'axe longitudinal des fibres musculaires et l'importance de leur tortuosité ainsi que le grand nombre d'embranchements contribuent à leur grande longueur totale. Le degré de tortuosité varie en fonction de la longueur des sarcomères et s'avère un déterminant important de la surface totale du capillaire. Plus précisément, il a été démontré que la taille de la jonction du capillaire à la fibre est de première importance lorsque l'on considère la capacité structurale du flux en oxygène (Mathieu-Costello et al. 1992). Le nombre de capillaires par fibre musculaire est couplé au profil métabolique et à la taille de la fibre. Plus la fibre a un métabolisme oxydatif important et plus sa densité capillaire est grande (Degens et al. 1992).

L'entraînement en endurance permet d'augmenter la densité capillaire musculaire (Andersen & Henriksson 1977), par une augmentation du nombre de capillaire plutôt que par une augmentation de leur degré de tortuosité (Mathieu-Costello et al. 1992). Dans le vaste externe, une forte corrélation entre le nombre de capillaires par fibre et la VO₂max a également été mise en évidence (Saltin et al. 1977). La nécessité du développement du réseau capillaire ne réside pas seulement dans l'adaptation des réseaux capillaires par rapport au flux sanguin mais dans le maintien ou même l'augmentation du temps de transit entre le sang et le muscle actif, ce qui permet l'extraction de l'O₂, malgré des débits sanguins accrus.

1.2.2. Les gradients de diffusion périphérique de l'oxygène

Le passage de l'O₂ entre le globule rouge et le sarcolemme représente le principal site de résistance à la diffusion de l'O₂, du fait de la chute importante de la pO₂. Honig et al. (Honig et al. 1992) ont démontré que ce n'est pas la délivrance de l'O₂ en elle-même qui est directement limitante, mais c'est une faible pO₂ cellulaire par rapport à la pO₂ sanguine qui est nécessaire pour maintenir une force de diffusion importante et d'accroître ainsi la conductance de l'O₂. La diffusion de l'oxygène dépend donc de l'interaction entre le transport

de l'O₂ par la myoglobine et sa consommation par la mitochondrie.

1.2.3 Les capacités oxydatives musculaires

Des études chez l'homme ont montré, après un entraînement en endurance bien calibré, que la VO₂max n'augmentait que de 10-20% tandis que les activités des enzymes oxydatives augmentaient de plus de 200% (Saltin et al. 1977). Il a donc été proposé que l'augmentation des capacités oxydatives permettaient l'augmentation de la performance en endurance plutôt que l'amélioration de la VO₂max. Ainsi, pour un exercice sous maximal, l'augmentation des capacités oxydatives observée dans les muscles entraînés induirait de plus faibles perturbations du métabolisme cellulaire. L'augmentation de leur nombre éviterait aux mitochondries de fonctionner au maximum de leurs possibilités et permettrait une meilleure extraction de l'O₂ à partir du sang artériel, contribuant, de façon mineure, à l'augmentation de la VO₂max.. D'autre part, l'augmentation des capacités oxydatives jouerait un rôle permissif pour l'augmentation de la VO₂max .

2. MODIFICATIONS DU PHENOTYPE MUSCULAIRE APRES UN ENTRAINEMENT EN ENDURANCE

2.1. Les effets sur le phénotype contractile

Les effets de l'exercice en endurance, comme la course à pied, sur le profil des MHCs apparaissent être muscle-spécifiques et travail-dépendants. Par exemple chez le petit rongeur, lorsque les animaux sont entraînés à courir à une intensité élevée (30 m/min, 20% d'inclinaison, 75% VO₂max) pendant plusieurs semaines, la proportion des MHCs IIA et IIX est augmentée alors que la proportion des MHC IIB est significativement diminuée dans le muscle gastrocnémien. A l'opposé, on note une augmentation de l'expression des MHC I uniquement si la durée d'exercice quotidien est augmentée de façon drastique (Demirel et al. 1999). Chez les marathoniens et les athlètes en endurance, la proportion des MHC I atteint 80-90% des MHCs totales, les 10-20% restant se composent de MHC IIA (Andersen et al. 2000). D'un autre côté, l'entraînement en endurance à haute intensité sur une courte période, induit une transition des MHCs rapides vers les MHCs lentes dans le muscle vaste externe (Schaub et al. 1989). Ainsi, l'expression des MHCs peut être modifiée via l'augmentation chronique de l'activité contractile comme lors de l'entraînement en endurance. Tonkonogi et collaborateurs ont mis en évidence une corrélation entre le pourcentage de MHC I, dans le muscle vaste externe, et la VO₂max, démontrant l'importance du profil en MHC dans les capacités à l'exercice des sujets (Tonkonogi et al. 1998). D'un autre côté, même s'il semble

qu'il y ait une relation positive entre le pourcentage de fibres I et le rendement énergétique musculaire chez les sportifs de haut niveau (Coyle 1992), la différence d'efficacité entre les fibres de type I et II chez l'homme, semble relativement faible. Les différences de performance entre différents sujets ne peuvent pas s'expliquer uniquement par une différence dans la distribution des types de fibres (Mallory et al. 2002). En effet il a été montré que lors d'un exercice sous-maximal, il n'y a aucune relation entre les paramètres de « l'économie musculaire » ($\Delta\text{VO}_2/\Delta\text{puissance mécanique}$) ou de « l'efficacité musculaire » ($\Delta\text{énergie totale consommée}/\Delta\text{puissance mécanique}$) et le pourcentage de fibres de type I (Mallory et al. 2002).

2.2. Les effets sur le phénotype métabolique

L'entraînement en endurance permet de mettre en place une séquence de processus adaptatifs par lesquels le muscle squelettique acquiert des caractéristiques structurales, physiologiques et biochimiques lui permettant de produire en aérobose une puissance mécanique soutenue plus importante, tout en retardant l'apparition de la fatigue ou de la douleur. Ainsi, l'entraînement en endurance active la biogenèse mitochondriale dans le muscle. Cette biogenèse mitochondriale est une conséquence des changements métaboliques musculaires se produisant au cours de l'exercice. En effet, durant la contraction musculaire, l'élévation de [ADP] favorise la réaction catalysée par la créatine kinase vers la formation de créatine et d'ATP. Il a été démontré qu'après entraînement en endurance, une plus faible augmentation de l'ADP était nécessaire pour atteindre le même niveau de consommation d'oxygène (Dudley et al. 1982; Constable et al. 1987). L'ADP étant un activateur allostérique de la glycolyse anaérobie, celle-ci ne va donc être que faiblement activée, diminuant la production d'acide lactique. De plus l'acide lactique formé est plus efficacement éliminé après un entraînement en endurance. Plus la densité mitochondriale sera importante et moins la glycolyse anaérobie est sollicitée (Hood 2001). Ces adaptations aboutissent donc à un changement conséquent du métabolisme énergétique, avec comme principale conséquence l'amélioration de la résistance à la fatigue.

La mesure des marqueurs du métabolisme énergétique comme l'activité de la citrate synthase, ou l'activité de la COX, ont permis de démontrer qu'un entraînement en endurance de six semaines est nécessaire pour que le contenu en mitochondries atteigne un nouvel état d'équilibre. Cependant, 7 jours d'entraînement à raison de 2 heures par jour à 60-70% de la VO_2max est suffisant pour augmenter de 30% l'activité de plusieurs enzymes mitochondriales

(Spina et al. 1996). Ainsi, la période nécessaire pour atteindre un nouvel état d'équilibre dépend de la durée, de la fréquence et de l'intensité de l'exercice (Dudley et al. 1982; Harms & Hickson 1983; Hoppeler 1986). Structurellement, il a été clairement démontré une densité volumétrique mitochondriale plus élevée dans les muscles de sujets entraînés en endurance comparé à des sujets contrôles. D'autre part, le volume mitochondrial dans les muscles squelettiques augmente en proportion directe de la consommation d'oxygène globale dans les espèces athlétiques, comparées aux espèces normales. Taylor et collaborateurs proposent que ce serait uniquement l'augmentation du nombre de mitochondries qui, ayant toutes la même structure, permettraient d'ajuster la production d'énergie à la demande plutôt que la variation des vitesses de réaction des enzymes de la chaîne respiratoires (Taylor et al. 1987). De plus, les changements dans les activités d'enzymes oxydatives sont proportionnels aux changements dans la densité volumétrique des mitochondries (Hoppeler 1986). Il a été montré que l'entraînement en endurance induit préférentiellement la prolifération des mitochondries sous-sarcolemmales, qui représentent normalement 10 à 15% du volume total mais qui peuvent atteindre jusqu'à 30% chez les cyclistes professionnels (Hoppeler et al. 1985). En ce qui concerne les adaptations en fonction du type de fibre, ce sont les fibres de type IIa qui montrent une augmentation relative plus importante de leur volume mitochondrial par rapport aux fibres de type I ou IIx (Howald et al. 1985), même si le type de protocole d'entraînement (intensité élevée par intermittence ou intensité faible sur une longue période) peut faire varier les proportions (Dudley et al. 1982). Seuls les muscles voyant leur production énergétique augmenter au cours de l'exercice sont affectés par l'entraînement en endurance alors que les autres muscles ont même plutôt tendance à diminuer leur volume mitochondrial (Saltin et al. 1976).

L'utilisation de la technique des fibres perméabilisées à la saponine permet d'aborder l'aspect qualitatif de la fonction mitochondriale et n'a été utilisée que récemment chez l'homme. Elle a permis de montrer, en plus d'une augmentation des capacités oxydatives musculaires, que la sensibilité mitochondriale à l'ADP est plus faible d'une part lorsque le pourcentage de fibre de type I est plus élevé dans le muscle et d'autre part, suite à un entraînement (Tonkonogi et al. 1998; Walsh et al. 2001). Récemment, Zoll et collaborateurs ont montré une diminution de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP et une augmentation du rôle fonctionnel de la créatine kinase mitochondriale, démontrant ainsi une adaptation fonctionnelle de la mitochondrie à la fois dans les fibres glycolytiques et oxydatives (Zoll et al. 2003), chez des rats effectuant une activité physique volontaire. Ce changement dans la régulation de la respiration mitochondriale permet non seulement de produire une quantité plus importante

d'énergie mais également d'améliorer le couplage entre les sites de production et d'utilisation de l'énergie. Ces modifications métaboliques se font indépendamment du phénotype contractile (Zoll et al. 2003). D'autre part des résultats similaires ont été obtenus chez des sujets ayant différents niveaux d'activités physiques (Zoll et al. 2002). Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la mi-CK devient donc fonctionnellement couplée à la production d'ATP uniquement chez les sujets sportifs qui sont capables de soutenir une activité physique importante et prolongée. Ceci suggère que, chez ces sujets, les capacités oxydatives ne dépendent pas seulement de la quantité de mitochondries, mais également des mécanismes de contrôle de la respiration mitochondriale.

C. ADAPTATION DU TRANSPLANTE CARDIAQUE A L'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE

Au cours de ces deux dernières décennies, la transplantation cardiaque est passée d'un stade expérimental à un stade thérapeutiquement reconnu dans la prolongation de la durée de vie des patients IC sévères. Avec les progrès spectaculaires réalisés dans les techniques de préservation d'organes, de chirurgie et de prise en charge des traitements antirejets, la survie à court terme des sujets transplantés cardiaques ne représente plus un objectif primaire. Le résultat désiré par les procédures actuelles est un retour à un style de vie fonctionnel avec une vie normale. Pour atteindre cet objectif, une réadaptation physique efficace est essentielle.

1. EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE SUR LA CAPACITÉ A L'EXERCICE

Les effets de l'entraînement en endurance des sujets TC ainsi que les diverses modalités et durées des programmes de réentraînement utilisés sont résumés dans le tableau 4.

Très tôt, plusieurs études ont montré que l'entraînement en endurance induisait une amélioration des capacités physiques des sujets TC. Cette amélioration se traduit par une augmentation significative de leur VO_2 pic, comprise entre 10 et 30% (Kavanagh et al. 1988; Keteyian et al. 1991; Lampert et al. 1998). Une étude a même rapporté une augmentation de 52% de la VO_2 pic après une période d'entraînement de seize mois (Kavanagh et al. 1988). Toutes ces études antérieures ont cependant observé que ces valeurs de VO_2 pic obtenues chez les sujets TC entraînés, restaient inférieures à celles des sujets sains contrôles (Mandak et al. 1995). Toutefois, Richard et collaborateurs ont rapporté dans leur étude des valeurs de VO_2 pic proches des valeurs prédites de sujets sains contrôles (Richard et al. 1999). Très récemment Kavanagh et collaborateurs ont étudié, au cours d'un suivi de douze ans, l'influence à long terme d'un entraînement en endurance de sujets TC, effectué sur une

période de seize mois. Ils ont montré qu'après un gain de 26% de la VO_2 pic induite par l'entraînement, on observait comme chez les sujets sains contrôles, une diminution progressive de 0.39 ml/min/kg chaque année, liée à l'âge (Kavanagh et al. 2003).

Outre la VO_2 pic, une augmentation du même ordre de la VO_2 au seuil ventilatoire et une augmentation de 15 à 52% de la puissance maximale tolérée (PMT) ont été également rapportées (Kavanagh et al. 1988; Lampert et al. 1998).

Les mécanismes de cette limitation des capacités physique des sujets TC, même après entraînement sont encore mal connus. La dénervation cardiaque, avec une cinétique de fréquence cardiaque retardée, et la dysfonction diastolique ont également été évoqués (Braith and Edwards 2000).

Tableau 4: Effets de l'entraînement en endurance des sujets transplantés cardiaques (d'après Braith et al 2000).

Etudes	Description de l'entraînement					Résultats de l'entraînement					
	N	Durée pG	Durée	séance	Type	PMT (%)	VO ₂ pic (%)	FC _{repos} (%)	FC _{max} (%)	Force (%)	Autres résultats
Kavanagh 1988	36	7 mois	16 mois	5/sem 45 min	aérob	+49	+19	-4	+9		+24%SV
Keteyian 1991	12 (+5ctr)	12-15 sem	10 sem	2- 3/sem 32min	aérob		+17	+4	+14		+17% VEM
Kobashi-gawa 1999	14 (+13ct)	2 sem	6 mois	17 ≥30min	aérob IM	+59	+49	+10	+23	+125	
Geny 1996	7	11 mois	6 sem	2/sem	PEPC	+15	+12	-7	+3		
Ehrman 1992	11	2.5 mois	9 sem	3/sem 32 min	aérob		+12		+9		+13% VO ₂ SV
Saini 1995	7	10.6 mois	6 sem	3/sem 45min	PEPC	+36		-10			
Lampert 1996	8	>1an	6 sem	3/sem	PEPC	+17	+17				↑tps lact ↓lact _{pic/FE}
Charloux 1997	6	18 mois	6 sem	2/sem	PEP' C	+7					↑VO ₂ SV
Lampert 1998	12 (+7ctr)		6 sem	3/sem	PEPC		+11	ns	ns		+23% VO ₂ SV
Zhao 1998	11	13.2 mois	6 sem	3/sem	PEPC	+15	+10				+28% VO ₂ SV

VO₂pic(ml/min/kg): consommation maximale d'oxygène; PMT (Watt):puissance maximale tolérée; N: nombre de sujets; Durée pG: durée post-greffe; IM: intensité modérée; aérob: aérobie ; PEPC : programme d'entraînement personnalisé en crénaux.

2. EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE SUR LE PHENOTYPE MUSCULAIRE

A ce jour, une seule étude de notre équipe a étudié les effets d'un programme de

réentraînement en endurance à court terme, sur le phénotype musculaire des sujets TC (Lampert et al. 1998). Dans cette étude, les auteurs ont comparé des paramètres d'histologie ultrastructurale quantitative, caractérisant les capacités oxydatives du tissu musculaire de sujets TC et de sujets témoins appariés, observés avant et après entraînement. L'évolution spontanée de ces paramètres au cours du temps a également été étudiée chez des sujets TC ne désirant pas s'entraîner. Les résultats ont montré que la densité volumétrique des mitochondries, déjà préservée chez ces sujets (voir la section « altérations périphériques après transplantation cardiaque »), augmente après entraînement, comme chez les sédentaires sains. Cette modification n'est pas due à une évolution spontanée de ce paramètre. L'augmentation de la densité mitochondriale observée au cours de cette étude était plus importante au niveau des mitochondries sous-sarcolemmales (+74% et +70% respectivement chez les greffés et les témoins). Les mitochondries interfibrillaires quant à elles, étaient moins affectées par cet entraînement en endurance (+16% et +24% respectivement chez les greffés et les témoins). D'autre part, une corrélation entre l'augmentation de la densité mitochondriale et celle de la VO_2 pic a été également observée. Sur le plan microvasculaire, le nombre de capillaires /fibre, déjà diminué chez le sujet TC par rapport au sujet normal (voir également la section « altérations périphériques après transplantation cardiaque »), n'augmente pas chez les sujets TC alors qu'il augmente chez les témoins.

Dans son ensemble, ces résultats étaient concordants avec les bénéfices précédemment observés au niveau de la capacité à l'exercice des sujets TC (Kavanagh et al. 1988; Keteyian et al. 1991; Lampert et al. 1998). Ceci montre que malgré le traitement immunosuppresseur, l'augmentation adaptative du contenu mitochondrial du muscle a lieu normalement chez le sujet TC, comme déjà décrit chez le patient IC (Hambrecht et al. 1995).

La persistance de la limitation physique, même après entraînement, démontre que les facteurs périphériques (Meyer et al. 1990; Kao et al. 1994), principalement liés au déconditionnement du muscle squelettique pendant la période de pré-transplantation (Drexler et al. 1992), ne sauraient à eux seuls expliquer la persistance du handicap physiques des sujets TC. Par ailleurs, la possibilité d'une persistance des anomalies musculaires périphériques après entraînement pourrait renforcer l'hypothèse de l'action délétère des immunosuppresseurs et poser la question de la sensibilité du muscle entraîné à la ciclosporine. D'autre part, l'absence d'adaptation au niveau de la capillarité suite à un entraînement en endurance, pose également le problème des interactions entre les immunosuppresseurs (la ciclosporine notamment) et la régulation de l'angiogénèse d'une

part et les mécanismes de la vasoconstriction d'autre part. Cependant, la fonctionnalité de cette densité mitochondriale préservée chez le transplanté d'une part et les effets d'un programme d'entraînement sur cette dernière d'autre part, n'a jamais été étudiée chez ces sujets TC.

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

Depuis la maîtrise des phénomènes de rejet par l'utilisation des immunosuppresseurs tels que la ciclosporine A, la transplantation cardiaque a pris une place maintenant bien codifiée dans l'arsenal thérapeutique appliqué à l'insuffisance cardiaque sévère. Elle permet à ce jour, de corriger la perte de la fonction cardiaque de façon durable avec un taux de survie supérieur à 60% à 10 ans. Cependant, malgré la normalisation de la plupart des valeurs hémodynamiques et de l'oxygénation, les transplantés cardiaques (TC) présentent une limitation à l'effort physique qui affecte leur qualité de vie. Ce handicap se caractérise par une réduction moyenne de 35 à 50% de leur capacité à l'exercice maximal, par rapport à celle de sujets normaux. L'origine de cette limitation physique reste encore discutée. Initialement, la plupart des auteurs l'attribuaient à une cause centrale, notamment l'incapacité du greffon à augmenter normalement sa fréquence cardiaque à l'effort, du fait de la dénervation cardiaque. Plus récemment, la mise en évidence de nombreuses anomalies musculaires, a permis de reconnaître l'importance de la part périphérique dans ce handicap. Néanmoins, les mécanismes responsables de ce dysfonctionnement périphérique après transplantation cardiaque restent encore à élucider. Plusieurs hypothèses, telles que le déconditionnement, l'excès de sécrétion d'hormones vasoconstrictrices, la persistance après transplantation des anomalies liées à l'insuffisance cardiaque, les effets délétères des immunosuppresseurs, et les anomalies de la réactivité microvasculaire, ont été émises pour tenter d'expliquer ces anomalies musculaires périphériques des TC. Notre équipe a, par le passé, réalisé deux études, dont la première a porté sur l'analyse de l'ultrastructure du muscle squelettique des TC, et la seconde, sur les modifications ultrastructurales induites par l'entraînement en endurance sur le muscle squelettique des TC. Nous avons montré que la densité volumétrique des mitochondries du muscle squelettique était normale après transplantation cardiaque, mais qu'elle n'était pourtant pas corrélée à la consommation maximale d'oxygène (VO_{2pic}) de ces sujets, contrairement à ce qui était observé chez les sujets normaux. Par contre, une diminution de la densité capillaire de ces muscles avait été mise en évidence. L'entraînement en endurance induisait une augmentation de la densité mitochondriale alors qu'il était sans effet sur la densité capillaire. Ces résultats tendaient à étayer l'hypothèse d'une altération de la fonction mitochondriale (qui pourrait être compensée par une augmentation du nombre de mitochondries) et une diminution de la microcirculation des muscles squelettiques, comme mécanisme du handicap physique du TC. L'ensemble de ces observations était compatible avec un effet délétère de la ciclosporine. Nous avons aussi montré, plus récemment, que le

Sandimmun (la formulation clinique de la ciclosporine A) avait un effet négatif sur les capacités oxydatives des muscles striés de rats. Cet effet, via l'inhibition de certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, pouvait être entièrement attribué à son excipient (le Crémophor EL), lui-même déjà connu pour ses effets néfastes sur de nombreux tissus. Finalement, tous ces résultats étayaient l'hypothèse d'un effet délétère du traitement immunosuppresseur par la CsA sur les muscles striés des TC. Cependant les caractéristiques fonctionnelles intrinsèques des mitochondries musculaires, les effets délétères de la ciclosporine sur ces organites et l'adaptation fonctionnelle des mitochondries à l'entraînement, n'ont jamais été étudiés chez ces sujets TC.

L'objectif de cette thèse s'inscrit dans le cadre général de la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'incapacité à l'effort des TC et dans celui de la prévention de cette incapacité. Nous nous sommes en particulier attachés à l'élucidation des parts respectives des immunosuppresseurs et du déconditionnement dans cet handicap physique. Nos principaux objectifs étaient donc :

De caractériser les capacités oxydatives des muscles squelettique et cardiaque des sujets TC sous traitement immunosuppresseur.

D'étudier, de façon spécifique, les effets délétères de la ciclosporine A et d'évaluer séparément les effets des différents constituants de sa formulation clinique, le Sandimmun, sur la fonction mitochondriale des muscles squelettique et cardiaque des TC.

De déterminer les modifications et les mécanismes d'adaptations cellulaires induites par un programme d'entraînement en endurance sur le phénotype contractile et métabolique et sur les systèmes de transfert d'énergie du muscle squelettique des TC.

Pour ce faire nous avons appliqué la technique des fibres perméabilisées à la saponine à l'étude de la fonction mitochondriale sur biopsies musculaires humaines. Nous avons également étudié et comparé différents protocoles de mesure de la respiration mitochondriale et de sa régulation, afin de déterminer lesquels étaient les mieux appropriés pour répondre aux questions posées.

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Toutes les méthodes concernant les muscles striés humains et animaux ont été décrites dans les publications qui ont fait l'objet de cette thèse.

I. DESCRIPTION DES EXPERIMENTATIONS

A. LES ANIMAUX

L'étude sur la détermination des effets propres de la molécule de ciclosporine, ne pouvant être envisagée chez l'homme, elle a été réalisée sur des rats. Pour ce faire, 14 rats Wistar (~250g) dont 6 ont reçu, par gavage oral, de la ciclosporine dissoute dans de l'éthanol et 8 ont reçu uniquement de l'éthanol, pendant 4 semaines.

B. SUJETS

1. NORMAUX

Un groupe de 10 sujets sains, composé de 6 sujets sédentaires (50.2 ± 1.8 ans ; $VO_2\text{max} = 29.5 \pm 1.3 \text{ ml/min/kg}$) et 4 sujets actifs (47.4 ± 4.0 ans ; $VO_2\text{max} = 41.5 \pm 4.7 \text{ ml/min/kg}$) ont participé à notre étude et nous ont permis dans un premier temps de mettre au point des protocoles de mesure de la respiration mitochondriale sur des fibres musculaires humaines perméabilisées à la saponine (Veksler et al. 1987).

2. PATIENTS INSUFFISANTS VALVULAIRES CARDIAQUES ET PATIENT MYOPATHE.

Lors d'opérations de remplacement de la valve aortique ou mitrale, nous avons obtenu des biopsies cardiaques de 2 patients souffrant d'insuffisance aortique aiguë et 2 autres d'insuffisance mitrale aiguë. Ces patients avaient une fraction d'éjection ventriculaire gauche normale et leurs biopsies ventriculaires ont été considérées comme normales. Elles nous ont permis avec une biopsie réalisée chez un patient souffrant d'une myopathie non définie, de réaliser notre étude préliminaire.

3. SUJETS TRANSPLANTES CARDIAQUES

Un groupe de 23 sujets TC (19 hommes et 4 femmes ; 54.5 ± 3.2 ans ; $VO_2\text{max} = 22.0 \pm 2.0 \text{ ml/min/kg}$) a participé à nos études sur la détermination des effets du traitement immunosuppresseur et de l'entraînement, dans le cadre du suivi classique après

transplantation et d'un projet soutenu par l'INSERM (1998-2002). Ces sujets ne présentaient aucun signe particulier de rejet ou d'infection au moment de l'étude qui se situait à une période de 9 ± 1 mois après transplantation. Leur traitement immunodépresseur comprenait de la ciclosporine (Néoral, 252 ± 19 mg/jour) et de la prednisone (18 ± 4 mg/jour). Quelques uns étaient traités pour hypertension et recevaient des bloqueurs de canaux calciques et du furosémide. Seulement trois de nos sujets n'ont pu achever notre étude, respectivement pour raison de rejet aigu, de myopathie ou de sciatique. Parmi les 20 restants, 12 ont accepté de participer à l'étude sur le réentraînement.

C. MESURES DES PARAMETRES A L'EXERCICE

Les protocoles d'étude ont été approuvés par le comité d'éthique local. Grâce à une entrevue préliminaire et au remplissage du questionnaire de Baecke modifié (Baecke et al. 1982; Bigard et al. 1992), nos sujets sains ont été répartis en 3 groupes. 1) les sédentaires qui ne réalisent aucune activité physique, ni durant leur vie professionnelle, ni durant leurs loisirs ; 2) les actifs, qui réalisent des activités physiques soit durant leur vie professionnelle, soit durant leurs loisirs, 3) les sportifs, qui sont impliqués dans un programme d'entraînement en endurance de façon régulière depuis plusieurs années. L'indice de Baecke est ainsi inférieur à 6 chez les sujets sédentaires, entre 6 et 8 chez les actifs et supérieur à 8 chez les sportifs. Les transplantés cardiaques seront eux comparés à des sujets sains sédentaires ou actifs similaires en âges et en poids.

Les sujets ont tous bénéficié d'une épreuve d'effort à charge croissante sur ergocycle. Des paliers de 20 watts toutes les deux minutes, permettent d'épuiser les sujets au bout de 10-15 minutes d'effort. Les échanges gazeux sont déterminés pendant tout l'exercice, avec notamment les mesures de :

- la consommation d'O₂ (VO₂) au seuil ventilatoire et au maximum de l'exercice (VO₂max)
- la production de CO₂
- le quotient respiratoire (VCO₂/VO₂).

Chez tous les sujets, le seuil ventilatoire (qui correspond au seuil lactique) correspond au point où il y a une activation accrue du métabolisme anaérobie (glycolyse anaérobie). Cette activation accrue de la glycolyse entraîne une accumulation d'acide pyruvique qui va être transformé en acide lactique, provoquant l'augmentation du débit ventilatoire afin de compenser l'acidose métabolique. Les sujets arrêtent l'exercice lorsqu'ils ne sont plus capables de soutenir une fréquence de pédalage de 50-60 rotations/minute et lorsque le quotient respiratoire est supérieur à 1.1, ce qui nous permet de penser que la VO₂ pic est

proche de la VO_2 max. Des micro-échantillons sanguins, pour le dosage du lactate, ont été prélevés au lobe de l'oreille, à la fin de l'exercice et toutes les minutes pendant les cinq premières minutes, lors de la phase de récupération passive. La valeur maximale de lactatémie mesurée a été définie comme le pic de lactate (Lactate pic). Ces paramètres vont permettre à la fois de bien caractériser les capacités à l'exercice des sujets et d'évaluer la limitation à l'exercice des transplantés cardiaques.

D. PROGRAMME D'ENTRAÎNEMENT PERSONNALISE EN CRENEAUX (PEP'C)

Le principe de ce type d'entraînement proposé par Gimenez (Gimenez et al. 1982a; Gimenez et al. 1982b; Gimenez et al. 1982c) repose sur celui de "l'interval training". L'entraînement en créneaux consiste à alterner régulièrement des périodes d'effort en résistance et en endurance créant ainsi une situation comparable à celle rencontrée dans la plupart des sports ou des activités physiques de durée prolongée. Ce type d'effort combine donc les effets des périodes d'activité "à forte mobilisation des stocks d'ATP" et des périodes de récupération active où les réserves sont en partie restaurées par les voies métaboliques glycolytique et aérobie. Cet entraînement est destiné à améliorer les conditions physiques des sédentaires, des sportifs et même des sujets transplantés cardiaques.

Le programme comprend trois sessions de 45 minutes par semaine pendant 6 semaines. Le test en lui-même comporte neuf créneaux de cinq minutes dont les quatre premières minutes sont réalisées à une charge correspondant au premier seuil ventilatoire (SV1) appelé « base » suivies d'une minute à une charge correspondant à 90% de la Puissance Maximale Tolérée (PMT) appelée « pic ». Lorsqu'une baisse d'environ 10% de la fréquence cardiaque (FC) « cible » (fréquence cardiaque observée lors du PEPC initial) est observée, la charge est augmentée d'un incrément pour maintenir la même FC obtenue lors de la première session. Cette augmentation de la charge se fait alternativement au niveau de la base ou au niveau du pic.

E. BIOPSIES MUSCULAIRES

Les échantillons musculaires du vaste externe, d'environ 100 mg, sont prélevés sous anesthésie locale, grâce à la technique de Bergström. Une partie de cet échantillon est congelée dans l'azote liquide pour les études ultérieures d'enzymologie et de biochimie tandis que l'autre partie de ce matériel frais est utilisée pour l'étude des paramètres de la respiration mitochondriale.

Les échantillons de ventricule droit de 3 à 6mg environ ont été obtenus, par prélèvement

direct sur le greffon au moment de la transplantation, et dix mois après, par cathétérisation cardiaque, après ponction de veine jugulaire sous anesthésie locale, grâce à la technique endovasculaire de Caves et Schultz (Caves et al. 1975).

II. TECHNIQUES D'ETUDE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE

A. PRINCIPE DE LA POLAROGRAPHIE

La polarographie est une technique permettant de visualiser la consommation d'oxygène dans une enceinte close. Elle utilise une électrode constituée d'un couple platine-argent, immergée dans une solution saturée de KCl (électrode de Clark). Une différence de potentiel de 0,6-0,7 est appliquée entre l'anode (électrode en argent) et la cathode (électrode en platine) ce qui entraîne leur ionisation et la création d'un courant. L'intensité de ce courant est liée à la conductance entre l'électrode de platine, le pont KCl et l'électrode en argent. Elle est directement proportionnelle à la concentration en oxygène du milieu. En effet, plus il y a d'oxygène dans le milieu et meilleure est la conductance (diminution de la résistance). Finalement, la variation d'intensité est transformée en une variation de voltage pour pouvoir donner un signal enregistrable. La solution contenant les fibres perméabilisées à la saponine est séparée du couple platine-argent par une fine membrane en Téflon ne laissant passer que l'oxygène. On enregistre la vitesse initiale de respiration (V_i) qui représente l'oxygène consommé par les électrodes. V_i est retranchée de l'ensemble des vitesses de respiration. Les chaînes respiratoires des mitochondries vont être activées par l'addition d'ADP et l'oxygène présent dans le tampon va commencer à être consommé, ce qui va entraîner une diminution de l'intensité du courant. La diminution de quantité d'oxygène du milieu va donc se traduire à l'écran par une courbe décroissante.

Environ tous les mois, les membranes en téflon ainsi que la solution saturée de KCl sont renouvelées. Avant chaque expérience les électrodes sont calibrées, afin de s'assurer de leur bon fonctionnement, mais également pour définir la concentration maximale d'oxygène (à la pression atmosphérique et à 22°C) attendue au début de l'expérience. La valeur de 270 μmoles d'oxygène/l d'eau distillée est retenue. La calibration de cette valeur est précédée de celle du point zéro grâce à une solution d'eau distillée contenant du sulfite de sodium qui consomme l'ensemble de l'oxygène présent dans la chambre.

B. MATERIEL

Des électrodes de Clark sont utilisées pour la mesure de la consommation d'oxygène dans des chambres hermétiques thermostathées à 22°C et sous agitation. Une interface connecte les électrodes à un programme informatique d'acquisition qui permet le traitement des données.

L'oxygraphe est un «Strathkelvin instruments 928 6-Channel system ».

Pou les solutions : Voir l'article en référence 1 de la liste des publications faisant l'objet de cette thèse.

C. TECHNIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES PERMEABILISEES A LA SAPONINE.

La description détaillée de cette technique, ses avantages et limites, la comparaison des différents protocoles d'étude de la respiration mitochondriale, et une revue complète de la littérature, ont fait l'objet d'une publication (voir la première partie des résultats).

III. METHODES D'ETUDE IN VITRO

L'étude de la respiration mitochondriale des tissus musculaires permet d'avoir une bonne mesure de leurs capacités oxydatives. La caractérisation du profil métabolique et contractile musculaire nécessite des études in vitro complémentaires.

A. CARACTERISATION DU PROFIL METABOLIQUE

Elle a été réalisée en collaboration avec l'équipe de R. Ventura-Clapier de l'unité INSERM U446 à Chatenay-Malabry. Après homogénéisation des tissus, les activités enzymatiques de la Citrate-synthase (CS), du cytochrome-c oxidase (COX), de la créatine kinase (CK) et de la lactate déshydrogénase (LDH), ont été déterminées par spectrophotométrie en utilisant des systèmes d'enzymes couplés. Les isoformes de la créatine kinase et de la lactate déshydrogénase ont été séparées par électrophorèse sur gel d'aga rose et quantifiées par un système d'analyse d'image (Veksler et al. 1995; Ventura-Clapier et al. 1995).

B. CARACTERISATION DU PROFIL CONTRACTILE

Elle a été réalisée en collaboration avec l'équipe de X. Bigard au centre de recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA) à La Tronche. Les myosines des muscles ont été extraites et les isoformes des chaînes lourdes de myosines (MHCs) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis quantifiées par densitométrie. Ceci permet de déterminer le phénotype contractile par méthode quantitative (Talmadge & Roy 1993; Agbulut et al. 1996).

C. DETERMINATION DES EFFETS AIGUS DE LA CICLOSPORINE A ET DE SON EXCIPIENT

Nous avons utilisé le Sandimmun, forme clinique de la ciclosporine A. Cette formulation contient 50mg/ml of CsA dilué dans un excipient composé à 2/3 de Crémophor EL et 1/3 d'éthanol (v/v). Afin de déterminer les effets spécifiques de chaque constituant du Sandimmun, diverses formulations ont été étudiées: 1) le Sandimmun, 2) l'excipient complet, 3) la molécule de CsA diluée dans l'éthanol, et 4) l'éthanol seul.

RESULTATS

RESULTATS

I. EVALUATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES MUSCLES SQUELETTIQUE ET CARDIAQUE HUMAINS.

A. PRESENTATION

Depuis longtemps reconnue comme principale source de production de l'énergie cellulaire, la mitochondrie joue un rôle central dans le métabolisme des tissus à intense activité métabolique tels que les muscles squelettique et cardiaque. Leur implication directe, par un dysfonctionnement de l'organite, ou indirecte en constituant une cible pour certaines altérations systémiques primaires, a été mise en évidence dans plusieurs pathologies. En conséquence, les techniques et les protocoles permettant l'étude des propriétés mitochondriales, présentent une importance physiologique et physiopathologique. Cependant, malgré des progrès significatifs dans ce domaine, les premières méthodes utilisées étaient, pour la plupart, indirectes et difficiles à appliquer chez l'homme, avec le risque majeur d'une compréhension incomplète de la fonction mitochondriale et de sa régulation.

Il y a un peu plus de 15 ans, Veksler et collaborateurs mettaient au point, chez l'animal, une nouvelle méthode pour étudier la fonction mitochondriale musculaire. Cette nouvelle technique était basée sur la perméabilisation sélective du sarcolemme par une faible concentration de saponine et offre plusieurs avantages. Cependant, les études utilisant cette technique chez l'homme sain ou malade, restent très peu nombreuses et n'ont exploré, à ce jour, qu'un aspect limité des avantages liés cette méthode. Nous avons donc adapté cette technique d'exploration de la fonction mitochondriale à des biopsies musculaires humaines, en utilisant les différents protocoles de respiration précédemment mis en œuvre chez l'animal.

Le but de cette étude est:

- 1) de décrire en détail la technique de la fibre perméabilisée à la saponine,
- 2) de comparer, à partir de nos résultats sur divers échantillons musculaires humains, les mesures de consommation d'oxygène obtenues par les différents protocoles de respiration mitochondriale,
- 3) de faire une revue de la littérature sur les études faites dans ce domaine chez l'homme.

Nous présenterons des paramètres quantitatifs et qualitatifs de la fonction mitochondriale sous diverses conditions physiologique (activité physique) et physiopathologiques (myopathie). Cette étude comparative nous permettra également de donner les avantages et les inconvénients de chacun des différents protocoles d'investigation de la respiration mitochondriale et pourrait servir de "manuel de guide" pour la recherche en ce domaine.

B. RESULTATS

Ces résultats ont fait l'objet d'un article sous presse au journal "**Molecular and Cellular Biochemistry**".

C. DISCUSSION

Nous avons montré dans cette étude comment la technique des fibres perméabilisées à la saponine pouvait être appliquée avec succès à la détermination polarographique des propriétés intrinsèques réelles des mitochondries; et comment le choix des différents protocoles de mesure de la respiration mitochondriale, est important pour une meilleure détermination de la fonction mitochondriale de petits échantillons musculaires humains. Une revue de la littérature montre que les principaux objectifs visés par la plupart des études antérieures étaient la détermination des effets mitochondriaux de l'exercice ou de l'entraînement chez des sujets sains, l'investigation clinique des altérations mitochondriales potentielles chez des patients, la compréhension des mécanismes de l'activation de la phosphorylation oxydative. Pour répondre à ces différentes questions posées, des protocoles variés ont été utilisés, parfois même pour une même question donnée. Nous avons décrit et comparé tous les paramètres obtenus par les principaux protocoles de mesure respiratoire, et avons pu mettre en évidence que certains protocoles étaient mieux appropriés que d'autres pour évaluer les aspects quantitatifs et/ou qualitatifs de la fonction mitochondriale, c'est à dire la détermination des capacités oxydatives, la caractérisation du type de contrôle de la respiration mitochondriale, la détermination d'altérations au niveau de la chaîne respiratoire. Nous avons ainsi démontré que:

- le protocole A (utilisant seulement 2 ajouts d'ADP séparés par l'addition de créatine) est mieux adapté pour les échantillons de très petite quantité et permet d'évaluer les aspects quantitatifs (V_0 et V_{max}) et d'estimer les aspects qualitatifs (K_m et %Cr, ACR) de la fonction mitochondriale. Toutefois, il faut savoir que dans ce protocole, le K_m pour l'ADP est sous-estimé dans les muscles à capacité oxydative élevée.
- Le protocole B (en absence de créatine) et le protocole C (en présence de créatine), utilisant des ajouts successifs et croissants d'ADP, permettent, en plus des paramètres quantitatifs, de déterminer la sensibilité réelle à l'ADP de la population de mitochondries, ainsi que le rôle fonctionnel réel de la CK mitochondriale dans la production et le transfert de l'ATP.
- Le protocole D (utilisant divers substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire) permet d'étudier de manière isolée, l'activation de la respiration mitochondriale par quelques

complexes spécifiques de la chaîne respiratoire et donc de mettre en évidence d'éventuelles altérations de ces derniers.

La connaissance précise de ces avantages et de ces inconvénients, pour chaque protocole utilisé, est donc nécessaire et le choix des protocoles est d'autant plus important que l'on s'intéresse à la fonction mitochondriale de tissus musculaires déjà altérés par des pathologies. En conclusion, nous avons montré que la technique d'étude de la fonction mitochondriale sur fibres perméabilisées à la saponine, est une bonne alternative à l'isolation des mitochondries. Cette nouvelle approche, qui consiste à étudier les mitochondries dans leur environnement naturel en maintenant leurs interactions avec le cytosquelette, présente plusieurs avantages, dont celui de travailler sur de petits échantillons tissulaires tels que les biopsies musculaires humaines. Cependant, comme nous avons pu le montrer dans cette étude, une connaissance appropriée et une standardisation des différents protocoles de respiration utilisés, est nécessaire pour une meilleure évaluation des paramètres quantitatifs et qualitatifs de la fonction mitochondriale, et pour une meilleure comparaison des différents résultats de la littérature.

II. EFFET MITOCHONDRIAL D'UN TRAITEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR PAR UNE FORMULATION DE CICLOSPORINE A SUR LES MUSCLES SQUELETTIQUE ET CARDIAQUE DU SUJET TC

A. PRESENTATION

La ciclosporine A (CsA) représente la base de la plupart des traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation clinique. Cependant, d'important effets secondaires sont liés à son utilisation, malgré l'avancée spectaculaire qu'a entraîné son introduction dans les traitements antirejet. Chez l'animal, de nombreuses études ont attribué à la CsA un rôle majeur dans la diminution de la respiration mitochondriale de divers tissus. De plus, le traitement de rats sains par la CsA entraîne non seulement une diminution de la respiration mitochondriale du muscle squelettique, mais également une réduction du temps d'endurance de ces animaux. Ceci suggère que la CsA pourrait affecter la fonction mitochondriale des muscles locomoteurs et par conséquent contribuer à la limitation de la performance physique décrite chez les sujets transplantés.

Chez le sujet transplanté cardiaque (TC), malgré la normalisation du transport central de l'oxygène, et une nette amélioration des capacités à l'exercice, des anomalies musculaires persistent et semblent même empirer dans le période post-opératoire précoce. Ces anomalies musculaires ont été suspectées de contribuer à la réduction de la capacité à l'exercice observée chez ces sujets. La plupart des auteurs ont donc émis l'hypothèse que la CsA pourrait être responsable du handicap physique des TC. D'autre part, une toxicité de la CsA a été suspectée dans le dysfonctionnement du métabolisme énergétique cardiaque, et dans l'induction d'une fibrose interstitielle associée à une altération des structures mitochondriales du greffon.

Dans la majorité des études antérieures, la CsA était généralement dissoute dans divers excipients à cause de ses propriétés hydrophobes. Cependant, le Crémophor, principal excipient dans la formulation clinique de la ciclosporine, a largement été décrit dans la littérature pour ses effets toxiques aigus sur de nombreux types cellulaires. Il est donc impératif de déterminer séparément, les effets dus à l'excipient et ceux dus à la molécule active de CsA elle-même.

Chez l'homme, la fonction mitochondriale des muscles squelettique et cardiaque, de même que les potentiels effets toxiques du traitement immunosuppresseur aigu ou chronique par CsA, n'ont jamais été étudiés. L'objectif de cette étude était : 1) de déterminer les capacités oxydatives des muscles ventriculaire droit (VD) et Vaste externe (VE), dix mois après transplantation, et de les comparer à celles obtenues au moment de la greffe; 2) d'étudier

séparément, les effets pharmacologiques aigus du Sandimmun et de ses composants, sur ces capacités oxydatives et ; 3) d'étudier l'influence de cet excipient sur certains complexes de la chaîne respiratoire.

B. RESULTATS

Ces résultats font l'objet d'un article soumis au "**Journal of the American College of Cardiology**".

C. DISCUSSION

Nous avons montré que dix mois après la transplantation, la capacité à l'exercice est encore limitée puisque leur pic de VO_2 n'atteint que 70% des valeurs prédites. Curieusement, les capacités oxydatives des muscles striés sont légèrement augmentées par rapport aux valeurs initiales du moment de la greffe. Ainsi, la fonction mitochondriale intrinsèque des muscles cardiaque et squelettique des sujets TC n'est pas modifiée par la trithérapie immunosuppressive. Ces données sont en accord avec celles relatives à une préservation de la densité mitochondriale trouvée dans le muscle squelettique des sujets TC. Cependant, elles semblent en apparente contradiction avec les études antérieures qui ont montré une diminution de l'activité citrate synthase, une augmentation de la déplétion en phosphocréatine et une diminution de la vitesse de resynthèse de l'ATP, suggérant que les propriétés oxydatives du muscle squelettique des sujets TC sont altérées. Ces résultats métaboliques peuvent être expliqués par le fait que de nombreuses enzymes du cycle de Krebs et de la PHOSPHOX tels que la COX et la CS, fonctionnent largement au dessus de leur seuil d'activité et ne sont pas limitantes pour la respiration mitochondriale. Ainsi, une diminution de l'activité de ces enzymes n'implique pas nécessairement une diminution globale de la fonction oxydative. Nos résultats s'inscrivent également dans la continuité d'une préservation des capacités oxydatives du muscle squelettique chez les patients IC.

Concernant la fonction mitochondriale du cœur greffé, nous avons montré que dix mois après transplantation cardiaque, les capacités oxydatives du muscle cardiaque ne sont pas modifiées malgré le traitement antirejet. Cette étude ne nous permet pas de dire si la capacité oxydative déterminée sur le greffon est similaire à celle des sujets sains. Cependant, puisque le cœur du donneur est généralement considéré comme sain, la fonction mitochondriale du greffon semblerait normale au moment de la transplantation et resterait donc préservée malgré la thérapie immunosuppressive. Ces résultats suggèrent que les capacités oxydatives musculaires des sujets TC sembleraient intactes, et qu'une altération de la fonction mitochondriale ne

saurait être la cause majeure de leur handicap physique.

Par la suite, nous avons entrepris d'étudier les effets aigus d'une formulation de CsA, le Sandimmun, sur la réponse mitochondriale des muscles cardiaque et squelettique des sujets TC. Nos résultats montrent que le Sandimmun induit une diminution de la respiration mitochondriale des deux muscles. Toutefois, la part de l'excipient n'a pas toujours été évaluée. L'excipient de la CsA se compose du Crémophor dont la toxicité n'est plus à discuter. Nous démontrons dans cette étude que les effets délétères du Sandimmun sont entièrement attribuables à une toxicité du Crémophor et non à la molécule active de CsA. Des résultats similaires obtenus chez l'animal ont été antérieurement rapportés par notre équipe.

Nous avons déterminé les sites d'action de l'excipient sur la chaîne respiratoire particulièrement sur les complexes I, -II et/ou -IV. Les résultats obtenus vont dans le sens d'une inhibition massive du complexe I tandis que le complexe II n'est pas altéré. Le complexe IV quant à lui ne présente qu'une légère altération significative dans le muscle cardiaque et pas dans le muscle squelettique. L'implication de la voie d'inhibition sélective des activités de certains complexes de la chaîne respiratoire, et sa tissu-spécificité, ont également été mises en évidence chez l'animal. Dans le cœur, les complexes I et IV semblent impliqués dans l'inhibition de la respiration mitochondriale, tandis que dans le muscle squelettique, seul le complexe I serait impliqué. Ce dernier représente en effet, une importante étape limitante dans le contrôle de la respiration mitochondriale des tissus musculaires, contrairement au complexe IV qui est présent en excès.

En conclusion, nos résultats montrent qu'il est peu probable que la fonction mitochondriale musculaire des sujets TC soit affectée par l'administration de faibles doses de CsA. Cependant, il existe certaines situations cliniques dans lesquelles une augmentation des doses de CsA est nécessaire. Cette augmentation peut entraîner une élévation des concentrations plasmatiques de l'excipient, à laquelle peut être exposé le tissu musculaire de ces sujets. Ceci suggère que les mécanismes impliqués dans la limitation à l'effort des sujets TC sont principalement extramitochondriaux et doivent opérer en amont de cet organe.

III. DETERMINATION DES EFFETS PROPRES DE LA MOLECULE DE CICLOSPORINE A SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE DE RATS

A. PRESENTATION

Il est aujourd'hui bien établi que la CsA inhibe directement la calcineurine, une enzyme capable d'activer le facteur de transcription NFAT récemment impliqué dans l'expression du phénotype musculaire de type lent. La comparaison des rats traités par la CsA dissoute dans l'éthanol (CsA *per se*) avec les rats contrôles (traités par l'éthanol seul) a montré, au niveau de la composition en MHC (les chaînes lourdes de myosine) du muscle soléaire, une transition du phénotype lent vers le phénotype rapide. Cette transition est associée à une augmentation d'enzymes du métabolisme oxydatif tels que la citrate synthase (CS) et l'isoforme H de la lactate déshydrogénase.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier les effets spécifiques de la CsA sur la respiration mitochondriale *in situ*, en s'affranchissant des effets délétères de son excipient. Pour cela, nous avons étudié sur un muscle lent oxydatif de rat, les effets du traitement chronique par la molécule active de CsA, aussi bien sur les paramètres de la respiration mitochondriale et sur la régulation de la phosphorylation oxydative par l'ADP, que sur la composition musculaire en types de fibres.

B. RESULTATS

Ces résultats ont fait l'objet d'un article sous presse au journal "**Muscles & Nerves**".

C. DISCUSSION

Le principal intérêt de cette étude est d'avoir, pour la première fois, démontré que l'administration chronique de la molécule active de CsA, entraîne une augmentation des capacités oxydatives du muscle squelettique lent oxydatif de rats, sans altérer la régulation de la respiration mitochondriale par l'ADP exogène.

On sait depuis longtemps chez le rat, que le potentiel oxydatif des fibres de type IIa est plus important que celui des fibres de type I. De ce fait, les augmentations simultanées du potentiel oxydatif et du contenu en isoformes rapides MHCIIa, renforcent l'affirmation selon laquelle l'administration de la CsA *per se* induit dans le soléaire de rat, une transition vers un phénotype rapide oxydatif à partir de fibres lentes oxydatives. Notre étude montre que dans le muscle lent oxydatif, la CsA *per se*, en inhibant la voie de la calcineurine/NFAT,

augmenterait le nombre de mitochondries et par conséquent, la capacité oxydative.

Chez l'homme, les fibres de type IIa possèdent un potentiel oxydatif plus faible que les fibres de type I. En induisant donc une transition vers un phénotype rapide oxydatif, la CsA pourrait entraîner une légère diminution des capacités oxydatives musculaires des sujets transplantés cardiaques. Il faut aussi rappeler que chez ces derniers, le traitement immunosuppresseur comprend en plus de la CsA, des corticoïdes dont les effets spécifiques sur la masse musculaire et sur le métabolisme énergétique, doivent être pris en compte pour expliquer les altérations musculaires périphériques décrits chez ces sujets. D'autres effets secondaires de la CsA sur la microcirculation et sur les fonctions hépatique et rénale, pourraient également être impliqués dans la limitation à l'exercice.

En conclusion, les résultats de cette étude démontrent que la CsA *per se* n'a aucun effet délétère direct sur le contenu mitochondrial des muscles. Cependant, en inhibant la voie de la calcineurine/NFAT, elle induit une légère transition coordonnée du phénotype musculaire de type oxydatif, de lent vers rapide, avec un potentiel oxydatif plus important.

IV. ADAPTATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE A UN PROGRAMME D'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE DES SUJETS TC

A. PRESENTATION

Puisque le déconditionnement représente une source importante du handicap physique observé après transplantation, plusieurs études ont porté sur les effets de l'entraînement en endurance chez les transplantés. Ces études ont montré une augmentation bénéfique de leur capacité à l'exercice

Au niveau musculaire, une étude de notre équipe a montré qu'un entraînement en endurance à court terme induisait une augmentation de la densité volumétrique des mitochondries sous-sarcolemmales et centrales, sans changer la densité capillaires du muscle squelettique, chez des sujets TC. Toutefois, l'effet de ce type de programme d'entraînement en endurance n'a jamais été déterminé sur la fonction mitochondriale musculaire des transplantés cardiaques.

Le but de cette étude était dans un premier temps, de caractériser les capacités oxydatives du muscle squelettique des sujets TC sous traitement immunosuppresseur, et dans un second temps, de déterminer les adaptations quantitatives et qualitatives induites par un entraînement en endurance à court terme.

B. RESULTATS

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Zoll J, N'Guessan B et al., *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:126-32)

C. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois chez des sujets TC que :

- 1) la capacité oxydative du muscle squelettique et sa régulation par l'ADP, sont similaires à celles déterminées dans d'autres études chez des sédentaires sains.
- 2) la respiration mitochondriale et le système de transfert de l'énergie, réagissent à l'entraînement en endurance par des adaptations quantitatives et qualitatives similaires à celles précédemment observées chez les sujets sportifs sains.

Cependant, contrairement à leurs propriétés mitochondriales musculaires, la capacité à l'exercice de ces sujets TC, reste inférieure celle de sujets sédentaires sains soumis au même type d'entraînement. Alors que les premières études ont suggéré une altération de la fonction mitochondriale après transplantation cardiaque, nos résultats montrent que cette dernière reste préservée dans le muscle squelettique des sujets TC et réagit normalement à un stimulus

physiologique tel que l'entraînement en endurance. Nous avons rapporté des augmentations de la capacité oxydative musculaire et des activités enzymatiques du métabolisme oxydatif induites par l'entraînement qui sont proches des valeurs trouvées chez des sujets sportifs sains présentant cependant une $VO_2\text{max}$ deux fois plus importante.

Par ailleurs, nous montrons dans cette étude une adaptation importante de la régulation de la respiration mitochondriale à l'entraînement, avec une diminution de la sensibilité mitochondriale à l'ADP vers des valeurs déjà trouvées chez des sujets sains entraînés. Cette sensibilité pour l'ADP augmente significativement en présence de créatine après entraînement, suggérant une activation fonctionnelle de la créatine kinase mitochondriale (mi-CK). Nous avons également montré que l'ACR (acceptor control ratio, V_{max}/V_0 , qui reflète le couplage entre l'oxydation et la phosphorylation) n'est pas significativement modifié par l'entraînement à court terme, contrairement à ce qui est observé chez les sujets athlétiques. Ceci suggère la nécessité d'un entraînement à long terme pour améliorer significativement le rendement mitochondrial. Il en est de même pour le changement de composition de muscle en MHC.

En conclusion, la fonction mitochondriale du muscle squelettique des sujets TC reste normale, neuf mois après transplantation, et est significativement améliorée après un entraînement en endurance, avec la mise en place d'un couplage fonctionnel de la mi-CK avec la rephosphorylation de l'ADP. Ainsi, notre étude suggère pour la première fois que : 1) les doses cliniques des immunosuppresseurs, particulièrement la CsA, ont un effet négligeable *in vivo* et n'altèrent pas l'adaptation mitochondriale à l'entraînement ; 2) Les mécanismes à l'origine de la persistance du handicap physique après transplantation sont indépendants des capacités métaboliques intrinsèques du muscle, mais relèvent plutôt de facteurs extramitochondriaux, qui persisteraient après entraînement.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. DISCUSSION GENERALE

Les principaux objectifs de cette thèse étaient :

- 1) De caractériser les capacités oxydatives fonctionnelles des muscles squelettique et cardiaque des sujets TC sous traitement immunosuppresseur.
- 2) D'étudier, de façon spécifique, les effets délétères de la ciclosporine A, et d'évaluer séparément les effets des différents constituants de sa formulation clinique, le Sandimmun, sur la fonction mitochondriale des muscles squelettique et cardiaque des sujets TC.
- 3) De déterminer les capacités d'adaptation du phénotype contractile et métabolique du muscle squelettique des TC suite à un programme d'entraînement en endurance, avec en particulier l'étude des adaptations de la fonction mitochondriale et de son contrôle par l'ADP et la créatine.

Ces différents objectifs scientifiques s'inscrivaient dans le cadre général de la compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de l'incapacité physique des sujets TC, et de celui de la recherche de solutions préventives à cette limitation à l'exercice qui altère leur qualité de vie. Pour la caractérisation des propriétés fonctionnelles des mitochondries sur des biopsies musculaires humaines, nous avons fait le choix d'appliquer chez l'homme, la technique d'étude de la fonction mitochondriale sur fibres perméabilisées à la saponine, antérieurement mise au point chez l'animal par Veksler et collaborateurs. Ceci a donc constitué la première partie de notre travail de thèse.

L'ensemble de nos résultats a contribué à élucider les parts respectives de la toxicité de la ciclosporine A, composant majeure du traitement immunosuppresseur, et du déconditionnement physique, dans les altérations du phénotype musculaire périphérique, suspectées de participer à la persistance du handicap physique des transplantés cardiaques. En effet:

- 1) Concernant la caractérisation des propriétés fonctionnelles mitochondriales, nous avons montré que :
 - Les capacités oxydatives des muscles squelettique et cardiaque des sujets TC, sous traitement immunosuppresseur, ne varient pas significativement, entre le moment de la greffe et dix mois après l'opération.
 - Les capacités oxydatives du muscle squelettique des sujets TC sont similaires à celles de sujets sédentaires sains appariés en âge, et ne semblent donc pas altérées

in vivo par le traitement immunosuppresseur, du moins dix mois après transplantation.

2) Concernant la potentielle toxicité musculaire de la ciclosporine A, nous avons montré que :

- *In vitro*, la CsA, sous sa formulation clinique, entraîne une diminution, concentration-dépendante, de la respiration mitochondriale des muscles squelettique et cardiaque des sujets TC.
- Cet effet délétère sur la respiration mitochondriale est principalement médié par l'excipient et non par la molécule active de la CsA.
- L'action inhibitrice de l'excipient est tissu-spécifique et affecte plus particulièrement certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment le complexe I et, à un degré moindre, le complexe IV.
- *In vivo*, et chez le rat, l'administration chronique de la molécule active de CsA, sans son excipient, entraîne au contraire, une augmentation des capacités oxydatives du muscle squelettique lent-oxydatif, sans altérer le contrôle de la respiration mitochondriale par l'ADP exogène.

3) Concernant les effets musculaires d'un programme d'entraînement en endurance des sujets TC, nous avons montré :

- Une augmentation significative des capacités oxydatives du muscle squelettique, atteignant des valeurs similaires à celles de sujets sportifs, et supérieures à celles de sujets sédentaires sains.
- Une activation fonctionnelle de la créatine kinase mitochondriale (impliquée dans le système de transfert de l'énergie), similaire à celle observée chez les sujets sportifs et absente chez des sujets sédentaires sains.

A. ETUDE DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE PAR LA TECHNIQUE DES FIBRES PERMEABILISEES A LA SAPONINE

1. IMPORTANCE DU CHOIX DES DIFFERENTS PROTOCOLES DE RESPIRATION MITOCHONDRIALE

Nous avons montré dans cette étude comment la technique des fibres perméabilisées à la saponine pouvait être appliquée avec succès à la détermination polarographique des propriétés fonctionnelles intrinsèques des mitochondries, et comment le choix des différents protocoles de mesure de la respiration mitochondriale est important, pour une détermination optimale de la fonction mitochondriale de petits échantillons musculaires humains. Les principaux objectifs visés par la plupart des études antérieures étaient la détermination des effets

mitochondriaux de l'exercice ou de l'entraînement chez des sujets sains, l'investigation clinique des altérations mitochondriales chez des patients, la compréhension des mécanismes d'activation de la phosphorylation oxydative. Pour répondre aux différentes questions posées, divers protocoles ont été mis au point, et sont souvent différents pour une même question donnée. Nous avons décrit et comparé tous les paramètres obtenus par les principaux protocoles, et avons ainsi pu mettre en évidence que certains d'entre eux étaient mieux appropriés pour évaluer les aspects quantitatifs et/ou qualitatifs de la fonction mitochondriale, c'est à dire pour l'évaluation des capacités oxydatives, la caractérisation du contrôle de la respiration mitochondriale, la détermination des altérations au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi, nous avons démontré que:

- le protocole A (utilisant seulement 2 ajouts d'ADP séparés par l'addition de créatine) est mieux adapté pour les échantillons de très faible quantité et permet d'évaluer les aspects quantitatifs (V_0 et V_{max}) et d'estimer les aspects qualitatifs (K_m et %Cr, ACR) de la fonction mitochondriale. Toutefois, il faut savoir que dans ce protocole, le K_m pour l'ADP est sous-estimé dans les muscles à capacité oxydative élevée.
- le protocole B (en absence de créatine) et le protocole C (en présence de créatine), utilisant des ajouts successifs et croissants d'ADP, permettent, en plus des paramètres quantitatifs, de déterminer la sensibilité réelle à l'ADP exogène de la population de mitochondries, ainsi que le rôle fonctionnel réel de la CK mitochondriale dans la production et le transfert de l'ATP.
- Le protocole D (utilisant divers substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire) permet d'étudier de manière isolée, l'activation de la respiration mitochondriale par les complexes spécifiques de la chaîne respiratoire (I, II ou IV) et donc de mettre en évidence d'éventuelles altérations de ces derniers.

La connaissance précise de ces avantages et de ces inconvénients, pour chaque protocole utilisé, est donc nécessaire et pourrait expliquer en partie, quelques résultats controversés de la littérature. Par exemple, dans une étude récente de notre équipe, nous avons montré, en utilisant les protocoles B, C et D, que les capacités oxydatives et les autres paramètres respiratoires du muscle Vaste Externe des patients porteurs d'une sclérose latérale amyotrophique étaient les mêmes que ceux de sujets sains sédentaires appariés en âge et en activité physique. Au contraire, Wiedemann et collègues (Wiedemann et al. 1998) qui n'ont pas utilisé le protocole D permettant d'étudier les complexes de la chaîne respiratoire, montrent une capacité oxydative diminuée chez ces patients.

Le choix des protocoles est d'autant plus important que l'on s'intéresse à la fonction

mitochondriale de tissu musculaire déjà altéré par des pathologies.

D'autre part, puisque la diminution du K_m apparent pour l'ADP par la créatine indique un couplage fonctionnel de la créatine kinase mitochondriale avec la production d'ATP et le transfert de l'énergie, il est important d'utiliser les protocoles B et C lorsque l'on veut caractériser la régulation de la fonction mitochondriale par le système de la créatine kinase. De plus, le rôle fonctionnel de la miCK n'est accessible que par la technique des fibres perméabilisées et non par celle des mitochondries isolées.

Comme nous pouvons le constater dans la présente étude, une standardisation des protocoles de respiration est également nécessaire et permettrait une meilleure comparaison des différentes études de la littérature.

2. LIMITES DE LA TECHNIQUE DES FIBRES PERMEABILISEES

La principale limite de cette technique est la perte du cytosol, donc de ses enzymes solubles, au cours des étapes de perméabilisation et de rinçage des fibres. Ainsi, les mécanismes précis de transduction du signal intracellulaire ne peuvent être étudiés par cette méthode. De plus, la fonction mitochondriale est mesurée dans des conditions standards ne prenant pas en compte les principaux facteurs des changements environnementaux transitoires tels que l'acidité cellulaire, la composition en électrolytes, la concentration des métabolites, la pression partielle de l'oxygène et la température. Etant donné que ces facteurs peuvent entraîner un dysfonctionnement mitochondrial *in vivo*, particulièrement dans des conditions pathologiques, l'extrapolation de nos résultats à la situation *in vivo*, doit être faite avec précaution.

Une autre question importante est de savoir si les valeurs de respiration mitochondriale obtenues sur fibres perméabilisées sont conformes à celles de la consommation d'oxygène *in vivo* (Rasmussen et al. 2001). En appliquant un facteur de 3,5 (tel que déterminé dans nos conditions expérimentales) pour le rapport entre poids humide et poids sec, et en tenant compte d'un coefficient de température de 2,9 entre 22°C et 38°C, l'extrapolation donne une valeur de 4,8 mol O₂/min/kg pour le muscle Vaste Externe de sujets normaux actifs, ou de 6.6 mmol O₂/min/kg pour des sujets athlétiques (Zoll et al. 2001). Cependant, cette extrapolation reste largement en dessous de la valeur de 12-14 mmol O₂/min/kg rapporté pour le Vaste Externe de jeunes sujets volontaires sains entraînés (Tonkonogi & Sahlin 1997; Rasmussen et al. 2001). Il a été proposé que les mitochondries pourraient être en partie découplées *in vivo*, ou qu'il pourrait exister d'autres facteurs de régulation de la respiration mitochondriale qui seraient perdus dans les préparations de mitochondries isolées ou de fibres perméabilisées.

Le meilleur candidat de ces facteurs est le calcium, déjà connu, comme démontré dans le

muscle cardiaque, pour activer les déshydrogénases et l'ATP synthase mitochondriales, et pour augmenter la vitesse de respiration, à des concentrations physiologiques (Territo et al. 2000; Territo et al. 2001). Comme dans nos conditions expérimentales, la concentration de calcium a été maintenue à la concentration de repos du muscle (100 mM, pCa 7), pour garantir la stabilité mitochondriale, ceci pourrait expliquer pourquoi les valeurs de respiration sont inférieures à celles obtenues *in vivo*. Le fait que les valeurs de la consommation de l'oxygène, lorsqu'elles sont extrapolées à partir des données expérimentales obtenues *ex vivo*, soient habituellement plus basses que celles mesurées *in vivo*, a déjà été discuté dans la littérature (Tonkonogi & Sahlin 1997; Rasmussen et al. 2001).

B. CARACTERISATION DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DES MITOCHONDRIES DANS LES MUSCLES STRIES DU SUJET TC

Après transplantation cardiaque, les sujets présentent toujours un handicap physique, caractérisé par une VO_{2pic} limitée à 60% de celle des sujets sédentaires sains appariés en âge, sexe et en taille, malgré une normalisation de la plupart des paramètres hémodynamiques et de l'oxygénation (Mettauer et al. 1996; Braith & Edwards 2000). De ce fait, l'ensemble des données de la littérature s'accorde à reconnaître la part importante des anomalies périphériques dans la persistance de cette limitation physique (Stratton et al. 1994). Néanmoins l'origine précise de ces altérations reste encore obscure. Certains auteurs les rapportent à une atteinte mitochondriale, à cause des activités anormalement basses de certaines enzymes oxydatives (Schaufelberger et al. 2001), et à cause d'anomalies mitochondriales de l'insuffisance cardiaque sévère, qui auraient pu persister après la transplantation (Drexler et al. 1992; Hambrecht et al. 1995). L'observation chez le rat d'altérations de la respiration de mitochondries musculaires isolées, attribuées à la ciclosporine, semblait pouvoir conforter cette hypothèse (Hokanson et al. 1995; Mercier et al. 1995). Paradoxalement, nous observons, dans le muscle squelettique des sujets TC, une densité mitochondriale normale et une perte de sa corrélation avec la VO_{2pic} , pourtant observée chez les sujets sains (Lampert et al. 1996a; Lampert et al. 1996b). De plus, notre équipe avait récemment montré chez le rat des anomalies de la fonction mitochondriale entièrement dues à l'excipient plutôt qu'à la CsA *per se* (Sanchez et al. 2000; Sanchez et al. 2001).

Cependant les caractéristiques fonctionnelles des mitochondries des muscles squelettique et cardiaque, n'ont jamais été déterminées chez les sujets TC. Nous avons fait l'hypothèse que ces mitochondries quantitativement normales pouvaient présenter des anomalies

fonctionnelles. De ce fait nous avons voulu évaluer les capacités oxydatives intrinsèques du tissu musculaire chez de sujets TC stabilisés, plus de six mois après la greffe. Nous avons montré que les paramètres quantitatifs de respiration mitochondriale du muscle squelettique restent strictement au niveau des valeurs observées chez des sujets sédentaires sains (Mettauer et al. 2001; Zoll et al. 2002), comme nous l'avons déjà montré pour les patients insuffisants cardiaques (Mettauer et al. 2001). Nous avons également déterminé, pour la première fois, les capacités oxydatives du muscle cardiaque des sujets TC. Le greffon, qui jusqu'à présent a été considéré comme un tissu "sain", présente une valeur oxydative trois fois plus importante que celle du muscle squelettique, ce qui confirme, comme nous nous y attendions, le haut potentiel oxydatif du tissu cardiaque.

C. TOXICITE MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE DE LA CICLOSPORINE A

Comme nous l'avons précédemment souligné, l'existence d'un dysfonctionnement mitochondrial musculaire attribué à une toxicité de la ciclosporine, serait l'un des mécanismes responsables du maintien du handicap physique des sujets TC. Ces anomalies mitochondriales ont été caractérisées d'une part, par la diminution de la respiration mitochondriale du muscle squelettique de rats sains traités par la CsA (Hokanson et al. 1995; Mercier et al. 1995), associée à une réduction du temps d'endurance de ces animaux (Mercier et al. 1995), et d'autre part, par la diminution chez l'homme de l'activité de certains marqueurs mitochondriaux tels que la citrate synthase (Schaufelberger et al. 2001). Ceci a suggéré que la CsA pourrait affecter la fonction mitochondriale des muscles locomoteurs et par conséquent contribuer à la limitation de la performance physique décrite chez les sujets transplantés (Mercier et al. 1995). Une étude de notre équipe, qui a montré que la densité volumétrique mitochondriale des sujets TC était similaire à celle des sujets sains sédentaires, avec une perte de la corrélation entre cette dernière et leur VO_2 pic, contrairement à ce qui est observé chez les sujets sains témoins (Lampert et al. 1996b), nous a également suggéré une atteinte fonctionnelle de ces mitochondries, qui pourrait être due à la ciclosporine.

Cependant, deux études récentes de notre équipe ont démontré chez le rat, que la toxicité mitochondriale, depuis longtemps attribuée à la ciclosporine, était en réalité entièrement médiée par son excipient, composé à 2/3 de Crémophor et à 1/3 d'éthanol (Sanchez et al. 2000; Sanchez et al. 2001). De plus, l'un des mécanismes de l'action délétère de l'excipient sur la respiration mitochondriale, a été mis en évidence et serait l'altération spécifique de certains complexes de la chaîne respiratoire, en particulier le complexe I et à un degré moindre, le complexe IV (Sanchez et al. 2001). Par ailleurs, nos résultats pourraient expliquer

les effets protecteurs apparents de la CsA, observés lors de la comparaison des effets modérés de sa formulation clinique (Sandimmun), par rapport aux effets délétères plus accentués de son excipient seul (éthanol et Crémophor), sur le respiration mitochondriale (Sanchez et al. 2000; Sanchez et al. 2001).

L'un des objectifs de notre travail de thèse était donc d'étudier de façon spécifique, les effets de la CsA *per se*, et d'évaluer séparément les effets des différents constituants de sa formulation clinique sur la fonction mitochondriale des muscles squelettique et cardiaque des sujets TC.

1. EFFETS AIGUS D'UNE FORMULATION DE CSA SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE CHEZ LE SUJET TC

Parce que les TC sont traités simultanément par de nombreux médicaments, il est difficile d'étudier *in vivo*, les effets chroniques individuels de chaque agent immunosuppresseur. Pour ce faire, nous avons entrepris d'étudier *in vitro*, les effets aigus d'une formulation de CsA, le Sandimmun, sur la réponse mitochondriale des muscles cardiaque et squelettique des sujets TC. Nos résultats ont montré que le Sandimmun induit une diminution dose-dépendante de la respiration mitochondriale des deux types de muscles, et que cette inhibition se fait de façon tissu-spécifique. Cependant, la part de l'excipient n'a pas toujours été évaluée par le passé. L'excipient de la CsA, dans la formulation Sandimmun, est un émulsifiant utilisé pour dissoudre les composants lipophiliques, et il se compose d'éthanol et de Crémophor. Ce dernier est un dérivé polyoxyéthyléné d'huile de ricin dont la toxicité n'est plus à démontrer (Roman et al. 1989; Bowers et al. 1991; Tatou et al. 1996). Nous avons également démontré, comme chez l'animal, que les effets délétères du Sandimmun décrits dans cette étude étaient entièrement attribuables à une toxicité du Crémophor et non à la molécule active de CsA. Nous avons aussi déterminé les sites d'action de l'excipient sur la chaîne respiratoire et nos résultats ont montré une inhibition massive du complexe I, tandis que le complexe II n'était pas affecté. Le complexe IV quant à lui ne présentait qu'une légère altération, toutefois significative, dans le muscle cardiaque et pas dans le muscle squelettique. Nos résultats sont dans l'ensemble proches, à quelques détails près, de ce que nous avons démontré chez l'animal (Sanchez et al. 2001).

Dans le cœur, nos résultats semblent donc montrer une implication des complexes I et IV dans l'inhibition de la respiration mitochondriale, tandis que dans le muscle squelettique, seul le complexe I serait impliqué. En effet, ce dernier représente une étape limitante importante dans le contrôle de la respiration mitochondriale des tissus musculaires, contrairement au complexe

IV qui est présent en excès (Rossignol et al. 1999). D'autre part, le complexe IV pourrait être en moindre excès dans le cœur par rapport au muscle squelettique, ce qui pourrait expliquer la différences de résultats et la tissu-spécificité observées dans notre étude pour ces deux muscles.

L'inhibition du complexe I pourrait donc avoir une importance physiopathologique dans l'immunosuppression aiguë par le Sandimmun tandis que celle du complexe IV, dans les proportions obtenues, affecterait peu la respiration mitochondriale du muscle cardiaque *in vivo* (Gnaiger et al. 1998; Letellier et al. 1998).

En résumé, nous avons montré qu'il est peu probable que la fonction mitochondriale musculaire des TC soit affectée *in vivo* par le traitement immunosuppresseur, basé sur l'administration de faibles doses de CsA. Cependant, il existe certaines situations cliniques, telle que la période des complications post-opératoires précoces et celle des rejets aigus, au cours desquelles une augmentation des doses de CsA est nécessaire. Cette augmentation pourrait donc entraîner une élévation des concentrations plasmatiques de l'excipient, à laquelle pourrait être exposé le tissu musculaire de ces sujets.

2. EFFETS PROPRES DE LA MOLECULE DE CICLOSPORINE A, SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE

Compte tenu des résultats précédents, nous avons donc voulu étudier les effets propres de la CsA *per se* sur la respiration mitochondriale *in situ*, en s'affranchissant des effets délétères de son excipient. Pour cela, nous avons étudié sur un muscle lent oxydatif de rat (le soléaire), les effets du traitement chronique par la molécule active de CsA, sur les paramètres de la respiration mitochondriale, de régulation de la phosphorylation oxydative par l'ADP, et sur la composition musculaire en types de fibres.

Nous avons démontré que l'administration chronique de la molécule active de CsA à des rats, entraîne une augmentation des capacités oxydatives du muscle squelettique lent oxydatif, sans altérer la régulation de la respiration mitochondriale par l'ADP exogène. Une augmentation concomitante de l'activité de la CS a été mise en évidence et représente un argument en faveur d'une augmentation du nombre de mitochondries. Il est bien établi chez le rat, que le potentiel oxydatif des fibres de type IIa est plus élevé que celui des fibres de type I (Smith et al. 1988). De ce fait, une augmentation des capacités oxydatives (présente étude), en même temps qu'une augmentation du contenu en isoformes rapides MHCIIa (Bigard et al. 2000), confirme que l'administration de la CsA *per se* induit dans le soléaire de rat, une transition vers un phénotype rapide oxydatif à partir de fibres lentes oxydatives (Bigard et al. 2000).

Ceci est en accord avec l'implication de la voie de la calcineurine/NFAT dans le maintien du phénotype lent du muscle adulte (Chin et al. 1998; Bigard et al. 2000). Notre étude a donc montré que dans le muscle lent oxydatif, la CsA *per se*, en inhibant la voie de la calcineurine/NFAT, entraînerait une augmentation du nombre de mitochondries et par conséquent, de la capacité oxydative. Ces résultats suggèrent que la CsA *per se* n'a pas d'effets délétères sur les capacités oxydatives musculaire, mais induit une transition coordonnée à la fois, du phénotype musculaire contractile et du phénotype métabolique, de lent vers rapide-oxydatif.

Chez l'homme, les fibres de type IIa possèdent un potentiel oxydatif plus faible que les fibres de type I. Ainsi, en induisant une transition vers un phénotype rapide oxydatif, la CsA pourrait entraîner une légère diminution des capacités oxydatives musculaires des sujets TC. Toutefois, les effets spécifiques des corticoïdes sur la masse musculaire et sur le métabolisme énergétique, doivent aussi être pris en compte pour expliquer les altérations musculaires périphériques décrites chez ces sujets. D'autres effets secondaires de la CsA sur la microcirculation et sur les fonctions hépatique et rénale, pourraient également être impliqués dans la limitation à l'exercice.

En conclusion, nous avons démontré que la CsA *per se* n'a aucun effet délétère direct sur les propriétés fonctionnelles mitochondriales des muscles.

D. ADAPTATION ET REGULATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE DES SUJETS TC

Puisque le déconditionnement peut représenter une autre cause importante du handicap physique observé après transplantation, de nombreuses études ont porté sur les effets de l'entraînement en endurance à court et long terme chez les transplantés. L'ensemble de ces études a montré une augmentation bénéfique de la capacité à l'exercice de ces sujets (Kavanagh et al. 1988; Keteyian et al. 1991; Squires 1991; Badenhop 1995).

Au niveau musculaire, une seule étude, de notre équipe, a montré chez des sujets TC, qu'un entraînement en endurance à court terme, induisait une augmentation de la densité volumétrique totale des mitochondries sous-sarcolemmales, sans affecter la densité capillaire du muscle squelettique (Lampert et al. 1998). Toutefois, l'effet de l'entraînement en endurance n'a jamais été déterminé sur la fonction mitochondriale musculaire des transplantés cardiaques.

Nous avons montré que la respiration mitochondriale et le système de transfert de l'énergie,

réagissent à l'entraînement en endurance par des adaptations quantitatives et qualitatives similaires à celles précédemment observées chez les sujets sportifs sains (Zoll et al. 2002).

Cependant, contrairement à leurs propriétés mitochondriales musculaires, la capacité à l'exercice de ces sujets TC, reste inférieure celle de sujets sédentaires sains soumis au même type d'entraînement (Lampert et al. 1998). Ceci suggère encore une fois que la limitation métabolique aérobie est liée à des mécanismes opérant plutôt en amont de la « machinerie mitochondriale musculaire ».

Nous avons rapporté dans notre étude que les augmentations de la capacité oxydative musculaire et des activités enzymatiques du métabolisme oxydatif induites par l'entraînement en endurance des sujets TC, étaient proches des valeurs trouvées chez des sujets sportifs sains, qui cependant, garde une $VO_2\text{max}$ deux fois plus élevée.

Chez les sujets sains, Walsh et collaborateurs avaient montré des augmentations de 20% de la $VO_2\text{max}$ et de 38% de la V_{max} mitochondriale, après un entraînement en endurance de six semaines comportant des séances de 60 minutes à 70% de la $VO_2\text{max}$ (Walsh et al. 2001). Dans notre étude, nous avons observé, pour une même durée d'entraînement mais avec des séances plus courtes, une augmentation de 17% de la $VO_2\text{max}$ et de 48% de la V_{max} mitochondriale. Ainsi, avec notre type d'entraînement personnalisé en créneaux (PEP'C), nous avons obtenu un gain similaire sur la capacité à l'exercice, mais un gain plus important sur la capacité oxydative musculaire des sujets. Les avantages de ce type d'entraînement ont largement été décrits dans la littérature (Lonsdorfer et al. 1992; Geny et al. 1996; Lampert et al. 1996c; Lampert et al. 1998), et nos résultats ont confirmé les effets bénéfiques plus importants de ce type d'entraînement, chez la plupart des sujets désentraînés (Rowell 1974).

Par ailleurs, une importante adaptation de la régulation de la respiration mitochondriale à l'entraînement, a été démontrée. Veksler et collaborateurs (Veksler et al. 1995) avaient décrit que le K_m apparent pour l'ADP représentait une caractéristique du phénotype métabolique musculaire : il était élevé dans les muscles oxydatifs (300 à 600 μmol), traduisant une faible sensibilité ($1/K_m$) de leurs mitochondries pour l'ADP, et faible dans les muscles glycolytiques (10 à 50 μmol), reflétant au contraire, une grande sensibilité des mitochondries pour l'ADP. Dans notre étude, nous avons montré une diminution de la sensibilité mitochondriale à l'ADP vers des valeurs trouvées chez des sujets sains entraînés (Mettauer et al. 2001). De plus cette sensibilité mitochondriale à l'ADP n'augmentait de façon significative, en présence de créatine, qu'après entraînement, suggérant la mise en jeu d'un couplage fonctionnel entre la créatine kinase mitochondriale (mi-CK) et la phosphorylation oxydative, ainsi que l'apparition de voies de transfert de l'énergie effectué à travers la navette

CK. Comme chez les sujets athlétiques sains (Zoll et al. 2002), la mi-CK semblerait ainsi jouer un rôle important dans le contrôle de la respiration mitochondriale des muscles squelettiques des sujets TC. Ceci permettrait, grâce à la CK cytosolique et à la CK liée aux myofilaments ou au réticulum sarcoplasmique, d'établir une connexion entre la production d'énergie et son utilisation.

Ce type de contrôle (ou "servo-contrôle") de la production d'énergie par les mitochondries paraît adapté à l'activité contractile soutenue de l'exercice en endurance (Zoll et al. 2002).

Nous avons également montré que chez les transplantés, l'ACR (acceptor control ratio, V_{max}/V_0 , qui reflète le couplage entre l'oxydation et la phosphorylation) n'était pas significativement modifié par l'entraînement à court terme, contrairement à ce qui avait été observé chez les sujets athlétiques. Ceci suggère qu'un entraînement en endurance à long terme est probablement nécessaire pour induire une amélioration significative du rendement mitochondrial. Cette suggestion est aussi valable pour la composition de muscle en MHC, et il est possible que ni la durée ni l'intensité de notre programme d'entraînement, n'étaient suffisants pour induire des modifications significatives sur le contenu en MHC des muscles squelettiques de nos sujets TC. En effet, les altérations du phénotype contractile musculaire surviennent tardivement et ne sont pas toujours mises en évidence après un entraînement en endurance (Booth & Thomason 1991).

En conclusion, nous avons montré que la fonction mitochondriale du muscle squelettique des sujets TC, préservée même neuf mois après transplantation, est significativement améliorée après un entraînement en endurance, avec la mise en place d'un couplage fonctionnel entre de la mi-CK et la rephosphorylation de l'ADP. Ainsi, notre étude suggère, une fois de plus, que les mécanismes à l'origine de la persistance du handicap physique après transplantation sont indépendants des capacités métaboliques intrinsèques du muscle, mais relèvent plutôt de facteurs extramitochondriaux, qui persisteraient même après entraînement.

II. PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE

A. PERSPECTIVES

Les conclusions de nos différentes études ouvrent plusieurs perspectives d'investigation :

1. PAR RAPPORT AUX LIMITES DE NOTRE METHODOLOGIE

Dans nos différentes études, les mesures de respiration mitochondriale ont toutes été réalisées en condition saturante d'oxygène (à pression atmosphérique, ≈ 20 kPa) et de substrats

composant les solutions de respiration. Sous ces conditions, le seul facteur limitant cette respiration mitochondriale, est l'ADP exogène, ajouté dans le milieu extracellulaire. Finalement, ce que nous mesurons, c'est la capacité oxydative du tissu musculaire, dans des conditions "idéales", c'est à dire sans variations de pH, de température, de forces ioniques, de concentrations calciques et de pO_2 . Ceci est rarement le cas *in vivo*, où l'on observe souvent de nombreuses variations de l'homéostasie intracellulaire, en fonction de l'état physiologique ou physiopathologique de la cellule. Chez les sujets TC, il serait donc intéressant d'étudier les variations de ces différents facteurs, susceptibles d'altérer *in vivo*, la fonction mitochondriale musculaire. En effet, des études ont montré une acidose plus importante chez ces sujets, au cours de l'exercice (Stratton et al. 1994). Les variations des autres facteurs, particulièrement celui de la pO_2 , reste encore inconnu à ce jour. Cependant, l'influence des variations de la pO_2 sur la fonction mitochondriale et particulièrement sur ses adaptations qualitatives a été bien démontrée (Gnaiger et al. 1995; Gnaiger et al. 2000).

D'autre part, le fait de caractériser les propriétés fonctionnelles de l'ensemble de la population mitochondriale ne permet pas d'exclure la présence de mitochondries défectueuses dans les muscles des sujets TC. Des études fonctionnelles et (ultra)structurales supplémentaires sont donc nécessaires. Par ailleurs, des résultats préliminaires de notre équipe portant sur l'étude de complexes spécifiques de la chaîne respiratoire, n'ont pas révélé de dysfonctionnement de ces derniers. L'utilisation d'inhibiteurs et de substrats spécifiques de la chaîne respiratoire permettra d'étudier ces anomalies de fonctionnement de la mitochondrie (Mazat et al. 2001). Cette étude doit donc être poursuivie sur un plus grand nombre de sujets.

Enfin, nous avons étudié la respiration mitochondriale avec le couple glutamate-malate comme substrat, les équivalents réducteurs (NADH) étant uniquement apportés à la chaîne respiratoire, grâce à la réaction catalysée par la malate déshydrogénase. L'utilisation d'autres substrats tels que le pyruvate, les acides gras et le glycérol 3 phosphate permettrait d'avoir une vue plus complète des capacités oxydatives du muscle et de montrer, éventuellement, une utilisation préférentielle par les mitochondries de l'un ou l'autre de ces substrats. Par exemple, une altération de la pyruvate déshydrogénase dans certaines pathologies, ou une limitation à un niveau donné du cycle de Krebs, pourrait être mise en évidence par l'utilisation du pyruvate comme substrat, en plus du couple malate-glutamate. Alors que l'utilisation du couple glutamate-malate permet de montrer principalement des altérations au niveau de cette chaîne respiratoire, l'utilisation de plusieurs substrats impliqués dans différentes voies métaboliques permettrait de mettre en évidence des altérations en amont de la chaîne respiratoire.

2. PAR RAPPORT A LA FONCTION MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE DES SUJETS TC

2.1. Rejets aigus et fonction mitochondriale

Nous avons montré *in vitro*, que les effets délétères de la ciclosporine (sous sa formulation Sandimmun) sur la respiration mitochondriale musculaire, pouvaient entièrement être attribués à son excipient (le Crémophor). Cependant, *in vivo*, la fonction mitochondriale musculaire des sujets TC, ne semblait pas affectée par le traitement immunosuppresseur, du fait des faibles doses administrées, et était similaires à celle de sujets sédentaires sains. Dans cette étude, nous avons donc suggéré que l'augmentation des doses de CsA, notamment au moment des rejets aigus, pourrait dans ces conditions, avoir des répercussions négatives sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries. Il faudrait donc réaliser des mesures de respiration mitochondriale sur des biopsies musculaires cardiaque et squelettique obtenues au moment où les sujets TC sont traités pour un rejet aigu. Aucune étude n'a à ce jour été effectuée chez l'homme. Chez l'animal, une seule étude de Abastado et collaborateurs, a montré une diminution des paramètres respiratoires quantitatifs et qualitatifs du muscle cardiaque. Ces anomalies de la fonction mitochondriale ont été confirmées par l'observation d'altérations morphologiques. Les auteurs ont conclu à une perturbation de la voie respiratoire mitochondriale au cours d'un épisode de rejet aigu (Abastado et al. 1991).

2.2. Suivi à long terme de la fonction mitochondriale

Les études que nous avons réalisées chez nos sujets TC, se situaient en moyenne entre le neuvième et le dixième mois après la transplantation. Il serait donc intéressant de faire une étude de suivi complet à intervalles réguliers, de l'évolution des propriétés fonctionnelles mitochondriales, depuis le moment de la greffe, et ce pendant au moins une année. Cette étude permettrait de voir l'évolution spontanée des capacités oxydatives musculaires et de les mettre en relation avec celle de la capacité à l'exercice des sujets TC. Le suivi de cette capacité à l'exercice a déjà été étudiée et sa cinétique se caractérise par une augmentation de la VO_2 max dès le troisième mois suivant la greffe et se poursuit sans réentraînement, jusqu'au douzième mois où elle se stabilise (Labovitz et al. 1989; Quigg et al. 1989; Rudas et al. 1992; Mandak et al. 1995). Des résultats préliminaires que nous avons obtenus sur des mesures effectuées à 3, 6, 12 et 18 mois après la greffe, montrent en effet que l'évolution des capacités oxydatives musculaires semblent suivre le même profil que celui de la capacité à l'exercice, confirmant une fois de plus que l'hypothèse d'une altération de la fonction mitochondriale par le traitement immunosuppresseur, semble peu vraisemblable.

2.3. Corticoïdes et fonction mitochondriale

Certains corticoïdes exogènes tels que la prednisone, font partie de la trithérapie immunosuppressive à vie des sujets TC. Après la transplantation, les doses de prednisone sont généralement réduites, sauf pendant les périodes de rejet aigu où elles sont nécessairement augmentées. Malheureusement, de nombreux effets secondaires leur ont été rapportés notamment une myopathie et une ostéoporose qui représentent l'une des causes de morbidité chez les sujets TC. Une atrophie et une fatigue musculaires associées à des anomalies structurales du muscle squelettique caractérisées par des diminutions de protéines myofibrillaires et de la densité volumétrique mitochondriale (Horber et al. 1987), ont particulièrement été décrites. Il serait donc intéressant d'étudier chez l'animal, les mécanismes à l'origine de ces altérations et de les comparer à ceux impliqués dans les anomalies médiées par la ciclosporine. D'autre part une étude des interactions entre les différents immunosuppresseurs sur la fonction mitochondriale musculaire permettrait d'avoir une approche plus physiologique de ce qui se passe *in vivo* dans les muscles périphériques de ces sujets.

3. PAR RAPPORT A L'HYPOTHESE D'UNE ATTEINTE EXTRAMITOCHONDRIALE

Au vu de nos résultats, il apparaît que la mitochondrie musculaire du sujet TC, intrinsèquement normale, ne fonctionnerait pas *in vivo* au mieux de ses capacités oxydatives, à cause d'une insuffisance des apports locaux en oxygène et en substrats énergétiques, malgré un débit sanguin musculaire normal. En effet, si les capillaires sont en nombre insuffisant, ou peu alimentés du fait de la vasoconstriction anormale, il en résulterait des anomalies de distribution intramusculaire du débit sanguin nutritif, pouvant entraîner une sous-alimentation des mitochondries en substrats énergétiques. De plus, cette situation pourrait être exacerbée par la diminution du débit sanguin déjà observé à l'exercice chez les patients IC (Wilson et al. 1984a). Cette hypothèse n'est pas en contradiction avec l'observation d'une oxygénation apparemment normale du muscle (Mancini et al. 1994), et est même renforcée par l'observation, chez les sujets TC, d'une diminution de la densité capillaire (Lampert et al. 1996b), qui persiste même après entraînement en endurance (Lampert et al. 1998). Il serait donc intéressant d'étudier les voies de l'angiogenèse, de l'expression des NO synthases, de l'endothéline et de certaines cytokines (TNF α , IL-6, IL-1 β).

B. CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des données de ce travail de thèse démontre que les propriétés intrinsèques des mitochondries musculaires du sujet transplanté cardiaque demeurent intacte plusieurs mois après transplantation, tant au niveau de leurs caractéristiques fonctionnelles quantitatives, qu'au niveau de leurs mécanismes fins de régulation de la production et du transfert de l'énergie cellulaire. Ceci suggère que, contrairement à la majorité des données de la littérature, la fonction mitochondriale musculaire des transplantés, n'est pas directement affectée *in vivo*, par le traitement immunosuppresseur clinique en général, et par la ciclosporine A en particulier. Le dysfonctionnement énergétique potentiel n'est donc pas la principale cause des altérations musculaires périphériques, suspectées d'être à l'origine de la limitation à l'effort physique, généralement observée chez ces sujets. D'autres acteurs, extramitochondriaux, tels que le réseau capillaire et certaines voies de signalisation impliquées dans la transition phénotypique musculaire, restent des cibles préférentielles des immunosuppresseurs, et semblent être altérés *in vivo*, dans les muscles locomoteurs. La composante musculaire périphérique du handicap physique persistant des sujets TC, reste donc l'un des principaux facteurs limitant leur performance physique. Ainsi, toute action thérapeutique favorisant une restauration des capacités musculaires périphériques, permettrait également de réduire cette incapacité physique à l'effort. L'entraînement physique en endurance, de par sa simplicité de réalisation et de par ses effets bénéfiques tant au niveau central que périphérique, demeure à ce jour, la meilleure option pour la réhabilitation physique et l'amélioration de la qualité de vie du sujet transplanté. Il devrait donc à ce titre, être généralisé à l'ensemble de la population des transplantés, dans le cadre de leur suivi post-transplantation classique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abastado P, Duboc D, Marsac C, Muffat-Joly M, Toussaint M, Perier P, Francois D, Carpentier A, Valty J, Guerin F** (1991) *[Demonstration of abnormalities of myocardial mitochondrial oxygenation in cardiac graft rejection]*. Arch Mal Coeur Vaiss 84:855-9
- Adamopoulos S, Coats AJ, Brunotte F, Arnolda L, Meyer T, Thompson CH, Dunn JF, Stratton J, Kemp GJ, Radda GK, et al.** (1993) *Physical training improves skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol 21:1101-6
- Agbulut O, Li Z, Mouly V, Butler-Browne GS** (1996) *Analysis of skeletal and cardiac muscle from desmin knock-out and normal mice by high resolution separation of myosin heavy-chain isoforms*. Biology of the Cell 88:131-5
- Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR** (1997) *Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting*. Am J Physiol 273:C579-87
- Altschuld RA, Hohl CM, Castillo LC, Garleb AA, Starling RC, Brierley GP** (1992) *Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes*. Am J Physiol 262:H1699-704
- Andersen JL, Schjerling P, Saltin B** (2000) *Muscle, genes and athletic performance*. Sci Am 283:48-55
- Andersen P, Henriksson J** (1977) *Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise*. J Physiol 270:677-90
- Andreassen AK, Kirkeboen KA, Gullestad L, Simonsen S, Kvernebo K** (1998a) *Effect of heart transplantation on impaired peripheral microvascular perfusion and reactivity in congestive heart failure*. Int J Cardiol 65:33-40
- Andreassen AK, Kvernebo K, Jorgensen B, Simonsen S, Kjekshus J, Gullestad L** (1998b) *Exercise capacity in heart transplant recipients: relation to impaired endothelium-dependent vasodilation of the peripheral microcirculation*. Am Heart J 136:320-8
- Anflous K, Armstrong DD, Craigen WJ** (2001) *Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice*. J Biol Chem 276:1954-60
- Anflous K, Blondel O, Bernard A, Khrestchatisky M, Ventura-Clapier R** (1998) *Characterization of rat porin isoforms: cloning of a cardiac type-3 variant encoding an additional methionine at its putative N-terminal region*. Biochim Biophys Acta 1399:47-50
- Arellano F, Krupp P** (1991) *Muscular disorders associated with cyclosporin*. Lancet 337:915
- Arnolda L, Brosnan J, Rajagopalan B, Radda GK** (1991) *Skeletal muscle metabolism in heart failure in rats*. Am J Physiol 261:H434-42

B

- Badenhop DT** (1995) *The therapeutic role of exercise in patients with orthotopic heart transplant*. Med Sci Sports Exerc 27:975-85

- Baecke JA, Burema J, Frijters JE** (1982) *A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies.* Am J Clin Nutr 36:936-42
- Balaban RS** (1990) *Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell.* Am J Physiol 258:C377-89
- Baldwin KM, Hooker AM, Campbell PJ, Lewis RE** (1978) *Enzyme changes in neonatal skeletal muscle: effect of thyroid deficiency.* Am J Physiol 235:C97-102
- Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitas K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC, Labeit S** (2001) *Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies.* J Cell Biol 153:413-27
- Banijamali HS, ter Keurs MH, Paul LC, ter Keurs HE** (1993) *Excitation-contraction coupling in rat heart: influence of cyclosporin A.* Cardiovasc Res 27:1845-54
- Barton PJ, Buckingham ME** (1985) *The myosin alkali light chain proteins and their genes.* Biochem J 231:249-61
- Bassani JW, Bassani RA, Bers DM** (1994) *Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms.* J Physiol 476:279-93
- Bassett DR, Jr., Howley ET** (2000) *Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance.* Med Sci Sports Exerc 32:70-84
- Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M** (2000) *Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease.* Physiol Rev 80:1215-65
- Bereiter-Hahn J, Voth M** (1994) *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria.* Microsc Res Tech 27:198-219
- Bernardi L, Bianchini B, Spadacini G, Leuzzi S, Valle F, Marchesi E, Passino C, Calciati A, Vigano M, Rinaldi M, et al.** (1995) *Demonstrable cardiac reinnervation after human heart transplantation by carotid baroreflex modulation of RR interval.* Circulation 92:2895-903
- Bernardi L, Keller F, Sanders M, Reddy PS, Griffith B, Meno F, Pinsky MR** (1989) *Respiratory sinus arrhythmia in the denervated human heart.* J Appl Physiol 67:1447-55
- Bernardi P, Petronilli V** (1996) *The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal.* J Bioenerg Biomembr 28:131-8
- Bexton RS, Milne JR, Cory-Pearce R, English TA, Camm AJ** (1983) *Effect of beta blockade on exercise response after cardiac transplantation.* Br Heart J 49:584-8
- Bigard AX, Boehm E, Veksler V, Mateo P, Anflous K, Ventura-Clapier R** (1998) *Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure.* J Mol Cell Cardiol 30:2391-401
- Bigard AX, Duforez F, P. P, Guezennec CY** (1992) *Determination de l'activité physique par questionnaire: validation du questionnaire autoadministrable de Baecke.* Science et Sport 7:215-221
- Bigard X, Sanchez H, Zoll J, Mateo P, Rousseau V, Veksler V, Ventura-Clapier R** (2000) *Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype.* J Biol Chem 275:19653-60
- Biring MS, Fournier M, Ross DJ, Lewis MI** (1998) *Cellular adaptations of skeletal muscles to cyclosporine.* J Appl Physiol 84:1967-75
- Boehm E, Ventura-Clapier R, Mateo P, Lechene P, Veksler V** (2000) *Glycolysis supports calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in skinned ventricular fibres of mice deficient in mitochondrial and cytosolic creatine kinase.* J Mol Cell Cardiol 32:891-902

- Booth FW, Thomason DB** (1991) *Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models*. *Physiol Rev* 71:541-85
- Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H** (1994) *Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. 1976*. *Agents Actions* 43:179-86
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP** (1997) *Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression*. *FEBS Lett* 408:39-42
- Bossen EH, Sommer JR, Waugh RA** (1981) *Comparative stereology of mouse atria*. *Tissue Cell* 13:71-7
- Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C** (1994) *Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres*. *J Physiol* 478:341-9
- Bouhnik J, Michel O, Francois D, Clot JP, Michel R** (1975) *[Effects of thyroidectomy of the rat on the structure and functions of skeletal muscle mitochondria]*. *Biochimie* 57:779-86
- Bowers VD, Locker S, Ames S, Jennings W, Corry RJ** (1991) *The hemodynamic effects of Cremophor-EL*. *Transplantation* 51:847-50
- Braith RW** (1998) *Exercise training in patients with CHF and heart transplant recipients*. *Med Sci Sports Exerc* 30:S367-78
- Braith RW, Edwards DG** (2000) *Exercise following heart transplantation*. *Sports Med* 30:171-92
- Braith RW, Limacher MC, Leggett SH, Pollock ML** (1993) *Skeletal muscle strength in heart transplant recipients*. *J Heart Lung Transplant* 12:1018-23
- Brand MD** (2000) *Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing*. *Exp Gerontol* 35:811-20
- Braun U, Paju K, Eimre M, Seppet E, Orlova E, Kadaja L, Trumbeckaite S, Gellerich FN, Zierz S, Jockusch H, Seppet EK** (2001) *Lack of dystrophin is associated with altered integration of the mitochondria and ATPases in slow-twitch muscle cells of MDX mice*. *Biochim Biophys Acta* 1505:258-70
- Brdiczka D, Wallimann T** (1994) *The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism*. *Mol Cell Biochem* 133-134:69-83
- Bronson DD, Schachat FH** (1982) *Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit*. *J Biol Chem* 257:3937-44
- Bronstein WW, Knull HR** (1981) *Interaction of muscle glycolytic enzymes with thin filament proteins*. *Can J Biochem* 59:494-9
- Brooke MH, Kaiser KK** (1970) *Muscle fiber types: how many and what kind?* *Arch Neurol* 23:369-79
- Bussieres LM, Pflugfelder PW, Menkis AH, Novick RJ, McKenzie FN, Taylor AW, Kostuk WJ** (1995) *Basis for aerobic impairment in patients after heart transplantation*. *J Heart Lung Transplant* 14:1073-80

C

- Caiozzo VJ, Haddad F** (1996) *Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading*. *Exerc Sport Sci Rev* 24:321-61
- Capo LA, Sillau AH** (1983) *The effect of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles*. *J Physiol* 342:1-14
- Caves PK, Stinson EB, Billingham ME, Shumway NE** (1975) *Transvenous intracardiac biopsy using a new catheter forceps*. *Heart Lung* 4:69-74

- Chati Z, Zannad F, Jeandel C, Lherbier B, Escanye JM, Robert J, Aliot E** (1996) *Physical deconditioning may be a mechanism for the skeletal muscle energy phosphate metabolism abnormalities in chronic heart failure.* Am Heart J 131:560-6
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS** (1998) *A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type.* Genes Dev 12:2499-509
- Clayton DA** (1992) *Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs.* Int Rev Cytol 141:217-32
- Coats AJ** (1996) *The "muscle hypothesis" of chronic heart failure.* J Mol Cell Cardiol 28:2255-62
- Cohen-Solal A, Ferron B, Pansard Y, Gourgon R** (1994) *[Functional capacity after cardiac transplantation].* Arch Mal Coeur Vaiss 87:1353-7
- Colombini M** (1989) *Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC.* J Membr Biol 111:103-11
- Constable SH, Favier RJ, McLane JA, Fell RD, Chen M, Holloszy JO** (1987) *Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training.* Am J Physiol 253:C316-22
- Conti A, Gorza L, Sorrentino V** (1996) *Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles.* Biochem J 316 (Pt 1):19-23
- Coyle EF** (1992) *Carbohydrate supplementation during exercise.* J Nutr 122:788-95
- Cozens AL, Runswick MJ, Walker JE** (1989) *DNA sequences of two expressed nuclear genes for human mitochondrial ADP/ATP translocase.* J Mol Biol 206:261-80
- Crabtree GR** (1989) *Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation.* Science 243:355-61
- Craig EE, Chesley A, Hood DA** (1998) *Thyroid hormone modifies mitochondrial phenotype by increasing protein import without altering degradation.* Am J Physiol 275:C1508-15
- Crompton M, McGuinness O, Nazareth W** (1992) *The involvement of cyclosporin A binding proteins in regulating and uncoupling mitochondrial energy transduction.* Biochim Biophys Acta 1101:214-7

D

- De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R** (2000) *Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle.* Circulation 102:1847-53
- Degens H, Turek Z, Hoofd LJ, Van't Hof MA, Binkhorst RA** (1992) *The relationship between capillarisation and fibre types during compensatory hypertrophy of the plantaris muscle in the rat.* J Anat 180:455-63
- Degre SG, Niset GL, De Smet JM, Ibrahim T, Stoupele E, Le Clerc JL, Primo G** (1987) *Cardiorespiratory response to early exercise testing after orthotopic cardiac transplantation.* Am J Cardiol 60:926-8
- Delp MD, Duan C, Mattson JP, Musch TI** (1997) *Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure.* J Appl Physiol 83:1291-9
- Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, Coombes JS** (1999) *Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship.* J Appl Physiol 86:1002-8.
- Dempsey JA, Hanson PG, Henderson KS** (1984) *Exercise-induced arterial hypoxaemia in healthy human subjects at sea level.* J Physiol 355:161-75

- Denton RM, McCormack JG** (1980) *On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria*. FEBS Lett 119:1-8
- Denton RM, McCormack JG** (1985) *Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action*. Am J Physiol 249:E543-54
- Desplanches D, Mayet MH, Ilyina-Kakueva EI, Frutoso J, Flandrois R** (1991) *Structural and metabolic properties of rat muscle exposed to weightlessness aboard Cosmos 1887*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 63:288-92
- Doerner A, Pauschinger M, Badorff A, Noutsias M, Giessen S, Schulze K, Bilger J, Rauch U, Schultheiss HP** (1997) *Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans*. FEBS Lett 414:258-62
- Drexler H** (1997) *Endothelial dysfunction: clinical implications*. Prog Cardiovasc Dis 39:287-324
- Drexler H, Faude F, Hoing S, Just H** (1987) *Blood flow distribution within skeletal muscle during exercise in the presence of chronic heart failure: effect of milrinone*. Circulation 76:1344-52
- Drexler H, Riede U, Munzel T, Konig H, Funke E, Just H** (1992) *Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure*. Circulation 85:1751-9
- Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M** (1993) *On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res 27:1790-4
- Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL** (1982) *Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle*. J Appl Physiol 53:844-50
- Dudley GA, Tullson PC, Terjung RL** (1987) *Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control*. J Biol Chem 262:9109-14
- Dummler K, Muller S, Seitz HJ** (1996) *Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues*. Biochem J 317:913-8
- Duscha BD, Kraus WE, Keteyian SJ, Sullivan MJ, Green HJ, Schachat FH, Phippen AM, Brawner CA, Blank JM, Annex BH** (1999) *Capillary density of skeletal muscle: a contributing mechanism for exercise intolerance in class II-III chronic heart failure independent of other peripheral alterations*. J Am Coll Cardiol 33:1956-63

E

- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD** (2002) *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*. Nature 415:96-9
- Eklblom BT** (2000) *Blood boosting and sport*. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 14:89-98
- Enriquez JA, Fernandez-Silva P, Garrido-Perez N, Lopez-Perez MJ, Perez-Martos A, Montoya J** (1999) *Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone*. Mol Cell Biol 19:657-70

F

- Fabiato A** (1983) *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol 245:C1-14
- Fernandez-Sola J, Campistol J, Casademont J, Grau JM, Urbano-Marquez A** (1990) *Reversible cyclosporin myopathy*. Lancet 335:362-3

- Ferrari R** (1996) *The role of mitochondria in ischemic heart disease*. J Cardiovasc Pharmacol 28 Suppl 1:S1-10
- Ferretti G** (1997) *The effect of prolonged bed rest on maximal instantaneous muscle power and its determinants*. Int J Sports Med 18 Suppl 4:S287-9
- Fisher RP, Clayton DA** (1988) *Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor I*. Mol Cell Biol 8:3496-509
- Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR** (1991) *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. Nature 352:803-7
- Fournier N, Ducet G, Crevat A** (1987) *Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes*. J Bioenerg Biomembr 19:297-303
- Franciosa JA, Park M, Levine TB** (1981) *Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure*. Am J Cardiol 47:33-9
- Fraysse B, Rouaud T, Millour M, Fontaine-Perus J, Gardahaut MF, Levitsky DO** (2001) *Expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger in skeletal muscle*. Am J Physiol Cell Physiol 280:C146-54

G

- Gambke B, Lyons GE, Haselgrove J, Kelly AM, Rubinstein NA** (1983) *Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles*. FEBS Lett 156:335-9
- Geny B, Saini J, Mettauer B, Lampert E, Piquard F, Follenius M, Epailly E, Schnedecker B, Eisenmann B, Haberey P, Lonsdorfer J** (1996) *Effect of short-term endurance training on exercise capacity, haemodynamics and atrial natriuretic peptide secretion in heart transplant recipients*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 73:259-66
- Gimenez M, Cereceda V, Teculescu D, Aug F, Laxenaire MC** (1982a) *Square-wave endurance exercise test (SWEET) for training and assessment in trained and untrained subjects. III. Effect on VO₂ max and maximal ventilation*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 49:379-87
- Gimenez M, Servera E, Salinas W** (1982b) *Square-wave endurance exercise test (SWEET) for training and assessment in trained and untrained subjects. I. Description and cardiorespiratory responses*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 49:359-68
- Gimenez M, Servera E, Saunier C, Lacoste J** (1982c) *Square-wave endurance exercise test (SWEET) for training and assessment in trained and untrained subjects. II. Blood gases and acid-base balance*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 49:369-77
- Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V** (2001) *Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function*. Biochem J 358:147-55
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R** (1998) *Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase*. J Exp Biol 201:1129-39
- Gnaiger E, Mendez G, Hand SC** (2000) *High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11080-5
- Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Mendez G, Eberl T, Margreiter R** (1995) *Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen*. J Bioenerg Biomembr 27:583-96
- Gollnick PD, Ianuzzo CD** (1972) *Hormonal deficiencies and the metabolic adaptations of rats to training*. Am J Physiol 223:278-82

- Gordon AM, Homsher E, Regnier M** (2000) *Regulation of contraction in striated muscle*. *Physiol Rev* 80:853-924
- Goy JJ, Stauffer JC, Deruaz JP, Gillard D, Kaufmann U, Kuntzer T, Kappenberger L** (1989) *Myopathy as possible side-effect of cyclosporin*. *Lancet* 1:1446-7
- Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC** (1997) *A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator*. *Nat Genet* 16:226-34
- Gregorio CC, Weber A, Bondad M, Pennise CR, Fowler VM** (1995) *Requirement of pointed-end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes*. *Nature* 377:83-6
- Griffiths EJ, Halestrap AP** (1993) *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. *J Mol Cell Cardiol* 25:1461-9
- Guertner C, Krause BJ, Klepzig H, Jr., Herrmann G, Lebach S, Vockert EK, Hartmann A, Maul FD, Kranert TW, Mutschler E, et al.** (1995) *Sympathetic re-innervation after heart transplantation: dual-isotope neurotransmitter scintigraphy, norepinephrine content and histological examination*. *Eur J Nucl Med* 22:443-52
- Gullestad L, Haywood G, Ross H, Bjornerheim R, Geiran O, Kjekshus J, Simonsen S, Fowler M** (1996) *Exercise capacity of heart transplant recipients: the importance of chronotropic incompetence*. *J Heart Lung Transplant* 15:1075-83

H

- Hamalainen N, Pette D** (1997) *Coordinated fast-to-slow transitions of myosin and SERCA isoforms in chronically stimulated muscles of euthyroid and hyperthyroid rabbits*. *J Muscle Res Cell Motil* 18:545-54
- Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G** (1998) *Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure*. *Circulation* 98:2709-15
- Hambrecht R, Fiehn E, Yu J, Niebauer J, Weigl C, Hilbrich L, Adams V, Riede U, Schuler G** (1997) *Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure*. *J Am Coll Cardiol* 29:1067-73
- Hambrecht R, Niebauer J, Fiehn E, Kalberer B, Offner B, Hauer K, Riede U, Schlierf G, Kubler W, Schuler G** (1995) *Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles*. *J Am Coll Cardiol* 25:1239-49
- Hanada A, Okita K, Yonezawa K, Ohtsubo M, Kohya T, Murakami T, Nishijima H, Tamura M, Kitabatake A** (2000) *Dissociation between muscle metabolism and oxygen kinetics during recovery from exercise in patients with chronic heart failure*. *Heart* 83:161-6
- Harms SJ, Hickson RC** (1983) *Skeletal muscle mitochondria and myoglobin, endurance, and intensity of training*. *J Appl Physiol* 54:798-802
- Harridge SD, Magnusson G, Gordon A** (1996) *Skeletal muscle contractile characteristics and fatigue resistance in patients with chronic heart failure*. *Eur Heart J* 17:896-901
- Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJ** (1997) *Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure*. *J Am Coll Cardiol* 30:1758-64

- Heizmann CW, Berchtold MW, Rowlerson AM** (1982) *Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles*. Proc Natl Acad Sci U S A 79:7243-7
- Hill AV, Lupton H** (1923) *Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen*. Q. J. Med. 16:135-171
- Hokanson JF, Mercier JG, Brooks GA** (1995) *Cyclosporine A decreases rat skeletal muscle mitochondrial respiration in vitro*. Am J Respir Crit Care Med 151:1848-51
- Honig CR, Connett RJ, Gayeski TE** (1992) *O₂ transport and its interaction with metabolism; a systems view of aerobic capacity*. Med Sci Sports Exerc 24:47-53
- Hood DA** (2001) *Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle*. J Appl Physiol 90:1137-57
- Hoppeler H** (1986) *Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle*. Int J Sports Med 7:187-204
- Hoppeler H, Howald H, Conley K, Lindstedt SL, Claassen H, Vock P, Weibel ER** (1985) *Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle*. J Appl Physiol 59:320-7
- Horber FF, Hoppeler H, Scheidegger JR, Grunig BE, Howald H, Frey FJ** (1987) *Impact of physical training on the ultrastructure of mid thigh muscle in normal subjects and in patients treated with glucocorticoids*. J Clin Invest 79:1181-90
- Hornig B, Maier V, Drexler H** (1996) *Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure*. Circulation 93:210-4
- Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Boucek MM, Novick RJ** (1999) *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report--1999*. J Heart Lung Transplant 18:611-26
- Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O, Straub R** (1985) *Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans*. Pflugers Arch 403:369-76
- Huey KA, Bodine SC** (1998) *Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior*. Eur J Biochem 256:45-50
- Hughes SM, Chi MM, Lowry OH, Gundersen K** (1999) *Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice*. J Cell Biol 145:633-42
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA** (1993) *Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones*. Development 118:1137-47
- Humphreys JE, Cummins P** (1984) *Regulatory proteins of the myocardium. Atrial and ventricular tropomyosin and troponin-I in the developing and adult bovine and human heart*. J Mol Cell Cardiol 16:643-57
- Hutter JA, Wallwork J, English TA** (1990) *Management of rejection in heart transplant recipients: does moderate rejection always require treatment?* J Heart Transplant 9:87-91

I

- Ikemoto N, Ronjat M, Meszaros LG, Koshita M** (1989) *Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum*. Biochemistry 28:6764-71

J

- John R, Chen JM, Weinberg A, Oz MC, Mancini D, Itescu S, Galantowicz ME, Smith CR, Rose EA, Edwards NM** (1999) *Long-term survival after cardiac retransplantation: a twenty-year single-center experience.* J Thorac Cardiovasc Surg 117:543-55
- Jorgensen AO, Shen AC, Campbell KP** (1985) *Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells.* J Cell Biol 101:257-68
- Jurado F, Bellon JM, Pareja JA, Golitsin A, Millan L, Pascual G, Bujan J** (1998) *Effects of ischaemia-reperfusion and cyclosporin-A on cardiac muscle ultrastructure.* Histol Histopathol 13:761-74

K

- Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R** (2001) *Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization.* Circ Res 89:153-9
- Kao AC, Van Trigt P, 3rd, Shaeffer-McCall GS, Shaw JP, Kuzil BB, Page RD, Higginbotham MB** (1994) *Central and peripheral limitations to upright exercise in untrained cardiac transplant recipients.* Circulation 89:2605-15
- Kao AC, Van Trigt P, 3rd, Shaeffer-McCall GS, Shaw JP, Kuzil BB, Page RD, Higginbotham MB** (1995) *Allograft diastolic dysfunction and chronotropic incompetence limit cardiac output response to exercise two to six years after heart transplantation.* J Heart Lung Transplant 14:11-22
- Karch SB, Billingham ME** (1985) *Cyclosporine induced myocardial fibrosis: a unique controlled case report.* J Heart Transplant 4:210-2
- Kavanagh T, Mertens DJ, Shephard RJ, Beyene J, Kennedy J, Campbell R, Sawyer P, Yacoub M** (2003) *Long-term cardiorespiratory results of exercise training following cardiac transplantation.* Am J Cardiol 91:190-4
- Kavanagh T, Yacoub MH, Mertens DJ, Kennedy J, Campbell RB, Sawyer P** (1988) *Cardiorespiratory responses to exercise training after orthotopic cardiac transplantation.* Circulation 77:162-71
- Kay L, Li Z, Mericskay M, Olivares J, Tranqui L, Fontaine E, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Samuel JL, Rappaport L, Usson Y, Leverve X, Paulin D, Saks VA** (1997) *Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton.* Biochim Biophys Acta 1322:41-59
- Kay L, Nicolay K, Wieringa B, Saks V, Wallimann T** (2000) *Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ.* J Biol Chem 275:6937-44
- Kaye MP, Randall WC, Hageman GR, Geis WP, Priola DV** (1977) *Chronology and mode of reinnervation of the surgically denervated canine heart: functional and chemical correlates.* Am J Physiol 233:H431-7
- Keogh A, Macdonald P, Harvison A, Richens D, Mundy J, Spratt P** (1992a) *Initial steroid-free versus steroid-based maintenance therapy and steroid withdrawal after heart transplantation: two views of the steroid question.* J Heart Lung Transplant 11:421-7
- Keogh A, Macdonald P, Mundy J, Chang V, Harvison A, Spratt P** (1992b) *Five-year follow-up of a randomized double-drug versus triple-drug therapy immunosuppressive trial after heart transplantation.* J Heart Lung Transplant 11:550-5; discussion 556

- Keteyian S, Shepard R, Ehrman J, Fedel F, Glick C, Rhoads K, Levine TB** (1991) *Cardiovascular responses of heart transplant patients to exercise training.* J Appl Physiol 70:2627-31
- Kirklin JK, Bourge RC, White-Williams C, Naftel DC, Thomas FT, Thomas JM, Phillips MG** (1990) *Prophylactic therapy for rejection after cardiac transplantation. A comparison of rabbit antithymocyte globulin and OKT3.* J Thorac Cardiovasc Surg 99:716-24
- Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ** (1988) *Calcineurin.* Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 61:149-200
- Klingenberg M, Huang SG** (1999) *Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue.* Biochim Biophys Acta 1415:271-96
- Kontos HA, Thames MD, Lower RR** (1970) *Responses to electrical and reflex autonomic stimulation in dogs with cardiac transplantation before and after reinnervation.* J Thorac Cardiovasc Surg 59:382-92
- Kormos RL, Armitage JM, Dummer JS, Miyamoto Y, Griffith BP, Hardesty RL** (1990) *Optimal perioperative immunosuppression in cardiac transplantation using rabbit antithymocyte globulin.* Transplantation 49:306-11
- Korzeniewski B** (2001) *Theoretical studies on the regulation of oxidative phosphorylation in intact tissues.* Biochim Biophys Acta 1504:31-45
- Ku DH, Kagan J, Chen ST, Chang CD, Baserga R, Wurzel J** (1990) *The human fibroblast adenine nucleotide translocator gene. Molecular cloning and sequence.* J Biol Chem 265:16060-3
- Kushmerick MJ, Moerland TS, Wiseman RW** (1992) *Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi.* Proc Natl Acad Sci U S A 89:7521-5
- Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Kay L, Daneshrad Z, Rossi A, Kadaja L, Peet N, Seppet E, Saks VA** (1996) *Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo.* Eur J Biochem 241:909-15

L

- Labovitz AJ, Drimmer AM, McBride LR, Pennington DG, Willman VL, Miller LW** (1989) *Exercise capacity during the first year after cardiac transplantation.* Am J Cardiol 64:642-5
- Laczkovics A, Havel M, Teufelsbauer H, Horvath R, Schreiner W, Wolner E** (1987) *Cyclosporin-A induced heart failure after orthotopic heart transplantation.* Thorac Cardiovasc Surg 35:83-6
- Lampert E, Charloux A, Lonsdorfer J, Frans A** (1996a) *The concept of Raynaud's phenomenon of the lung revisited* Am J Med. Vol. 101, pp 468-71
- Lampert E, Mettauer B, Hoppeler H, Charloux A, Charpentier A, Lonsdorfer J** (1996b) *Structure of skeletal muscle in heart transplant recipients.* J Am Coll Cardiol 28:980-4
- Lampert E, Mettauer B, Hoppeler H, Charloux A, Charpentier A, Lonsdorfer J** (1998) *Skeletal muscle response to short endurance training in heart transplant recipients.* J Am Coll Cardiol 32:420-6
- Lampert E, Oyono-Enguelle S, Mettauer B, Freund H, Lonsdorfer J** (1996c) *Short endurance training improves lactate removal ability in patients with heart transplants.* Med Sci Sports Exerc 28:801-7

- Laske A, Gallino A, Schneider J, Bauer EP, Carrel T, Pasic M, von Segesser LK, Turina MI** (1992) *Prophylactic cytolytic therapy in heart transplantation: monoclonal versus polyclonal antibody therapy*. *J Heart Lung Transplant* 11:557-63
- Le Guennec JY, Cazorla O, Lacampagne A, Vassort G** (2000) *Is titin the length sensor in cardiac muscle? Physiological and physiopathological perspectives*. *Adv Exp Med Biol* 481:337-48; discussion 348-51
- Leenen FH** (1995) *Cardiac trophic stimuli and the transplanted heart*. *Blood Press Suppl* 2:35-8
- Lemmi CA, Miller RL, Rajfer J** (1990) *Inhibition of fatty acid-supported mitochondrial respiration by cyclosporine*. *Biochem Med Metab Biol* 44:266-70
- Lenka N, Vijayasarathy C, Mullick J, Avadhani NG** (1998) *Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61:309-44
- Letellier T, Heinrich R, Malgat M, Mazat JP** (1994) *The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach*. *Biochem J* 302:171-4
- Letellier T, Malgat M, Rossignol R, Mazat JP** (1998) *Metabolic control analysis and mitochondrial pathologies*. *Mol Cell Biochem* 184:409-17
- Lewartowski B** (2000) *Excitation-contraction coupling in cardiac muscle revisited*. *J Physiol Pharmacol* 51:371-86
- Lindsay DC, Anand IS, Bennett JG, Pepper JR, Yacoub MH, Rothery SM, Severs NJ, Poole-Wilson PA** (1994) *Ultrastructural analysis of skeletal muscle. Microvascular dimensions and basement membrane thickness in chronic heart failure*. *Eur Heart J* 15:1470-6
- Lipkin DP, Jones DA, Round JM, Poole-Wilson PA** (1988) *Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure*. *Int J Cardiol* 18:187-95
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL** (1991) *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. *Cell* 66:807-15
- Longhurst J, Capone RJ, Zelis R** (1975) *Evaluation of skeletal muscle capillary basement membrane thickness in congestive heart failure*. *Chest* 67:195-8
- Lonsdorfer J, Lampert E, Mettaufer B, Hoppeler H, Frey B, Shnedecker C, Dah E, Epailly E** (1992) *Physical fitness after cardiac transplantation: a proposal for an endurance training program and its assessment*. *Science and sports* 7:39-44
- Lunde PK, Dahlstedt AJ, Bruton JD, Lannergren J, Thoren P, Sejersted OM, Westerblad H** (2001) *Contraction and intracellular Ca(2+) handling in isolated skeletal muscle of rats with congestive heart failure*. *Circ Res* 88:1299-305

M

- Magnusson G, Kaijser L, Rong H, Isberg B, Sylven C, Saltin B** (1996) *Exercise capacity in heart failure patients: relative importance of heart and skeletal muscle*. *Clin Physiol* 16:183-95
- Mallory LA, Scheuermann BW, Hoelting BD, Weiss ML, McAllister RM, Barstow TJ** (2002) *Influence of peak VO₂ and muscle fiber type on the efficiency of moderate exercise*. *Med Sci Sports Exerc* 34:1279-87
- Mancini D** (1997) *Surgically denervated cardiac transplant. Rewired or permanently unplugged?* *Circulation* 96:6-8
- Mancini DM, Coyle E, Coggan A, Beltz J, Ferraro N, Montain S, Wilson JR** (1989) *Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure*. *Circulation* 80:1338-46

- Mancini DM, Wilson JR, Bolinger L, Li H, Kendrick K, Chance B, Leigh JS** (1994) *In vivo magnetic resonance spectroscopy measurement of deoxymyoglobin during exercise in patients with heart failure. Demonstration of abnormal muscle metabolism despite adequate oxygenation.* Circulation 90:500-8
- Mandak JS, Aaronson KD, Mancini DM** (1995) *Serial assessment of exercise capacity after heart transplantation.* J Heart Lung Transplant 14:468-78
- Mannella CA** (1992) *The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels.* Trends Biochem Sci 17:315-20
- Massie BM, Conway M, Rajagopalan B, Yonge R, Frostick S, Ledingham J, Sleight P, Radda G** (1988) *Skeletal muscle metabolism during exercise under ischemic conditions in congestive heart failure. Evidence for abnormalities unrelated to blood flow.* Circulation 78:320-6
- Massie BM, Conway M, Yonge R, Frostick S, Sleight P, Ledingham J, Radda G, Rajagopalan B** (1987) *³¹P nuclear magnetic resonance evidence of abnormal skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure.* Am J Cardiol 60:309-15
- Massie BM, Simonini A, Sahgal P, Wells L, Dudley GA** (1996) *Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure.* J Am Coll Cardiol 27:140-5
- Mathieu-Costello O, Suarez RK, Hochachka PW** (1992) *Capillary-to-fiber geometry and mitochondrial density in hummingbird flight muscle.* Respir Physiol 89:113-32
- Matsuda S, Koyasu S** (2000) *Mechanisms of action of cyclosporine.* Immunopharmacology 47:119-25
- Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S, Nishida E** (1998) *T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A.* J Biol Chem 273:12378-82
- Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR, Herzenberg LA** (1990) *The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes.* Embo J 9:4425-33
- Mazat JP, Rossignol R, Malgat M, Rocher C, Faustin B, Letellier T** (2001) *What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions...that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects.* Biochim Biophys Acta 1504:20-30
- McAllister HA, Jr.** (1990) *Histologic grading of cardiac allograft rejection: a quantitative approach.* J Heart Transplant 9:277-82
- McElhinny AS, Kolmerer B, Fowler VM, Labeit S, Gregorio CC** (2001) *The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed ends of the thin filaments.* J Biol Chem 276:583-92
- Mehring N, Neumann KH, Rahn KH, Zidek W** (1992) *Mechanisms of cyclosporin A-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat kidney.* Nephron 60:477-81
- Menkis AH, Powell AM, Novick RJ, McKenzie FN, Kostuk WJ, Pflugfelder PW, Brown JE, Rochon J, Chow LH, Stiller C** (1992) *A prospective randomized controlled trial of initial immunosuppression with ALG versus OKT3 in recipients of cardiac allografts.* J Heart Lung Transplant 11:569-76
- Mercier J, Ville N, Wintrebert P, Caillaud C, Varray A, Albat B, Thevenet A, Prefaut C** (1996) *Influence of post-surgery time after cardiac transplantation on exercise responses.* Med Sci Sports Exerc 28:171-5
- Mercier JG, Hokanson JF, Brooks GA** (1995) *Effects of cyclosporine A on skeletal muscle mitochondrial respiration and endurance time in rats.* Am J Respir Crit Care Med 151:1532-6

- Metcalf S, Alexander D, Turner J** (1994) *FK506 and cyclosporin A each inhibit antigen-specific signaling in the T cell line 171 in the absence of a calcium signal.* Cell Immunol 158:46-58
- Mettauer B, Lampert E, Lonsdorfer J, Levy F, Geny B, Kretz JG, Carpentier A, Haberey P, Eisenmann B, Kieny R** (1991) *Cardiorespiratory and neurohormonal response to incremental maximal exercise in patients with denervated transplanted hearts.* Transplant Proc 23:1178-81
- Mettauer B, Lampert E, Petitjean P, Bogui P, Epailly E, Schnedecker B, Geny B, Eisenmann B, Haberey P, Lonsdorfer J** (1996) *Persistent exercise intolerance following cardiac transplantation despite normal oxygen transport.* Int J Sports Med 17:277-86
- Mettauer B, Zhao QM, Epailly E, Charloux A, Lampert E, Heitz-Naegelen B, Piquard F, di Prampero PE, Lonsdorfer J** (2000) *VO₂ kinetics reveal a central limitation at the onset of subthreshold exercise in heart transplant recipients.* J Appl Physiol 88:1228-38
- Mettauer B, Zoll J, Sanchez H, Lampert E, Ribera F, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Epailly E, Lonsdorfer J, Ventura-Clapier R** (2001) *Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure patients versus sedentary or active control subjects.* J Am Coll Cardiol 38:947-54
- Meyer K, Lehmann M, Sunder G, Keul J, Weidemann H** (1990) *Interval versus continuous exercise training after coronary bypass surgery: a comparison of training-induced acute reactions with respect to the effectiveness of the exercise methods.* Clin Cardiol 13:851-61
- Michel C, Chati Z, Mertes PM, Escanye JM, Zannad F** (1998) *Physical activity, skeletal muscle beta-adrenoceptor changes and oxidative metabolism in experimental chronic heart failure.* Fundam Clin Pharmacol 12:263-9
- Millane T, Wilson AJ, Patel MK, Jennison SH, Holt DW, Murday AJ, Camm AJ** (1994) *Mitochondrial calcium deposition in association with cyclosporine therapy and myocardial magnesium depletion: a serial histologic study in heart transplant recipients.* J Heart Lung Transplant 13:473-80
- Miller LW** (1990) *Treatment of cardiac allograft rejection with intravenous corticosteroids.* J Heart Transplant 9:283-7
- Miller LW, Wolford T, McBride LR, Peigh P, Pennington DG** (1992) *Successful withdrawal of corticosteroids in heart transplantation.* J Heart Lung Transplant 11:431-4
- Millevoi S, Trombitas K, Kolmerer B, Kostin S, Schaper J, Pelin K, Granzier H, Labeit S** (1998) *Characterization of nebulin and nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs.* J Mol Biol 282:111-23
- Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y** (2000) *Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function.* J Cell Biol 150:1283-98
- Minajeva A, Ventura-Clapier R, Veksler V** (1996) *Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase.* Pflugers Arch 432:904-12
- Minotti JR, Christoph I, Oka R, Weiner MW, Wells L, Massie BM** (1991) *Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure. Relationship to systemic exercise performance.* J Clin Invest 88:2077-82
- Moncman CL, Wang K** (1995) *Nebulette: a 107 kD nebulin-like protein in cardiac muscle.* Cell Motil Cytoskeleton 32:205-25

- Murakami T, Shimomura Y, Yoshimura A, Sokabe M, Fujitsuka N** (1998) *Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle.* Biochim Biophys Acta 1381:113-22
- Murray JM, Knox MK, Trueblood CE, Weber A** (1982) *Potentiated state of the tropomyosin actin filament and nucleotide-containing myosin subfragment 1.* Biochemistry 21:906-15
- Myers J, Froelicher VF** (1991) *Hemodynamic determinants of exercise capacity in chronic heart failure.* Ann Intern Med 115:377-86

N

- Nelson BD, Luciakova K, Li R, Betina S** (1995) *The role of thyroid hormone and promoter diversity in the regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins.* Biochim Biophys Acta 1271:85-91
- Niggli E** (1999) *Localized intracellular calcium signaling in muscle: calcium sparks and calcium quarks.* Annu Rev Physiol 61:311-35
- Novgorodov SA, Gudz TI, Milgrom YM, Brierley GP** (1992) *The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A.* J Biol Chem 267:16274-82

O

- Olbrich HG, Donck LV, Geerts H, Mutschler E, Kober G, Kaltenbach M** (1993) *Cyclosporine increases the intracellular free calcium concentration in electrically paced isolated rat cardiomyocytes.* J Heart Lung Transplant 12:652-8
- Olson EN** (1993) *Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression.* Mol Endocrinol 7:1369-78
- Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH** (1990) *Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum.* J Biol Chem 265:13472-83

P

- Paulus WJ, Bronzwaer JG, Felice H, Kishan N, Wellens F** (1992) *Deficient acceleration of left ventricular relaxation during exercise after heart transplantation.* Circulation 86:1175-85
- Perini R, Orizio C, Gamba A, Veicsteinas A** (1993) *Kinetics of heart rate and catecholamines during exercise in humans. The effect of heart denervation.* Eur J Appl Physiol Occup Physiol 66:500-6
- Perreault CL, Gonzalez-Serratos H, Litwin SE, Sun X, Franzini-Armstrong C, Morgan JP** (1993) *Alterations in contractility and intracellular Ca²⁺ transients in isolated bundles of skeletal muscle fibers from rats with chronic heart failure.* Circ Res 73:405-12
- Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P** (1994) *Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A.* Biochim Biophys Acta 1187:255-9
- Pette D, Smith ME, Staudte HW, Vrbova G** (1973) *Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles.* Pflugers Arch 338:257-72

- Pette D, Staron RS** (1990) *Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers*. Rev Physiol Biochem Pharmacol 116:1-76.
- Pette D, Staron RS** (1997) *Mammalian skeletal muscle fiber type transitions*. Int Rev Cytol 170:143-223
- Pette D, Vrbova G** (1985) *Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers*. Muscle Nerve 8:676-89
- Pette D, Vrbova G** (1999) *What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity?* Muscle Nerve 22:666-77
- Pflugfelder PW, McKenzie FN, Kostuk WJ** (1988) *Hemodynamic profiles at rest and during supine exercise after orthotopic cardiac transplantation*. Am J Cardiol 61:1328-33
- Pflugfelder PW, Purves PD, McKenzie FN, Kostuk WJ** (1987) *Cardiac dynamics during supine exercise in cyclosporine-treated orthotopic heart transplant recipients: assessment by radionuclide angiography*. J Am Coll Cardiol 10:336-41
- Poole-Wilson PA, Ferrari R** (1996) *Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure*. J Mol Cell Cardiol 28:2275-85
- Pope SE SE, Daughters GT, Schroeder JS, Ingels NB, Aldermann EL** (1980) *Exercise response of the denervated heart in long-term cardiac transplant recipients*. Am J Cardiol 48:213-218

Q

- Qin W, Khuchua Z, Boero J, Payne RM, Strauss AW** (1999) *Oxidative myocytes of heart and skeletal muscle express abundant sarcomeric mitochondrial creatine kinase*. Histochem J 31:357-65
- Quigg RJ, Rocco MB, Gauthier DF, Creager MA, Hartley LH, Colucci WS** (1989) *Mechanism of the attenuated peak heart rate response to exercise after orthotopic cardiac transplantation*. J Am Coll Cardiol 14:338-44

R

- Rasmussen UF, Rasmussen HN, Krstrup P, Quistorff B, Saltin B, Bangsbo J** (2001) *Aerobic metabolism of human quadriceps muscle: in vivo data parallel measurements on isolated mitochondria*. Am J Physiol Endocrinol Metab 280:E301-7
- Richard R, Verdier JC, Duvallet A, Rosier SP, Leger P, Nignan A, Rieu M** (1999) *Chronotropic competence in endurance trained heart transplant recipients: heart rate is not a limiting factor for exercise capacity*. J Am Coll Cardiol 33:192-7
- Richardson RS, Grassi B, Gavin TP, Haseler LJ, Tagore K, Roca J, Wagner PD** (1999) *Evidence of O₂ supply-dependent VO₂ max in the exercise-trained human quadriceps*. J Appl Physiol 86:1048-53
- Rincon M, Flavell RA** (1994) *AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes*. Embo J 13:4370-81
- Roman ID, Monte MJ, Esteller A, Jimenez R** (1989) *Cholestasis in the rat by means of intravenous administration of cyclosporine vehicle, Cremophor EL*. Transplantation 48:554-8
- Rossignol R, Malgat M, Mazat JP, Letellier T** (1999) *Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies*. J Biol Chem 274:33426-32
- Rowell LB** (1974) *Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress*. Physiol Rev 54:75-159

- Rudas L, Pflugfelder PW, Kostuk WJ** (1990) *Comparison of hemodynamic responses during dynamic exercise in the upright and supine postures after orthotopic cardiac transplantation.* J Am Coll Cardiol 16:1367-73
- Rudas L, Pflugfelder PW, McKenzie FN, Menkis AH, Novick RJ, Kostuk WJ** (1992) *Normalization of upright exercise hemodynamics and improved exercise capacity one year after orthotopic cardiac transplantation.* Am J Cardiol 69:1336-9
- Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R** (1992) *Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development.* Cell 71:383-90

S

- Sabbah HN, Hansen-Smith F, Sharov VG, Kono T, Lesch M, Gengo PJ, Steffen RP, Levine TB, Goldstein S** (1993) *Decreased proportion of type I myofibers in skeletal muscle of dogs with chronic heart failure.* Circulation 87:1729-37
- Saks VA, Belikova YO, Kuznetsov AV, Khuchua ZA, Branishte TH, Semenovskiy ML, Naumov VG** (1991) *Phosphocreatine pathway for energy transport: ADP diffusion and cardiomyopathy.* Am J Physiol 261:30-8
- Saks VA, Kaambre T, Sikk P, Eimre M, Orlova E, Paju K, Piirsoo A, Appaix F, Kay L, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Seppet E** (2001) *Intracellular energetic units in red muscle cells.* Biochem J 356:643-57
- Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova O, Kuznetsov AV** (1994) *Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis.* Mol Cell Biochem 133-134:155-92
- Saks VA, Kuznetsov AV, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova JO, Kesvatera T, Tiivel T** (1995) *Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions.* J Mol Cell Cardiol 27:625-45
- Saks VA, Tiivel T, Kay L, Novel-Chate V, Daneshrad Z, Rossi A, Fontaine E, Keriel C, Leverve X, Ventura-Clapier R, Anflous K, Samuel JL, Rappaport L** (1996a) *On the regulation of cellular energetics in health and disease.* Mol Cell Biochem 160-161:195-208
- Saks VA, Vasil'eva E, Belikova Yu O, Kuznetsov AV, Lyapina S, Petrova L, Perov NA** (1993) *Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation.* Biochim Biophys Acta 1144:134-48
- Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F, Kunz WS** (1998) *Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo.* Mol Cell Biochem 184:81-100
- Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK** (1996b) *Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells.* Biochim Biophys Acta 1274:81-8
- Saltin B, Henriksson J, Nygaard E, Andersen P, Jansson E** (1977) *Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners.* Ann N Y Acad Sci 301:3-29
- Saltin B, Nazar K, Costill DL, Stein E, Jansson E, Essen B, Gollnick D** (1976) *The nature of the training response; peripheral and central adaptations of one-legged exercise.* Acta Physiol Scand 96:289-305

- Sanchez H, Bigard X, Veksler V, Mettauer B, Lampert E, Lonsdorfer J, Ventura-Clapier R** (2000) *Immunosuppressive treatment affects cardiac and skeletal muscle mitochondria by the toxic effect of vehicle.* J Mol Cell Cardiol 32:323-31
- Sanchez H, Zoll J, Bigard X, Veksler V, Mettauer B, Lampert E, Lonsdorfer J, Ventura-Clapier R** (2001) *Effect of cyclosporin A and its vehicle on cardiac and skeletal muscle mitochondria: relationship to efficacy of the respiratory chain.* Br J Pharmacol 133:781-8
- Savard GK, Richter EA, Strange S, Kiens B, Christensen NJ, Saltin B** (1989) *Norepinephrine spillover from skeletal muscle during exercise in humans: role of muscle mass.* Am J Physiol 257:H1812-8
- Savin WM, Haskell WL, Schroeder JS, Stinson EB** (1980) *Cardiorespiratory responses of cardiac transplant patients to graded, symptom-limited exercise.* Circulation 62:55-60
- Scarpulla RC** (1997) *Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells.* J Bioenerg Biomembr 29:109-19
- Schatz G** (1996) *The protein import system of mitochondria.* J Biol Chem 271:31763-6
- Schaub MC, Brunner UT, Von Schulthess C, Neidhart M, Baumann H** (1989) *Adaptation of contractile proteins in human heart and skeletal muscles.* Biomed Biochim Acta 48:S306-12
- Schaufelberger M, Andersson G, Eriksson BO, Grimby G, Held P, Swedberg K** (1996) *Skeletal muscle changes in patients with chronic heart failure before and after treatment with enalapril.* Eur Heart J 17:1678-85
- Schaufelberger M, Eriksson BO, Grimby G, Held P, Swedberg K** (1997) *Skeletal muscle alterations in patients with chronic heart failure.* Eur Heart J 18:971-80
- Schaufelberger M, Eriksson BO, Lonn L, Rundqvist B, Sunnerhagen KS, Swedberg K** (2001) *Skeletal muscle characteristics, muscle strength and thigh muscle area in patients before and after cardiac transplantation.* Eur J Heart Fail 3:59-67
- Schiaffino S, Reggiani C** (1994) *Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle.* J Appl Physiol 77:493-501.
- Schiaffino S, Reggiani C** (1996) *Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance.* Physiol Rev 76:371-423.
- Schieffer B, Wollert KC, Berchtold M, Saal K, Schieffer E, Hornig B, Riede UN, Drexler H** (1995) *Development and prevention of skeletal muscle structural alterations after experimental myocardial infarction.* Am J Physiol 269:H1507-13
- Schulte LM, Navarro J, Kandarian SC** (1993) *Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium pump gene expression by hindlimb unweighting.* Am J Physiol 264:C1308-15
- Schwaiger M, Hutchins GD, Kalff V, Rosenspire K, Haka MS, Mallette S, Deeb GM, Abrams GD, Wieland D** (1991) *Evidence for regional catecholamine uptake and storage sites in the transplanted human heart by positron emission tomography.* J Clin Invest 87:1681-90
- Seppet EK, Kaambre T, Sikk P, Tiivel T, Vija H, Tonkonogi M, Sahlin K, Kay L, Appaix F, Braun U, Eimre M, Saks VA** (2001) *Functional complexes of mitochondria with Ca, MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells.* Biochim Biophys Acta 1504:379-95
- Seppet EK, Kadaya LY, Hata T, Kallikorm AP, Saks VA, Vetter R, Dhalla NS** (1991) *Thyroid control over membrane processes in rat heart.* Am J Physiol 261:66-71
- Severinghaus JW** (1994) *Exercise O₂ transport model assuming zero cytochrome P₄₅₀ at V_{O₂ max.}* J Appl Physiol 77:671-8
- Shenolikar S** (1994) *Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation.* Annu Rev Cell Biol 10:55-86

- Shephard RJ** (1997) *Exercise for patients with congestive heart failure*. Sports Med 23:75-92
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y** (1999) *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. Nature 399:483-7
- Shoshan-Barmatz V, Ashley RH** (1998) *The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels*. Int Rev Cytol 183:185-270
- Simonini A, Long CS, Dudley GA, Yue P, McElhinny J, Massie BM** (1996a) *Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity*. Circ Res 79:128-36
- Simonini A, Massie BM, Long CS, Qi M, Samarel AM** (1996b) *Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure*. J Mol Cell Cardiol 28:1683-91
- Smith D, Green H, Thomson J, Sharratt M** (1988) *Oxidative potential in developing rat diaphragm, EDL, and soleus muscle fibers*. Am J Physiol 254:C661-8
- Sokol PP, Capodagli LC, Dixon M, Holohan PD, Ross CR, Coulson R, Jones DB** (1990) *Cyclosporin A and vehicle toxicity in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells*. Am J Physiol 259:C897-903
- Spina RJ, Chi MM, Hopkins MG, Nemeth PM, Lowry OH, Holloszy JO** (1996) *Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise*. J Appl Physiol 80:2250-4
- Squires RW** (1991) *Exercise training after cardiac transplantation*. Med Sci Sports Exerc 23:686-94
- Staron RS, Pette D** (1986) *Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers*. Histochemistry 86:19-23
- Sterling K, Brenner MA, Sakurada T** (1980) *Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo*. Science 210:340-2
- Sterling K, Milch PO, Brenner MA, Lazarus JH** (1977) *Thyroid hormone action: the mitochondrial pathway*. Science 197:996-9
- Stratton JR, Kemp GJ, Daly RC, Yacoub M, Rajagopalan B** (1994) *Effects of cardiac transplantation on bioenergetic abnormalities of skeletal muscle in congestive heart failure*. Circulation 89:1624-31
- Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y** (1994) *JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes*. Cell 77:727-36
- Su B, Karin M** (1996) *Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression*. Curr Opin Immunol 8:402-11
- Sullivan MJ, Duscha BD, Klitgaard H, Kraus WE, Cobb FR, Saltin B** (1997) *Altered expression of myosin heavy chain in human skeletal muscle in chronic heart failure*. Med Sci Sports Exerc 29:860-6
- Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR** (1990) *Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure*. Circulation 81:518-27
- Sullivan MJ, Knight JD, Higginbotham MB, Cobb FR** (1989) *Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure*. Circulation 80:769-81
- Sweeney HL, Bowman BF, Stull JT** (1993) *Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function*. Am J Physiol 264:C1085-95

T

- Tada M** (1992) *Molecular structure and function of phospholamban in regulating the calcium pump from sarcoplasmic reticulum*. *Ann N Y Acad Sci* 671:92-102; discussion 102-3
- Tada M, Yamamoto T, Tonomura Y** (1978) *Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum*. *Physiol Rev* 58:1-79
- Takahashi M, Tonomura Y** (1975) *Developmental changes in the structure and kinetic properties of myosin adenosinetriphosphatase of rabbit skeletal fast muscle*. *J Biochem (Tokyo)* 78:1123-33
- Takeyama N, Matsuo N, Tanaka T** (1993) *Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca(2+)-dependent inner-membrane permeability transition*. *Biochem J* 294 (Pt 3):719-25
- Talmadge RJ** (2000) *Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms*. *Muscle Nerve* 23:661-79
- Talmadge RJ, Roy RR** (1993) *Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms*. *J Appl Physiol* 75:2337-40
- Tatou E, Mossiat C, Maupoil V, Gabrielle F, David M, Rochette L** (1996) *Effects of cyclosporin and cremophor on working rat heart and incidence of myocardial lipid peroxidation*. *Pharmacology* 52:1-7
- Taylor CR, Karas RH, Weibel ER, Hoppeler H** (1987) *Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand*. *Respir Physiol* 69:1-127
- Territo PR, French SA, Dunleavy MC, Evans FJ, Balaban RS** (2001) *Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering*. *J Biol Chem* 276:2586-99
- Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS** (2000) *Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase*. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C423-35
- Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR** (1996) *Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression*. *Nature* 383:837-40
- Tonkonogi M, Harris B, Sahlin K** (1998) *Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise*. *J Physiol* 510:279-86
- Tonkonogi M, Sahlin K** (1997) *Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status*. *Acta Physiol Scand* 161:345-53
- Toussaint JF, Kwong KK, M'Kparu F, Weisskoff RM, LaRaia PJ, Kantor HL** (1996) *Interrelationship of oxidative metabolism and local perfusion demonstrated by NMR in human skeletal muscle*. *J Appl Physiol* 81:2221-8

V

- Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB** (2000) *Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4666-71
- Vatner DE, Vatner SF, Fujii AM, Homcy CJ** (1985) *Loss of high affinity cardiac beta adrenergic receptors in dogs with heart failure*. *J Clin Invest* 76:2259-64
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, Ventura-Clapier R** (1995) *Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal*

- muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function.* J Biol Chem 270:19921-9
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA** (1987) *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers.* Biochim Biophys Acta 892:191-6
- Veksler VI, Lechene P, Matrougui K, Ventura-Clapier R** (1997) *Rigor tension in single skinned rat cardiac cell: role of myofibrillar creatine kinase.* Cardiovasc Res 36:354-62
- Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anflous K** (1998) *Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity.* Mol Cell Biochem 184:231-47
- Ventura-Clapier R, Kuznetsov AV, d'Albis A, van Deursen J, Wieringa B, Veksler VI** (1995) *Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function.* J Biol Chem 270:19914-20
- Ventura-Clapier R, Veksler V, Hoerter JA** (1994) *Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction.* Mol Cell Biochem 133-134:125-44
- Vescovo G, Dalla Libera L, Serafini F, Leprotti C, Facchin L, Volterrani M, Ceconi C, Ambrosio GB** (1998) *Improved exercise tolerance after losartan and enalapril in heart failure: correlation with changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition.* Circulation 98:1742-9
- Vescovo G, Volterrani M, Zennaro R, Sandri M, Ceconi C, Lorusso R, Ferrari R, Ambrosio GB, Dalla Libera L** (2000) *Apoptosis in the skeletal muscle of patients with heart failure: investigation of clinical and biochemical changes.* Heart 84:431-7
- Virbasius JV, Scarpulla RC** (1994) *Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A 91:1309-13
- von Harsdorf R, Li PF, Dietz R** (1999) *Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis.* Circulation 99:2934-41
- Voos W, Martin H, Krimmer T, Pfanner N** (1999) *Mechanisms of protein translocation into mitochondria.* Biochim Biophys Acta 1422:235-54

W

- Wallimann T, Eppenberger HM** (1985) *Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle.* Cell Muscle Motil 6:239-85
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM** (1992) *Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis.* Biochem J 281:21-40
- Walsh B, Tonkonogi M, Sahlin K** (2001) *Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres.* Pflugers Arch 442:420-5
- Weibel ER, Taylor CR, Hoppeler H** (1991) *The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship.* Proc Natl Acad Sci U S A 88:10357-61
- Weiss JN, Lamp ST** (1987) *Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes.* Science 238:67-9
- Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS** (1998) *Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis.* J Neurol Sci 156:65-72

- Wiener DH, Fink LI, Maris J, Jones RA, Chance B, Wilson JR** (1986) *Abnormal skeletal muscle bioenergetics during exercise in patients with heart failure: role of reduced muscle blood flow*. *Circulation* 73:1127-36
- Wiles CM, Young A, Jones DA, Edwards RH** (1979) *Muscle relaxation rate, fibre-type composition and energy turnover in hyper- and hypo-thyroid patients*. *Clin Sci (Lond)* 57:375-84
- Wilson JR, Fink L, Maris J, Ferraro N, Power-Vanwart J, Eleff S, Chance B** (1985) *Evaluation of energy metabolism in skeletal muscle of patients with heart failure with gated phosphorus-31 nuclear magnetic resonance*. *Circulation* 71:57-62
- Wilson JR, Mancini DM** (1990) *The mechanism of exertional fatigue in heart failure*. *Cardioscience* 1:13-7
- Wilson JR, Mancini DM, Dunkman WB** (1993a) *Exertional fatigue due to skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure*. *Circulation* 87:470-5
- Wilson JR, Martin JL, Ferraro N** (1984a) *Impaired skeletal muscle nutritive flow during exercise in patients with congestive heart failure: role of cardiac pump dysfunction as determined by the effect of dobutamine*. *Am J Cardiol* 53:1308-15
- Wilson JR, Martin JL, Schwartz D, Ferraro N** (1984b) *Exercise intolerance in patients with chronic heart failure: role of impaired nutritive flow to skeletal muscle*. *Circulation* 69:1079-87
- Wilson RF, Christensen BV, Olivari MT, Simon A, White CW, Laxson DD** (1991) *Evidence for structural sympathetic reinnervation after orthotopic cardiac transplantation in humans*. *Circulation* 83:1210-20
- Wilson RF, Laxson DD, Christensen BV, McGinn AL, Kubo SH** (1993b) *Regional differences in sympathetic reinnervation after human orthotopic cardiac transplantation*. *Circulation* 88:165-71
- Windebank AJ, Blexrud MD, de Groen PC** (1994) *Potential neurotoxicity of the solvent vehicle for cyclosporine*. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1051-6
- Winder WW, Holloszy JO** (1977) *Response of mitochondria of different types of skeletal muscle to thyrotoxicosis*. *Am J Physiol* 232:C180-4
- Winegrad S** (2000) *Myosin binding protein C, a potential regulator of cardiac contractility*. *Circ Res* 86:6-7
- Wrzosek A** (2000) *Regulation of Ca²⁺ release from internal stores in cardiac and skeletal muscles*. *Acta Biochim Pol* 47:705-23
- Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS** (2000) *MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type*. *Embo J* 19:1963-73
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM** (1999) *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. *Cell* 98:115-24
- Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T** (1992) *Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism*. *Biochim Biophys Acta* 1102:119-66

X

- Xu KY, Zweier JL, Becker LC** (1995) *Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport*. *Circ Res* 77:88-97

- Xu X, Decker W, Sampson MJ, Craigen WJ, Colombini M** (1999) *Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability.* J Membr Biol 170:89-102
- Xu X, Forbes JG, Colombini M** (2001) *Actin modulates the gating of Neurospora crassa VDAC.* J Membr Biol 180:73-81

Y

- Yano K, Zarain-Herzberg A** (1994) *Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties.* Mol Cell Biochem 135:61-70

Z

- Zerkowski HR, Khamssi M, Brodde OE** (1991) *Development of beta-adrenoceptor number and subtype distribution in the transplanted human heart.* Eur Heart J 12 Suppl F:124-6
- Zhang BW, Zimmer G, Chen J, Ladd D, Li E, Alt FW, Wiederrecht G, Cryan J, O'Neill EA, Seidman CE, Abbas AK, Seidman JG** (1996) *T cell responses in calcineurin A alpha-deficient mice.* J Exp Med 183:413-20
- Zoll J, Koulmann N, Bahi L, Ventura-Clapier R, Bigard AX** (2003) *Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity.* J Cell Physiol 194:186-93
- Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, Mettauer B** (2002) *Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle.* J Physiol 543:191-200
- Zoll J, Ventura-Clapier R, Serrurier B, Bigard AX** (2001) *Response of mitochondrial function to hypothyroidism in normal and regenerated rat skeletal muscle.* J Muscle Res Cell Motil 22:141-7