

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
EA 3072

Thèse présentée par :

Irina ENACHE

Soutenue le : 25 septembre 2012

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline: Sciences du Vivant

Domaine : Physiologie et Biologie des Organismes, Populations Interactions

**RETENTISSEMENT MUSCULAIRE CARDIAQUE ET
PERIPHERIQUE DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE
PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE CHEZ LE
RAT : DYSFONCTION MITOCHONDRIALE ET EFFET DE
L'EXERCICE EXCENTRIQUE**

THÈSE dirigée par :

Madame CHARLOUX Anne

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur DEGANO Bruno

Professeur, Université de Franche-Comté

Monsieur COSTES Frédéric

Praticien Hospitalier, CHU de Saint Etienne

Monsieur SIBILIA Jean

Professeur, Université de Strasbourg

EXAMINATEUR :

Monsieur OBERT Philippe

Professeur, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

MEMBRE INVITE :

Monsieur GENY Bernard

Professeur, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

A

M. le Professeur Bruno DEGANO,

M. le Docteur Frédéric COSTES,

M. le Professeur Jean SIBILIA,

Je vous remercie sincèrement de l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de juger ce travail.

M. le Professeur Philippe OBERT,

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Votre présence m'honore.

Mme le Professeur Anne CHARLOUX, qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse. Tes compétences scientifiques et pédagogiques, ta disponibilité et ton soutien sans faille au long des années m'ont donné confiance en moi et m'ont aidé à mener au terme ce travail. Un grand Merci...

M. le Professeur Bernard GENY, que je remercie pour ses conseils éclairés, pour m'avoir accueillie dans l'Equipe d'accueil EA 3072 et encourager lors de mes premiers pas dans la recherche chez l'animal.

M. le Professeur Fabrice Favret, que je remercie vivement pour sa disponibilité et son aide expérimenté dans ce travail, pour sa bonne humeur et l'attention portée à la conception du protocole expérimental et à l'écriture. Collaborer avec toi m'a permis d'enrichir mes compétences et de lever un peu le voile sur le « mystère » de la recherche chez l'animal.

Mme le Docteur Monique Oswald, pour ton soutien moral dans les moments difficiles, pour l'attention et la rigueur que tu as toujours porté à la correction de mon écriture scientifique, pour avoir partagé ton savoir sur la physiopathologie vasculaire pulmonaire.

Mme le Docteur Evelyne Lonsdorfer, pour ton amitié qui m'est si précieuse, pour tous les bons moments passés ensemble et tes encouragements répétés.

M. le Docteur Stéphane Doutreleau, pour avoir toujours gardé ta porte largement ouverte pour moi, pour ton enthousiasme, tes idées et ta capacité à transformer les problèmes compliqués en de plus simples et d'avoir « presque » toujours des réponses aux « pourquoi ? »

Mme le Docteur Paola Di Marco, pour tes encouragements, tes conseils et ton aide portant sur une (en fait deux) « expériences » vécues peu avant. Promis que je ne te tourne plus le dos dans notre bureau à partir d'octobre...

Messieurs François Piquard, Joffrey Zoll et Jamal Bouitbir, pour vos compétences et vos conseils, pour votre gentillesse.

Mme Anne-Laure Charles, pour ta disponibilité, ton sourire et tes conseils avisés. Tu as été très présente à mes côtés lors de mon début au laboratoire et ta patience m'a permis d'acquérir des compétences expérimentales indispensables pour l'avancement de ce travail.

Mme Laurence Rasseneur, pour son aide et son implication dans la mise en place et le déroulement du protocole d'entraînement.

Mesdames Isabelle Benz et Fabienne Goupilleau, pour votre assistance technique si précieuse, pour votre sourire et votre disponibilité

Madame le Docteur Cristina Pistea et Madame Fabienne Lebourg, pour vos encouragements, votre aide au protocole expérimental et votre présence. Ce travail est aussi le vôtre.

Messieurs les Docteurs Samy Talha et Olivier Rouyer, pour vos encouragements et vos conseils

L'ensemble du personnel du Service de Physiologie et Explorations Fonctionnelles : techniciennes, infirmières, secrétaires, pour leurs sourires de tous les jours, leur soutien, pour leur collaboration dans l'esprit d'une bonne équipe.

Messieurs les Professeurs Emmanuel Weitzenblum et Ari Chaouat, qui m'ont toujours honoré de leur confiance et m'ont initié dans les connaissances sur l'hypertension pulmonaire.

Ma famille :

Mes beaux-parents, ma grande-mère et mon père, qui m'ont soutenue, de loin ou de près, sans faille, sur le plan moral et dans la gestion du quotidien...Ce travail vous est dédié !

Va multumesc din inima pentru tot ce ati facut pentru mine in ultimii ani si va dedic aceasta teza !

Mon mari, Eduard, et mes enfants, Rares et Laura...

RESUME

CONTEXTE : La fonction du ventricule droit (VD) est un des plus importants facteurs pronostiques de la maladie et la compréhension des mécanismes cellulaires qui conduisent à sa défaillance est une priorité. Il a été montré que les anomalies du métabolisme énergétique, incluant la diminution de la production d'ATP par la mitochondrie, contribuent au développement de l'insuffisance cardiaque gauche, mais aussi probablement droite. Un des facteurs à l'origine de ces anomalies est l'altération de la biogenèse mitochondriale. Elle joue un rôle important dans l'insuffisance ventriculaire gauche, mais n'a pas été étudiée dans le contexte de l'HTAP. Elle pourrait constituer une cible thérapeutique, le but étant de préserver le potentiel contractile d'un VD hypertrophié par l'adaptation à la post-charge élevée, et éviter ou retarder la défaillance.

L'HTAP est actuellement considérée comme une maladie systémique où l'on peut notamment observer une véritable «myopathie» caractérisée par une **atteinte des muscles périphériques**. Cette atteinte contribue aux symptômes de la maladie et à la diminution de la qualité de vie des patients. Elle pourrait éventuellement s'améliorer par la pratique de l'exercice, comme c'est le cas dans d'autres pathologies chroniques. Les recommandations internationales publiées en 2009 autorisent une activité physique générant une dyspnée modérée, mais soulignent la nécessité d'études complémentaires afin d'établir les objectifs et les modalités des programmes de réentraînement. L'entraînement physique en endurance améliore les performances aérobies, notamment en modifiant le métabolisme et la morphologie des muscles squelettiques. L'exercice à la base d'un entraînement peut se réaliser en mode concentrique ou excentrique. L'exercice excentrique permet de développer la même puissance mécanique pour un moindre coût énergétique, ce qui pourrait constituer un atout pour l'entraînement des patients HTAP, en sollicitant moins leur fonction cardiaque. Mais à ce jour, la tolérance et l'absence d'effet délétère de ce type d'exercice sur les paramètres hémodynamiques et sur l'énergétique cardiaque droite n'ont pas été étudiées dans l'HTAP. L'existence d'effets bénéfiques musculaires périphériques, notamment sur la biogenèse et la fonction mitochondriale, reste également à prouver.

Questions posées : Au cours de ce travail, nous avons, dans un **premier temps**, étudié la chronologie des altérations de la respiration et de la biogenèse mitochondriale des muscles

cardiaque et squelettiques dans un modèle animal d'HTAP, induite par la monocrotaline. Dans un **second temps**, nous avons étudié le retentissement d'un entraînement en mode excentrique sur la survie, l'hémodynamique, et la biogenèse mitochondriale du muscle squelettique, dans le même modèle animal.

LES ALTERATIONS MITOCHONDRIALES SONT-ELLES PLUS PRECOCES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE QUE DANS LE MUSCLE CARDIAQUE ?

Notre hypothèse était que le VD, qui doit lutter contre des résistances vasculaires pulmonaires élevées, devait présenter des anomalies plus précoces que le muscle squelettique. Si le VD montrait des anomalies mitochondriales importantes bien avant que d'éventuelles altérations musculaires périphériques n'apparaissent, un potentiel effet délétère de l'exercice physique répété sur l'énergétique, et donc sur la fonction cardiaque droite, serait d'autant plus probable.

Nous avons observé, dans le **muscle squelettique**, une diminution précoce de **l'expression ARNm des gènes** impliqués dans la **biogenèse mitochondriale**. Aucune anomalie n'était détectée dans le VD ou le ventricule gauche (VG). Plus tard, au stade **compensé** de l'insuffisance cardiaque, une diminution de ces **ARNm** était présente tant dans le **muscle gastrocnémien** que dans le **VD**. La respiration mitochondriale, ainsi que le niveau de protéine PGC-1 α et l'activité de la citrate-synthase, restaient proches de ceux des rats témoins. En revanche, au stade **décompensé**, **l'expression des ARNm, leur traduction protéique** et la **respiration mitochondriale** étaient réduites par rapport à ceux des témoins dans le VD et le muscle squelettique. L'expression des ARNm et la respiration mitochondriale n'étaient pas modifiées de façon significative dans le VG.

L'ENTRAINEMENT EN MODE EXCENTRIQUE A-T-IL DES EFFETS DELETERES DANS L'HTAP ?

Nous nous sommes intéressés à l'effet de l'entraînement en mode excentrique sur le même modèle animal d'HTAP, le « rat monocrotaline »

La survie des animaux entraînés n'a pas été différente de celle des sédentaires. Les paramètres de remodelage et fonction du VD mesurés en échographie n'étaient pas altérés chez les animaux entraînés. La tolérance hémodynamique de cet entraînement donc a été bonne. L'entraînement a eu un bénéfice qui s'est traduit en termes d'augmentation de la vitesse maximale de course dans les deux groupes entraînés, malades et témoins. Les effets sur

l'expression des ARNm des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale ont été positifs mais modestes, dans le muscle vaste intermédiaire.

En conclusion, nous avons donc mis en évidence une atteinte précoce de la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale du muscle squelettique, plus précoce que celle qui apparaît dans le VD. Cette dernière survient au stade d'insuffisance cardiaque. La traduction protéique et fonctionnelle de ces altérations est très tardive, au stade décompensé de l'insuffisance cardiaque, tant dans le muscle squelettique que dans le VD. L'évolution néfaste rapide de ce modèle animal n'a néanmoins pas permis d'affirmer si l'altération des capacités oxydatives mitochondriales est une cause ou une conséquence de la transition de l'hypertrophie à la défaillance ventriculaire droite.

L'atteinte précoce du muscle squelettique a été attribuée à l'influence de facteurs systémiques. L'entraînement en mode excentrique pourrait améliorer les défenses de ce muscle. Nous avons montré que ce type d'entraînement a été bien toléré sur le plan hémodynamique et qu'il a amélioré la vitesse maximale de course sur tapis. Ce mode d'entraînement pourrait constituer une modalité de réhabilitation chez les patients porteurs d'hypertension pulmonaire, en améliorant la force musculaire mais avec une sollicitation cardio-respiratoire réduite.

TABLE DES MATIERES

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	12
PRINCIPALES ABREVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES	18
INTRODUCTION	20
CHAPITRE I : L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE	22
I. 1. DEFINITION ET CLASSIFICATION	22
I. 2. HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE (GROUPE 1)	23
I. 3. EVALUATION FONCTIONNELLE ET PRONOSTIQUE	25
<i>I.3.1. CLASSE FONCTIONNELLE NYHA</i>	<i>25</i>
<i>I.3.2. TESTS D'EXERCICE</i>	<i>26</i>
<i>I.3.3. L'ECHOCARDIOGRAPHIE</i>	<i>27</i>
<i>I.3.4. CATHETERISME CARDIAQUE DROIT</i>	<i>28</i>
CHAPITRE II : MODIFICATIONS DES MUSCLES CARDIAQUE ET SQUELETTIQUES DANS L'HTAP	30
II.1. LE VENTRICULE DROIT	30
<i>II.1.1. L'HYPERTROPHIE DU VENTRICULE DROIT</i>	<i>31</i>
<i>II.1.2. LA TRANSITION DE L'HYPERTROPHIE VERS LA DILATATION ET LA DEFFAILLANCE DU VENTRICULE DROIT</i>	<i>32</i>
II.2. LES MUSCLES PERIPHERIQUES	39
<i>II.2.1. ALTERATIONS MUSCULAIRES DANS L'HTAP CHEZ L'HOMME</i>	<i>39</i>
<i>II.2.1.1. Fonction musculaire</i>	<i>39</i>
<i>II.2.1.2. Modifications de la cellule musculaire</i>	<i>41</i>
<i>II.2.2. ALTERATIONS MUSCULAIRES DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE GAUCHE CHEZ L'HOMME</i>	<i>42</i>
<i>II.2.3. ETUDES EXPERIMENTALES DES MUSCLES PERIPHERIQUES DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE</i>	<i>47</i>
CHAPITRE III : LA MITOCHONDRIE	51
III.1. STRUCTURE	51
III.2. DISTRIBUTION ET FONCTION DE LA MITOCHONDRIE	53
III.3. BIOGENESE MITOCHONDRIALE	56

<i>III.3.1. FACTEURS IMPLIQUES DANS LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE</i>	58
<i>III.3.2. BIOGENESE MITOCHONDRIALE ET REPONSE A L'EXERCICE</i>	61
<i>III.3.3. BIOGENESE MITOCHONDRIALE ET INSUFFISANCE CARDIAQUE</i>	63
CHAPITRE IV : PLACE ET PROPRIETES DE L'EXERCICE EXCENTRIQUE	65
IV.1. PROPRIETES DU REGIME DE CONTRACTION EXCENTRIQUE	67
<i>IV.1.1. PARTICULARITES PAR RAPPORT AU REGIME CONCENTRIQUE</i>	67
<i>IV.1.2. PRODUCTION DE FORCE</i>	68
<i>IV.1.3. FAIBLE COUT METABOLIQUE</i>	70
<i>IV.1.4. SPECIFICITE CARDIOVASCULAIRE DE L'EXERCICE EXCENTRIQUE</i>	72
<i>IV.1.5. DOMMAGES MUSCULAIRES</i>	73
IV.2. ADAPTATIONS MUSCULAIRES INDUITES PAR L'EXERCICE EXCENTRIQUE	
CHRONIQUE	77
<i>IV. 2. 1. EFFETS DE LA REPETITION DES SESSIONS</i>	77
<i>IV. 2. 2. AMELIORATION DE LA FORCE</i>	79
<i>IV. 2. 3. MODIFICATIONS DES STRUCTURES MUSCULAIRES</i>	79
IV.3. INTERET ET PLACE DE L'EXERCICE EXCENTRIQUE DANS LA	
READAPTATION A L'EFFORT	81
PROBLEMATIQUE	84
MATERIEL ET METHODES	88
<u>1^{ERE} ETUDE</u>: L'ALTERATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE	
PRECEDE CELLE DU VENTRICULE DROIT DANS L'HYPERTENSION	
PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE	89
<i>I.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL</i>	89
<i>I.2. PRELEVEMENTS MUSCULAIRES</i>	89
<i>I.3. PROTOCOLES D'ETUDE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE SUR FIBRES</i>	
<i>PERMEABILISEES</i>	90
<i>I.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA CITRATE-SYNTHASE</i>	90
<i>I.5. DOSAGE DE LA PROTEINE PGC-1α</i>	91
<i>I.6. q-RT-PCR QUANTITATIVE</i>	91
<u>2^{EME} ETUDE</u>: EFFETS DE L'ENTRAINEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE	
SUR LA TOLERANCE HEMODYNAMIQUE, LA SURVIE ET LA BIOGENESE	
MITOCHONDRIALE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA	
MONOCROTALINE	92

<i>II.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL</i>	92
<i>II.2. EPREUVE D'EFFORT INCREMENTALE</i>	93
<i>II.3. ENTRAINEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE</i>	93
<i>II.4. ECHOGRAPHIE CARDIAQUE</i>	94
<i>II.5. CATHETERISME CARDIAQUE DROIT ET GAUCHE</i>	95
<i>II.6. DOSAGE DE LA CREATINE KINASE</i>	96
<i>II.7. PRELEVEMENTS MUSCULAIRES</i>	96
<i>II.8. MESURE DE LA TAILLE DES FIBRES MUSCULAIRES</i>	97
ANALYSE STATISTIQUE	97
RESULTATS	98
<u>1^{ERE} ETUDE</u> : L'ALTERATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE PRECEDE CELLE DU VENTRICULE DROIT DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE	99
<i>I.1. PRESENTATION</i>	99
<i>I.2. RESULTATS</i>	99
<i>Skeletal muscle mitochondrial dysfunction precedes right ventricular impairment in experimental pulmonary hypertension</i>	100
<u>2^{EME} ETUDE</u> : EFFETS DE L'ENTRAINEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE SUR LA TOLERANCE HEMODYNAMIQUE, LA SURVIE ET LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE	
<i>II.1. PRESENTATION</i>	123
<i>II.2. RESULTATS</i>	123
DISCUSSION	
<u>1^{ERE} ETUDE</u> : L'ALTERATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE PRECEDE CELLE DU VENTRICULE DROIT DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE	140
<u>2^{EME} ETUDE</u> : EFFETS DE L'ENTRAINEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE SUR LA TOLERANCE HEMODYNAMIQUE, LA SURVIE ET LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE	145
<i>II.1. CHOIX DU MODELE</i>	145
<i>II.2. EVOLUTION DES PARAMETRES HEMODYNAMIQUES</i>	146

<i>II.3. CHOIX DU PROTOCOLE D'ENTRAINEMENT</i>	146
<i>II.4. EFFETS DE L'ENTRAINEMENT</i>	147
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	152
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXE 1	178
ANNEXE 2	182

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS FAISANT L'OBJET DE CETTE THESE

1. *Skeletal muscle mitochondrial dysfunction precedes right ventricular impairment in experimental pulmonary hypertension.* Enache I, Charles AL, Bouitbir J, Favret F, Zoll J, Oswald-Mammosser M, Geny B, Charloux A (en révision à *Mol Cell Biochem*)
2. *Effects of eccentric exercise training on cardiac function and peripheral muscle in monocrotaline rats.* Enache I, Favret F, Charles AL, Doutreleau S, Di Marco P, Pistea C, Geny B, Charloux A (en préparation)

COMMUNICATIONS ORALES

1. *Time trends in mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in cardiac and skeletal muscles of rats with pulmonary hypertension.* Enache I, Charles AL, Bouitbir J, Zoll J, Piquard F, Oswald-Mammosser M, Geny B, Charloux A. Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique P2T, Grenoble, mars 2011.
2. *Feasibility of eccentric exercise training in monocrotaline rats: effects on survival, echocardiographic and hemodynamic parameters.* Enache I, Favret F, Doutreleau S, Di Marco P, Charloux A. European Respiratory Society Annual Congress, Vienna 2012, 1-5 September. Poster session.

AUTRES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Chaouat A., Canuet M., Kraemer JP., **Enache I.**, Ducolone A., Kessler R., Weitzenblum E. *Physiological functional tests to evaluate pulmonary arterial hypertension.* Rev Mal Respir . 2005 Dec ; 22(6Pt 1):991-7
2. Chaouat A., Bugnet AS., Kadaoui N., Schott R., **Enache I.**, Ducolone A., Ehrhart M., Kessler R., Weitzenblum E. *Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med. 2005 Jul 15;172(2):189-94
3. Charloux A., **Enache I.**, Richard R., Oswald-Mammosser M., Lonsdorfer-Wolf E., Piquard F., Geny B. *Diffusing capacity of the lung for CO and pulmonary blood flow during incremental and intermittent exercise.* Scand J Med Sci Sports 2009 Apr13
4. Oswald-Mammosser M., Charloux A., **Enache I.**, Lonsdorfer-Wolf E., Geny B. *A comparison of four algorithms for the measurement of interrupter respiratory resistance in adults.* Respir Med. 2009 May;103(5):729-35. Epub 2008 Dec 30
5. Goette-Di Marco P., Talha S., **Enache I.**, Weiller MA., Charloux A., Massard G., Kessler R., Piquard F., Geny B. *Endocrine heart after lung transplantation: increased brain natriuretic peptide is related to right ventricular function.* Transpl Int. 2010 Jul;23(7):728-35. Epub 2010 Jan 22.
6. **Enache I.**, Oswald-Mammosser M., Scarfone S., Simon C., Schlienger JL, Geny B., and Charloux A. *Impact of altered alveolar volume on DLCO in obesity.* Respiration, 2010 May 6.
7. Oswald-Mammosser M., Charloux A., **Enache I.**, Lonsdorfer-Wolf E. *The opening interrupter technique for respiratory resistance measurements in children.* Respirology, 2010 Oct;15(7):1104-10.
8. Talha S., Charloux A., **Enache I.**, Piquard F., Geny B. *Mechanisms involved in increased plasma brain natriuretic peptide after heart transplantation.* Cardiovasc Res. 2011 Feb 1;89(2):273-81. Epub 2010 Oct 20.
9. Charles AL., Guilbert AS., Bouitbir J., Goette-Di Marco P., **Enache I.**, Zoll J., Piquard F., Geny B. *Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping.* Br J Surg. 2011 Jan 24. doi: 10.1002/bjs.7384.
10. Echaniz-Laguna A., Pisteu C., Philippi N., **Enache I.**, Oswald-Mammosser M., De Sèze J., Charloux A. *Asthma as a cause of persistent dyspnea in treated myasthenia gravis patients.* European Neurology, accepté

11. **Enache I.**, Noel G., Jeung MY., Meyer N., Oswald-Mammosser M., Urban-Kraemer E., Schumacher C., Geny B., Quoix E., Charloux A. *Can FeNO predict radiotherapy-induced lung toxicity in lung cancer patients.* Radiation Oncology, accepté
12. **Enache I.**, Noel G., Jeung MY., Meyer N., Oswald-Mammosser M., Pisteu C., Jung GM, Mennecier B., Quoix E., Charloux A., *Impact of 3D conformal radiotherapy on lung function of patients with lung cancer: a prospective stud.* Respiration (en révision)

PRINCIPALES ABREVIATIONS

Acétyl CoA	acétyl coenzyme A
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNmt	acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADP	adénosine-5'-diphosphate
Akt	protéine kinase B
ALK	<i>activine-like-receptor-type I</i>
AMPK	protéine kinase activée par l'AMP
ANT	transporteur des nucléotides adényliques
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine-5'-triphosphate
bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2 gene</i>
BMPR 2	<i>Bone morphogenetic protein receptor type II</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
BSA	albumine de sérum bovin
Ca²⁺	ion calcium
CaMK	calcium-calmoduline kinase II
CK	créatine kinase
COX 1	cytochrome c oxydase
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
DOMS	<i>delayed onset muscular soreness</i>
EIM	espace inter-membranaire
FADH₂/FAD⁺	flavine adénine dinucléotide réduite/oxydée
FC	fréquence cardiaque
GAS	muscle gastrocnémien
GH	hormone de croissance
HP	hypertension pulmonaire
HSF 1	<i>heat shock factor</i>
HTAP	hypertension artérielle pulmonaire
HTP	hypertension pulmonaire secondaire

IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
LDH	lactate déshydrogénase
MEC	matrice extracellulaire
MEF 2	<i>myocyte enhancer factor-2</i>
mi-CK	créatine kinase mitochondriale
Mn-SOD	superoxyde dismutase associée au manganèse
MPTP	pore de transition de perméabilité mitochondrial
MT	Monocrotaline
NADH, H⁺/NAD⁺	nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé
NADPH, H⁺/NADP⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé
NFκB	facteur nucléaire kappa B
NRF	nuclear respiratory factor
PAPm	pression artérielle pulmonaire moyenne
Pcap	pression capillaire pulmonaire
PCR	polymerase chain reaction
PCr	Phosphocreatine
PDH	pyruvate déshydrogénase
PDK	pyruvate déshydrogénase kinase
PGC-1α	<i>peroxisome proliferator –activated receptor gamma co-activator</i>
Pi	phosphate inorganique
POD	pression dans l'oreillette droite
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
p38MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
mPTP	pore de transition de perméabilité mitochondrial
Q	débit cardiaque
NRF	<i>nuclear respiratory factor</i>
NYHA	New York Heart Association
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ou espèces réactives oxygénées
RVP	résistances vasculaires pulmonaires
SIRT1	sirtuin 1
SOD1	superoxyde dismutase 1
SOD2	superoxyde dismutase 2
SvO2	saturation en oxygène du sang veineux

TAPSE	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TFAm	<i>mitochondrial transcription factor A</i>
TM6	Test de marche de 6 minutes
TMPD	N, N, N', N' tétraméthyl-1,4-phenylènediamine
TnC	troponine C
TNF-α	facteur de nécrose tumorale α
TnI	troponine I
TnT	troponine T
tRNA	ARN de transfert
UCP	protéine découplante (UnCoupling Protein)
VD	ventricule droit
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VDAC	canaux ioniques voltage-dépendants
VG	ventricule gauche
VDAC	voltage dependant anion channel
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VO₂	débit d'oxygène consommé
VE/VCO₂	équivalent respiratoire en dioxyde de carbone

LISTES DES FIGURES

- Figure 1** : La configuration du VD chez le sujet sain et dans l'HTAP
- Figure 2** : Mécanismes cellulaires et moléculaires supposés impliqués dans la transition vers la défaillance ventriculaire droite dans l'HTAP
- Figure 3** : La biogénèse mitochondriale dans le myocarde normal, hypertrophié ou défaillant
- Figure 4** : Plante de *Crotalaria spectabilis* (gauche). La monocrotaline induit chez le rat une hypertrophie de média et une infiltration de cellules mononucléaire par rapport au rat sain
- Figure 5** : Structure d'une mitochondrie
- Figure 6** : Cycle du Krebs
- Figure 7** : Chaîne de transport des électrons
- Figure 8** : PGC-1 α et son implication dans la biogénèse et la fonction mitochondriale
- Figure 9** : Facteurs induisant la biogénèse mitochondriale à l'exercice
- Figure 10** : Aspect strié du muscle squelettique
- Figure 11** : Contractions concentrique et excentrique
- Figure 12** : Représentation schématique du comportement du muscle lors du cycle "étirement-détente"
- Figure 13** : Signaux électromyographiques de surface
- Figure 14** : Consommation d'oxygène (VO₂) pendant 2min en condition basale à 15W puis pendant 6 min à haute intensité (HC-330W), moyenne intensité (MC-216W) et basse intensité (LC-70W) en mode concentrique, et à haute intensité en mode excentrique (HE-330W)
- Figure 15** : Fibre musculaire photographiée en microscopie électronique
- Figure 16** : Relation tension-longueur
- Figure 17** : Relation entre ROS et dommage musculaire
- Figure 18** : Protocole expérimental
- Figure 19** : Tapis roulant à 5 couloirs
- Figure 20** : Tapis roulant en mode concentrique pente (+15°) et excentrique (pente -15°)
- Figure 21** : Courbe de Kaplan-Meyer, qui montre l'effet de la monocrotaline et de l'entraînement sur la survie des animaux pendant les 6 semaines d'observation
- Figure 22** : **A.** Evolution du poids exprimé en pourcentage de la valeur initiale au moment de l'injection. **B.** V_{max} déterminées avant (2w) et lors de l'entraînement (4w et 6w)
- Figure 23** : Evolution de la créatine-kinase
- Figure 24** : La fréquence cardiaque mesurée en échographie à la 2^{ème}, la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine après l'injection
- Figure 25** : Le Tac, l'épaisseur de la paroi libre du VD, le rapport VD/VG et le diamètre télédiastolique du VD mesurés à la 2^{ème}, la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine après l'injection.....
- Figure 26** : Le TAPSE mesuré à la 2^{ème}, la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine après l'injection
- Figure 27** : Le débit cardiaque normalisé par le poids, le volume d'éjection, l'épaisseur de la paroi libre et l'épaisseur du septum
- Figure 28** : Les pressions systoliques ventriculaires droites mesurées lors du cathétérisme cardiaque
- Figure 29** : Le niveau d'expression des ARNm de SIRT1, PGC-1 α , NRF1 et

TFAm dans le muscle vaste intermédiaire

Figure 30 : Le niveau d'expression des ARNm de la citrate-synthase dans le muscle vaste intermédiaire

Figure 31 : Le niveau d'expression des ARNm de SIRT1, PGC-1 α , NRF1 et TFAm dans le muscle gastrocnémien

Figure 32 : Le niveau d'expression des ARNm de la citrate-synthase dans le muscle gastrocnémien

Figure 33 : Le niveau d'expression des ARNm de SIRT1, PGC-1 α , NRF1 et TFAm dans le VD

Figure 34 : Le niveau d'expression des ARNm de la citrate-synthase dans le VD

Figure 35 : Technique de la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées

Figure 36 : Etude de la respiration mitochondriale complexe par complexe

INTRODUCTION

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est définie par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg associée à une pression capillaire pulmonaire normale ($P_{cap} \leq 15$ mmHg). Cette augmentation de la PAPm est secondaire à plusieurs mécanismes associant à des degrés variables une vasoconstriction, un remodelage prolifératif de toutes les couches de la paroi vasculaire et une oblitération thrombotique des artères pulmonaires de petit calibre (1, 2).

L'HTAP est une maladie orpheline, ce qui justifie sa prise en charge dans des centres de compétence qui disposent d'équipes pluridisciplinaires et de ressources optimales. En France, le réseau national a été mis en place en 2000, à l'initiative du Centre de Référence pour l'Hypertension Artérielle Pulmonaire de l'Hôpital Antoine Bécclère de Clamart et compte actuellement 26 centres dont Strasbourg. Selon le registre national français ouvert en 2002, la prévalence de la maladie est de 15 cas par million d'habitants, établie sur une étude multicentrique regroupant 674 cas d'hypertension pulmonaire. La prévalence est de 5,9 cas par million d'habitants pour la forme idiopathique (3). L'âge, similaire pour les 2 sexes, est de 50 +/- 15 ans, mais 9,1% des patients avaient plus de 70 ans au moment de diagnostic. Ce sont donc des patients relativement jeunes, mais chez qui le diagnostic est la plupart du temps tardif puisque dans cette même étude 75% des cas étaient en classe fonctionnelle III ou IV (New York Heart Association, NYHA) au moment du diagnostic. La survie des patients souffrants d'HTAP a beaucoup augmenté durant les dernières décennies grâce au développement de plusieurs classes de molécules thérapeutiques dont les prostacyclines (époprostenol, treprostinil et iloprost), les antagonistes des récepteurs de l'endothéline (bosentan et ambrisentan) et les inhibiteurs de phosphodiesterase V (sildenafil et tadalafil). L'HTAP reste pourtant une maladie grave et progressive, incurable, dont la survie est de seulement 50% à 5 ans. Le principal symptôme est l'intolérance à l'effort, sous la forme de dyspnée et/ou de fatigue musculaire. Le principal déterminant de la survie est la fonction ventriculaire droite, mais les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant la transition vers la défaillance cardiaque droite sont peu connus.

L'altération du métabolisme énergétique joue un rôle important dans cette évolution. Cela a été montré dans de nombreuses études sur l'insuffisance cardiaque gauche. Il existe beaucoup moins d'études sur l'insuffisance cardiaque droite. Néanmoins, elles montrent que l'altération du métabolisme énergétique est impliquée dans la dysfonction contractile du ventricule droit

(VD), du muscle squelettique et en diminue la résistance à la fatigue. Encore moins d'études se sont intéressées au métabolisme énergétique du VD lors de la transition vers la décompensation alors qu'il s'agit probablement d'un tournant majeur conduisant à sa défaillance irréversible. Les thérapies ciblées sur la fonction du VD pourront peut-être offrir aux patients HTAP une longévité accrue et une meilleure qualité de vie, comme cela fût le cas lors de l'introduction des traitements d'épargne énergétique comme les bêtabloquants ou les inhibiteurs d'enzyme de conversion dans l'insuffisance cardiaque gauche. Parallèlement, la myopathie décrite dans l'HTAP, qui touche les muscles respiratoires comme les muscles périphériques, pourrait peut-être bénéficier de l'effet d'un entraînement adapté afin d'améliorer la dyspnée et la résistance à la fatigue à plus long terme. Le rapport bénéfice/risque du réentraînement à l'effort est encore très débattu dans cette pathologie.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes proposé d'étudier, dans un modèle animal (rat) d'HTAP induite par la monocrotaline, les conséquences de cette pathologie sur la mitochondrie musculaire, principale usine énergétique de la cellule. La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude chronologique des modifications du fonctionnement mitochondrial dans les ventricules droit et gauche et dans certains muscles squelettiques. Dans une seconde partie, je me suis intéressée aux effets de l'entraînement en mode excentrique sur la survie, l'évolution hémodynamique et les capacités à l'effort des rats porteurs d'une hypertension pulmonaire stable.

Afin d'introduire ces études, nous avons consacré un premier chapitre à l'hypertension artérielle pulmonaire et son impact clinique. Le second chapitre mettra l'accent sur les conséquences de l'hypertension pulmonaire sur les propriétés du muscle strié, cardiaque et squelettique tandis que le troisième chapitre présentera de brefs rappels sur la structure, la fonction et la biogenèse mitochondriale. Enfin, un dernier et quatrième chapitre présentera les particularités et l'intérêt de l'exercice en mode excentrique.

Notre équipe EA 3072 ayant depuis plusieurs années comme une des thématiques principales la mitochondrie et l'exercice, je remercie ma collègue Marie-Eve Isner de m'avoir autorisé à reproduire une partie des rappels de sa thèse concernant ces deux sujets.

CHAPITRE I : L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE

I.1. DEFINITION ET CLASSIFICATION

L'hypertension pulmonaire (HP) est définie par une augmentation permanente de la pression artérielle pulmonaire moyenne au-delà de la limite supérieure de la normale, par consensus établie à 25 mmHg au repos. La pression pulmonaire moyenne normale est située entre 10 et 15 mmHg et des valeurs supérieures à 20 mmHg sont anormales. Les patients ayant des valeurs comprises entre 20 et 25 mmHg doivent faire l'objet d'études cliniques en tenant compte aussi de l'âge, afin d'établir la valeur pronostique et physiopathologique de ces pressions intermédiaires.

L'hypertension pulmonaire apparaît dans différentes situations pathologiques et est associée à une palette d'anomalies histologiques. En raison de cette diversité, l'HP est classée actuellement en 6 groupes (*Dana Point, 2008*) définis d'après des caractéristiques communes d'ordre clinique, de réponse au traitement et sur de potentiels mécanismes étiologiques. L'inclusion correcte d'un patient dans une de ces 6 catégories est importante car cela a des implications thérapeutiques et pronostiques. De plus, les différences histologiques et de localisation des lésions au niveau de l'arbre vasculaire pulmonaire sous-tendent des mécanismes pathogéniques différents qui pourraient permettre de mettre au point des thérapies spécifiques efficaces.

Les différents groupes, sont résumés dans le tableau 1. Je n'apporte des précisions que sur le groupe 1 qui comprend plusieurs affections conduisant à une *Hypertension artérielle pulmonaire* (HTAP). Les patients atteints ont des réponses quasi-similaires aux traitements disponibles : antagonistes des récepteurs à l'endothéline, inhibiteurs de phosphodiésterases de type V et prostanoides.

Les maladies regroupées sous le terme d'HTAP sont séparées en quatre principaux sous-groupes :

- 1) les *HTAP idiopathiques*, définies par la survenue de la maladie en l'absence d'une affection associée décelable,
- 2) les *HTAP hérissables* (présentant une mutation génétique connue),
- 3) les *HTAP associées à la consommation de toxiques ou prise d'anorexigènes* et
- 4) l'*HTAP associée à diverses pathologies (connectivites, infection par le VIH, hypertension portale, cardiopathie congénitale, schistosomiase, anémie hémolytique chronique)*.

Le **groupe 1'** comprend la maladie véno-occlusive et l'hémangiomatose capillaire pulmonaire qui sont caractérisées par une atteinte veineuse et capillaire prédominante, et par un risque d'œdème pulmonaire en réponse à un traitement spécifique de l'HTAP. Pour ces raisons, mais en tenant également compte de la similitude clinique avec l'HTAP idiopathique, ces deux entités ont été incluses dans un groupe 1'.

Par définition, les hypertensions pulmonaires «secondaires» (HTP) à une cause bien identifiée n'appartiennent pas au groupe des HTAP proprement dites. Elles peuvent souvent, mais pas toujours, bénéficier d'un traitement spécifique: maladie thromboembolique chronique, insuffisance cardiaque gauche (HTP post-capillaire), pathologies respiratoires chroniques (HTP hypoxique). Le groupe 5 comprend des causes rares d'HP, mais actuellement bien individualisées (sarcoïdose, histiocytose, splénectomie, syndromes myélo-prolifératifs ou métaboliques).

I.2. HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE (GROUPE 1)

L'hypertension artérielle pulmonaire est caractérisée par un remodelage des petites artérioles (<500µm). La prolifération des cellules endothéliales et musculaires lisses conduisent à une hypertrophie de média et de l'intima, les zones de fibrose intimale et les thromboses organisées et recanalisées sont associées dans ce qu'on appelle l'artériopathie pléxiforme, caractéristique d'HTAP. La conséquence est une augmentation progressive des résistances vasculaires et de la pression artérielle pulmonaire, donc de la post-charge ventriculaire droite, qui conduit à plus ou moins long terme à une défaillance ventriculaire droite et au décès. Néanmoins, de remarquables progrès concernant la physiopathologie, le management et les traitements spécifiques ont été réalisés lors de la dernière décennie, qui ont contribué à la réduction de la morbidité et à l'amélioration de la survie des patients.

Un sous-groupe homogène qui a été largement étudié ces dernières années est celui des *HTAP idiopathiques, héritables et induites par la prise d'anorexigènes*. La survie des patients avec une HTAP idiopathique ou familiale observée dans les années 1980 d'après le registre américain était, en l'absence de tout traitement spécifique, de 68% et 48% à 1 et 3 ans respectivement (survie médiane de 2,8 ans). Les données épidémiologiques du registre français d'HTAP (2002-2003) publiées en 2010 (4) font état dans ce groupe d'une survie des cas prévalents (diagnostic réalisé dans les 3 ans précédant l'inclusion, avec une moyenne de 1,6 ans) de 89%, 77% et 69% à 1-, 2- et 3 ans respectivement.

Tableau 1 : Classification clinique des hypertensions pulmonaires (Dana Point 2008)

- 1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)**
 - 1.1 HTAP idiopathique (ex primitive)
 - 1.2 HTAP héritable : BMPR2, ALK1, endogline (avec ou sans maladie de Rendu-Osler), non connu
 - 1.3 HTAP induite par la prise de médicaments et de toxiques
 - 1.4 HTAP associée à :
 - une connectivite
 - une infection par le VIH
 - une hypertension portale
 - une cardiopathie congénitale
 - une schistosomiase
 - une anémie hémolytique chronique
 - 1.5 Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né
- 1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire**
- 2. Hypertension pulmonaire due aux cardiopathies gauches**
 - 2.1 Dysfonction systolique
 - 2.2 Dysfonction diastolique
 - 2.3 Valvulopathie
- 3. Hypertension pulmonaire due aux maladies respiratoires et/ou à l'hypoxie**
 - 3.1 BPCO
 - 3.2 Pathologie interstitielle pulmonaire
 - 3.3 Autres maladies pulmonaires restrictives et/ou obstructives
 - 3.4 Troubles ventilatoires du sommeil
 - 3.5 Syndrome d'hypoventilation alvéolaire
 - 3.6 Exposition chronique à la haute altitude
 - 3.7 Anomalies du développement
- 4. Hypertension pulmonaire de la maladie thromboembolique chronique chronique**
- 5. Hypertension pulmonaire de mécanisme non clair ou multifactoriel**
 - 5.1 Troubles hématologiques : troubles myéloprolifératifs, splénectomie
 - 5.2 Troubles systémiques : sarcoïdose, histiocytose X pulmonaire, lymphangiomeiomyomatose, neurofibromatose, vascularites
 - 5.3 Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, troubles thyroïdiens.
 - 5.4 Autres : obstruction tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique dialysée

Par contre les cas incidents (diagnostic réalisé lors de la période d'inclusion) avaient une survie à 1-, 2- et 3 ans de 89%, 68% et 55%. L'HTAP reste donc une maladie dévastatrice, avec des symptômes conduisant à un handicap fonctionnel important et au décès relativement rapide.

L'insuffisance ventriculaire droite est la principale cause de décès chez ces patients et la capacité du ventricule droit (VD) à s'adapter à l'augmentation progressive des résistances vasculaires qui fait suite au remodelage des artérioles pulmonaires représente le principal facteur pronostic fonctionnel et de survie (5).

I. 3. EVALUATIONS FONCTIONNELLE ET PRONOSTIQUE

La suspicion d'HTAP doit conduire à une série d'investigations qui permettront de confirmer le diagnostic, de préciser l'étiologie, d'évaluer la gravité de l'atteinte fonctionnelle et hémodynamique et donc de choisir la meilleure option thérapeutique, de suivre la réponse au traitement et d'établir, dans la mesure du possible, le pronostic à long terme.

I.3.1. CLASSE FONCTIONNELLE NYHA

La classe fonctionnelle NYHA permet de stratifier les symptômes en fonction de la sévérité (dyspnée, fatigue, douleurs thoraciques, syncopes) par rapport à l'activité physique quotidienne. Les signes cliniques d'insuffisance cardiaque droite et leur aggravation, ainsi que l'apparition des syncopes sont considérés comme des facteurs pronostiques de l'HTAP. La classe NYHA est utilisée et validée comme facteur prédictif d'évolution, tant avant qu'après l'introduction d'une thérapie spécifique. Les récentes recommandations internationales considèrent d'ailleurs la classe NYHA comme un des indicateurs-clés dans le suivi des patients atteints d'HTAP (1, 6). Néanmoins, il faut tenir compte du caractère subjectif de la classe NYHA qui est donc sujet à une sous- ou surestimation en raison de la différence de perception des symptômes d'un patient à l'autre et même d'un clinicien à l'autre. Les comorbidités comme l'obésité, l'âge, les affections musculo-squelettiques peuvent être des facteurs confondants et, par leurs propres symptômes, limiter les activités quotidiennes des patients. De plus, ce qui est particulier dans l'HTAP est qu'une classe fonctionnelle I ou II de la NYHA n'est pas toujours associée à une hémodynamique satisfaisante, surtout chez les jeunes patients qui sont à risque d'évolution rapidement défavorable (7, 8). En conclusion, malgré sa valeur pronostique, la seule classe fonctionnelle NYHA n'est pas suffisante pour déterminer le pronostic et d'autres paramètres sont nécessaires.

I.3.2. TESTS D'EXERCICE

L'exploration à l'exercice peut apporter des informations majeures à la fois sur les plans diagnostique et pronostique. Il peut s'agir soit d'un test de marche de 6 minutes (TM6), soit d'une épreuve d'exercice incrémentale maximale avec mesure des échanges gazeux et de la consommation maximale en oxygène (VO_{2max}).

Le **test de marche de 6 minutes (TM6)** est un test sous-maximal facile à réaliser, reproductible, de faible coût et représentatif de la vie quotidienne (9). La distance parcourue au TM6 est un bon facteur pronostique (4) et elle est directement proportionnelle au débit cardiaque, et inversement proportionnelle aux résistances vasculaires pulmonaires (10) et à la classe fonctionnelle NYHA.

La valeur absolue de cette distance, plutôt que la différence par rapport à la valeur précédente, a une valeur prédictive après le début d'un traitement spécifique (10-12). Cela explique que dans les recommandations actuelles une distance parcourue >500m doit constituer l'objectif thérapeutique, alors qu'une valeur <300m doit conduire à une escalade thérapeutique. Toutefois, la distance parcourue au test de marche de 6 minutes ne dépend pas seulement de la fonction cardiaque, mais également de facteurs comme la motivation, la fatigue musculaire, d'éventuelles co-morbidités, l'âge, le poids et la taille.

Chez des patients avec une HTAP sévère, l'entraînement à l'effort strictement surveillé améliore de façon spectaculaire de la distance au TM6 (+111m), sans modification des paramètres hémodynamiques de fonction ventriculaire droite (13). Par contre, l'amélioration hémodynamique sous traitement ne s'accompagne pas systématiquement d'une amélioration significative de la distance parcourue au TM6 si cette dernière était > 450 m au départ (14). Il semble donc bien exister une dissociation entre les paramètres hémodynamiques centraux de repos et la capacité fonctionnelle mesurée sur le TM6.

Le test d'effort cardio-respiratoire est moins utilisé que le TM6 en raison de certains facteurs limitant sa reproductibilité comme les comorbidités et la motivation des patients, surtout dans les stades avancés d'HTAP. Aussi, l'équipement requis et l'expérience nécessaire du personnel médical et technique font que ces tests sont beaucoup plus difficiles à réaliser que le TM6.

Néanmoins, le test d'effort permet de mettre en évidence plus facilement des améliorations cliniques car c'est un test maximal, surtout chez les patients ayant une relativement bonne capacité d'exercice de base, chez qui le TM6 peut plafonner. Le paramètre le plus étudié est la

valeur maximale de VO_2 calculée lors de ce test (VO_{2pic}). Dans les recommandations actuelles, une valeur de la VO_{2pic} supérieure à 15ml/mn/kg est associée à un bon pronostic, alors qu'une valeur < 12 ml/mn/kg est de plus mauvais pronostic (1). Dans une étude sur 86 patients dont 70 ont été aptes à réaliser un test d'effort incrémental, l'association d'une VO_{2pic} < 10,4 ml/kg/min avec une pression systolique systémique au pic de l'exercice < 120 mmHg constituait un indice de survie très limitée (23%) à 12 mois (15). A côté du pic de VO_2 , d'autres paramètres apportent une information pronostique sur la survie et le temps avant la détérioration clinique. L'équivalent ventilatoire pour le dioxyde de carbone (VE/VCO_2) au premier seuil ventilatoire (valeur seuil de 54) est corrélé à la classe NYHA (16) et constitue un facteur pronostique indépendant de survie (17).

I.3.3. L'ECHOCARDIOGRAPHIE

L'échocardiographie est la méthode non invasive utilisée en routine pour le dépistage et le suivi de l'HTAP. Elle permet d'accéder à des informations à la fois sur l'anatomie et la fonction du cœur droit, mais aussi à des paramètres hémodynamiques. De nombreuses études ont montré que certains paramètres échographiques en rapport avec la fonction du VD ont une valeur pronostique. Parmi ceux-ci, citons la présence d'un épanchement péricardique qui est liée à la perturbation du drainage veineux et lymphatique du myocarde due à l'augmentation de la pression dans l'oreillette droite (POD), reflet de la dysfonction diastolique du VD (18, 19). Il a été aussi montré que la valeur du TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*), indice de fonction systolique du ventricule droit, est corrélée à la fraction d'éjection du VD (20-22) et qu'en dessous du seuil de 1,8 cm la dysfonction systolique mais aussi diastolique du VD est importante et associée à un index cardiaque et une survie abaissés (22). Ces deux indices, le TAPSE et la présence d'un épanchement péricardique, sont faciles à déterminer et font donc partie du bilan d'évaluation des patients HTAP, d'après les recommandations internationales.

L'indice de Tei (valeur normale de $0,28 \pm 0,04$) est un autre indicateur de dysfonction ventriculaire droite (23, 24), qui intègre des paramètres à la fois systoliques et diastoliques du VD. L'augmentation de cet indice est corrélée à l'aggravation clinique. Parmi les autres paramètres échographiques ayant une valeur pronostique on peut citer le diamètre et l'épaisseur de la paroi libre du VD (25), l'index d'excentricité du VG (18) et, chez les enfants souffrant d'HTAP, le rapport entre la durée de la systole et la diastole du VD (26).

Malgré son importance dans le dépistage et le suivi des patients et sa large disponibilité, l'échocardiographie a ses limites techniques et est opérateur-dépendante. Au niveau

individuel, cette exploration sous-estime parfois les pressions surtout en présence d'une fuite tricuspидienne importante (27). De plus la pression pulmonaire systolique n'est pas un facteur prédictif de survie.

Récemment il a été montré chez les patients traités par thérapies spécifiques, que la fraction d'éjection du VD mesurée en **IRM** est mieux corrélée au pronostic que les résistances vasculaires pulmonaires. 25% des patients étudiés, malgré la diminution des résistances vasculaires, ont évolué vers une détérioration de la fonction du VD et un mauvais pronostic (28). Cette étude souligne l'importance de la compréhension des mécanismes conduisant à la défaillance ventriculaire droite.

I.3.4. CATHETERISME CARDIAQUE DROIT

Du fait des limites actuelles de l'exploration échographique du cœur droit, l'exploration hémodynamique représente le *gold standard* pour le diagnostic d'HTAP, pour le suivi après l'initiation du traitement spécifique et en cas d'aggravation clinique, avant tout changement thérapeutique. Selon les recommandations des sociétés européennes de cardiologie et pneumologie (ESC/ERS), le cathétérisme cardiaque doit impérativement être réalisé lors du bilan initial d'hypertension pulmonaire, devant une suspicion échocardiographique d'hypertension pulmonaire (vitesse du flux de régurgitation tricuspide $> 3,4$ m/s ou $> 2,8$ m/s si associée à d'autres signes échocardiographiques suggérant une hypertension pulmonaire (1). Il permettra de définir le caractère pré ou post-capillaire de la maladie. Néanmoins, il s'agit d'un examen invasif, pas toujours bien accepté par les patients et qui doit être réalisé dans des centres expérimentés.

Une partie des paramètres hémodynamiques a également une valeur pronostique : la POD élevée (>20 mmHg), l'index cardiaque abaissé ($<2,2$ l/min/m²) et la diminution de la saturation veineuse en O₂ (SvO₂) (1). Récemment Thenappan et coll. (29) ont développé une équation de prédiction de la survie en utilisant des paramètres mesurés lors du cathétérisme cardiaque droit. La survie calculée grâce à cette équation appliquée à d'autres cohortes de patients (autres que celle utilisée pour bâtir l'équation) n'était pas différente de la survie observée dans ces cohortes. Il faut préciser que les indices pronostiques dérivés de ces paramètres sont applicables aux patients porteurs d'une HTAP idiopathique et ne sont pas validés pour les HTP d'autres étiologies.

Les données hémodynamiques obtenus lors du cathétérisme cardiaque droit ou lors de l'échographie cardiaque doivent néanmoins toujours être confrontés aux paramètres cliniques

afin d'évaluer le pronostic des patients. L'étude des registres a permis de décrire les caractéristiques anthropométriques, cliniques et hémodynamiques des patients HTAP. Le registre français a montré, grâce à une analyse multivariée que, pour l'HTAP idiopathique, familiale et liée aux anorexigènes, le sexe féminin, une bonne distance au TM6 et un débit cardiaque augmenté sont des facteurs associés à une meilleure survie (Humbert, Circulation 2010). Enfin, certains paramètres biologiques, comme le BNP (*brain natriuretic peptide*), doivent être pris en compte afin de permettre une meilleure évaluation du pronostic, relié surtout à la fonction du VD. Actuellement, les valeurs seuils optimales ainsi que la meilleure équation permettant, en tenant compte de tous ces paramètres, d'obtenir une bonne prédiction du pronostic, n'ont pas encore été définis.

CHAPITRE II. MODIFICATIONS DES MUSCLES CARDIAQUE ET SQUELETTIQUES DANS L'HTAP

II.1. LE VENTRICULE DROIT

L'importance du VD dans le pronostic de l'HTAP a largement été confirmée dans des études de survie où différents paramètres hémodynamiques reflétant la fonction du VD ont été identifiés comme prédictifs de mortalité : pression dans l'oreillette droite, débit cardiaque et index cardiaque (30, 31). La défaillance du VD constitue la cause principale de mortalité chez les patients porteurs d'HTAP. La capacité du VD à s'adapter à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) associée aux modifications de la vascularisation est le facteur pronostique essentiel de la capacité fonctionnelle et de la survie des patients dans cette pathologie. Il est important de souligner également que l'augmentation de la post-charge n'est pas seule responsable de l'insuffisance ventriculaire droite puisque la sténose pulmonaire ainsi que le modèle animal de sténose progressive de l'artère pulmonaire ont un meilleur pronostic que l'HTAP chez l'homme ou que l'HTAP expérimentale (32). Chez l'animal, l'association sténose de l'artère pulmonaire et hypoxie conduit à une augmentation des pressions droites qui vont atteindre le niveau des pressions systémiques sans défaillance ventriculaire droite (33, 34).

Malgré son importance, le VD ne constitue une thématique de recherche que depuis peu de temps et nous connaissons peu de choses sur les mécanismes qui conduisent à l'insuffisance cardiaque droite, la valeur pronostique des changements de structure et fonction ventriculaire droite, ou l'effet des thérapies spécifiques sur le VD (20, 32, 35). En effet, les trois classes thérapeutiques spécifiques employées actuellement ont comme cible principale le remodelage vasculaire pulmonaire, et non le VD. Ces dernières années, une série de paramètres caractérisant la structure et la fonction ventriculaire droite, la plupart mesurés par des techniques non-invasives, ont été proposés afin d'apprécier le pronostic et la réponse au traitement. Les techniques les plus répandues sont l'échographie cardiaque et l'IRM. Néanmoins, une partie de ces indicateurs doit être standardisée et validée dans de larges cohortes avant d'être utilisée en routine chez les patients HTAP. Ce que nous savons est que l'insuffisance ventriculaire droite est potentiellement réversible, comme cela a été observé après transplantation pulmonaire ou endartériectomie pulmonaire pour HTP thrombo-embolique chronique.

La recherche sur l'insuffisance cardiaque gauche a permis de dévoiler de nombreux mécanismes physiopathologiques concernant le ventricule gauche (VG), qui sont parfois, par extrapolation, transposés au l'insuffisance cardiaque droite. Néanmoins il ne faut pas oublier les différences structurales, fonctionnelles et de développement qui séparent le VG du VD.

II.1.1 L'HYPERTROPHIE DU VENTRICULE DROIT

L'augmentation de la post-charge est à l'origine de l'adaptation initiale du VD. Les caractéristiques anatomiques du VD (paroi fine et forme en demi-lune) expliquent sa compliance plus importante que celle du VG et sa capacité de s'adapter rapidement à la surcharge volémique. La relation pression-volume fait que le VD répond à la majoration de la post-charge par une augmentation de la contractilité. Chez les patients porteurs d'HTAP, cette majoration chronique de la post-charge due à une augmentation des résistances vasculaires conduit à une hypertrophie concentrique du VD (**figure 1**) qui permet de maintenir un index cardiaque et des pressions de remplissages correctes. Cette adaptation se fait au prix d'une augmentation de la pression pulmonaire moyenne (PAPm).

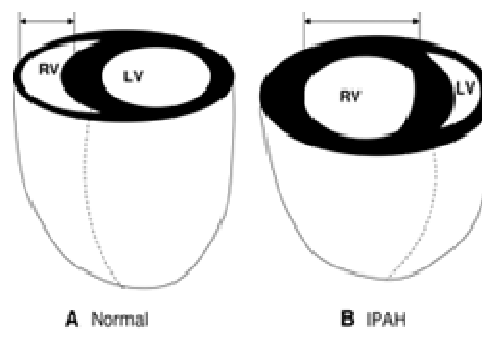


Figure 1 : La configuration du VD chez le sujet sain (A) et dans l'HTAP (IPAH) (B) ; RV- ventricule droit ; LV- ventricule gauche. Modifié d'après (32).

L'hypertrophie ventriculaire, déclenchée par l'augmentation du stress pariétal, est due à une augmentation de la synthèse des protéines et de la taille des cardiomyocytes par l'ajout de sarcomères (32). Le stress mécanique est « traduit » en signaux chimiques intracellulaires par des intégrines (récepteurs d'adhésion cellulaire, situés entre la matrice extra-cellulaire et le cytosquelette) et à travers des canaux ioniques situés au niveau des cellules cardiaques (myocytes, fibroblasts et cellules endothéliales) (36). Ce phénomène est renforcé par des influences neuro-hormonales (comme le système rénine-angiotensine ou le système

sympatique), auto- et paracrines. L'hypertrophie du VD s'accompagne de modifications de l'expression des protéines contractiles et régulatrices, comme par exemple la dégradation de la troponine, le changement de la proportion des chaînes lourdes de myosine de type α en faveur du type β (37). Les chaînes légères de type cardiaque diminuent en faveur de celles de type α -actine, squelettique et muscle lisse (38).

L'hypertrophie et la prolifération des cardiomyocytes nécessitent le soutien de la matrice extracellulaire (MEC) et de la vascularisation. La MEC est constituée essentiellement par un réseau de fibres de collagène qui entoure et permet l'interconnexion des myocytes, myofibrilles et faisceaux musculaires et représente ainsi le milieu de conduction électrique. Un milieu inhomogène prédispose aux anomalies de conduction et aux troubles de rythme (39).

La vascularisation doit s'adapter par angiogénèse et, dans des conditions physiologiques, ce phénomène adaptatif est favorisé par le VEGF, l'angiopoïétine I et par d'autres facteurs de croissance.

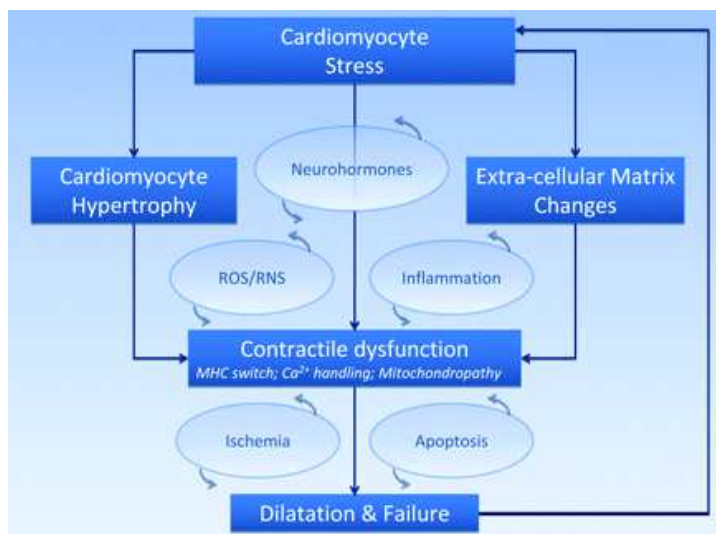


Figure 2: Mécanismes cellulaires et moléculaires supposés impliqués dans la transition vers la défaillance ventriculaire droite dans l'HTAP (modifié d'après (32)).

II.1.2. LA TRANSITION DE L'HYPERTROPHIE VERS LA DILATATION ET LA DEFFAILLANCE DU VENTRICULE DROIT

Contrairement au VG, le VD ne peut pas maintenir longtemps l'hypertrophie « adaptative » face à une augmentation soutenue de la post-charge en pression et finalement survient la transition vers la dilatation (**figure 2**). A ce stade, la contractilité n'augmente plus ou même

diminue, ce qu'on appelle le découplage du VD. La dilatation du VD a des conséquences fonctionnelles: le reflux au niveau de la valve tricuspide par dilatation de l'anneau et traction des cordages, l'augmentation de la pression dans l'oreillette droite, mais également l'altération du remplissage du VG par la diminution de sa pré-charge due à l'augmentation du temps de contraction et l'asynchronisme du VD. (40, 41). Le remplissage du VG est affecté par le déplacement du septum vers la gauche, et par l'allongement du temps de contraction du VD dans la proto-diastole (42, 43). Ce phénomène contribue, avec la dysfonction systolique et diastolique du VD, à la diminution du débit cardiaque dans le stade avancé de l'HTAP.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent l'adaptation et surtout la transition vers la défaillance du VD sont peu connus et commencent à être déchiffrés surtout grâce à des études expérimentales.

Le déséquilibre entre la demande et l'apport d'O₂ semble jouer un rôle crucial (44). L'augmentation de la tension pariétale majore la demande en O₂ et diminue en même temps la perfusion coronaire, aggravant le cercle vicieux de la défaillance.

Les modifications cellulaires, ajoutées aux changements de structure de la matrice extracellulaire (fibrose et dégradation) et à l'angiogénèse inadaptée sont associées à la dysfonction contractile et diastolique du VD. Ces changements au niveau du VD ont été démontrés dans une étude expérimentale récente (modèle obtenu par l'administration d'un inhibiteur de récepteur de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) associée à l'hypoxie, SuHx) : fibrose myocardique droite probablement en réponse au stress oxydant, diminution de la capillarisation du VD, diminution du niveau de protéine VEGF malgré des taux élevés de protéine HIF-1 α (*hipoxia-induced factor1 α*), censée stimuler le VEGF. De plus il a été montré que ces modifications ne sont pas induites uniquement par l'augmentation de la post-charge, en comparant le modèle SuHx avec le modèle de sténose progressive de l'artère pulmonaire. Dans ce dernier, l'hypertrophie du VD est proportionnelle à l'augmentation de la pression systolique du VD et toutes les modifications décrites dans le premier modèle (fibrose myocardique, raréfaction de capillaires et dilatation de VD), n'apparaissent pas (33).

La diminution de l'expression protéique de VEGF a été impliquée aussi dans la dysfonction du VD dans le modèle rat-monocrotaline en 1998 (45), mais pas dans le modèle hypoxie, où l'hypertrophie du VD n'est pas suivie par sa défaillance. Ces données suggèrent donc une inadaptation de l'angiogénèse à l'hypertrophie myocardique qui, ajoutée à la diminution de la

perfusion coronaire du VD due à l'hypotension systémique, peut expliquer en partie la dysfonction contractile et l'apoptose cellulaire.

Peu de données sont disponibles concernant le **métabolisme énergétique** du VD. L'accumulation de glucose dans la paroi de VD a été montrée par tomographie par émission de positrons chez les patients souffrant d'HTAP, accumulation d'autant plus importante que la post-charge était importante. La transition du métabolisme oxydatif des acides gras vers le métabolisme glycolytique, un peu moins consommateur d'O₂ (-12%) représente une stratégie démontrée dans l'insuffisance ventriculaire gauche afin de réduire la consommation d'O₂ (46) en condition d'hypoxie. Dans le VD des rats-monocrotaline, la transition métabolique se fait vers la glycolyse anaérobie en raison d'une altération du métabolisme oxydatif mitochondrial. Une des étiologies serait l'impossibilité du pyruvate, qui provient du métabolisme du glucose, d'entrer dans le cycle du Krebs en raison de l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase par les pyruvate dehydrogenases kinases (PDK). Le résultat est la majoration de la glycolyse anaérobie et l'apparition d'une acidose. La glycolyse anaérobie produit que 2 molécules d'ATP/molécule glucose et, malgré une majoration du l'apport du glucose dans la cellule myocardique, elle ne peut compenser que temporairement la diminution du métabolisme oxydatif. Cette altération métabolique a comme conséquence la diminution de la contractilité myocardique et finalement, la dysfonction ventriculaire (46). Le PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) semble avoir un rôle important dans la balance métabolique déterminant l'utilisation des acides gras ou du glucose (47), mais aussi la surexpression de HIF-1 α qui stimule l'activité des enzymes de la glycolyse anaérobie (48) et la transcription des PDK. Dans le modèle de sténose d'artère pulmonaire les réserves de créatine phosphate du VD isolé hypertrophié sont diminuées, mais le niveau d'ATP est maintenu par une moindre dépendance de métabolisme oxydatif grâce à la transition au métabolisme glycolytique (49). Ce n'est pas le cas dans le modèle rat-monocrotaline, où le niveau de créatine phosphates mais aussi d'ATP étaient diminués à 6 et 8 semaines après l'injection (50). Les capacités oxydatives mitochondriales sont diminuées et corrélées à la fonction du VD, plus précisément à l'indice de Tei. Si cette diminution est une conséquence des anomalies structurales ou fonctionnelles mitochondriales ou le résultat des facteurs inhibiteurs comme les ROS ou la déviation métabolique anaérobie, n'est pas encore clair.

Le stress oxydant joue un rôle essentiel dans le remodelage du VD et dans la transition vers le stade décompensé de l'insuffisance cardiaque. Ses sources sont multiples et la mitochondrie

en fait partie, produisant des ROS en excès en conditions d'hypoxie cellulaire. Les ROS, à leur tour, stimulent la voie *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) conduisant à l'activation de l'apoptose (51). Comme cela a été montré dans plusieurs études, les capacités antioxydantes estimées par la mesure de l'expression ARN ou protéique des enzymes antioxydantes, mais aussi des leurs activités enzymatiques, sont diminuées dans le VD défaillant, après une activation dans la phase d'hypertrophie (52, 53). L'expression de NRF2 (*facteur respirateur nucléaire 2*), facteur régulateur de l'expression de plusieurs enzymes antioxydants, est diminuée dans le modèle SuHx (33). La production excessive des ROS va déterminer des dommages au niveau de l'ADN, des lipides et des protéines et, probablement conduire à la fibrose. Elle conduit aussi, comme il a été montré dans l'insuffisance cardiaque gauche, à la diminution de la contractilité des cardiomyocytes et au remodelage cardiaque.

Une partie de voies impliquées dans l'insuffisance ventriculaire droite est probablement stimulée par les modifications de la vascularisation pulmonaire, se reflétant sur la fonction du VD. Par exemple, les mastocytes, abondants dans les artères pulmonaires et le myocarde des patients et des animaux HTAP, sont impliqués, dans l'insuffisance cardiaque gauche, dans l'activation des métalloprotéinases, impliquées dans la dégradation du collagène et la dilatation ventriculaire (54).

Deux études se sont intéressées au **profil génétique** des animaux qui évolue vers la défaillance ventriculaire droite. La première (55) a montré, dans le modèle rat-monocrotaline, que très tôt dans le développement de l'hypertrophie du VD, les animaux qui vont évoluer vers l'insuffisance cardiaque droite ont un profil ARN pro-apoptotique. Ce profil concerne plus particulièrement, mais pas seulement, l'expression des gènes impliqués dans la structure et le fonctionnement mitochondrial comme le *bcl-2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), le TFAM (*facteur de transcription mitochondriale A*) ou ANT1 (*transporteur de nucléotides adényliques 1*) et VDAC1 (*canal ionique voltage-dépendant 1*), ces 2 derniers codant pour des composants du MPTP (*pore de transition de perméabilité mitochondrial*). Une étude plus récente a utilisé un modèle de souris soumise à une sténose pulmonaire relativement sévère évoluant vers la défaillance cardiaque droite (56), en le comparant avec un modèle d'insuffisance cardiaque gauche par constriction aortique. Les auteurs ont analysé le profil des micro-ARN (miARN, nucléotides impliquées dans la régulation des gènes et qui n'ont pas de fonction de codage) dans les deux ventricules, à plusieurs moments dans l'évolution vers l'insuffisance cardiaque. Dans l'ensemble le profil était similaire, mais quelques miARN et leurs gènes cible étaient spécifiques au VD. Ainsi, ces gènes concernaient des voies

apoptotiques, de fibrose, de transport mitochondrial ou de métabolisme énergétique. Les auteurs suggèrent une sensibilité plus importante du VD à l'augmentation de la post-charge par rapport au VG.

Les études réalisées sur le VG suggèrent plusieurs mécanismes susceptibles d'intervenir dans la transition vers l'insuffisance ventriculaire et ces mécanismes méritent être explorés dans l'hypertension pulmonaire. Un rôle important dans la transition de l'hypertrophie à l'insuffisance ventriculaire gauche a été attribué à la **biogénèse mitochondriale** (57, 58). Un facteur central de contrôle de la biogénèse est le PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator α*) et la diminution de son expression a été confirmée dans des nombreuses études chez l'homme (59, 60) ou dans des différents modèles animaux d'insuffisance cardiaque. Cette diminution concerne également la cascade transcriptionnelle dépendante de PGC-1 α , (les NRF, le TFAM) ou les protéines cibles comme la citrate-synthase ou la cytochrome c oxydase (61, 62) et est corrélée à la fonction cardiaque. La régulation de la biogénèse mitochondriale dans la phase compensée, d'hypertrophie ventriculaire, est moins claire car les résultats sont contradictoires, en fonction du modèle utilisé ou du moment dans l'évolution de la pathologie. Il semble que ce phénomène s'adapte à l'augmentation de taille des cardiomyocytes afin de répondre à une demande énergétique plus importante (58) (**figure 3**).

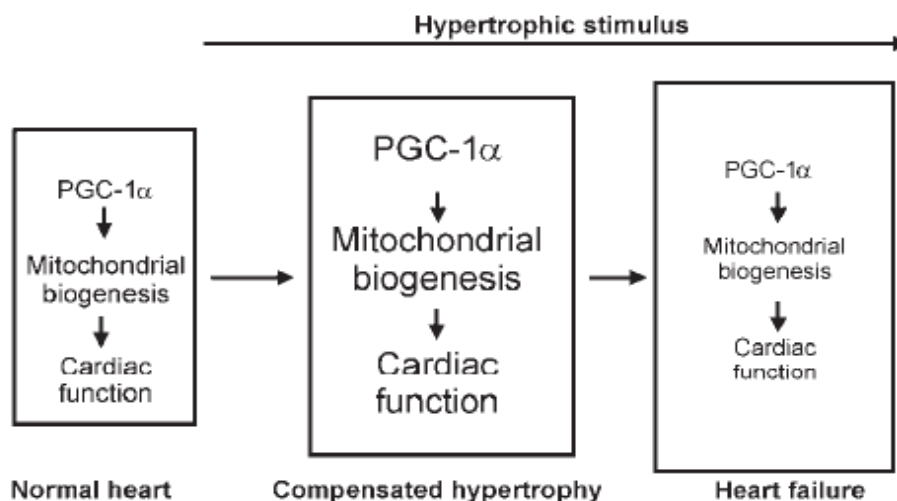


Figure 3: La biogénèse mitochondriale dans le myocarde normal, hypertrophié ou défaillant. D'après (57).

Les études spécifiques à l'insuffisance cardiaque droite, relativement peu nombreuses, sont généralement le résultat de la recherche sur des **modèles animaux**, et le degré d'hypertrophie et de défaillance varie en fonction de modèle, de la dose de produit d'induction administrée, de type d'animal et de moment de l'évolution. Donc ces modèles ont tous leurs limitations, mais néanmoins ils sont indispensables dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la maladie et dans l'élaboration des nouvelles thérapeutiques. L'hypoxie chronique conduit à une vasoconstriction pulmonaire et une hyperplasie des cellules musculaires lisses vasculaires. Il est souvent impossible de déterminer quels sont les effets de l'hypoxie et quels sont ceux de l'augmentation de la post-charge sur le VD et généralement le modèle n'évolue pas vers l'insuffisance cardiaque. Les modèles d'hypertension pulmonaire par hyper débit (shunt aorto-cave) entraînent des modifications qui s'approchent de celles vues dans les HP des cardiopathies congénitales, mais pas de celles observées dans d'autres types d'HP(63). Le modèle obtenu par sténose de l'artère pulmonaire entraîne une augmentation importante de la post-charge du VD et qui a des conséquences dépendantes de degré de sténose, de l'espèce d'animal et de son âge.

Le modèle rat-monocrotaline est le plus utilisé depuis 30 ans et il présente des avantages par sa reproductibilité, son coût réduit et la rapidité de son évolution. La monocrotaline est un alcaloïde de la famille de pyrrolizidine qui se trouve dans les tiges, les feuilles et les graines d'une plante, *Crotalaria spectabilis* (**figure 4**). Cet alcaloïde est transformé dans le foie dans un métabolite actif, dehydromonocrotaline, sous l'influence du cytochrome p450. Le mécanisme précis de toxicité de la monocrotaline au niveau de la vascularisation pulmonaire n'est pas connu. Elle induit des multiples altérations structurales et fonctionnelles des cellules endothéliales, mais néanmoins le modèle animal est caractérisé surtout par une hypertrophie des cellules musculaires lisses et non par une prolifération ou obstruction aux dépens des cellules endothéliales. Les modifications hémodynamiques varient en fonction de la dose administrée : celle de 60 mg/kg est la plus utilisée, mais la pression systolique du VD varie entre 35 et 80 mm Hg (64). Plus récemment, 2 modèles différentes ont été décrits : d'hypertrophie et de défaillance ventriculaire droite, observés par l'administration de 30 et respectivement 80 mg/kg de monocrotaline (55, 65). Dans ce modèle, un effet inflammatoire précoce sur la vascularisation coronaire ne peut pas être exclu, reflet d'une inflammation plus généralisée, observée dans le poumon et le myocarde (66, 67). Cet effet aurait des conséquences négatives sur la fonction cardiaque, droite mais aussi sur celle du VG (68).

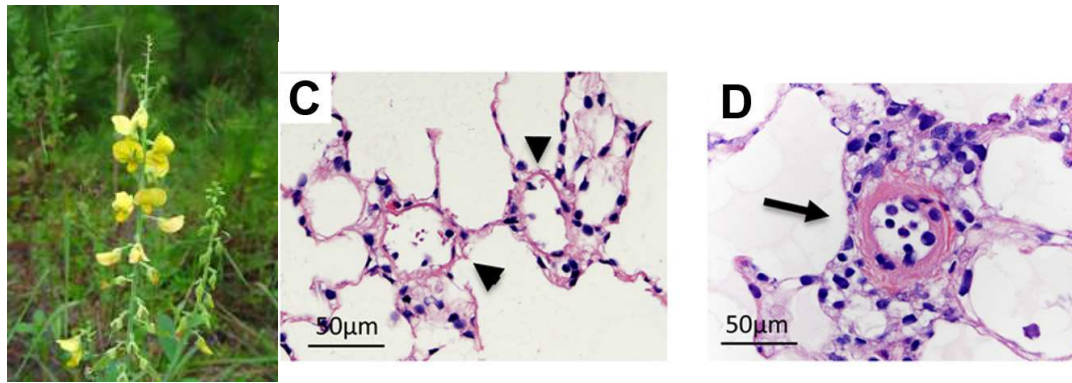


Figure 4 : Plante de *Crotalaria spectabilis* (gauche). La monocrotaline induit chez le rat une hypertrophie de média et une infiltration de cellules mononucléaire (D), par rapport au rat sain. D'après (64).

Un modèle animal plus récent est celui obtenu par l'administration d'un inhibiteur de récepteur VEGF combiné à l'hypoxie (SuHx). Les modifications vasculaires pulmonaires et l'évolution observées dans ces modèles sont les plus proches de la pathologie humaine (69) (33). Comme dans l'insuffisance cardiaque gauche, les modèles d'animaux transgéniques peuvent avoir un rôle important dans la recherche sur le VD, permettant de vérifier certaines hypothèses et voies supposées intervenir dans la transition de l'hypertrophie vers la défaillance (32).

***Au total,** si l'augmentation de la post-charge stimule l'hypertrophie ventriculaire droite, d'autres facteurs sont très probablement impliqués dans la progression vers la dilatation et l'insuffisance cardiaque comme l'inflammation et l'activité neuro-hormonale, le stress oxydant, les modifications du métabolisme énergétique, l'apoptose cardiomyocytaire et l'ischémie myocardique.*

II.2. LES MUSCLES PERIPHERIQUES

II.2.1. ALTERATIONS MUSCULAIRES DANS L'HTAP CHEZ L'HOMME

L'insuffisance ventriculaire droite reste la cause principale de décès chez les patients HTAP. Néanmoins, la dysfonction musculaire périphérique joue un rôle important sur le pronostic et la qualité de vie de ces patients. Les premières études réalisées dans l'insuffisance cardiaque ont suggéré que cette dysfonction ne semble pas due seulement au déconditionnement musculaire ou à la limitation du débit cardiaque et donc à la limitation du transport d'O₂ (70, 71), car la transplantation cardiaque ne permet de corriger que très partiellement et tardivement ces anomalies (72). De plus, le pronostic et la classe fonctionnelle NYHA sont mieux corrélés à la distance parcourue au TM6 et à la VO_{2pic} que les données hémodynamiques (10, 15). Il existerait donc d'autres facteurs que l'inadaptation de la perfusion à l'effort qui expliqueraient la limitation à l'exercice.

Les études s'intéressant spécifiquement au muscle périphérique dans l'HTAP ne sont pas nombreuses et l'utilisation des données obtenues dans l'insuffisance cardiaque gauche peut ne pas être toujours adaptée.

Depuis 2005, R. Naeije a souligné que l'HTAP est une maladie systémique, caractérisée par une « myopathie » similaire à ce qui a été bien décrit dans la broncho-pneumopathie obstructive chronique (BPCO) et l'insuffisance cardiaque gauche (73). Une des différences très importantes entre les patients HTAP et les insuffisants cardiaques ou les patients BPCO est que les premiers sont généralement plus jeunes et la durée de la maladie plus courte.

II.2.1.1. FONCTION MUSCULAIRE

Muscles respiratoires

L'étude de 2005 de Meyer (74) était la première à s'intéresser spécifiquement aux muscles respiratoires, car il avait été démontré par la même équipe que la pression inspiratoire maximale (P_{imax}) constituait un des facteurs pronostiques dans l'insuffisance cardiaque gauche, en analyse multivariée. La pression expiratoire maximale (P_{emax}) et la P_{imax} étaient diminuées chez les patients HTAP comparés à des sujets témoins mais, de façon surprenante, cette diminution n'était corrélée ni à la classe NYHA, ni à la capacité d'exercice, ni au rapport VE/VCO₂ ou à l'hémodynamique. Ceci pourrait s'expliquer par le faible nombre de sujets (37). Ces données ont été confirmées par l'étude de (75) qui a mesuré également les pressions inspiratoires mais indépendamment de la volonté du sujet, par stimulation magnétique

diaphragmatique. Il a été ainsi montré qu'il existe une diminution de 34% de la force des muscles inspiratoires sous stimulation magnétique bilatérale chez les patients HTAP par rapport aux sujets contrôles, diminution plus importante que celle rapportée dans l'insuffisance cardiaque gauche. De plus, ces patients n'avaient pas d'altération de la fonction ventriculaire gauche, ni d'arguments en faveur d'une malnutrition. Ces deux derniers facteurs sont considérés comme des facteurs confondants dans l'apparition d'une dysfonction des muscles respiratoires (76). L'hyperventilation de repos et même pendant le sommeil et qui s'accroît à l'effort (77) occasionne une surcharge de travail imposée aux muscles respiratoires. Mais il n'est pas clair si cette commande ventilatoire exagérée est une conséquence ou un facteur à l'origine de la dysfonction des muscles respiratoires. La P_{imax} et sniff-test transdiaphragmatique corrélaient avec la distance parcourue au TM6, donc avec la capacité d'exercice, contrairement à l'étude de Meyer et coll. (74). Si les pressions inspiratoires sont des facteurs déterminants de la VO_{2max} et de pronostic chez les patients HTAP reste à déterminer.

L'analyse des biopsies diaphragmatiques réalisées sur un nombre réduit de patients et sujets témoins montrait une atrophie importante des fibres musculaires, ainsi qu'une diminution de leur force de contraction maximale (78).

Quoi qu'il soit, «les patients HTAP doivent respirer plus avec des muscles plus faibles» (77). Il est connu que dans l'insuffisance cardiaque gauche, la ventilation non-invasive en pression positive continue améliore la fonction des muscles respiratoires (79), et le même effet a été obtenu par l'entraînement spécifique de ces muscles (80). Aucun résultat de telles interventions n'a été rapporté chez les patients HTAP, si ce n'est que dans le cadre d'un programme de réhabilitation global, sans objectif ciblé sur la fonction musculaire respiratoire (13).

Au total, le déséquilibre entre la demande respiratoire augmentée et l'incapacité des muscles respiratoires de générer la force maximale peut contribuer à la diminution de la capacité d'exercice, à la dyspnée et l'altération de la qualité de vie chez ces patients.

Muscles squelettiques

Une des premières études qui s'est intéressée aux muscles squelettiques dans cette pathologie est celle de Bauer et coll. (81). Elle a montré, chez des sujets en classe II et III NYHA, que la force isométrique des membres supérieurs mesurée par la méthode du « hand grip » était significativement réduite par rapport aux sujets témoins. Cette faiblesse musculaire des membres supérieurs était corrélée au TM6, donc à la sévérité de la maladie. Elle était également proportionnelle à la dysfonction des muscles respiratoires, mesurée à l'aide des Pimax et Pemax. Les auteurs soulignent l'importance de la recherche ciblée sur le muscle squelettique afin de trouver les interventions capables d'améliorer sa dysfonction.

Les thérapies spécifiques qui ont incontestablement amélioré le pronostic de l'HTAP n'évitent pas qu'un bon nombre de patients restent en classe III NYHA, caractérisée par une dyspnée et une limitation à l'effort importantes. Classiquement, cela a été attribué à la persistance sous traitement d'une altération de la fonction cardiaque droite et des anomalies respiratoires connues comme étant impliquées dans la physiopathologie de l'exercice chez ces patients. Néanmoins, l'hypothèse d'une myopathie impliquée dans cette limitation intéresse de plus en plus la communauté scientifique. En 2010, Mainguy et coll. (82) ont montré une diminution de la force du quadriceps mesurée chez 10 patients HTAP traités par thérapies spécifiques, classe III NYHA, par rapport aux témoins sédentaires sains. La force musculaire maximale obtenue par stimulation magnétique était corrélée à la capacité à l'exercice estimée par la VO_2max , mais à aucun des paramètres hémodynamiques mesurés par cathétérisme cardiaque droit.

En conclusion, les patients HTAP semblent présenter une diminution de la force musculaire périphérique et respiratoire, non-corrélée à l'hémodynamique, dont l'origine n'est pas élucidée.

II.2.1.2. MODIFICATIONS DE LA CELLULE MUSCULAIRE

Dans la même étude canadienne (82) décrite précédemment, des biopsies musculaires du vastus lateralis ont été prélevées en utilisant l'aiguille de Bergström. Chez les patients souffrant d'HTAP les fibres de types II, glycolytiques, notamment le type IIX, étaient retrouvées en plus grande proportion que les fibres de type I. L'augmentation du rapport phosphofruktokinase/3-hydroxyacyl-CoA-déhydrogénase, 2 enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, était en faveur d'un plus important potentiel pour le métabolisme anaérobie par rapport au métabolisme oxydatif. Il a été aussi montré que la proportion des

fibres de type I est inversement proportionnelle à la durée de la maladie. Par contre, la surface des fibres ainsi que la capillarisation musculaire n'étaient pas significativement différentes de celles mesurées chez les témoins.

Ces anomalies sont similaires à celles décrites dans l'insuffisance cardiaque gauche et la BPCO, qui comptent l'atrophie musculaire, la diminution de la force maximale, l'augmentation de la proportion des fibres fatigables de type Iix au dépens des fibres oxydatives de type I, la diminution de l'activité des enzymes oxydatives, un métabolisme calcique intracellulaire perturbé.

Les mécanismes impliqués dans la dysfonction musculaire périphérique ne sont pas bien définis et les hypothèses découlent notamment des études réalisées dans l'insuffisance ventriculaire gauche ou la BPCO : elles incluent des facteurs inflammatoires systémiques ou locaux, la diminution du débit cardiaque, l'hypoxémie, l'hyperactivité sympathique, éventuellement les anomalies endothéliales ou du métabolisme du NO au niveau des artérioles musculaires. Le déconditionnement est de plus en plus présenté comme étant un des facteurs principaux responsable des anomalies intrinsèques musculaires. Actuellement le rôle des thérapies spécifiques comme les antagonistes des récepteurs d'endothéline ou les inhibiteurs de phosphodiesterase 5 dans l'évolution de ces anomalies n'est pas connu.

II.2.2. ALTERATIONS MUSCULAIRES DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE GAUCHE CHEZ L'HOMME: *Quelles conclusions ? Quels enseignements ?*

Pathologie musculaire périphérique : une réalité ?

Les patients insuffisants cardiaques présentent une fatigue musculaire qui contribue à la dyspnée et limite leur tolérance à l'effort, avec un impact considérable sur la qualité de vie (83). De nombreuses études ont suggéré que cette fatigue musculaire est la conséquence de modifications intrinsèques des muscles squelettiques. Les altérations «périphériques» sont décrites actuellement dans la littérature comme partie intégrante de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque gauche. L'hypothèse que le muscle lui-même est atteint dans cette pathologie a été émise en constatant que l'ajout de l'exercice des membres supérieurs à l'exercice maximal des membres inférieurs augmente la VO_{2pic} . Ceci suggère que la limitation de la VO_2 à l'effort, bien corrélée à la classe NYHA, n'est pas due qu'au plafonnement du débit cardiaque (84). Comme cela a été montré aussi chez les patients HTAP, les données hémodynamiques ne sont pas corrélées à la limitation à l'effort, ni à la fatigue musculaire. Une autre caractéristique commune de l'insuffisance cardiaque gauche et

de l'HTAP est que l'entraînement physique peut améliorer la tolérance à l'effort en l'absence d'amélioration des paramètres hémodynamiques (13). De plus, les interventions qui améliorent le débit cardiaque comme la perfusion de dobutamine ou la transplantation cardiaque ne permettent pas de normaliser la VO_2 , malgré le fait que le débit cardiaque se normalise en général pour une charge donnée (85). Ce «paradoxe» hémodynamique indique que les muscles périphériques jouent un rôle important dans la symptomatologie.

Il est intéressant de noter que les études neurophysiologiques n'ont pas mis en évidence d'anomalies de la jonction neuro-musculaire ou d'altération de la commande centrale (86, 87). Par contre l'augmentation d'activité au niveau des mécano et métaborécepteurs musculaires peut contribuer à la stimulation neuro-hormonale, circulatoire et respiratoire, dans l'insuffisance cardiaque gauche (88, 89). Cet ergoréflexe musculaire exagéré est amélioré par l'entraînement, expliquant par un mécanisme différent, l'amélioration périphérique en l'absence de modifications centrales, cardiaques (90).

Anomalies structurales des muscles squelettiques

La cachexie est une complication qui touche environ 15% des patients insuffisants cardiaques et semble avoir une influence plus désastreuse sur la survie que l'obésité. La cachexie est associée à la **sarcopénie**, définie par une perte de masse et donc de force musculaire, et caractérisée par une diminution de la taille (atrophie) et du nombre de fibres. (91). Tous les patients sarcopéniques ne sont pas cachectiques, d'où la sous-estimation de la sarcopénie, par manque d'un moyen diagnostique simple, fiable et accessible. L'**atrophie** est une donnée histologique qui fait partie de la sarcopénie, associée au mauvais pronostic (92, 93), à la classe NYHA et à la VO_{2pic} , indifféremment d'âge. Les mécanismes qui la favorisent sont multiples. Le stress oxydant, l'inflammation (notamment le $TNF-\alpha$, IL6), le système neuro-hormonal (par l'augmentation du niveau de catécholamines circulantes, la résistance à l'insuline, la diminution de l'activité d'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) et l'activation du système renine-angiotensine-aldostérone), sont quelques exemples de voies qui pourraient expliquer le déséquilibre entre les processus anaboliques et cataboliques qui aboutit à l'atrophie musculaire (94-96). La voie ubiquitine –protéasome, considérée comme voie finale de protéolyse des myofibrilles, est actuellement bien décrite dans l'insuffisance cardiaque gauche, mais aussi dans la BPCO, et pourrait constituer la cible d'une future stratégie thérapeutique contre l'atrophie musculaire.

D'autres anomalies histologiques sont décrites, comme, par exemple, le **changement de phénotype de fibres musculaires** en faveur de fibres type II. La majoration de l'apoptose a

été aussi observée et semble influencer la contractilité et être corrélée avec la capacité à l'exercice (97).

Anomalies fonctionnelles des muscles squelettiques

La dysfonction musculaire squelettique est caractérisée par l'incapacité à maintenir une activité contractile d'intensité et amplitude normale. Cette fatigabilité est due aux **anomalies métaboliques**, notamment **énergétiques**. La première observation a été que le muscle squelettique utilise de façon plus rapide et préférentielle les réserves de phosphocréatine (PCr) et que le temps nécessaire pour refaire ces réserves est allongé (80, 98). La diminution des réserves énergétiques et l'augmentation du métabolisme glycolytique conduit à une acidose musculaire précoce. Il est aussi démontré que l'activité de la citrate-synthase (une enzyme de cycle du Krebs) et de la créatine-kinase (CK) cytosolique, impliquée dans la signalisation métabolique entre la cellule et la mitochondrie, sont diminuées chez le patient insuffisant cardiaque.

Les analyses des biopsies musculaires des patients ont montré une diminution du volume et de la densité des mitochondries, proportionnelle à la diminution de la VO_{2pic} (99). Par contre, la **capacité oxydative musculaire et l'expression des protéines mitochondriales** n'étaient pas modifiées chez les patients insuffisants cardiaques par rapport à des témoins sédentaires dans les études les plus récentes (100, 101), contrairement à ce qui avait été observé dans les modèles animaux. Toutes ces modifications semblaient suggérer plutôt un feedback défectueux entre la demande d'énergie et la production d'ATP qu'une altération de la capacité oxydative de la mitochondrie (95, 102).

Enfin, il est aussi important de souligner que la cascade de transcription de la **biogénèse mitochondriale**, incluant le PGC-1 α au centre de la régulation du réseau mitochondrial, ainsi que l'expression des gènes intervenant dans la dynamique et la dégradation de la mitochondrie (Mfn2, Drp1 et LonP) n'étaient pas altérées chez les insuffisants cardiaques par rapport aux sujets sains sédentaires (103).

Les résultats des études concernant la capacité oxydative et la biogénèse mitochondriale semblent donc contradictoires. Cependant, les effets protecteurs mitochondriaux des récents traitements cardiologiques (notamment les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, IEC), pourraient expliquer les différences observées entre les anciennes études réalisées chez l'homme ou les animaux et les plus récentes, qui ont été réalisées chez des patients traités par IEC (103-106).

Le rôle de la **cinétique du Ca²⁺** n'est pas complètement élucidé : très peu d'études cliniques se sont intéressées à cette problématique et il semble que le transfert de Ca²⁺ à l'intérieur de la fibre musculaire des patients n'est pas altéré, hormis une diminution de sa libération au niveau du reticulum sarcoplasmique(107).

La diminution de l'apport d'O₂ vers la fibre musculaire est une hypothèse qui a été avancée pour expliquer la limitation de la capacité d'exercice dans cette pathologie. Récemment (108) a été démontré que l'expression des ARNm du VEGF au repos et sa réponse à l'exercice ne sont pas altérés dans les muscles squelettiques, suggérant donc que l'intolérance à l'effort n'est pas expliquée par ce mécanisme puisque la vascularisation musculaire semble normale. Néanmoins, même si la densité capillaire rapportée à la surfaces des fibres musculaires est préservée dans l'insuffisance cardiaque (109), les anomalies endothéliales et la prédominance des facteurs vasoconstricteurs pourraient conduire à la diminution de l'apport d'O₂ au muscle, surtout à l'exercice.

Myopathie spécifique ou déconditionnement ?

Une revue récente de la littérature s'est intéressée au rôle du déconditionnement dans les anomalies musculaires et surtout mitochondriales, décrites dans cette pathologie (110). Elle souligne que les études cliniques qui ont pris en compte le niveau d'activité physique (estimé à l'aide d'un accéléromètre, par exemple) sont peu nombreuses et sujettes aux controverses quant au choix des sujets témoins. Pour ces auteurs l'existence d'une « myopathie » spécifique reste à prouver par des études qui doivent bien contrôler ce paramètre dans la méthodologie (110, 111). Notamment, il faut tenir compte de facteurs confondants comme par exemple le temps écoulé depuis la dernière hospitalisation. La comparaison de résultats obtenus dans des études cliniques contrôlées réalisées chez des patients insuffisants cardiaques, BPCO ou simplement déconditionnés, a conduit les auteurs à conclure que les différents changements et anomalies musculaires sont principalement la conséquence de la réduction de l'activité physique.

Néanmoins, les études actuelles s'intéressant notamment à la mitochondrie, ont été réalisées sur des patients bénéficiant de nouveaux traitements, protecteurs de la fonction et la biogénèse mitochondriale. De plus, l'hypothèse que la capacité oxydative est préservée in vitro mais soumise in vivo à de multiples influences néfastes inflammatoires, neuro-hormonales, du stress oxydatif et autres, ne peut pas être exclue à l'heure actuelle. Egalement, les altérations

du métabolisme glycolytique et du système créatine-kinase ne sont pas expliquées par le déconditionnement (100).

Un autre argument qui plaide en faveur d'une myopathie spécifique est le développement de cette pathologie secondaire au niveau du diaphragme. En effet, il a été montré dans une étude expérimentale que les capacités oxydatives du diaphragme étaient diminuées (112). Le déconditionnement ne peut toucher que les muscles squelettiques, le diaphragme travaillant en permanence.

Enfin, récemment, 2 études qui ont pris en compte dans leur méthodologie le niveau d'activité physique des patients et des témoins, ont montré une diminution de la quantité et de l'activité de la myosine, associée à une altération de la force maximale des fibres de type I (113, 114). De plus, Toth et coll. ont montré une altération de la synthèse protéique intramusculaire, expliquant l'atrophie et la dysfonction contractile (115, 116). Les auteurs suggèrent que ces modifications sont indépendantes du niveau d'activité physique et peuvent expliquer les altérations de la fonction contractile des insuffisants cardiaques.

***Au total**, dans l'insuffisance cardiaque gauche chez l'homme, les mécanismes impliqués dans la diminution de la capacité à l'exercice et l'apparition des anomalies de la fonction musculaire semblent nombreux et leurs rôles respectifs ne sont pas bien définis. Ces mécanismes incluent des facteurs systémiques comme l'inflammation, l'activité neuro-hormonale et des facteurs locaux comme la microvascularisation ou les altérations des protéines contractiles. En revanche, il ne semble pas exister d'anomalies importantes de la biogenèse, de la structure ou de la fonction mitochondriale, au moins in vitro, lors de l'analyse des biopsies musculaires, chez des patients insuffisants cardiaques traités par IEC et/ou bêta-bloquants. Ces altérations ont de nombreux points communs avec celles décrites chez les patients BPCO et chez les sujets sains déconditionnés (tableau 2). Néanmoins, l'existence d'anomalies secondaires à la maladie chronique ne peut pas être niée, ainsi que leurs répercussions fonctionnelles. Ces recherches pourraient aboutir à l'élaboration de stratégies thérapeutiques dont le but serait d'améliorer la qualité de vie et le pronostic de ces patients.*

Paramètre	Insuffisance cardiaque	BPCO	Déconditionnement
Capacité oxydative	↓	↓	↓
Atrophie	↑	↑	↑
Apoptose	↑	↑	↑
Altération de la distribution des fibres	↑	↑	↑
Inflammation	↑	↕	
Capillarisation	↕	↕	↕
Fatigabilité de la fibre musculaire isolée	↑	↑	↑

Tableau 2: Comparaison de propriétés musculaires décrites dans des études contrôlées dans l'insuffisance cardiaque, la BPCO et le déconditionnement musculaire. Modifié d'après (110).

II.2.3. ETUDES EXPERIMENTALES DES MUSCLES PERIPHERIQUES DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE

Les premières études dédiées au muscle squelettique dans l'hypertension pulmonaire ont été réalisées par les équipes italiennes à la fin des années 90. Elles ont utilisé le modèle rat-monocrotaline, bien connu dans cette pathologie pour sa reproductibilité et la rapidité de l'évolution de l'hypertension pulmonaire. Quelques-unes de ces études ont été réalisées en séparant le stade compensé d'insuffisance cardiaque (hypertrophie ventriculaire) du stade décompensé, caractérisé par la présence d'ascite, d'épanchement pleural et par une altération de l'état général de l'animal. Une augmentation de cytokines inflammatoires (117) accompagne ces modifications cliniques. Ceci a permis d'obtenir des données intéressantes en fonction de la sévérité de la maladie, sur la typologie des fibres, l'atrophie et l'apoptose musculaire, le métabolisme énergétique et l'inflammation.

Anomalies structurales

Ainsi, Vescovo et coll. (118) et Dalla Libera et coll. (119) ont montré lors de l'évolution de la maladie, un **changement des isoformes de myosine** de type I dans IIA. Les auteurs rapportent aussi l'apparition de l'**apoptose** des cellules musculaires, surtout de type glycolytique, au stade décompensé de l'insuffisance cardiaque. Ce phénomène, probablement induit par l'inflammation systémique caractérisée dans ce modèle par l'augmentation du TNF- α (facteur de nécrose tumorale), contribue d'après les auteurs à l'atrophie musculaire observée dans les stades avancés d'insuffisance cardiaque.

Une étude récente s'est intéressée aux anomalies morphologiques et fonctionnelles des fibres musculaires **diaphragmatiques** chez le rat (modèle obtenu par l'injection de monocrotaline), ainsi que chez un nombre réduit de patients HTAP (78). Il a été montré une atrophie des fibres diaphragmatiques chez les rats malades, probablement due à une augmentation de la protéolyse. La force maximale de contraction mesurée in vitro était aussi diminuée d'environ 30%, mais le mécanisme précis, intracellulaire, n'a pas été établi. Ont été évoqués le rôle de la perte de myosine, une des protéines contractiles majeures, ou les altérations géométriques des sarcomères. Il est intéressant de noter que la densité capillaire était conservée, ainsi que la capacité oxydative mesurée par l'activité de la succinate-déhydrogenase. Par contre, ces modifications diaphragmatiques (atrophie musculaire et force musculaire sur fibre isolée) n'étaient pas décrites dans le muscle squelettique, ni chez le rat, ni chez les patients.

En 2005, l'étude de Vescovo (120) a suggéré le rôle de **PGC-1 α** dans l'atrophie et l'apoptose musculaire dans le modèle rat-monocrotaline. Il est connu que le PGC-1 α est exprimé préférentiellement dans les fibres de type I et est un des principaux déterminants du type de métabolisme musculaire (121). Une diminution de l'expression de PGC-1 α a été montrée dans le muscle squelettique, associée à une augmentation du phénotype rapide des protéines contractiles (chaînes lourdes de myosine et de troponine I) et une diminution du volume mitochondrial dans le muscle oxydatif. Parallèlement, a été observé une diminution de la calcineurine, un des facteurs régulant l'expression de PGC-1 α . Le traitement par hormone de croissance (GH) inhibe l'apoptose, via l'augmentation d'IGF (insulin growth factor), et permet la conservation de la masse musculaire. La densité mitochondriale est aussi restaurée et le niveau de TNF- α est diminué. Enfin, Vescovo et coll. suggèrent un mécanisme commun de myopathie dans différents syndromes comme l'insuffisance cardiaque, le diabète ou les maladies inflammatoires chroniques. Ces conditions sont caractérisées par une résistance à la GH et une augmentation du TNF- α et des interleukines pro-inflammatoires. Ces voies de

signalisation agirait sur le PGC-1 α et détermineraient les modifications de phénotype musculaire, de transcription et métabolisme mitochondrial.

Anomalies du métabolisme énergétique

L'équipe de Bernocchi (122) s'est intéressée au **métabolisme énergétique** musculaire périphérique dans les 3 types de fibres : oxydatives lentes (type I), glycolytiques rapides (type IIB) et mixtes, oxydatives et glycolytiques. Il a été montré que les réserves de phosphocréatine sont diminuées au stade décompensé de l'insuffisance ventriculaire droite, surtout dans les fibres lentes. Ceci s'accompagnait d'une accumulation d'équivalents réducteurs, comme le NADH⁺, et d'une diminution du contenu d'ATP à moins de 50% par rapport aux rats témoins. Ces changements suggéraient un défaut d'utilisation d'équivalents réducteurs par les mitochondries. Par contre, au stade compensé le métabolisme énergétique est conservé par rapport aux rats témoins.

Les mêmes auteurs (123) ont voulu savoir si les anomalies énergétiques sont dues à la diminution de l'apport de l'O₂ par la baisse de débit sanguin afférent aux muscles ou par des anomalies d'utilisation de l'O₂ au niveau de la mitochondrie. La première hypothèse a été écartée, la perfusion musculaire étant normale (méthode de l'injection de microsphères fluorescentes). L'analyse de la respiration mitochondriale montrait une diminution des capacités oxydatives des deux types de muscle, oxydatif et glycolytique. Ces données plaideraient pour l'existence d'une myopathie spécifique dans cette pathologie, chez l'animal, indépendante des paramètres hémodynamiques, avec lesquels les anomalies musculaires n'étaient pas corrélées.

L'hypothèse d'une **altération de l'utilisation de l'O₂** au niveau musculaire a été confirmée récemment (124), mais dans certaines régions musculaires uniquement. Une réduction de la capillarisation rapportée à la surface de la cellule musculaire pouvait expliquer la diminution de la capacité oxydative dans les régions profondes du muscle, prédominantes de type I. Mais la diminution des capacités oxydatives mitochondriales a été montrée aussi dans les régions où ce remodelage capillaire n'était pas présent, comme les régions superficielles du muscle, à prédominance glycolytique.

Il a été également montré que la baisse de la respiration mitochondriale n'était pas due au changement de phénotype de fibres, mais à des anomalies de fonctionnement mitochondrial, plus précisément à une diminution d'activité du complexe I. Ces anomalies pourraient être favorisées par l'inflammation systémique, notamment par le TNF- α , comme cela a été démontré dans l'insuffisance cardiaque gauche (125).

.
En conclusion, les études expérimentales dans l'hypertension pulmonaire suggèrent une diminution des capacités oxydatives mitochondriales des muscles squelettiques au stade très avancé de la pathologie, indépendante de l'apport en O₂. Il n'est pas connu à l'heure actuelle si ces modifications sont dues à des altérations structurelles ou fonctionnelles de la mitochondrie, ni si elles peuvent être prévenues ou retardées par l'entraînement.

CHAPITRE III. LA MITOCHONDRIE

La mitochondrie est un organite des cellules eucaryotes spécialisé dans la transformation de l'énergie. Elle est riche en composants biochimiques dont l'objectif majeur est la production d'énergie, sous forme d'ATP ou de chaleur. Mais cet organite est également impliqué dans la signalisation et l'apoptose cellulaire. Elle est l'acteur d'un apparent paradoxe : promouvoir aussi bien la vie que la mort (126). D'une part la mitochondrie fournit le combustible à l'aide de l'oxygène, d'autre part elle communique avec des effecteurs cellulaires importants par l'intermédiaire des ROS qu'elle produit. Ainsi, cette usine énergétique est l'élément central de l'adaptation de l'organisme au milieu environnant, lui permettant de fonctionner et de maintenir une température stable. D'autre part, si elle n'est plus capable de répondre de façon optimale à la demande métabolique, elle a la capacité d'induire l'apoptose cellulaire.

La mitochondrie comporte plusieurs exemplaires de son propre ADN (ADNmt) distinct de l'ADN nucléaire (127). Cependant, le ADNmt encode seulement pour une partie de protéome mitochondrial (13 protéines), fondamental pour la fonction mitochondriale et plus particulièrement pour les complexes de la chaîne respiratoire (128). En plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en ATP, les mitochondries ont d'autres rôles vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule. Elles participent à l'homéostasie calcique, à la régulation du pH intracellulaire, à la synthèse d'hormones stéroïdes et des hèmes, ainsi qu'à la régulation de la thermogénèse. De plus, elles constituent un des principaux sites de production des radicaux libres qui jouent un rôle clé dans plusieurs voies de signalisation.

III.1. STRUCTURE

La mitochondrie est un organite qui se présente sous plusieurs formes : sphérique, en bâtonnet ou en réseau. Elle est constituée d'une membrane externe, un espace inter-membranaire (EIM) et une membrane interne formant dans l'espace matriciel des invaginations tubulaires ou lamellaires appelées crêtes (**figure 5**).

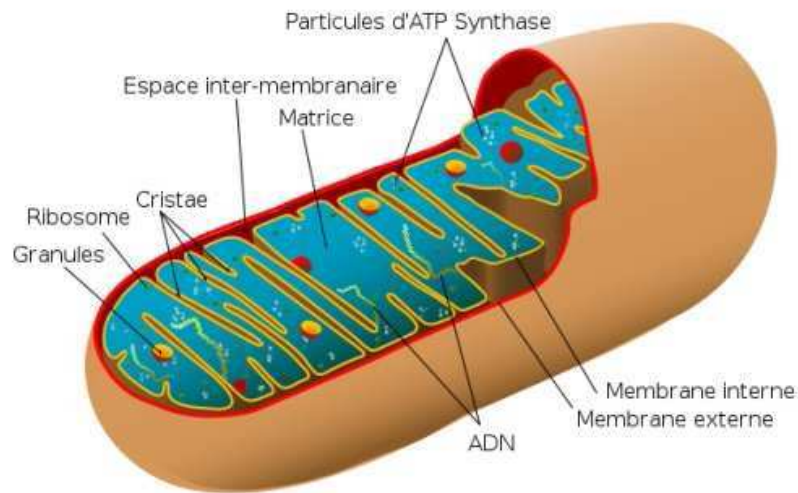


Figure 5: Structure d'une mitochondrie

La membrane externe

C'est une membrane rigide composée d'une bicouche lipidique, correspondant au modèle général des membranes biologiques, dans laquelle un nombre important de protéines sont enchâssées. Ces protéines permettent les échanges entre le cytosol et l'espace intermembranaire de la mitochondrie en formant des pores qui autorisent d'une part la translocation de protéines et qui, d'autre part, permettent les échanges de métabolites de petit poids moléculaire via des porines. La porine, également appelée canal ionique voltage dépendent (VDAC), est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale. Les trois isoformes dénombrées chez les mammifères (VDAC1, VDAC2, VDAC3) présentent des différences de perméabilité (129).

L'espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire (EIM) se situe entre les deux membranes et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire (130). Une des protéines qui occupe un rôle prépondérant dans les transferts d'énergie est la créatine kinase mitochondriale (mi-CK). Elle est fixée sur la membrane interne et a accès à l'ADP qui est généré dans la matrice mitochondriale puis transporté dans l'EIM par l'adénine nucléotide translocase (ANT). D'autre part elle régule l'importation de créatine du cytosol vers l'EIM et l'exportation de phosphocréatine (PCr) de l'EIM vers le cytosol.

La membrane interne

La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective : elle forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Sa perméabilité sélective lui permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites. Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie.

Les complexes de la chaîne respiratoire sont représentés par 5 complexes protéiques, dont l'ATP synthase, ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de protons et la formation d'ATP.

L'ANT est constituée de deux sous-unités de 32 kDa et d'un site unique de liaison à l'ATP ou l'ADP. Selon sa conformation, elle fait face, alternativement, à la matrice ou à l'espace intermembranaire. L'ATP mitochondriale est échangée contre l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1.

Les protéines découplantes (*uncoupling protein species*, UCPs) sont enchâssées dans la membrane interne et permettent le passage de protons de la matrice à l'espace intermembranaire. Ce phénomène de fuite induit un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Une partie de l'énergie est ainsi libérée sous forme de chaleur. Plusieurs isoformes ont été identifiées : UCP1 s'exprime principalement dans la graisse brune tandis qu'UCP3 s'exprime de façon majoritaire dans le muscle squelettique. La fuite des protons permettrait de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone, et donc minimiserait le stress oxydant ainsi que les dégâts au niveau de l'ADN (131), 2004). Les UCPs joueraient un rôle de protection contre le stress oxydant (132).

III.2. DISTRIBUTION ET FONCTION DE LA MITOCHONDRIE

La demande cellulaire énergétique détermine le nombre de mitochondries dans chaque cellule. Une cellule somatique peut contenir ainsi entre 200 et 2 000 mitochondries (133), et la cellule musculaire squelettique fait partie des cellules les plus actives, avec le myocarde, le cerveau et le foie. A l'exception des érythrocytes, les mitochondries se trouvent dans chaque cellule humaine.

L'utilisation de sondes fluorescentes a permis de décrire la mitochondrie comme un réticulum ou un réseau dynamique et continu qui entre continuellement en fusion ou en scission (130). Ces analyses ont permis de regrouper les mitochondries en deux groupes : les mitochondries

inter-fibrillaires et sous-sarcolemmiques. Ces deux types d'organelles présentent des propriétés biochimiques et des niveaux d'activité enzymatique différents et semblent répondre différemment au stress métabolique (134). Les mitochondries sont ancrées dans la cellule grâce à des protéines du cytosquelette et peuvent se déplacer grâce à des protéines dites motrices telles que les myosines, la dynéine ou la kinésine.

La chaîne de transport des électrons

Les éléments clés participant à la transformation d'énergie dans la mitochondrie sont, d'une part, les enzymes qui oxydent les substrats énergétiques et, d'autre part, la chaîne de transport des électrons ou chaîne respiratoire. L'oxydation des substrats (carbohydrates et graisses), dans le cycle des acides tricarboxyliques, connu comme le cycle de l'acide citrique ou le cycle du Krebs, entraîne la réduction du NAD^+ en NADH et du FAD_{2^+} en FADH_2 (**figure 6**). Ces intermédiaires sont appelés équivalents réducteurs et fournissent des électrons.

1. La **voie du cycle de Krebs** est la suivante : le catabolisme du glucose dans le cytosol produit 2 molécules de pyruvate, qui traversent la double membrane mitochondriale pour entrer dans le cycle du Krebs. Ces 2 molécules rencontrent 2 enzymes, la pyruvate déshydrogénase (PDH) et la pyruvate carboxylase. La PDH nécessite une série de coenzymes et substrats pour son fonctionnement : coenzyme A (CoA), qui est dérivée de l'acide pantothénique (vitamine B5), NAD^+ , qui contient de la niacine (vitamine B3), FAD^+ , qui contient la riboflavine (vitamine B2), acide lipoïque et thiamine pyrophosphate qui contient de la thiamine (vitamine B1). La pyruvate carboxylase intervient quand il y a excès d'ATP pour orienter le pyruvate vers la gluconéogenèse. Quand la demande d'énergie est importante, les 2 molécules de pyruvate produisent 2 molécules d'acetyl-coenzyme A (acetyl CoA) qui rentrent dans le cycle de Krebs. Il existe 9 produits intermédiaires. Pour parcourir complètement le cycle de Krebs, les enzymes qui métabolisent ces produits intermédiaires nécessitent une série de co-facteurs : cystéine, fer, magnésium, thiamine, riboflavine, acide pantothénique, acide lipoïque (135). Chaque molécule d'acetyl CoA produit 3 molécules de NADH et 2 molécules de FADH . Alternativement, l'acetyl CoA peut provenir de l'oxydation des acides gras.
2. La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes : le complexe I ou NADH deshydrogénase, le complexe II ou succinate deshydrogénase, le complexe III ou ubiquinol cytochrome c réductase, le complexe IV ou cytochrome c oxydase (COX) et le complexe V ou ATP synthase (**figure 7**). Tous sont composés de plusieurs sous-unités protéiques.

La phosphorylation oxydative

Les complexes I-IV contiennent l'ubiquinone (Coenzyme Q10). Les électrons sont transportés par le NADH et le FADH₂, aux complexes I et II respectivement, complexes qui transfèrent les électrons à l'ubiquinone, cette dernière les acheminant au complexe III. L'arrivée de l'électron au complexe IV par le cytochrome c constitue la fin de la chaîne d'oxydoréduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les réactions associées au passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP (136).

Chance (137) considère que le premier facteur de contrôle de la phosphorylation oxydative est la concentration en ADP extra-mitochondriale. Il observe en effet une relation hyperbolique entre la concentration d'ADP et la respiration mitochondriale. Cependant, d'autres facteurs que l'ADP régulent et jouent un rôle primordial dans la phosphorylation oxydative. Parmi ces facteurs, on compte: 1°) la concentration extra-mitochondriale en Pi, 2°) l'approvisionnement en H⁺, fourni par les différents substrats, 3°) l'activité du cytochrome c- oxydase (complexe IV) (138). Dans les conditions de métabolisme basal, 90% de l'O₂ est consommé par la mitochondrie. De cette consommation mitochondriale, 80% est utilisée pour la synthèse d'ATP et 20% lors de la fuite de protons.

Cette dernière est caractérisée par le retour passif de protons dans la matrice (proton leak), sans passer par l'ATP synthase, donc sans générer d'ATP. Ces fuites membranaires diminuent la force protomotrice et induisent une baisse de l'efficacité du complexe V.(139).

Le cytochrome c-oxydase (COX), accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire (140), est une enzyme majeure pour la respiration mitochondriale. Elle fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire, et permet de catalyser la réaction suivante :

$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$. Cette réaction représente une des étapes limitantes de la vitesse de la phosphorylation oxydative.

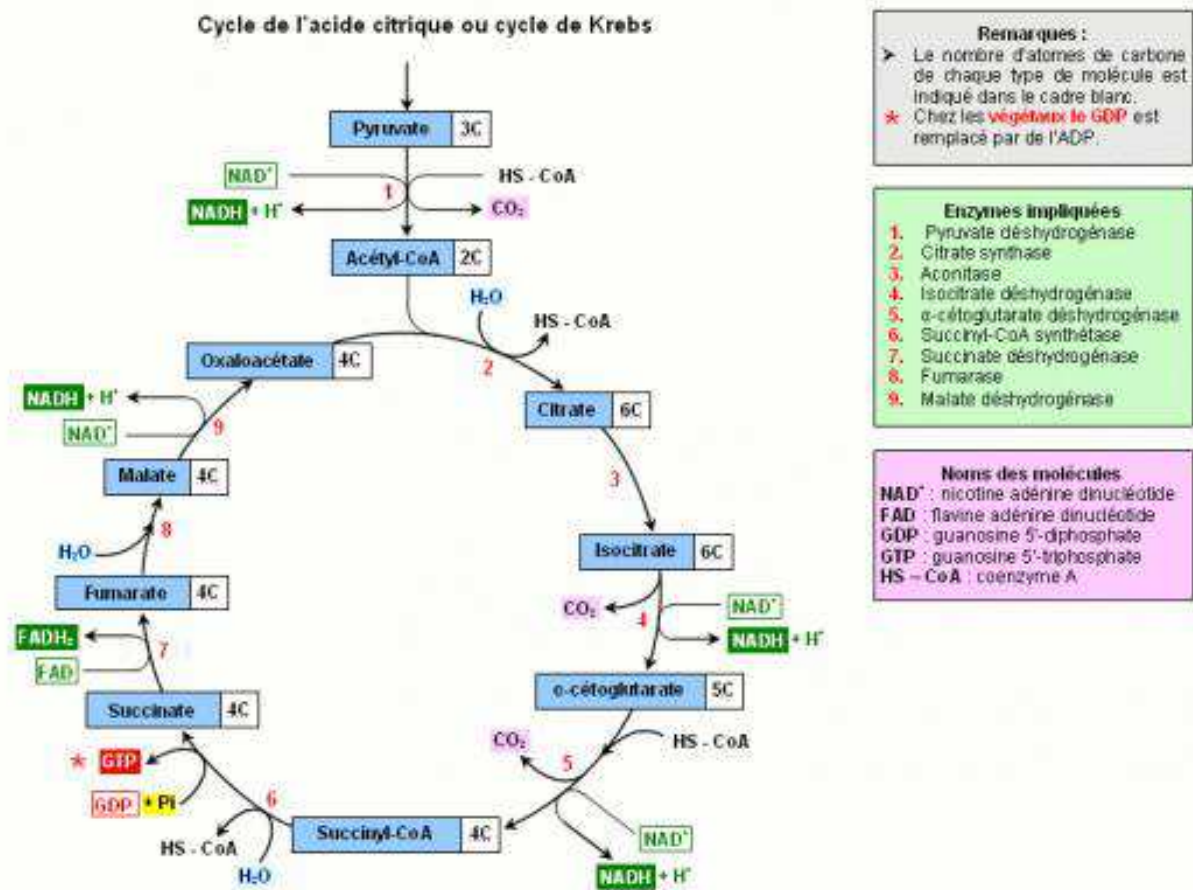


Figure 6 : Cycle du Krebs (extrait de Biologie moléculaire de la cellule. Médecine - Sciences, Flammarion, 3eme édition 1995)

III.3. BIOGENESE MITOCHONDRIALE

Les théories actuelles soutiennent que la mitochondrie provient d'une bactérie aérobie qui a colonisé un ancien procaryote il y a 1 à 3 milliards d'années. Cette théorie explique l'évolution vers la cellule eucaryote, capable d'une respiration aérobie, processus indispensable pour l'évolution vers les organismes pluricellulaires (141). A l'appui de cette théorie est le fait que la mitochondrie est le seul organite cellulaire à avoir de l'ADN. Contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial n'est pas protégé par des histones, impliqués dans la protection et la réparation de l'ADN. Le génome mitochondrial code pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Cette double origine des protéines mitochondriales nécessite une régulation fine et coordonnée de leur expression (142). Il existe ainsi des facteurs régulateurs clés codés par le génome nucléaire qui

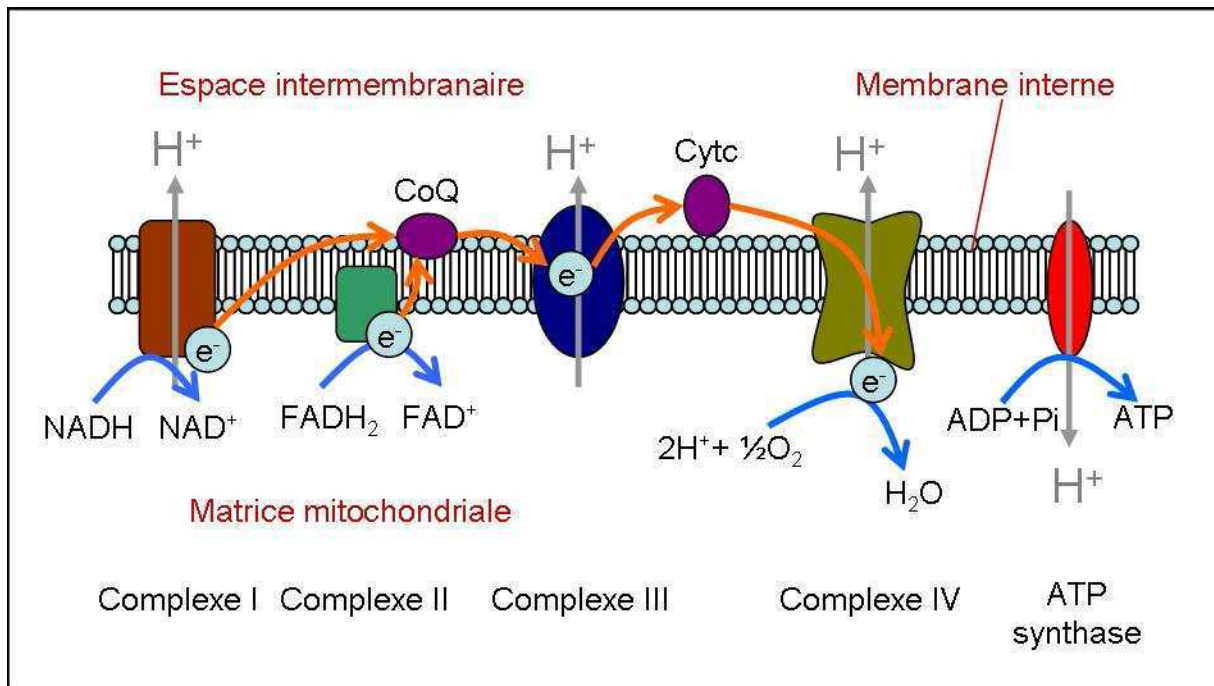


Figure 6: Chaîne de transport des électrons. L'électron est apporté au niveau de la chaîne respiratoire par les équivalents réducteurs : NADH (complexe I) et FADH₂ (complexe II). L'électron est ensuite amené au niveau du complexe IV où il est utilisé pour former de l'eau. Le passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraîne le passage de protons (H⁺) dans l'espace intermembranaire et crée un gradient protonique qui va permettre la formation ATP lors du passage des protons au niveau de l'ATP synthase.

vont permettre, d'une part, la transcription du génome mitochondrial et, d'autre part, l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

La biogenèse mitochondriale peut être définie comme la croissance et la division des mitochondries existantes (143). Ce phénomène est déclenché par le stress environnemental, comme l'exposition au froid, l'exercice, la restriction calorique, et par la division et la différenciation cellulaire.

L'ADN mitochondrial

Le ADNmt humain code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARN (acide ribonucléique) de transfert et 2 ARN ribosomiques. Chaque mitochondrie possède un nombre variable de copies (2 à 10) et une mutation de cet ADN peut être présente sur toutes les copies (homoplasmie) ou seulement sur une partie des copies (hétéroplasmie).

III.3.1. FACTEURS IMPLIQUES DANS LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE

Sirtuin 1 (SIRT1)

SIRT1 est une déacetylase dépendante de NAD^+ impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme la maturation et la différenciation, la sénescence, le métabolisme musculaire squelettique et hépatique. Son activité enzymatique dépendante de NAD^+ est donc corrélée au statut énergétique cellulaire, étant plus élevée en conditions de restriction calorique. Dans le muscle squelettique, SIRT1 intervient dans le métabolisme et la biogenèse mitochondriale par la déacétylation et l'activation de peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 (PGC-1 α). Cela a été démontré sur des cultures cellulaires où les modifications de niveau de protéine SIRT1 étaient suivies de modifications de l'expression des gènes mitochondriaux (144). De plus, toujours dans des cellules en culture, il a été montré que SIRT1 est distribué, outre dans le noyau, aussi dans la mitochondrie, associé à PGC-1 α et TFAM sous la forme de complexes protéiques couplés à l'ADNmt (145). Par contre, in vivo, la corrélation entre l'activité de déacétylation de SIRT1 et son niveau d'expression ARNm ou de protéine ne semble pas clairement établie (146, 147). Il semble que le rôle de SIRT1 diffère en fonction du compartiment cellulaire : l'augmentation de l'activité de SIRT1 au niveau du noyau représente un mécanisme clé dans l'activation de PGC-1 α (148). A l'inverse, l'augmentation de la protéine SIRT1 cytosolique semble s'accompagner d'une diminution de la capacité oxydative et d'une diminution de PGC-1 α . Enfin, l'entraînement chez l'homme et l'exercice aigu et chronique chez l'animal peuvent stimuler l'activité de SIRT1.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 (PGC-1)

PGC-1 α

PGC-1 α est un des facteurs centraux de la régulation de la biogenèse mitochondriale (149, 150) et serait particulièrement impliqué dans le muscle squelettique. Il a été identifié pour la première fois dans la graisse brune grâce à son interaction avec le PPAR γ . Le PGC-1 α est un coactivateur transcriptionnel, ce qui signifie qu'il n'est pas capable de se lier à l'ADN, mais à des nombreux coactivateurs, facteurs de transcription ou récepteurs hormonaux nucléaires. De nombreuses études ont montré que le PGC-1 α est un de régulateurs principaux de la fonction, la respiration et la biogenèse mitochondriale. Il peut interagir avec de multiples facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes codant pour des

protéines mitochondriales. Par exemple, PGC-1 α coactive la transcription des facteurs nucléaires respiratoires 1 et 2 (NRF1 et 2) qui régulent l'activation des gènes codant pour des protéines constituantes de la chaîne d'électrons ou impliquées dans l'importation mitochondriale. Il a été montré que c'est par l'intermédiaire de NRF1 que le PGC-1 α est capable de stimuler la prolifération mitochondriale (150). Récemment, l'ERR α (*estrogen-related receptor*) a été associé aussi à la biogénèse mitochondriale via le PGC-1 α , car des sites récepteurs pour ERR α et NRF2 ont été identifiés sur nombre de gènes codant pour des protéines de la phosphorylation oxydative (151, 152).

PGC-1 α est exprimé en fonction du niveau de métabolisme cellulaire : le niveau de protéine PGC-1 α est plus important dans les tissus qui ont une activité aérobie intense, comme le myocarde, le muscle squelettique et la graisse brune (153, 154).

L'importance de PGC-1 α dans la modulation du contenu mitochondrial dans le muscle squelettique a été démontré à l'aide de cultures cellulaires ou grâce à des études animales où l'expression de ce facteur était altérée (155, 156). Les souris déficientes pour PGC-1 α ont une diminution du nombre de mitochondries et une diminution des capacités oxydatives des muscles lents.

A l'inverse, des études expérimentales induisant un gain de fonction ont montré que la surexpression de PGC-1 α in vivo stimule la prolifération mitochondriale et l'expression des gènes mitochondriaux impliqués dans la phosphorylation oxydative (121, 156).

Une partie des facteurs qui modulent l'activité de PGC-1 α est représentée dans la **figure 7**.

L'augmentation de l'expression de PGC-1 α dans le muscle squelettique est induite par l'**exercice** aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme (157, 158). Cette stimulation semble être induite par l'activation de p38MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) (159). La déplétion d'ATP lors de l'effort physique conduit à l'activation de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*). De plus, l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire active la CaMK (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*), qui, associée à l'AMPK, stimulent le PGC-1 α . La calcineurine A agit également dans la cellule musculaire en activant le PGC-1 α par l'intermédiaire de MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), comme illustré dans la **figure 8**.

Lin et collègues ont montré que la surexpression de PGC-1 α induite par l'exercice dans les fibres rapides du muscle squelettique (121) entraînait la conversion de fibres rapides IIB en fibres de type IIA ainsi qu'en fibres lentes de type I (20 et 10 % respectivement, dans le muscle plantaris). Ces études montrent que l'activité contractile musculaire est un stimulus

majeur qui induit l'expression et l'activation de PGC-1 α , mais son rôle dans les adaptations mitochondriales à l'exercice en endurance n'est pas complètement élucidé. A l'inverse, la sédentarité extrême est associée à une diminution du niveau de protéine PGC-1 α (160).

PGC-1 α pourrait également induire une diminution de la production de stress oxydant, notamment de ROS. En effet, une publication montre que l'expression des enzymes anti-oxydantes augmente parallèlement à celle de PGC-1 α (161).

L'importance de PGC-1 α dans le maintien du volume et de la fonction mitochondriale, ainsi que son implication dans l'adaptation à l'exercice peuvent faire de ce coactivateur une future cible thérapeutique dans la dysfonction mitochondriale.

PGC-1 β

PGC-1 β coactive en partie les mêmes facteurs de transcription que PGC-1 α pour induire l'expression de gènes cibles communs, tels que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial (162, 163).

Cependant, PGC-1 β semble jouer un rôle plus important que PGC-1 α dans la biogenèse mitochondriale du cœur (143, 164). Par ailleurs, il semble que les stimulus métaboliques comme l'exercice n'entraînent pas d'activation de PGC-1 β dans le muscle squelettique, contrairement à PGC-1 α (165).

Nuclear respiratory factors (NRFs): NRF1- NRF2

NRF représente un effecteur en aval de l'axe SIRT1- PGC-1 α et active l'expression des composants de la chaîne mitochondriale, de transporteurs mitochondriaux et des protéines ribosomiques. Par son large rôle de régulateur transcriptionnel, NRF1 est un élément majeur des processus de biogenèse mitochondriale. NRF1 est ainsi particulièrement impliqué dans la régulation de l'expression de la COX mais aussi dans la régulation de la voie de synthèse de l'hème. Un deuxième facteur de transcription nucléaire, NRF2, est également impliqué dans la régulation de l'expression des gènes liés au métabolisme mitochondrial, notamment une sous-unité du complexe IV de la chaîne respiratoire (164). Les facteurs NRF1 et NRF2 régulent en amont le facteur impliqué dans la réplication et la transcription mitochondriale : TFAM (*Transcription factor A, mitochondrial*) qui permet ainsi l'expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux.

Parmi l'ensemble des activateurs associés à PGC-1 α , NRF1 et NRF2 sont ceux qui sont le plus impliqués dans la régulation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire. Le couple de facteurs de transcription NRF1 et NRF2 est ainsi associé à la

régulation de gènes qui codent pour des protéines qui composent les complexes de la chaîne respiratoire et ce chez le rat, la souris mais également chez l'homme (164).

Le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM)

TFAM est un facteur de transcription indispensable au maintien et à la réplication du génome mitochondrial (166).

Le facteur mitochondrial TFAM ainsi que les facteurs NRF1 et 2 sont requis pour la réplication de l'ADN mitochondrial (167), et l'expression de TFAM est corrélée au nombre de copies d'ARNm mitochondrial. En effet, NRF1 et NRF2 induisent tous les deux l'expression de TFAM (142) et une interaction directe entre PGC1- α et NRF1 permet l'induction de l'expression de TFAM à un niveau plus important que celle induite par PGC-1 α seul (150).

Des données relativement récentes démontrent que l'**entraînement physique** chez l'homme âgé, hormis une amélioration de la capacité oxydative musculaire, induit une augmentation du nombre de copies de l'ADN mitochondrial par le biais, en partie, d'une plus importante expression du TFAM (168). Il a été aussi montré que lors de l'entraînement physique les modifications de l'expression de TFAM précèdent les changements de contenu et fonction mitochondriale, argument en faveur d'une implication de l'activité de TFAM dans la biogenèse mitochondriale induite par l'exercice en endurance (169, 170).

III.3.2. BIOGENESE MITOCHONDRIALE ET REponse A L'EXERCICE

L'exercice régulier augmente les capacités d'endurance en améliorant les capacités musculaires d'extraction de l'oxygène, le rapport capillaires/fibres et le contenu mitochondrial. L'augmentation de la densité mitochondriale à l'exercice est bien connue, mais les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces changements sont complexes. Les voies de signalisation à l'exercice impliquées dans la biogénèse mitochondriale sont résumées dans la **figure 9** (171).

Dès le début de la contraction musculaire, des phénomènes d'adaptation apparaissent, entraînant une activation des molécules de signalisation, dont les protéines kinases. Cette voie est activée par l'élévation de Ca²⁺, le turnover de l'ATP (AMP, ADP, Pi), la production des ROS et l'augmentation de la consommation d'oxygène au cours de l'exercice. Ceci a été

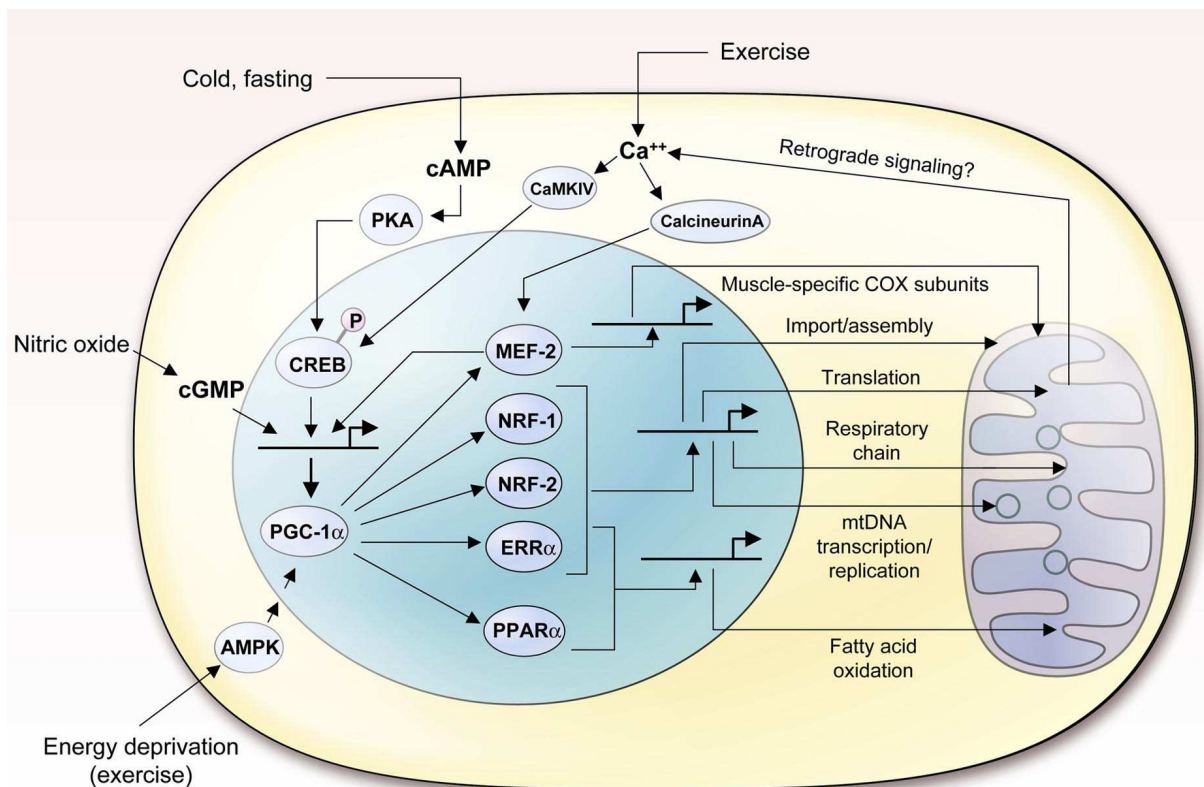


Figure 8: PGC-1 α et son implication dans la biogénèse et la fonction mitochondriale. Dans le noyau (partie bleue) se trouvent les principaux facteurs de transcription (NRF1 et 2, ERR α , PPAR α et MEF-2) qui sont les cibles de PGC-1 α et agissent sur les gènes nucléaires impliqués dans la fonction mitochondriale. Sont indiquées aussi des voies effectrices qui modifient l'expression ou la fonction de PGC-1 α : les niveaux élevés de cAMP conduisent à l'activation de *cAMP response element binding* (CREB), après sa phosphorylation par la protéine kinase A (PKA).; le cGMP induit par l'augmentation d'oxyde nitrique. D'après (164).

démonstré par des manipulations induisant des modifications de la concentration de Ca²⁺ cytosolique et de l'ATP, imitant ainsi les changements induits par l'exercice.

Il est clairement établi que de nombreuses protéines kinases, parmi lesquelles l'AMPK, la *protein kinase B* (Akt), la CaMK et la p38MAPK, sont augmentées à l'exercice. L'activation de ces protéines conduit à la phosphorylation des cofacteurs de transcription (PGC-1 α et β) ainsi que des facteurs de transcription nucléaires (NRF1-2) impliqués dans la régulation de l'expression d'un nombre important de protéines du métabolisme cellulaire. La phosphorylation de ces protéines kinases dépend de l'intensité et de la durée de la contraction musculaire ainsi que du type de fibres sollicités (172, 173).

Il est intéressant de noter que l'élévation de l'expression ou de l'activité des facteurs transcriptionnels a lieu le plus souvent lors de la période de récupération après une séance d'exercice (1-2h) (153), alors que le pic des ARNm est signalé entre 2 et 4h post-exercice

(174). Ceci suggère d'après Ljubicic (172) qu'une période de temps est nécessaire afin de récupérer les ressources énergétiques nécessaires aux processus de d'activation et transcription des facteurs impliqués dans les phénomènes d'adaptation.

III.3.3. BIOGENESE MITOCHONDRIALE ET INSUFFISANCE CARDIAQUE

La dysfonction mitochondriale intervient dans la défaillance énergétique du myocarde et l'aggravation de l'apoptose cellulaire observée dans l'insuffisance cardiaque gauche. Malheureusement, les mécanismes responsables de cette dysfonction sont multiples et partiellement connus, d'où la difficulté à l'heure actuelle d'élaborer des thérapies ciblées. (175). Le PGC-1 α a un rôle central dans la biogenèse et la fonction mitochondriale cardiaque et il a été observé une diminution de ce facteur, ainsi que de l'expression de ses gènes cible dans des modèles animaux de défaillance du myocarde (61, 155). Egalement, les facteurs qui influencent l'expression de PGC-1 α sont modifiés dans les modèles d'insuffisance cardiaque par rapport aux animaux témoins. Les mécanismes d'action de ces différentes voies de signalisation sur l'expression et l'activité de PGC-1 α (la MAPK, la calcineurine, les protéines CREB et l'AMPK, le NO) sont en voie d'élucidation. Par exemple, la suppression de la calcineurine chez la souris transgénique conduit au dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (176) et à l'augmentation du stress oxydant.

En revanche, dans le cœur humain, hypertrophié ou défaillant, la calcineurine peut être activée, diminuée ou inchangée (177). Les stimuli induisant l'hypertrophie cardiaque déterminent une diminution d'activité des protéines CREB corrélée au contenu en PGC-1 α et aux facteurs dépendants de celui-ci, comme le NRF et TFAM, et aussi à la respiration mitochondriale (178). Contrairement au muscle squelettique, dans le cœur il a été montré que la voie p38MAPK est impliquée dans la régulation négative de la biogénèse mitochondriale (179). Les conditions de restriction calorique conduisent à l'augmentation de la biogénèse mitochondriale par la stimulation, via le NO, de SIRT1 et de l'eNOS (nitric oxyde synthétase endothéliale) (180), tous les deux influençant le PGC-1 α .

La diminution de l'activité du complexe PGC-1 α /PPAR α a été rapportée aussi dans le myocarde humain défaillant (60), ainsi que la diminution de l'expression des ARNm ou du niveau de protéine PGC-1 α (59).

Il existe donc actuellement assez d'arguments en faveur de l'hypothèse que la diminution de l'expression de PGC-1 α /PPAR α et de la cascade de transcription dépendante de ce complexe peuvent conduire à la défaillance énergétique dans l'insuffisance cardiaque gauche (143). Au

contraire, la stimulation exogène de la biogénèse mitochondriale dans le myocarde adulte conduit à la défaillance cardiaque, suggérant ainsi l'existence d'un volume optimal mitochondrial, strictement contrôlé par de multiples voies de signalisation.

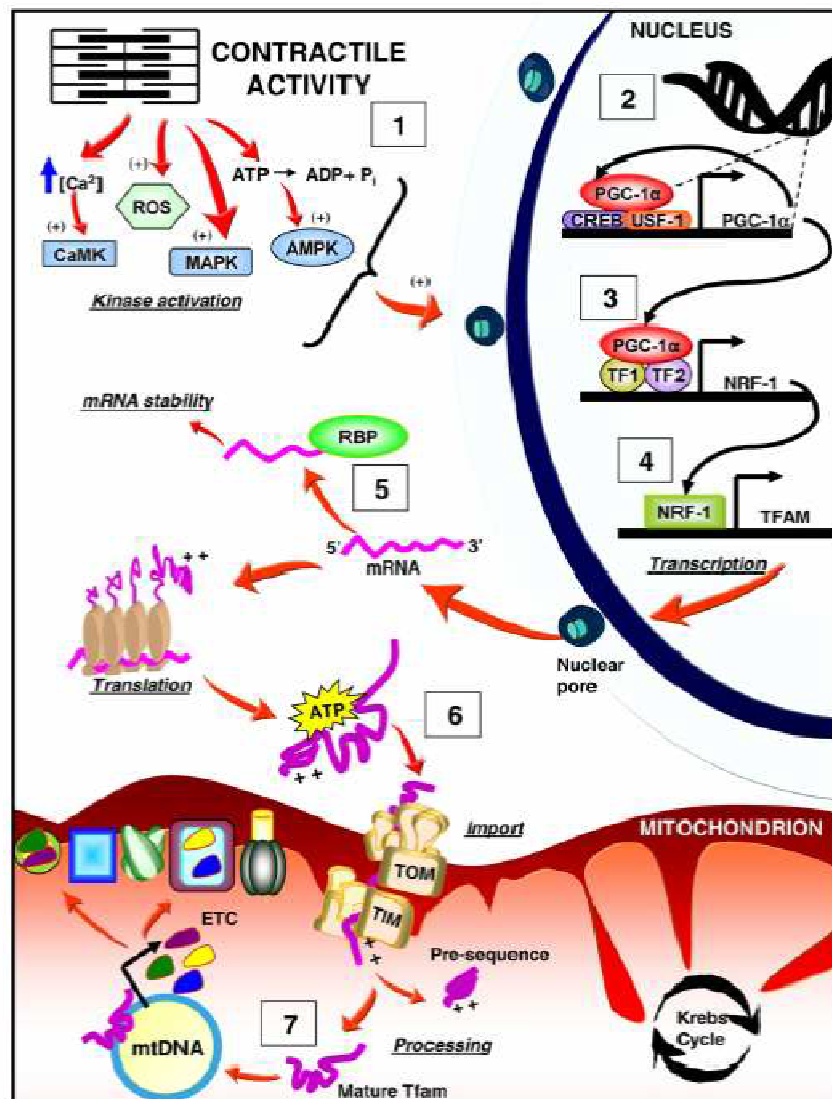


Figure 9 : Facteurs induisant la biogénèse mitochondriale à l'exercice. 1) La contraction musculaire conduit à la production de ROS et à l'activation des protéines kinases (CaMK, MAPK, AMPK). 2-3). Ces voies de signalisation induisent l'activation des facteurs de transcription PGC-1 α et des facteurs nucléaires respiratoires NRF1 et NRF2. 4) NRF1 active le facteur de transcription mitochondrial A (TFAm). 5) Ces protéines sont transcrites dans le noyau et exportées dans le cytoplasme sous forme de mARN. 6) Après translation, conversion en précurseur protéique. 7) Importation du précurseur dans la mitochondrie et synthèse de la forme mature de TFam avec induction des protéines encodées par l'ADN mitochondrial (mtDNA) qui, avec les protéines codées par l'ADN nucléaire, vont s'assembler pour former les sous-unités de la chaîne de transport des électrons. (d'après (171)).

CHAPITRE IV:

PLACE ET PROPRIETES DE L'EXERCICE EXCENTRIQUE

TYPES DE CONTRACTION MUSCULAIRE

Contraction concentrique

On parle de contraction musculaire concentrique lorsque les deux extrémités du muscle se rapprochent, se raccourcissent. Cette contraction musculaire entraîne la production d'une force concentrique et d'un mouvement dynamique segmentaire. On peut alors calculer la puissance concentrique (Puissance = force x vitesse).

Contraction excentrique

Lors de la contraction excentrique, les extrémités musculaires s'éloignent, entraînant un allongement du muscle. La force excentrique développée entraîne un déplacement qui va générer une puissance excentrique.

Par exemple, la course à pied en montée implique principalement des contractions en mode concentrique, alors que la course à pied en descente fait appel majoritairement à des actions musculaires excentriques, permettant de ralentir ou amortir la chute du corps ou d'un segment dans la locomotion. Les interactions entre les filaments d'actine et de myosine expliquent la différence entre ces différentes modalités de contraction (**figure 11**).

MECANISMES DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

Le muscle squelettique est caractérisé par l'alternance de bandes claires et foncées (**figure 10**), justifiant ainsi son appellation de muscle strié. Les bandes claires correspondent aux filaments d'actine ou filaments fins ; les bandes foncées correspondent aux filaments épais de myosine. L'actine et la myosine sont les deux protéines contractiles et c'est leur prépondérance et leur disposition dans la cellule musculaire qui détermine les qualités du muscle squelettique et cardiaque. Le mécanisme de la contraction musculaire est basé sur le glissement des myofilaments. Cela implique que les filaments de myosine (bande A) gardent une longueur constante, tandis que les filaments d'actine (bande I) se déplacent en dedans et en dehors. Ce processus se déroule en 4 étapes, pendant lesquelles l'énergie chimique fournie par l'ATP est transformée en énergie mécanique. :

1. La tête de myosine, pliée sur elle-même, est liée à l'actine pour former des ponts transversaux.

2. Une molécule d'ATP en se fixant sur la tête de myosine, va permettre la dissociation des ponts actine –myosine et le dépliement de la tête de myosine.
3. L'ADP et le phosphate résultant de l'hydrolyse de l'ATP restent liés à la tête de myosine qui, ainsi activée, s'attache au site d'actine le plus proche.

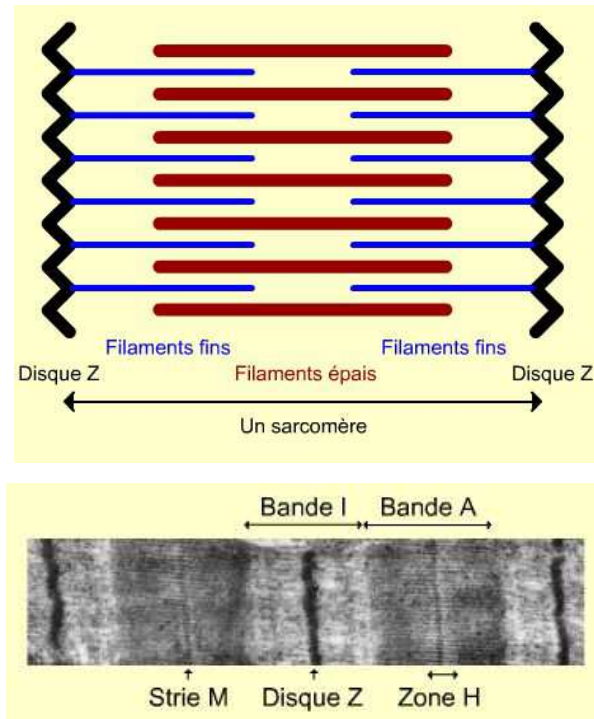


Figure 10 : Aspect strié du muscle squelettique. En haut, diagramme montrant la disposition des filaments d'actine et de myosine. En haut, image de microscopie électronique d'un sarcomère.

4. La tête de myosine se replie de nouveau sur elle-même entraînant la molécule d'actine dans son mouvement. Ce déplacement libère les molécules d'ADP et phosphate, laissant le site disponible pour une nouvelle molécule d'ADP.

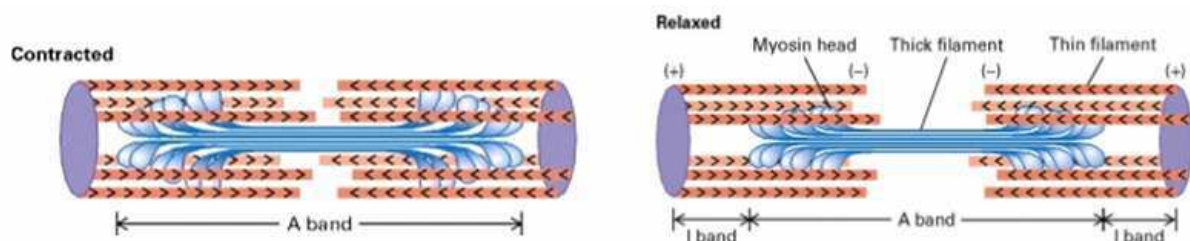


Figure 11 : Contractions concentrique et excentrique. Lors du raccourcissement du sarcomère, les filaments d'actine se déplacent vers le milieu; lors de son allongement, leur déplacement se fait vers l'extérieur. Les filaments de myosine ne varient pas pendant ces contractions.

IV. 1. PROPRIETES DU REGIME DE CONTRACTION EXCENTRIQUE

IV. 1. 1. PARTICULARITES PAR RAPPORT AU REGIME CONCENTRIQUE

L'exercice excentrique a fait l'objet d'études de physiologie de l'exercice dès le début des années 1950 (181). Il consiste à opposer une force musculaire (force de freinage) à une force créée soit par l'effet de la gravité soit par un élément extérieur.

En mode concentrique, le muscle exerce une action motrice et libère de l'énergie, le travail réalisé est dit "positif". En mode excentrique, le muscle supporte un travail externe et exerce une action frénatrice, absorbant l'énergie développée par la charge externe imposée. Le travail réalisé est dit "négatif". Ainsi, les actions musculaires concentriques permettent la réalisation de mouvements corporels comme la locomotion ou la préhension, tandis que les actions excentriques génèrent des mouvements antigravitaires, de freination, permettant par exemple de ralentir le pas ou de descendre les escaliers.

La particularité des exercices excentriques est de mettre en jeu le complexe musculotendineux en étirement après qu'il ait été activé(182, 183). L'allongement forcé du complexe muscle-tendon qui accompagne alors la production de force est désigné sous le terme de *lengthening contraction* en opposition au régime d'action concentrique (*shortening contraction*).

Lors de la contraction musculaire excentrique, l'énergie absorbée peut être i) dissipée sous forme de chaleur et le muscle fonctionne alors comme un amortisseur (action frénatrice lors de la descente des escaliers par exemple), ii) stockée de manière temporaire en énergie potentielle élastique pour être restituée par la suite (lors d'une course, par exemple).

Reich et collaborateurs (184) ont comparé le comportement du muscle à un ressort qui emmagasine et restitue de l'énergie de manière cyclique. L'enchaînement cyclique rapide de contractions excentriques et concentriques lors de la locomotion (marche, course) est classiquement désigné sous le terme de cycle "étirement-détente" (**figure 12**).

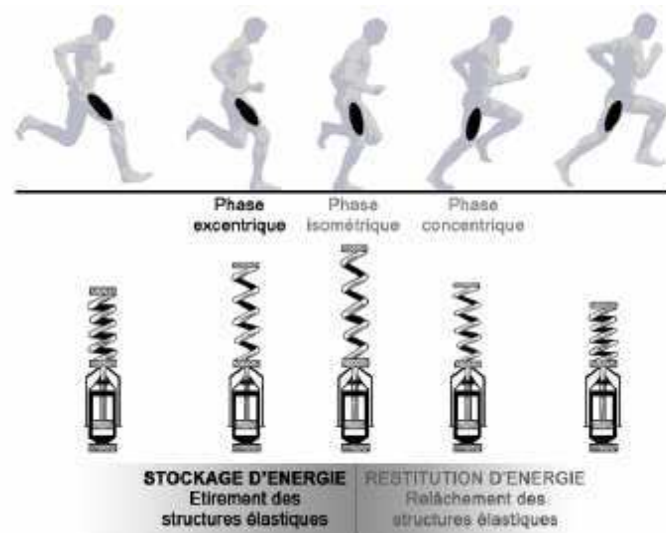


Figure 12 : Représentation schématique du comportement du muscle lors du cycle "étirement-détente". Lors de la course, l'énergie potentielle stockée par les structures élastiques musculotendineuses pendant la phase excentrique est restituée lors de la phase concentrique. Le comportement du muscle est schématisé par un ressort qui s'étire puis se relâche, libérant l'énergie élastique emmagasinée. D'après (184).

IV. 1. 2. PRODUCTION DE FORCE

COUPLE DE FORCE

La contraction musculaire excentrique conduit à l'étirement des éléments contractiles, qui restituent en retour une énergie génératrice d'une force additionnelle, lorsque cette contraction excentrique est immédiatement suivie d'une contraction concentrique.

La majorité des études qui se sont intéressées à la production de force en mode excentrique a montré que le couple de force produit en mode excentrique est supérieur à celui généré par une contraction concentrique.

Par contre, l'augmentation de la force en excentrique semble plus marquée après entraînement en régime excentrique et, à l'inverse, l'augmentation de la force en concentrique est plus importante après entraînement en mode concentrique (185). Le gain de force semble modalité d'exercice-dépendant, mais cette affirmation n'est pas consensuelle (186).

STRATEGIES D'ACTIVATION MUSCULAIRE

Le meilleur rendement musculaire en excentrique peut également s'expliquer par des stratégies d'activation centrale spécifiques à ce mode d'action.

Lors de contractions excentriques sous-maximales et maximales, il a été montré, par des études électroencéphalographiques, une activité corticale plus précoce et intense comparée à celle enregistrée après contractions concentriques (187). Il a aussi été montré que pour des actions musculaires en excentrique, l'activité électromyographique (EMG) recueillie par des électrodes de surface était inférieure à celle recueillie en concentrique (188) (**figure 13**), en faveur d'un recrutement préférentiel des fibres rapides. Cette diminution du signal EMG correspond, selon les auteurs, soit à une réduction de la fréquence de décharge (189) soit à un recrutement moins important en excentrique, ce qui conduit à la répartition du stress mécanique sur un plus faible nombre d'unités motrices (190, 191).

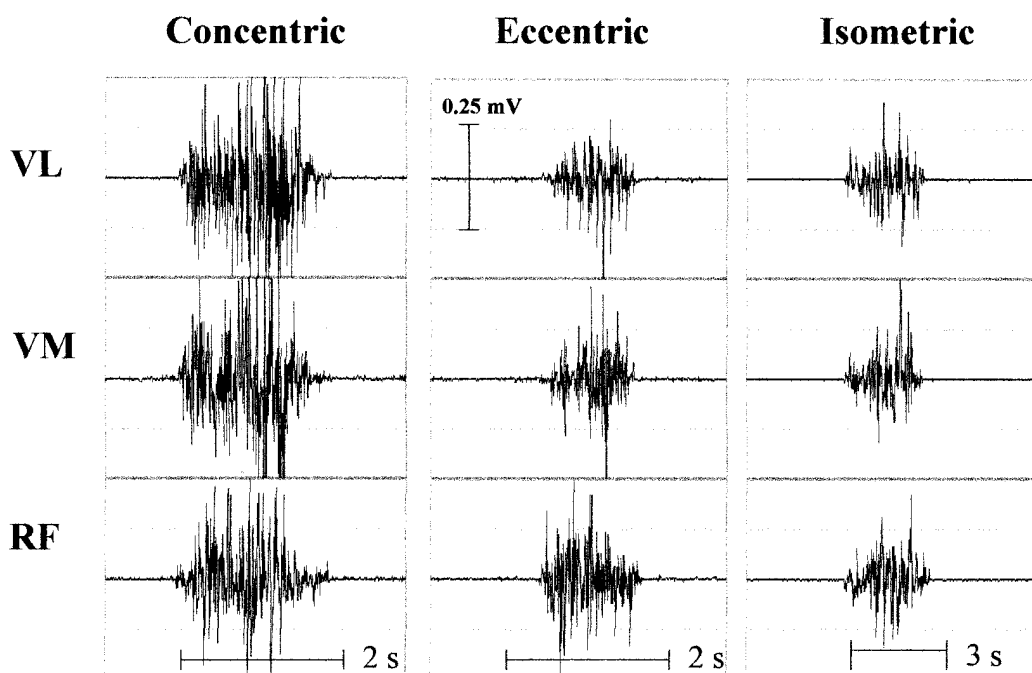


Figure 13 : Signaux électromyographiques de surface. Activité électromyographique dans les chefs vastus latéralis (VL), vastus médialis (VM) et rectus femoris (RF) du quadriceps lors de contractions concentriques, excentriques et isométriques à 25% d'une contraction volontaire maximale. D'après (188).

Ceci induit que la tension unitaire développée par chaque fibre musculaire active est donc plus importante en mode excentrique à même intensité de contraction, ce qui explique le meilleur rendement musculaire. Malheureusement, le tissu musculaire n'est pas préparé à

supporter de telles contraintes mécaniques qui peuvent être largement supérieures à celles développées dans la vie quotidienne et/ou dans les exercices habituels de travail de la force musculaire (192). Ainsi, des dommages musculaires peuvent apparaître après des exercices excentriques. Ceux-ci peuvent être très importants et invalidants au point que les exercices excentriques aigus et intenses ont été et continuent à être utilisés comme modèle expérimental pour l'étude des mécanismes de dégénérescence et de régénérescence musculaires.

IV. 1. 3. FAIBLE COUT METABOLIQUE

La rupture dite "mécanique" de certains ponts d'actine-myosine au cours de la contraction musculaire excentrique entraîne le détachement forcé de la tête de myosine par la force d'étirement sans dépense d'ATP, réalisant ainsi une contraction musculaire à plus faible coût énergétique. Depuis les premiers travaux en 1950, les différences mécaniques et métaboliques entre les modalités de contraction musculaire concentrique et excentrique ont été étudiées avec attention. Aujourd'hui il est admis que les exercices excentriques, à même intensité absolue, consomment 4 à 5 fois moins d'O₂ que les exercices concentriques (193) (**figure 14**) et ce, sans contribution majorée des métabolismes anaérobies (194).

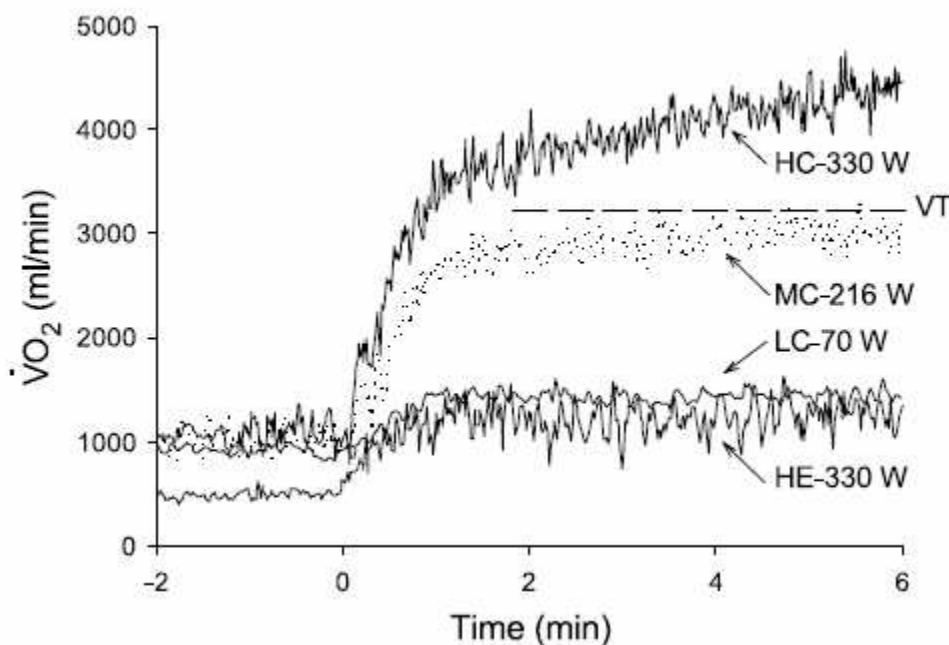


Figure 14: Consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$) pendant 2min en condition basale à 15W puis pendant 6 min à haute intensité (HC-330W), moyenne intensité (MC-216W) et basse intensité (LC-70W) en mode concentrique, et à haute intensité en mode excentrique (HE-330W). A même intensité d'exercice (330W), la consommation d'oxygène est 4 fois moins importante lors d'un exercice excentrique (HE-330W) qu'au cours d'un exercice concentrique (HC-330W). D'après (193).

En conséquence, pour une même dépense énergétique, les puissances mécaniques et les forces musculaires qu'il est possible de développer avec des exercices excentriques sont également 4 à 5 fois plus élevées, rendant ce type d'exercice extrêmement intéressant pour produire des stimuli musculaires mécaniques importants en minimisant les stimuli métaboliques.

C'est ce qui a été montré dans l'étude princeps d'Abbott et coll. (181, 195), qui ont développé l'un des tous premiers prototypes d'ergocycle excentrique à l'aide d'un système formé par deux ergocycles reliés par un système de chaînes (photo). Ainsi, lorsque le premier sujet pédalait en mode classique, concentrique, il activait le pédalier du second vélo dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Le second sujet devait alors appliquer une résistance et s'opposer au mouvement, s'exerçant ainsi en mode excentrique. *L'histoire nous raconte que Mme Ritchie qui travaillait en excentrique était alors capable d'empêcher son mari M. Bigland de pédaler en concentrique.*

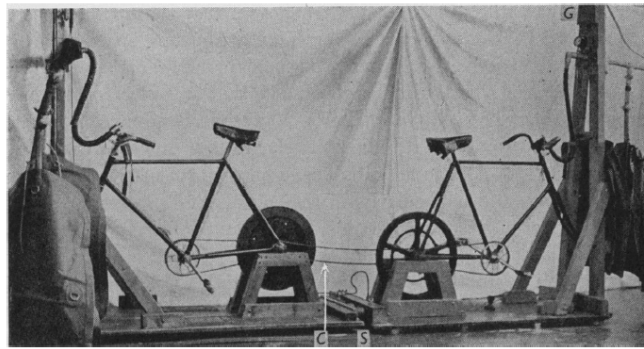


Photo: Cycloergomètre excentrique modifié par Abbott, 1952. Un cycliste pédale dans le sens conventionnel (en avant) pendant que le second cycliste pédale à l'envers (en arrière). Au cours du pédalage, la tension de la chaîne (C) rejoignant les plateaux tire les deux bicyclettes simultanément, entraînant la compression d'un système tampon rempli d'eau (S). Cette compression est enregistrée par une jauge (G) et affichée devant chaque sujet.

L'ensemble de ces éléments suggère que l'allongement du complexe musculotendineux observé en excentrique optimise la production de force. Le stockage d'énergie potentielle élastique et sa restitution par les composantes contractiles élastiques lors du cycle étirement-détente permet de générer une force additionnelle sans consommation d'ATP. Par ailleurs, le moindre recrutement des unités motrices à un niveau de force donnée, mais aussi la rupture forcée de certains ponts d'actine-myosine, participent à l'économie de l'énergie totale utilisée par le muscle.

IV.1.4. SPECIFICITE CARDIOVASCULAIRE DE L'EXERCICE EXCENTRIQUE

Les caractéristiques mécaniques de l'exercice excentrique ont été largement détaillées dans la littérature et utilisées dans des modèles expérimentaux, dans le domaine de la performance chez le sportif ou de la pathologie chronique. La spécificité métabolique de l'exercice excentrique, caractérisé par un faible coût énergétique, est démontrée par des études cardio-circulatoires. Knuttgen et coll. (196) ont montré que, à même puissance mécanique lors d'exercice de pédalage excentrique, le débit cardiaque (Q) et la fréquence cardiaque (FC) étaient environ deux fois moindres que lors du pédalage en concentrique. Lorsque l'exercice excentrique est réalisé à même VO_2 , la réponse du débit cardiaque et la FC sont supérieures à celles de l'exercice classique concentrique. Cette propriété est évidente lorsque la VO_2 approche 1 l/min et que la puissance mécanique est environ 4 à 5 fois supérieure en excentrique vs. concentrique (196, 197).

Dufour et collaborateurs (198) ont comparé les ajustements cardio-circulatoires chez 8 adultes sains après un exercice exhaustif concentrique vs. excentrique, réalisé à même charge métabolique, et ont observé une augmentation de 17% de la FC et de 27% du débit cardiaque (Q) après exercice excentrique.

Lorsque la demande métabolique est la même, l'activité électromyographique mesurée par électrodes de surface est supérieure en excentrique comparée au mode concentrique (199). Dans ce contexte, les niveaux de tension musculaire imposés par le régime excentrique pourraient être impliqués dans les mécanismes à l'origine de la réponse circulatoire. La sensibilité des ajustements circulatoires a été démontrée chez l'homme (200) où l'ergocycle excentrique a été utilisé comme un modèle expérimental permettant d'induire une stimulation mécanique importante pour une demande métabolique limitée. Ainsi, les stimuli mécaniques régulent environ 25% de la réponse du Q et 34% de la FC lors du pédalage. C'est par contre la demande métabolique qui est le facteur principal dans l'ajustement des paramètres cardio-circulatoires au cours de l'exercice : elle participe à hauteur de 75% pour le Q et 66% pour la FC.

Au total, les ajustements cardio-circulatoires induits par l'exercice sur ergocycle sont générés par les stimuli mécaniques pour 25% et par la demande métabolique pour 75%. A même puissance mécanique qu'un exercice en modalité concentrique, le débit et la fréquence cardiaques sont inférieurs en régime excentrique, la demande métabolique étant plus faible. Lorsque l'exercice excentrique est réalisé à même demande métabolique, les réponses du

débit cardiaque et la FC sont supérieures à celles induites par l'exercice classique concentrique.

IV. 1. 5. DOMMAGES MUSCULAIRES

Définition et manifestations cliniques

L'allongement musculaire forcé imposé par le régime excentrique est associé à des niveaux de tensions très importants, provoquant une altération du cytosquelette et des microlésions des fibres musculaires.

Ces dommages se caractérisent par une désorganisation plus ou moins complète de certains sarcomères avec perturbation de la ligne Z, des lésions du réticulum sarcoplasmique, du sarcolemme et des tubules transverses (**figure 15**). Lorsque les lésions sont importantes, une rupture de la ligne Z ou de la ligne A a pu être observée (201).

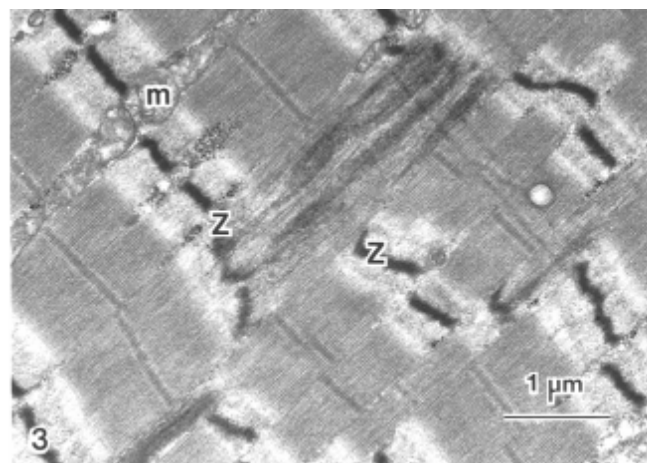


Figure 15 : Fibre musculaire photographiée en microscopie électronique. Perte de l'alignement de la ligne Z (Z) par rupture après exercice excentrique. m : mitochondrie. D'après (202).

L'exercice excentrique intensif et/ou inhabituel est le principal pourvoyeur de douleurs et de raideurs musculaires retardées appelées *Delayed onset muscular soreness* (DOMS), que l'on appelle communément "courbatures". Elles surviennent dans les 12 à 48 heures pour atteindre un pic entre 24h et 72h avant de disparaître en 5 à 7 jours.

Les DOMS sont accompagnés d'une diminution de la force musculaire variant selon les auteurs de -10 à -60% de la force maximale isométrique (203, 204). La persistance de la perte

de force après exercice excentrique est, chez l'homme, un marqueur indirect du dommage musculaire (205).

Lors d'une contraction excentrique d'intensité modérée et comparée à une contraction concentrique, la perte de force observée est similaire dans les deux cas (de l'ordre de 10 à 30%) mais elle perdure au-delà de 24 heures après exercice excentrique, alors qu'en régime concentrique elle revient à la normale dans les heures qui suivent (206). Lors d'exercices excentriques à haute intensité (générant une action excentrique maximale), la perte de force peut atteindre 50-65 % par rapport aux valeurs initiales avant exercice. La perte de force est réversible et, dès le second exercice, la réduction de force est moindre par rapport à la première séance. Des études animales ont montré que cette perte de force après exercice excentrique aigu est liée au dommage musculaire induit par de fortes tensions musculaires : désorganisation myofibrillaire par rupture des sarcomères associée à une perte des protéines contractiles, responsable dans un second temps d'une déficience dans le couplage excitation-contraction (205). Les fibres de type II (IIb en particulier) sont préférentiellement touchées (207, 208) et cette atteinte peut en partie s'expliquer par le recrutement préférentiel des unités motrices rapides en modalité d'exercice excentrique.

Marqueurs biologiques

Les enzymes musculaires, telles que la créatine kinase (CK) et la lactate déshydrogénase (LDH), sont des marqueurs sanguins du dommage musculaire. Les CK sont des marqueurs indirects des dommages musculaires à l'exercice et, plus particulièrement, de la modification de la perméabilité du sarcolemme (209, 210). Cependant, il existe une grande variabilité individuelle de réponse selon les individus et le type d'exercice. Ainsi, par exemple, lors de la course en descente chez le rat, on observe un pic de CK de 100-600 UI (Unité Internationale) après 12-24h (211, 212), tandis qu'après plusieurs contractions musculaires excentriques à haute intensité, l'élévation des CK n'apparaît qu'après 48h avec des valeurs beaucoup plus élevées, comprises entre 2000-10 000 UI, qui perdurent pendant 4 à 6 jours. Le dosage des CK reste un marqueur indirect qualitatif, plus que quantitatif, du dommage musculaire avec des variations d'amplitude importante selon le type d'exercice excentrique réalisé.

Etiologies

De nombreuses étiologies ont été proposées pour expliquer la physiopathologie des DOMS. La théorie du stress mécanique et de l'inflammation sont celles qui sont le plus d'argumentées.

- La théorie du "stress mécanique"

L'exercice excentrique est associé à des lésions très localisées du cytosquelette avec, en particulier, une désorganisation de certains sarcomères, pouvant aller jusqu'à la rupture de ceux-ci. L'étirement forcé conduit à de nombreuses lésions cellulaires incluant une rupture de la ligne Z, un élargissement de la ligne A, une désorganisation des sarcomères et une rupture du cytosquelette immédiatement après l'exercice. La sévérité de ces atteintes dépend de l'intensité et de la durée de l'exercice, de la longueur musculaire et des propriétés musculotendineuses préalables. Il a été montré *in vivo* que les lésions du cytosquelette et des protéines contractiles apparaissent dans les 15 minutes après le début d'exercice excentrique, alors que les lésions cellulaires n'apparaissent qu'à la fin de l'exercice.

Lors d'un exercice excentrique aigu, certains sarcomères sont plus susceptibles que d'autres à la rupture. Une des hypothèses est l'existence d'une instabilité des sarcomères. Selon la courbe tension-longueur, cette instabilité se manifeste sur la pente descendante de la courbe, lorsque la superposition des filaments fins et épais est réduite et que le nombre de ponts d'union est faible (**figure 16**) (213).

Dans ces conditions, le sarcomère est instable et la force musculaire produite s'affaiblit au fur et à mesure de la poursuite de l'étirement forcé, jusqu'à rupture complète du sarcomère. La répartition des sarcomères étirés au-delà de leur condition physiologique se fait de manière aléatoire au sein des fibres musculaires.

Les propriétés mécaniques du système musculo-squelettique jouent également un rôle dans le dommage musculaire. Certaines études montrent que ce sont les muscles les plus "rigides", où le complexe aponévrose-tendon est peu compliant à l'allongement forcé, qui sont susceptibles de subir le plus de dommages.

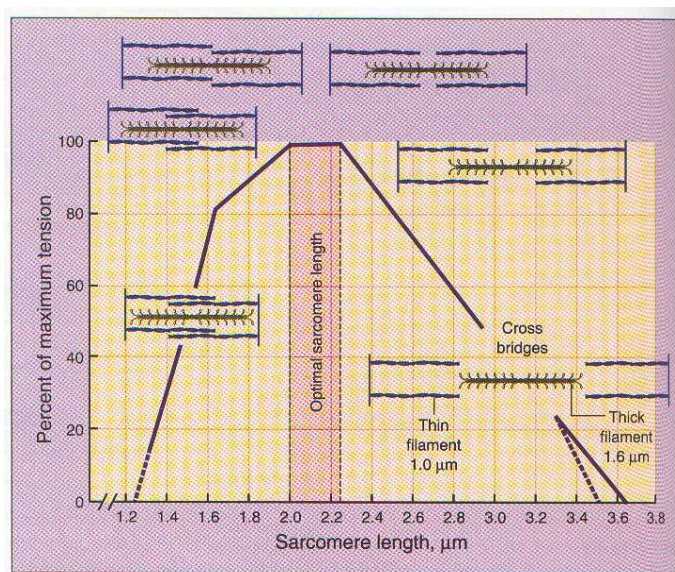


Figure 16: Relation tension-longueur. Phase ascendante correspondant à l’allongement progressif du sarcomère corrélé à l’augmentation progressive de la force musculaire jusqu’à une phase de plateau où la longueur optimale du sarcomère entraîne une superposition des filaments d’actine et de myosine responsables de la production de force maximale. Phase descendante où l’allongement du sarcomère entraîne une instabilité par diminution du nombre de ponts d’union, favorisant la rupture des myofibrilles et participant au dommage musculaire. D’après Mc Ardle W, *Exercise Physiology : Energy, Nutrition, And Human Performance*. Williams & Wilkins, 4th Revised edition 1996.

Des études sur des souris ne possédant pas de protéines de structure telle que la desmine (Sam *et al.*, 2000) ont montré qu’elles subissaient moins de dommages que des souris saines réalisant le même exercice excentrique. La compliance musculaire de ces souris modifiées étant plus élevée, le nombre de sarcomères risquant d’être lésés est réduit.

- La théorie de l’inflammation

L’apparition des signes cliniques 24 - 48h après l’exercice suggère que le dommage musculaire ne peut être directement et uniquement lié à cette théorie mécanique. Ainsi la théorie de l’inflammation, même si elle a souvent été remise en cause, reste confortée par une multitude de travaux et permettrait en partie d’expliquer la poursuite du dommage mais aussi le processus de régénération qui apparaît et qui permet la poursuite de l’exercice. Armstrong et coll. (Armstrong, 1984) ont été les premiers à proposer une cascade d’évènements selon laquelle l’exercice excentrique induit initialement des lésions musculaires mécaniques, qui conduisent dans un second temps à des dommages cellulaires avec apparition de phénomènes inflammatoires. Les dommages musculaires initiaux des structures contractiles induisent

l'apparition de dommages de la membrane cellulaire. La rupture des membranes entraîne la libération des marqueurs du dommage tels que la créatine kinase et perturbent l'homéostasie calcique des fibres lésées, à l'origine d'une nécrose cellulaire 48h après l'exercice.

A ce stade initial succède l'activation des cellules mononuclées musculaires. La libération de certains facteurs pro-inflammatoires, tels que le TNF- α , l'interleukine 1 et 8 (IL-1, IL-8), va permettre aux polynucléaires neutrophiles (PNN) circulants d'envahir les tissus musculaires. Dans un second temps, les PNN vont activer les phagocytes, qui vont éliminer les débris nécrotiques et activer les cellules satellites qui vont préparer le muscle au processus de régénération (**figure 17**) (214). Les ROS produits par les phagocytes vont être libérés dans le cytosol.

De nombreuses études aussi bien chez l'homme (215, 216) que chez l'animal (217, 218) ont montré une augmentation de la production de ROS après exercice excentrique. Leur rôle n'est pas clairement établi, mais il semble que leur effet dépende de leur niveau de production.

En effet, les ROS sont responsables *in vitro* d'atteintes des myotubes lorsqu'ils sont mis en présence de fibres musculaires intactes (219), mais ils agissent aussi comme des molécules de signalisation, en contrôlant l'activité de nombreux facteurs de transcription et modulant l'expression des gènes contrôlés par ces facteurs (220, 221). Ces facteurs de transcription incluent le facteur nucléaire kappa-B (NF κ B) et HSF1 (*heat shock factor*), qui vont induire une augmentation des enzymes antioxydantes et activer la voie des *heat shock proteins*, permettant de protéger le muscle de dommages ultérieurs. Les ROS servent donc de signal pour les phénomènes de régénération musculaire.

IV. 2. ADAPTATIONS MUSCULAIRES INDUITES PAR L'EXERCICE EXCENTRIQUE CHRONIQUE

IV. 2. 1. EFFETS DE LA REPETITION DES SESSIONS

L'exercice excentrique, lorsqu'il est intensif et inhabituel, induit des dommages musculaires et la cascade précédemment décrite. De nombreuses études ont montré que la réalisation d'une séance d'exercice excentrique préalable diminuait l'apparition du DOMS lors de la deuxième session réalisée classiquement à 1 semaine d'intervalle (202, 222-224). Ce phénomène adaptatif lié à la répétition des sessions est appelé " effet de répétition "(*repeated bout effect*).

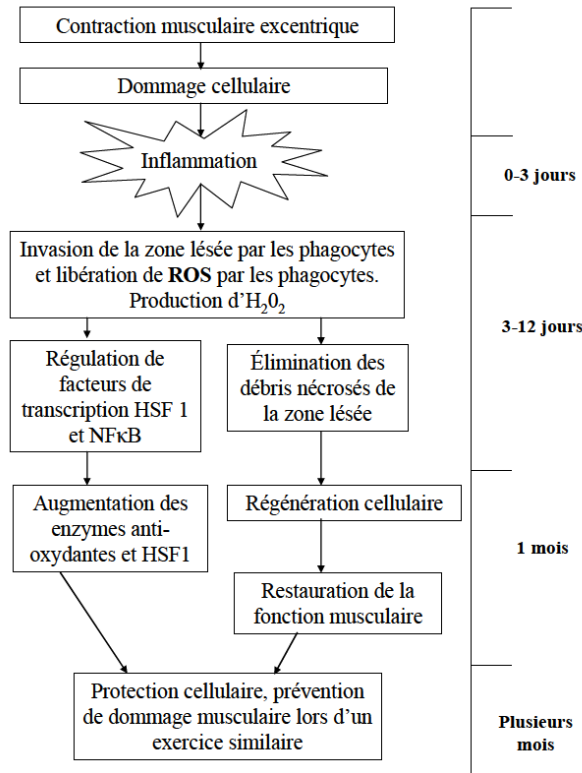


Figure 17 : Relation entre ROS et dommage musculaire, incluant le rôle potentiel des ROS dans les processus de réparation après dommage. Modifié d'après (225).

Cette adaptation à l'exercice se manifeste par une diminution des lésions musculaires, du largage des CPK et des chaînes lourdes de myosine et s'associe à une moindre diminution de la perte de force lors de la deuxième session d'exercice. Selon les auteurs, ce processus adaptatif à l'exercice excentrique varie de quelques semaines à 6 mois (226). L'importance du DOMS et le taux de CPK lors de la première session vont influencer l'amplitude de l'effet de répétition, ce qui peut expliquer que la répétition des exercices n'a pas les mêmes effets chez tous les individus. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer ce phénomène adaptatif. Tout d'abord, le recrutement plus important d'unités motrices lentes, responsables d'une meilleure répartition du stress mécanique sur les fibres musculaires, permettrait de diminuer le dommage musculaire en réduisant la rupture des myofibrilles (227). La réorganisation des protéines du cytosquelette (*i.e.* desmine et titine) va permettre l'alignement des sarcomères et une augmentation de la quantité de tissu conjonctif dans le muscle (228). Une augmentation du nombre de sarcomères en série est une autre hypothèse avancée pour expliquer l'effet protecteur de la répétition des sessions. Lynn et Morgan (229-231) ont montré chez l'animal une augmentation du nombre de sarcomères en séries pour pallier à

l'instabilité du sarcomère lors de l'allongement forcé. Ceci a aussi été montré chez l'Homme (232) et éviterait la rupture des sarcomères.

La répétition des sessions d'exercice excentrique diminuerait aussi les phénomènes inflammatoires en réduisant l'activation des monocytes et des polynucléaires neutrophiles (233). Ceci serait en rapport avec une diminution du nombre de myofibrilles lésées, sans qu'il soit cependant possible de préciser si cette adaptation en est la cause ou la conséquence (203).

IV. 2. 2. AMELIORATION DE LA FORCE

Si les dommages induits par l'exercice excentrique induisent une perte de force plus importante et prolongée que l'exercice concentrique, ce phénomène est réversible avec la répétition des séances. Ainsi, l'entraînement en excentrique (répétitions des séances), va permettre d'obtenir des gains de force musculaire plus importants (184, 234, 235). Chez l'homme, il a été rapporté une augmentation de force isométrique maximale 3,5 fois plus élevée après 6 semaines d'entraînement excentrique des muscles extenseurs du genou, comparée à un entraînement de même durée en concentrique (235). Lors de protocoles de plus longue durée, ces résultats sont confirmés avec des gains de force supérieurs obtenus après entraînement excentrique *vs.* entraînement concentrique.

D'autres modalités d'entraînement, telles que des exercices de pédalage sur cycloergomètre, permettent d'améliorer la force musculaire de 10 à 60% de la force musculaire maximale initiale des membres inférieurs (236-238). Ainsi, chez des sujets actifs, 8 semaines d'entraînement sur ergocycle excentrique *vs.* concentrique, réalisé à 55-65% de la FC, améliorent de 30% la force isométrique sans générer de douleurs musculaires (236, 237). Chez des sujets âgés, 10 semaines d'entraînement utilisant l'ergocycle excentrique améliorent la force isométrique de 60% (238).

Enfin, les gains de force obtenus en excentrique dépendent du mode de contraction testé. Le principe de spécificité de gains de force est retenu par de nombreux auteurs. Cependant l'entraînement excentrique est aussi capable d'augmenter la force concentrique maximale d'un groupe musculaire (239).

IV. 2. 3. MODIFICATIONS DES STRUCTURES MUSCULAIRES

Après entraînement en excentrique, les gains de force sont objectivés au niveau des analyses musculaires : augmentation de la surface de section des fibres musculaires chez l'homme

(236) et augmentation significative du nombre de sarcomères en série chez l'animal (229, 240).

Hypertrophie musculaire, typologie des fibres

L'entraînement excentrique conduit à un gain de la force via une augmentation de la masse musculaire. Les programmes d'entraînement utilisant des protocoles excentriques conduisent à une hypertrophie musculaire beaucoup plus importante que les protocoles d'entraînement concentrique (241). Higbie et coll.(239) ont montré une augmentation de la surface de section musculaire du quadriceps après entraînement en excentrique pendant 10 semaines comparée au même protocole réalisé en concentrique. Des résultats similaires ont été retrouvés par Hortobagyi (242). L'équipe de Lastayo (236) a montré, chez des sujets sains s'entraînant sur ergocycle, que le groupe "excentrique" présentait une augmentation de 52% du diamètre de section des fibres musculaires après entraînement.

L'exercice excentrique représente une contrainte mécanique particulière pour la cellule musculaire qui peut modifier l'expression de certains gènes. Ainsi, après exercice excentrique, il a été montré chez l'animal et chez l'homme une activation des gènes de la croissance (IGF-1) impliqués dans le processus d'hypertrophie musculaire (243, 244).

Lors de l'entraînement excentrique, on observe une modification de la typologie des fibres qui est similaire à celle observée lors de programme d'entraînement en résistance. Ainsi, l'hypertrophie musculaire induite par les protocoles d'exercice excentrique chez l'animal comme chez l'homme prédomine sur les fibres musculaires de type intermédiaire (IIa, IIa/IIb) (235).

Modifications des propriétés architecturales et mécaniques

Comparativement aux actions concentriques, l'entraînement en mode excentrique induit des modifications architecturales afin d'optimiser l'activité contractile des muscles sollicités. Il a été montré chez l'homme, après 10 semaines d'entraînement en excentrique du quadriceps, une augmentation de 21% de l'angle de pennation du muscle vaste latéral contre 13% après entraînement concentrique (185). Ceci permet d'augmenter la production de force en mettant à disposition une plus grande quantité de matériel contractile par unité de tendon ou d'aponévrose. L'augmentation de la longueur des fascicules musculaires augmente également la vitesse de contraction musculaire et les capacités de production de force. Ceci a été montré sur des études réalisées sur le muscle squelettique strié chez le rat (245).

Par ailleurs, l'entraînement excentrique conduit à une augmentation du nombre de sarcomères en série pour corriger l'instabilité mécanique liée au manque d'adhésion entre l'actine et la myosine lors de l'allongement du muscle (229, 246). Morgan et Allen (231) ont montré chez le rat une augmentation de 11% du nombre de sarcomères en série dans les fibres musculaires après un entraînement en course en descente sur tapis roulant. Ces modifications de la longueur musculaire favorisent la vitesse de contraction et la production de force maximale et témoignent de l'adaptation post-exercice excentrique.

Après entraînement excentrique, la raideur des structures musculaires élastiques et tendineuses augmente (247). Ce phénomène pourrait être le résultat d'une réorganisation des protéines du cytosquelette (telles la desmine ou la titine) responsables de l'alignement des sarcomères. Ces modifications d'élasticité après exercice excentrique joueraient également un rôle dans la restitution d'énergie mécanique et la production de force à moindre coût.

IV. 3. INTERET ET PLACE DE L'EXERCICE EXCENTRIQUE DANS LA READAPTATION A L'EFFORT

L'exercice excentrique permet de développer des niveaux de force importants avec un faible coût énergétique et une consommation d'oxygène moindre. Quels que soient les mécanismes sous-jacents, l'exercice excentrique permet de modifier le couplage puissance mécanique/puissance métabolique observé dans les actions musculaires concentriques. L'exercice excentrique a également un effet protecteur vis-à-vis du dommage musculaire. Enfin, la tolérance cardio-circulatoire des exercices excentriques, lorsqu'ils sont réalisés à des niveaux d'intensité sous maximale, est très bonne.

L'ensemble de ces propriétés confère à l'exercice excentrique un intérêt dans le domaine de la performance chez le sportif mais également dans le domaine de la réadaptation à l'effort chez les patients présentant une pathologie chronique.

Pour le clinicien, ce mode d'exercice est intéressant chez des sujets présentant une limitation cardio-respiratoire importante car ce régime d'entraînement, lorsqu'il est réalisé à des intensités sous maximales, va leur permettre de développer des capacités aérobies à moindre coût sans générer de douleurs, ni de complications respiratoires ou cardio-circulatoires. Steiner et collaborateurs (186) ont montré, chez des patients coronariens, après 8 semaines d'entraînement en ergocycle excentrique vs. ergocycle concentrique réalisées à 85% de la FCmax, une amélioration spécifique de 9-15% de la force musculaire maximale des membres

inférieurs dans le groupe "excentrique". Une autre étude a montré une amélioration de la fraction d'éjection de 5 % chez des patients coronariens après entraînement excentrique et pas de modification après entraînement concentrique (248). De plus, la post-charge du VG (résistances vasculaires systémiques) n'était pas majorée. Le régime d'exercice excentrique chez les patients coronariens peut ainsi être utilisé en toute sécurité.

Chez des patients souffrant de broncho-pneumopathie obstructive chronique, l'ajout d'exercices sur ergocycle excentrique aux exercices habituels au cours d'un programme de réentraînement de 10 semaines améliore les performances à l'exercice (249). Un entraînement de 12 semaines comportant, en plus du programme de rééducation classique, des exercices en résistance en mode excentrique chez des patients présentant une maladie de Parkinson a montré une amélioration de la qualité de vie (augmentation de la distance de marche et des capacités de monter et descendre les escaliers) (250, 251). Chez les patients diabétiques, l'ajout d'exercices excentriques à un entraînement classique de 16 semaines améliore la tolérance au glucose (252).

Chez la personne âgée, deux études mettent en avant l'intérêt de protocole de réentraînement en mode excentrique. La première (253) montre, chez 21 sujets âgés de 81 ans en moyenne, qu'un entraînement sur cycloergomètre excentrique à raison de 3 séances (de 10 à 20 minutes) par semaine, pendant 11 semaines, augmente la force musculaire isométrique, diminue le risque de chute et améliore l'équilibre par rapport au groupe contrôle qui s'entraîne en résistance. Par ailleurs, cette étude montre que lorsque l'intensité de l'exercice excentrique est basée sur la perception de la difficulté de l'exercice (échelle de Borg), cela permet au patient d'ajuster l'intensité de l'exercice et de poursuivre ainsi l'entraînement pendant 11 semaines. La deuxième étude (254) confirme l'intérêt d'un entraînement progressif sur cycloergomètre excentrique chez des sujets âgés de 81 ans en moyenne, et montre une augmentation significative de la force musculaire du quadriceps comparé au groupe contrôle.

Enfin, plus récemment, chez des patients suivis pour un cancer, 12 semaines d'entraînement excentrique génèrent une augmentation de 12% de la force musculaire du quadriceps et améliorent la qualité de vie, par comparaison à des patients sédentaires bénéficiant d'un suivi conventionnel (255).

En conclusion, l'exercice excentrique possède des propriétés physiologiques particulières pour lesquelles les applications dans le domaine de la performance sportive sont nombreuses. Ces applications commencent aussi à se développer dans le domaine de la pathologie chronique et du vieillissement. Les programmes d'entraînement excentrique,

lorsqu'ils sont réalisés à intensité faible à modérée, sont très bien tolérés d'un point de vue cardio-respiratoire et permettent de développer une force musculaire notable à moindre coût métabolique. Seul ou en association avec l'exercice concentrique, l'entraînement en modalité excentrique pourrait avoir une place dans la réhabilitation des patients HTAP.

PROBLEMATIQUE

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est caractérisée par une augmentation progressive et permanente des résistances vasculaires pulmonaires due à la vasoconstriction et à un important remodelage vasculaire, conduisant à l'hypertrophie ventriculaire droite. Cette réponse adaptative initiale est suivie, dans les stades avancés, par l'insuffisance cardiaque, caractérisée par l'augmentation des pressions de remplissage et la chute du débit cardiaque. Comme la fonction du ventricule droit (VD) est un des plus importants facteurs pronostiques de la maladie, la compréhension des mécanismes cellulaires qui conduisent à sa défaillance devient une priorité. Mais le VD est étroitement lié au VG avec lequel il partage une paroi, le septum. Le VD et le VG sont reliés par la circulation pulmonaire. La défaillance d'un de ces 3 maillons peut influencer la fonction de 2 autres.

De plus, certains auteurs considèrent l'HTAP comme une maladie systémique où l'on peut observer une véritable « myopathie » caractérisée par une atteinte des muscles périphériques et respiratoires, qui contribue par elle-même au pronostic et à la détérioration de la qualité de vie des patients.

L'exercice physique intense est réputé avoir un effet délétère sur l'évolution de la maladie. Les recommandations internationales publiées récemment autorisent une activité physique dans les limites d'une dyspnée modérée et tolérable, mais soulignent la nécessité d'études complémentaires afin d'établir les objectifs et les modalités des programmes de réentraînement.

Comparé à l'exercice concentrique, l'exercice excentrique permet de développer une puissance musculaire supérieure pour un coût métabolique moindre. Utilisé pour développer la puissance musculaire, l'exercice excentrique, lorsqu'il est réalisé à intensité faible ou moyenne, a un intérêt en pratique clinique quotidienne chez des patients présentant une pathologie chronique, notamment cardio-respiratoire. Toutefois l'exercice excentrique, lorsqu'il est pratiqué de manière intense et inappropriée, est responsable d'effets délétères à type de dommages musculaires, et en conséquence, de limitations fonctionnelles souvent importantes.

La mitochondrie joue un rôle central dans la production d'énergie du muscle cardiaque et périphérique. Les réponses à l'exercice en mode concentrique participant à l'amélioration des capacités musculaires oxydatives sont bien connues, tant chez l'homme que chez l'animal. Par contre, les effets de l'exercice excentrique sur les capacités oxydatives et sur la fonction

mitochondriale restent peu étudiés. Il en est de même pour les mécanismes d'adaptation après entraînement excentrique, qui restent à préciser.

A ce jour, l'effet spécifique de l'entraînement physique en modalités excentriques sur la biogenèse et la fonction mitochondriale du muscle périphérique et du ventricule droit n'a pas été étudié dans l'HTAP. C'est l'objet de cette thèse au cours de laquelle, à partir d'un modèle animal, le rat à qui a été injecté de la monocrotaline, nous nous sommes proposé dans un premier temps d'étudier la chronologie de la détérioration de la fonction oxydative mitochondriale du VD, du VG et du muscle squelettique gastrocnémien afin d'observer si elle apparaît de façon concomitante dans les trois muscles et à quel stade de l'insuffisance cardiaque. Dans un second temps nous nous sommes intéressés à l'effet de l'exercice excentrique chronique sur la survie, l'hémodynamique et les modifications musculaires cardiaques et squelettiques.

Au cours de ce travail de thèse, 2 parties ont été développées :

1^{ère} ETUDE : L'altération de la fonction mitochondriale du muscle squelettique précède celle du ventricule droit dans l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline

Nous nous sommes demandé si le VD, qui lutte contre une post-charge élevée, présentait des anomalies mitochondriales plus précoces que le muscle squelettique. Si cette hypothèse était confirmée, un potentiel effet délétère de l'exercice physique répété sur l'énergétique myocardique, et donc sur la fonction cardiaque droite, serait d'autant plus probable. Très peu d'études se sont intéressées aux capacités oxydatives mitochondriales au cours de l'évolution de l'hypertension pulmonaire, et la biogénèse mitochondriale n'a jamais été étudiée. En parallèle, nous nous sommes intéressés à la respiration et la biogénèse mitochondriale dans le ventricule gauche (VG) qui présente, dans cette pathologie, des modifications histologiques et de fonction contractile. Cette première partie a donc été conçue afin d'étudier la respiration et la biogénèse mitochondriale précocement, à 2 semaines après l'injection de monocrotaline chez le rat et tardivement, à 4 semaines. Le premier point dans le temps correspond au stade d'hypertrophie ventriculaire droite et le deuxième au stade d'insuffisance cardiaque droite, compensé ou décompensé. Les muscles analysés ont été le VD, le VG et le muscle squelettique gastrocnémien.

2^{ème} ETUDE : Effets de l'entraînement en modalité excentrique sur la tolérance hémodynamique, la survie et la biogénèse mitochondriale dans l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline

Dans la deuxième partie de cette thèse nous nous sommes intéressés à l'effet de l'entraînement en modalité excentrique sur la tolérance hémodynamique et la biogénèse mitochondriale dans le même modèle « rat-monocrotaline ». Notre hypothèse était que cette modalité d'entraînement devrait être bien supportée sur plan hémodynamique et pourrait améliorer la capacité à l'exercice. Le but ultime de cette recherche est, en clinique humaine, d'éventuellement associer l'exercice excentrique à l'exercice concentrique dans le programme de réentraînement afin d'améliorer la tolérance à l'effort et la qualité de vie des patients atteints d'HTAP.

MATERIELS ET METHODES

Cette partie, qui présente les deux protocoles expérimentaux constituant ce travail, décrit la méthodologie utilisée et les techniques mises en œuvre.

L'ensemble des expérimentations animales a été réalisé selon les recommandations en vigueur et après obtention des autorisations du comité d'éthique en recherche animale de l'Université de Strasbourg.

1^{ère} ETUDE : L'ALTERATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE SQUELETTIQUE PRECEDE CELLE DU VENTRICULE DROIT DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE ?

I.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Cette expérience a été réalisée en utilisant le modèle « rat-monocrotaline » (MT), modèle bien établi dans cette pathologie. L'hypertension pulmonaire a été induite par l'injection intrapéritonéale de 60mg/kg de monocrotaline (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). Nous avons étudié 2 séries d'animaux (rats mâles Wistar, Dépré, Saint-Doulchard, France) pesant 250 ± 35 g. Une première série a été étudiée à 2 semaines après l'injection, soit de monocrotaline (MT2, n=15), soit d'un même volume de solution saline (CL2, n=10). La deuxième série a été étudiée à 4 semaines après l'injection, série aussi divisée dans un groupe « monocrotaline » (MT4, n=12) et un groupe témoin (CL4, n=10). Le groupe MT4 a été observé afin de détecter des signes de décompensation cardiaque : léthargie, polypnée, poils hérissés, perte de poids > 5 %/jour et présence d'un épanchement pleural ou péritonéal. Les animaux qui présentaient ces signes ont été inclus dans le sous-groupe « décompensé » (MT4d, n=5) alors que ceux qui n'avaient pas ces signes ont constitué le groupe « compensé » (MT4c, n=7).

I.2. PRELEVEMENTS MUSCULAIRES

Le jour du sacrifice, les rats sont anesthésiés par inhalation de 3,5 % d'Isoflurane (Aerrane®, S.A.S Baxter), dans une chambre d'induction, puis placés sur un support chauffant. L'anesthésie est entretenue en ventilation spontanée par inhalation de 2% d'Isoflurane au masque facial.

La partie superficielle du muscle gastrocnémien (glycolytique) de la patte arrière droite et gauche, ainsi que le cœur sont prélevés. Les ventricules droit et gauche sont isolés et pesés. Le rapport VD/VG + septum est utilisé comme index d'hypertrophie ventriculaire droite. Le muscle gastrocnémien de la patte **gauche** est plongé immédiatement dans une solution S à

4°C, avant dissection des fibres musculaires pour l'étude des paramètres de la respiration mitochondriale. Le muscle de la patte **droite** est congelé dans de l'azote liquide et gardé à -80°C pour analyse ultérieure des ARNm de la biogénèse mitochondriale, de la protéine PGC-1 α et de l'activité de la citrate-synthase. Les ventricules droit et gauche sont coupés en plusieurs fragments, traités de la même façon que le muscle squelettique (un fragment pour l'étude de la respiration mitochondriale et les autres pour l'analyse des ARNm, de la protéine PGC-1 α et de l'activité de la citrate-synthase).

Après prélèvement des muscles, les rats sont euthanasiés par exsanguination au niveau de l'aorte abdominale.

I.3. PROTOCOLES D'ETUDE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE SUR FIBRES PERMEABILISEES

La technique des fibres musculaires perméabilisées à la saponine (KuznetsovAV, NatProtoc, 2008) permet d'étudier les propriétés fonctionnelles de l'ensemble de la population des mitochondries in situ. Il s'agit d'une technique utilisée en routine dans notre laboratoire, décrite dans les publications et les thèses de l'équipe EA 3072. Elle est détaillée dans l'**Annexe 1**.

I.4. DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA CITRATE-SYNTHASE

Principe : La citrate-synthase est une enzyme du cycle du Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétylCoA. Le CoA réduct formé lors de la réaction réagit avec le DTNB (5,5'- Dithio-bis(2 nitrobenzoic acid)) pour donner du TNB qui absorbe spécifiquement à 412 nm. L'activité de la citrate-synthase est donc mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm.

Méthode : 50 mg de muscle congelé sont homogénéisés par broyage et mélangés à une solution tampon d'homogénéisation contenant 5mM HEPES, 1mM EGTA (éthylène glycol bis (2-aminoethyl) – tetraacetic acid) et 1mM DTT (dithiothreitol).

Le mélange ainsi obtenu est supplémenté avec du Triton X-100 à 0,1% et mis en incubateur sur glace pendant 60 minutes en vortexant toutes les 15 minutes, afin d'obtenir l'extraction enzymatique complète. Après 5 minutes de centrifugation à 3000 rpm, le surnageant est prélevé et conservé à -80° jusqu'à l'utilisation. L'activité de la citrate-synthase est déterminée par spectrophotométrie (Biomate, Thermo Scientific), à 412 nm et température de 30°. Dans la micro-cuve de 1 ml du spectrophotomètre sont ajoutés 10 μ l d'échantillon et 0,94 ml de

tampon préparé le jour même, contenant : 0,1mM DTNB-Tris pH 8, 0,3 mM acétyl CoA et de l'eau. La lecture se fait pendant 4 minutes, après la lecture de la ligne de base (blanc). La réaction est déclenchée par le rajout dans la cuve de 50µl d'acide oxalo-acétique 10 mM.

L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité de base en nmoles/min/mg de protéines.

I.5. DOSAGE DE LA PROTEINE PGC-1 α

La détermination de la concentration de la protéine PGC-1 α a été effectuée dans le VD, le VG et le muscle gastrocnémien par l'Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA, USCN Life Science Inc, China).

Les fragments de muscle ont été réduits en poudre grâce au Sartorius (Mikrodismembrator, Germany), homogénéisés et centrifugés 5 minutes à 5000 g dans du PBS (0.02M/ pH~7.0-7.2). La concentration de protéines, par BioRad protein assay en utilisant la BSA (albumine sérique bovine) comme standard, a été déterminée dans le surnageant qui a été ensuite aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation. La quantité de protéine dans chaque échantillon était de 15µg. La concentration de la PGC-1 α (ng/µg de protéine) a été déterminée dans chaque échantillon et comparée avec une courbe standard. Finalement, les valeurs ont été exprimées en ratio de la quantité de PGC-1 α par mg de protéine.

I.6. q-RT-PCR QUANTITATIVE

Cette technique permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente: le SYBR green. Ce fluorochrome a la propriété de s'incorporer dans le petit sillon de l'ADN double brin et n'est fluorescent que sous cette forme. Au cours de chaque cycle d'amplification, lors de l'élongation, la quantité de fluorochrome fixé à l'ADN augmente ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence mesurée en fin de chaque cycle.

L'augmentation de la fluorescence détectée par un spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé.

Par cette méthode a été déterminé le niveau d'expression de SIRT1, PGC-1 α , NRF1 et TFAM, ainsi que de la citrate-synthase. La description de la méthode est dans l'**annexe 2**.

2^{ème} ETUDE : EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE SUR LA TOLERANCE HEMODYNAMIQUE, LA SURVIE ET LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE

II.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL (figure 18)

Le modèle animal utilisé a été aussi le rat monocrotaline, mais une dose de 40 mg/kg a été injectée, en sous-cutané. Cette étude a été réalisée sur 40 rats répartis en 4 groupes : un groupe témoin sédentaire (CLsed, n=7), un groupe témoin entraîné (CLEcc, n=7), un groupe monocrotaline sédentaire (MTsed, n=13) et un groupe monocrotaline entraîné (MTecc, n=13). Les groupes témoins ont été injectés avec le même volume de solution saline que les rats monocrotaline.

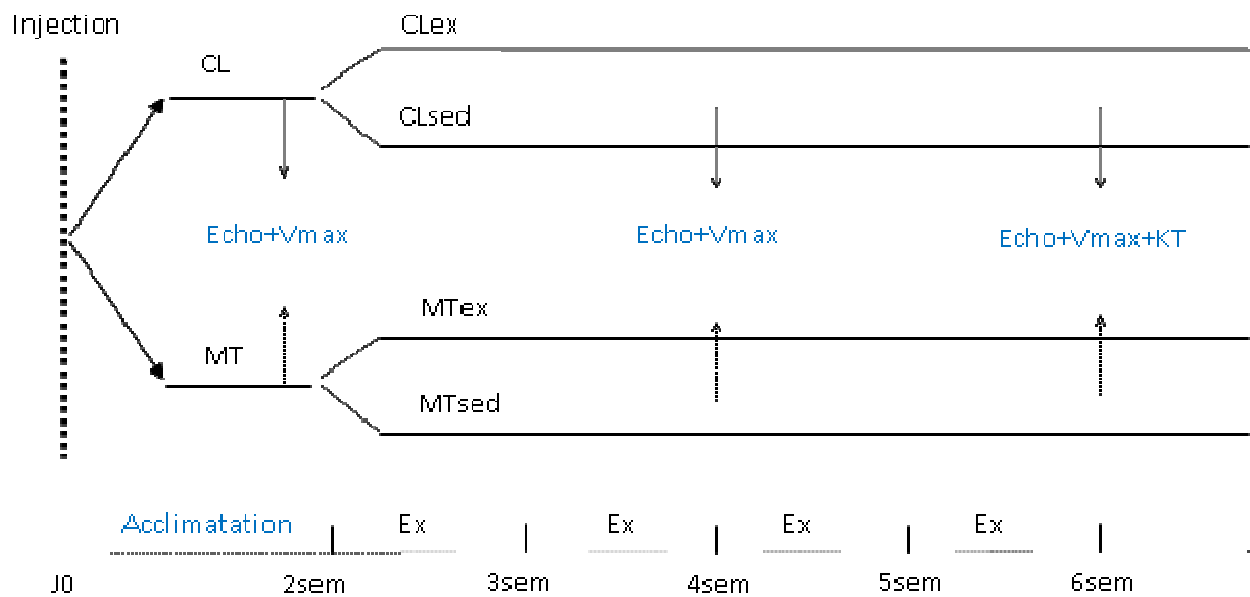


Figure 18: Protocole expérimental. L'entraînement a débuté à 2 semaines après l'injection et a duré 4 semaines. CL - rats témoins ; MT - rats monocrotaline ; Echo - échographie cardiaque ; V_{max} - vitesse maximale lors d'une épreuve d'effort incrémentale; KT – cathétérisme cardiaque

II.2. EPREUVE D'EFFORT INCREMENTALE

Afin de déterminer la vitesse de course imposée lors de l'entraînement, nous avons réalisé une épreuve d'effort incrémentale sur tapis roulant le jour précédant le début d'entraînement. La pente du tapis a été fixée à -15° . Après 3 minutes d'échauffement à 20 cm/s, la vitesse du tapis était augmentée toutes les 90 secondes de 10 cm/s. La vitesse maximale (V_{max}) était la vitesse plus élevée qui pouvait être maintenue plus de 30 secondes. Les rats ont été stimulés à l'exercice par des chocs électriques générés par une grille métallique placée à l'arrière du tapis. Le tapis était arrêté si le rat arrivait sur la grille électrique 3 fois de suite. La vitesse de course lors de l'entraînement a été établie à 50% de la vitesse maximale, ce qui correspond à environ 65% de la VO_{2max} mesurée en modalité excentrique (mesures réalisées dans notre laboratoire). Le test incrémental a été refait au mi-parcours de l'entraînement, c'est à dire après 14 jours et la vitesse de course d'entraînement a été ajustée afin de tenir compte des modifications de V_{max} et de poursuivre à 50% de la V_{max} réelle. Un dernier test a été effectué à la fin des 4 semaines afin d'estimer le bénéfice de l'entraînement.

II.3. ENTRAINEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE

Les rats ont réalisé un entraînement en modalité excentrique sur tapis roulant à 5 couloirs (Panlab®, S.L, Barcelona, Spain). Après l'injection de monocrotaline, les rats ont été habitués à la course sur le tapis roulant tous les 2 jours (**figure 19**). Cette acclimatation consistait en une course à plat pendant 5 minutes à une vitesse de 15 cm/s. L'entraînement a débuté 2 semaines après l'injection, en modalité excentrique (en descente), avec une pente du tapis de -15° (**figure 20**). La durée de l'entraînement a été de 30 minutes/jour, 5 jours/semaine pendant 4 semaines. L'entraînement débutait par une période d'échauffement de 3 minutes à 20 cm/s, ensuite la vitesse du tapis était progressivement augmentée à une valeur correspondant à 50% de la vitesse maximale de course déterminée lors de l'épreuve incrémentale. Cette vitesse a été ajustée après 2 semaines. Les tests incrémentaux ont remplacé une séance d'entraînement. Les rats sédentaires, monocrotaline et témoins, ont également été mis sur le tapis tous les 2 jours pendant 5 minutes, à une vitesse de 15 cm/s.



Figure 19: Tapis roulant à 5 couloirs



Figure 20: Tapis roulant en mode concentrique pente (+15°) et excentrique (pente - 15°)

II.4. ECHOGRAPHIE CARDIAQUE

Un suivi échocardiographique a été réalisé avant le début d'entraînement, donc à 2 semaines après l'injection (monocrotaline ou solution saline) et répété après 2 semaines et à la fin de l'entraînement. Les mesures échographiques transthoraciques (Agilent Technologies) ont été réalisées sur des rats rasés et anesthésiés par isoflurane (Aerrane®, S.A.S Baxter) à 3,5 % pour la l'induction et maintenus ensuite à 2%, en respiration spontanée. La durée d'un examen a été en moyenne de 15 à 20 minutes.

Les voies parasternale grand-axe, petit-axe et apicale ont permis de recueillir des paramètres morphologiques et fonctionnels au niveau du cœur droit et du cœur gauche.

Les principaux paramètres recueillis, moyennés sur trois mesures, étaient :

Pour le VD:

- diamètre du VD (mm, en 4 cavités), épaisseur de la paroi libre (mm, petit axe),
- remplissage ventriculaire par analyse du flux trans-tricuspidien (vélocité de l'onde E en cm/s),
- un indice de fonction systolique : la mesure de l'amplitude de l'excursion systolique du plan de l'anneau tricuspide (TAPSE, en mm).

Pour l'hémodynamique pulmonaire :

- diamètre du tronc de l'artère pulmonaire (en mm),
- temps d'accélération du flux antérograde pulmonaire en Doppler pulsé (en ms),
- intégrale temps vitesse du flux antérograde pulmonaire en Doppler pulsé (VITp, cm),
- vélocité du flux de régurgitation tricuspide (VIT, quand c'était possible, cm/s) en Doppler continu, permettant de calculer un gradient de pression entre l'oreillette droite (OD) et le VD par l'équation de Bernoulli simplifiée : $\text{gradient VD-OD} = 4 \times \text{VIT}^2$.

Pour le VG :

- diamètres télédiastolique et télésystolique (en mm), épaisseurs pariétales (en mm), fraction de raccourcissement (indice de fonction systolique),
- remplissage ventriculaire par analyse du flux trans-mitral (vélocité de l'onde E, en cm/s).

Pour l'hémodynamique systémique :

- diamètre de l'aorte thoracique ascendante (D en mm), et calcul de la surface aortique ($\text{SAo} = \pi \times \text{D}^2/4$)
- intégrale temps vitesse du flux antérograde aortique en Doppler pulsé (ITVAo en cm),
- calcul du débit cardiaque (Qc, ml/min) selon la formule :
$$\text{Qc} = \text{Fc} \times \text{ITVAo} \times \text{SAo},$$

où Fc est la fréquence cardiaque mesurée à partir du temps séparant deux flux d'éjection aortique (interval en ms).

II.5. CATHETERISME CARDIAQUE DROIT ET GAUCHE

Après 4 semaines d'entraînement, les rats ont été anesthésiés par isoflurane à 3,5% et mélange air et O₂ à 1 l/min dans une chambre d'induction. L'anesthésie a été ensuite maintenue par

l'inhalation par masque facial d'une concentration de 2,5% d'isoflurane, en respiration spontanée. La durée de l'exploration a été en moyenne de 30 à 35 minutes. Les pressions ventriculaires droites et gauches ont été mesurées par cathétérisme cardiaque, pratiqué par voie jugulaire droite et voie carotidienne droite, après la dénudation du vaisseau. Le placement adéquat du cathéter était attesté par les courbes de mesure dans les ventricules. Le cathéter (NON-STERILE POLYETHYLENE TUBING, *A-M Systems, Inc*), était relié à une chaîne de pression. Les analyses ont été faites par Powerlab en moyennant les valeurs sur au moins 30 secondes, en période stable.

II.6. DOSAGE DE LA CREATINE KINASE

Le dosage de l'activité catalytique de la créatine kinase sérique a été réalisé selon une méthode enzymatique (Advia TM1650, Siemens[®], Bayer HealthCare). Les valeurs ont été exprimées en U/l. Trois ml de sang ont été prélevés dans des tubes héparinés après une petite incision à la queue de l'animal et immédiatement centrifugés. Les prélèvements ont été réalisés avant le début d'entraînement, 24 h et 48 h après la première séance d'entraînement, à 2, 3 et 4 semaines d'entraînement, 24 h après la précédente séance. Ce dosage a été effectué chez les rats malades et témoins entraînés.

II.7. PRELEVEMENTS MUSCULAIRES

Après la réalisation du cathétérisme cardiaque droit l'anesthésie a été maintenue par l'inhalation d'une concentration d'isoflurane à 2,5 %. Les prélèvements musculaires concernaient la partie superficielle du muscle gastrocnémien (glycolytique), le muscle soléaire (oxydatif), le muscle vaste intermédiaire (très oxydatif) ainsi que le cœur. Le VD et le VG + septum ont été isolés et pesés, ainsi que le foie et le poumon. Les muscles de la patte droite ont été coupés en fragments et congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour l'analyse des ARNm de la biogénèse mitochondriale. Les muscles de la patte gauche ont été également congelés pour la réalisation des coupes histologiques, la mesure ultérieure de l'activité de la citrate-synthase et le dosage de la protéine PGC-1 α . Les coupes musculaires d'épaisseur de 10 μ m pour analyse histologique ont été faites au cryostat après fixation par la colle OCT[®]. Les coupes ont été placées sur des lames et conservées à -20°C.

Tous les prélèvements musculaires des rats entraînés ont été réalisés 24h après la dernière séance d'entraînement.

II.8. MESURE DE LA TAILLE DES FIBRES MUSCULAIRES

Elle a été réalisée sur coupes histologiques après coloration par la méthode de coloration à l'hématoxyline-éosine. Les noyaux ont été colorés en bleu et le cytoplasme en rose. La coloration a été réalisée sur le muscle vaste intermédiaire. Des coupes au cryostat d'une épaisseur de 10µm ont été réalisées, puis déshydratées pendant 30 min pour être ensuite placées dans une solution d'hématoxyline de Harris pendant 5 min, puis dans 3 bains d'eau distillée et 1 bain d'eau courante. Elles ont ensuite été placées dans une solution d'éosine Y pendant 5 min, puis dans 5 bains d'alcool éthylique anhydre à 100%. Les lames ont été finalement placées dans 2 bains de solution de xylène pendant 5 min. Les coupes ont été examinées sous un microscope optique avec un objectif X20 (Nikon Eclipse E800). 6 à 8 images ont été obtenues et examinées par animal. Le périmètre des fibres a été mesuré sur chaque image à l'aide du logiciel *Image J*.

ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm erreur standard (SEM). La comparaison entre les différents groupes a été réalisée en utilisant une analyse de la variance (ANOVA) à deux ou trois voies. Les différences entre groupes ont été localisées à l'aide du test post-hoc de Newmann-Keuls. Les relations entre variables ont été établies à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson. Le seuil de significativité retenu a été $p < 0,05$.

RESULTATS

1^{ère} ETUDE: L'ALTERATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE PRECEDE CELLE DU VENTRICULE DROIT DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE

1. PRESENTATION

Dans cette première étude notre objectif était de décrire l'évolution de la biogénèse et des capacités oxydatives mitochondriales dans 3 muscles : le ventricule droit et gauche et le muscle squelettique gastrocnémien, chez des rats chez qui l'hypertension pulmonaire a été induite par la monocrotaline. Les questions étaient 1) les altérations apparaissent-elles d'abord au niveau du ventricule droit ? 2) s'installent-elles précocement, au stade d'hypertrophie ventriculaire droite, ou plus tardivement, au stade d'insuffisance cardiaque ? 3) la biogénèse et la respiration mitochondriale sont-elles altérées dans le ventricule gauche ?

2. PRINCIPAUX RESULTATS

Cette étude montre :

1. La diminution précoce, 2 semaines après l'injection de monocrotaline, de l'expression ARNm des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale dans le muscle squelettique gastrocnémien ;
2. 4 semaines après l'administration de monocrotaline, la diminution de ces facteurs persiste dans le muscle gastrocnémien et apparaît aussi dans le ventricule droit
3. A 4 semaines, chez les rats au stade décompensé de l'insuffisance cardiaque droite, les altérations de l'expression ARNm dans ces 2 muscles s'accompagnent d'une diminution du niveau protéique de PGC-1 α , de l'activité de la citrate-synthase et de la capacité oxydative mitochondriale
4. Le niveau d'expression ARNm des gènes de la biogénèse mitochondriale, ainsi que la capacité oxydative du ventricule gauche ne sont pas modifiés, indifféremment de stade de l'insuffisance cardiaque droite, et ceci malgré une diminution de l'activité de la citrate-synthase au stade décompensé.

Ces résultats font l'objet d'un article en révision soumis à *Molecular and Cellular Biochemistry* pour publication :

Skeletal muscle mitochondrial dysfunction precedes right ventricular impairment in experimental pulmonary hypertension

Skeletal muscle mitochondrial dysfunction precedes right ventricular impairment in experimental pulmonary hypertension

Authors: Irina Enache^{1, 2}, Anne-Laure Charles^{1, 2}, Jamal Bouitbir^{1, 2}, Fabrice Favret², Joffrey Zoll^{1, 2}, Daniel Metzger³, Monique Oswald-Mammosser^{1, 2}, Bernard Geny^{1, 2}, Anne Charloux^{1, 2}

¹Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, Centre Hospitalier Universitaire Strasbourg

²Equipe d'Accueil 3072, Institut de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, Université de Strasbourg, Collège de France, 67404 Illkirch, France

Corresponding author :

Irina Enache

Service de Physiologie et Explorations Fonctionnelles, Nouvel Hôpital Civil, 1, Place de l'Hôpital, 67091, Strasbourg

Mail: irina.enache@chru-strasbourg.fr

Tel. 33 (0)3 69 55 08 47; Fax 33 (0)3 69 55 18 26

Key words: pulmonary hypertension, right ventricular failure, mitochondria, monocrotaline, PGC-1 α

Abstract (246 words):

Objective: We assessed the time courses of mitochondrial biogenesis factors and respiration in the right ventricle (RV), gastrocnemius (GAS) and left ventricle (LV) in a model of pulmonary-hypertensive rats.

Methods: Monocrotaline (MT) rats and controls were studied 2 and 4 weeks after injection. Compensated and decompensated heart failure stages were defined according to obvious congestion signs. mRNA expression and protein level of peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α), citrate synthase (CS) mRNA and activity, and mitochondrial respiration were investigated. In addition, mRNA expression of sirtuin1 (SIRT1), nuclear respiratory factor 1 (NRF 1), and mitochondrial transcription factor A (TFAM) were studied.

Results: As early as 2 weeks, the expression of the studied genes was decreased in the MT GAS. At 4 weeks, the MT GAS and MT RV showed decreased mRNA levels whatever the stage of disease, but PGC-1 α protein and CS activity were significantly reduced only at the decompensated stage. The functional result was a significant fall in mitochondrial respiration at the decompensated stage in the RV and GAS. The mRNA expression and mitochondrial respiration were not significantly modified in the MT LV.

Conclusion: MT rats demonstrated an early decrease in expression of genes involved in mitochondrial biogenesis in a skeletal muscle, whereas reduced protein expression, and the resulting mitochondrial respiratory dysfunction appeared only in rats with overt heart failure, in the GAS and RV. Dissociations between mRNA and protein levels at the compensated stage deserve to be further studied.

INTRODUCTION

Pulmonary hypertension (PH) is a condition characterized by vascular remodeling and vasoconstriction, resulting in increased pulmonary vascular resistance and subsequent right ventricular (RV) hypertrophy. This initial ventricular adaptive response is followed by progressive contractile dysfunction and RV failure, defined by the inability of the heart to supply sufficient blood flow to meet the needs of the body, and leading to fluid retention and organs congestion.

Cardiac contractile activity requires high energy supply to cardiomyocytes. Mitochondrial respiration, through oxidative phosphorylation, produces more than 90% of the energy consumed by the heart, and a strong relationship has been described between cardiac oxygen consumption and cardiac work (19, 25). Energy metabolism disorders, including reduced ATP production by the mitochondria, have emerged as important factors contributing to left cardiac failure development (9, 27, 35). Downregulation of mitochondrial biogenesis is considered as one of the main mechanisms leading to mitochondrial dysfunction, and restoring the transcriptional activity of the main genes involved in energy metabolism, especially the peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α), is regarded as a potential therapeutic target in left heart failure (12, 22). Since most studies have been performed in left-sided heart failure, little is known about mitochondrial ATP-producing ability of the RV during the progression of right ventricular disease, which is however distinguishable from the left one by its pathophysiology and prognosis (5). In rats treated with monocrotaline, a model of PH, the mitochondrial oxygen consumption rate of the RV has been found decreased, and inversely related with RV function indexes (8). The dysregulation of genes controlling mitochondrial biogenesis in the hypertrophied or the failing RV has not yet been investigated. Eventually, nothing is known about the mitochondrial respiration and biogenesis in the LV of PH rats or human, which however demonstrates histological as well as contractile abnormalities (7, 17, 29).

Besides impairment of RV performance, the skeletal muscle dysfunction of PH patients contributes to the decreased exercise capacity (2, 21, 28) and worsen the patient's prognosis (34). In experimental models and in patients (18), muscle atrophy,

transition from slow oxidative to fast anaerobic fibres, reduced capillarity, and decreased muscle oxidative capacities have been described (3, 30, 32). A model for the regulation of mitochondrial biogenesis and of fibres phenotype has been proposed with PGC-1 α playing a central role (31).

Overall, mitochondrial respiration and biogenesis alterations play an important role in PH progression but the chronology of events and the links between them in skeletal and cardiac muscles has not been investigated. Especially, very few experiments provided data from rats with compensated and rats with decompensated heart failure from the same experimental series, data that may help understanding the transition between these disease stages.

We designed this study to describe the time courses of mitochondrial biogenesis alterations and muscle oxidative capacity in parallel in the RV, the LV and the gastrocnemius of PH rats. We hypothesized that these factors will be impaired earlier in the RV, which is submitted to pressure overload, than in the skeletal muscle and the LV. Measurements were performed in monocrotaline-treated (MT) rats at two weeks, early in the development of the disease, and at 4 weeks, in compensated and decompensated heart failure rats.

METHODS

Animal model

Experiments were performed on adult male Wistar rats (Depré, Saint-Doulchard, France) weighing 250 ± 35 g. Pulmonary hypertension was induced by a single intra-peritoneal injection (60mg/kg body weight) of monocrotaline (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). Control rats were injected with the same volume of saline solution. Animals were housed in a neutral temperature environment ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) on a 12-h light-dark cycle, and received food and water *ad libitum*.

Experimental design

Animals were randomly assigned to one of the four studied groups: control and monocrotaline-injected at 2 weeks (CL2 and MT2, respectively) and at 4 weeks (CL4 and MT4) after injection. All animals were observed for general appearance including signs of respiratory distress and behavior. Decompensated right heart failure was

defined as development of peritoneal and pleural effusions, hemorrhage lungs, and severe distress respiratory signs. Treated-animals which showed these signs at 4 weeks after MT injection were included in the decompensated sub-group (MT4d). Rats which did not developed signs of decompensation 4 weeks after monocrotaline injection were included in the compensated group (MT4c).

At appropriate timings, the animals were anaesthetised with isoflurane (3,5% in 1:1 O₂/air mix) and the superficial parts of glycolytic gastrocnemius muscles (GAS), the RV and the LV were isolated and weighed. The rats were euthanized by exsanguination (under isoflurane). The ratio of right ventricle weight on the left ventricle plus septum weight (RV/LV+septum) was used as an index of RV hypertrophy and of pulmonary hypertension severity. Left muscle GAS was immediately used for mitochondrial respiration (see below) and right muscle GAS was rapidly frozen at -80° for q-RT-PCR (see below).

Procedures were conducted in accordance with the US National Institutes of Health guidelines and approved by the Ethics Committee of the University of Strasbourg (Reference number: AL/02/13/07/09).

Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (q-RT-PCR)

Quantification of gene expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α), citrate synthase, sirtuin1 (SIRT1), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), and mitochondrial transcription factor A (TFAM) were performed. Total RNA was obtained from muscles using Trizol reagent™ (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA), as previously described [23] and following manufacturer indications. RNA was stored at -70°C until to the reverse transcription reaction being performed. cDNA was synthesized from total RNA (2 μ g) with the SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamer primers. To perform the real time PCR reaction, 2.5 μ L of cDNA was used in a final volume of 8 μ L, containing 10 μ M of each primer (sense and antisense), and SYBR green (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA) as fluorescent dye and H₂O. The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed in triplicate using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the LightCycler System (Roche Diagnostics, Meylan, France). The sequences of the primers were designed using information contained in the public database GeneBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The sequences of the

primer sets used are listed on Table 1. Quantification of gene expression was carried out by the method described by (16) using glucocerebroside (GCB) gene as inner control, which is the most stable gene for real time RT-PCR measurements in muscles. Amplification efficiency of each sample was calculated as described by (23).

Relative mRNA levels were calculated using the $\Delta\Delta CT$ method between CL2 and MT2 groups and between CL4 and MT4 groups (15).

PGC-1 α immunoassay.

The quantitative determination of rat PGC-1 α concentration in muscles extracts was assayed by Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA, USCN Life Science Inc, China). Tissue assay procedure was carried out following the manufacturers instructions. Briefly, the RV, LV and GAS muscles were pulverized using Sartorius (Mikrodismembrator, Germany), homogenized and then centrifuged 5 minutes at 5,000g in ice-cold PBS (0.02M/ pH ~7.0-7.2). The supernatant was removed and the protein content determined by BioRad protein assay using BSA as standard. The supernatants were then stored at -80°C until used. The amount of protein in each well was 15 μ g for PGC-1 α . The concentration of PGC-1 α (ng/mg of protein) detected in each sample was compared to their own standard curve.

Citrate synthase activity measurement

Frozen tissue samples were weighed, homogenized into ice-cold buffer (30g/ml) containing (in mM) 5 HEPES, 1 EGTA, 5MgCl₂, 1DTT, and Triton X-100 (0.1%), pH 8.7, and incubated for 60 min at 0°C to ensure complete enzyme extraction. Citrate synthase activity was assessed by standard spectrophotometric methods as previously described (9).

Muscle mitochondrial respiration

The relative contribution of the respiratory chain complexes I, II and IV to the global mitochondrial respiratory rate of the saponin-skinned fibers was evaluated as previously described (35). Measurements of oxygen consumption were performed at 22,1°C using a Clark-type electrode (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK).

The substrates used in the respiration experiments were glutamate (5 mmol/L) and malate (2 mmol/L) which are substrates for the complex I. Maximal respiration (V_{max})

evaluated the functionality of complexes I, III and IV. Complex I was blocked with amital (0.02 mmol/L) and complex II was then stimulated with succinate (25 mmol/L). The complex II, III and IV activities were measured in these conditions (V_{succ}). The functionality of complex IV ($V_{TMPD/asc}$) was determined by adding ascorbate (0.5mmol/L) and N,N',N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD, 0.5 mmol/L) which are artificial electron donors to complex IV. Two measurements were made for each muscle.

After the experiments, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C, and the respiration rates were expressed as $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ dry weight.

Statistics

Data are expressed as mean \pm standard error mean. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Neuman-Keuls post hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered as significant.

RESULTS

Animal model characteristics

At 2 and 4 weeks, 15 and 12 MT rats were studied, respectively. At 4 weeks, 7 rats had compensated disease (MT4c sub-group) and 5 showed signs of decompensated heart failure (MT4d sub-group). Eleven and 10 control rats were studied at 2 and 4 weeks, respectively.

The time course of changes in body, right and left ventricle weights of the rats are shown in Table 2. The weight gain of the MT rats was lower than that of the CL at 2 and 4 weeks, and this, despite the presence of pleural effusion and ascites in MT4d. The RV weight, RV/body mass ratio, and RV/LV+septum ratio were higher in MT2 and MT4c compared to their respective controls and more pronounced in MT4d.

Factors associated with mitochondrial biogenesis and function

At 2 weeks, lower mRNA expressions of SIRT1, PGC-1 α , NRF1, TFAM (Figure 1) and citrate synthase (Figure 2) was observed only in the GAS. PGC-1 α protein level as well as citrate synthase activity did not differ in the GAS, RV and LV between CL2 and MT2 (Figure 3 and Figure 4).

At 4 weeks, compared to CL4, we found that mRNA expression of SIRT1, PGC-1 α and citrate synthase were decreased in the GAS and RV of **MT4c rats** while TFAM was decreased only in the GAS. These changes in mRNA expression in MT4c were not associated with a significant change in PGC-1 protein level and citrate synthase activity in the GAS and the RV. In the LV, no difference between CL4 and MT4c mRNA and protein level or activity was observed. At 4 weeks, **in MT4d rats**, mRNA expression of SIRT1, PGC-1 α , TFAM and citrate synthase were decreased in both GAS and RV while NRF1 fell only in the GAS. In the LV, no difference between CL4, MT4c and MT4d mRNA expression was observed. PGC-1 α protein level was lower in MT4d compared to MT4c in all three muscle types. Citrate synthase activity was lower in MT4d compared to CL4 in RV, GAS and LV.

Mitochondrial respiratory chain complex activity

At 2 weeks, mitochondrial respiration was similar in CL and MT for the GAS, RV and LV (Figure 5).

At 4 weeks, in the GAS, the maximal mitochondrial respiration (V_{max}) was decreased in MT4d compared to CL4. The RV V_{max} was significantly lower at 4 weeks in MT4d than in MT4c and CL4. The RV Complex IV mitochondrial respiration ($V_{TMPD/asc}$) was reduced in MT4d compared to CL4. Mitochondrial respiration was not significantly different in LV of CL4, MT4c and MT4d.

DISCUSSION

This study provided data on the time course of mitochondrial biogenesis and respiration, evaluated concomitantly in right and left ventricles and skeletal muscle in a well-characterized model of PH. The results showed that **(1)** reduction of SIRT1, PGC-1 α , NRF1, TFAM and citrate-synthase mRNA transcripts appeared early, at 2 weeks, in the GAS. **(2)** At 4 weeks, the GAS and RV of rats with compensated heart failure showed decreased mRNA expression for these factors. **(3)** These GAS and RV mRNA changes were associated with reduced citrate synthase activity and PGC-1 α protein level, and with a decreased mitochondrial oxidative capacity in rats with overt right ventricular failure only **(4)** The LV mRNA expression of these genes and LV oxidative capacity were not significantly altered, whatever the stage of disease.

Mitochondrial alterations at 2 weeks

The only alteration we observed at 2 weeks in MT rats was a decreased transcription of genes implicated in mitochondrial biogenesis and function in the GAS. Glycolytic muscles show usually larger changes than oxidative muscles in heart failure. This abnormalities include pronounced apoptosis and atrophy, inhibition of muscle protein synthesis, and impaired mitochondrial function and are reported at an advanced stage (3, 18, 32-34). In this series, we report tiny but very early alterations in a glycolytic muscle.

By contrast with the GAS, no changes were observed in the RV. At 2 weeks, the MT rats were free of heart failure signs but showed slowdown of weight gain and slightly increased RV weight/ body weight ratio, indicating progression of PH. Since the RV is directly affected by pressure overload, abnormalities could be expected to develop earlier in the RV than in a skeletal muscle. The reason why mitochondrial biogenesis of skeletal muscles is impaired earlier than that of the myocardium remains to be determined. The myocardium, which is a vital tissue, may have better protection mechanisms. On the other hand, the goal may be the protection of the skeletal muscle itself. Indeed, it has been hypothesized that fiber atrophy and reduced mitochondrial volume density may help protecting against the development of low intracellular oxygen pressure in PH (34). The mechanisms leading to alterations of mitochondrial biogenesis in skeletal muscles of MT rats have been described only in advanced PH. The responsibility of MT toxicity beyond 2 weeks is unlikely (10, 34).

PH is a systemic disease and the role of systemic factors is more likely. In the model elaborated by Vescovo et al., PGC-1 α has a central position and links inflammatory and hormonal stimulations with mitochondrial biogenesis (31). Increased levels of TNF alpha, interleukine 1, angiotensin II, and noradrenaline lower PGC-1 α through MAP kinase. In another potential signaling cascade, resistance to growth hormone also leads to low PGC-1 α expression.

Mitochondrial alterations at 4 weeks

At a compensated stage of right heart failure, the GAS and RV of MT rats showed reduced SIRT1, PGC-1 α and citrate-synthase mRNA transcripts. Citrate synthase activity, PGC-1 α protein level and mitochondrial respiration were not altered. This suggests that efficient post-transcriptional mechanisms or decreased degradation of the mitochondrial proteins and enzymes allowed preserving the respiratory chain complexes synthesis and/or activity during the compensated heart failure period. Another hypothesis may be that mRNA production level, even though lowered, remained sufficient to maintain mitochondrial proteins synthesis. Interestingly, in a recent study performed in human failing LV, the PGC-1 α protein level was significantly increased whereas mRNA level was unchanged (14), suggesting as well that post-transcriptional mechanisms maybe playing a role. In contrast, in keeping with the concept of a link between altered mitochondrial function and cardiac pump failure, we found concomitant reductions in mRNA level, PGC-1 α protein level, citrate synthase activity and mitochondrial respiration in the RV of rats with overt heart failure. Similar mitochondrial abnormalities were found in the GAS at the same time. These last results extend those showing a reduction of mitochondrial respiration due to oxygen utilization. (3).

At 4 weeks, the transition from a compensated to a decompensated heart failure stage can occur rapidly in the MT model we used, and the decompensated stage is very quickly followed by the death of the animal. As a result, very few experiments provided data on both stages achieved in animals from the same series, as done in this study. We found that patterns of mRNA expression, protein level and mitochondrial respiration differed according to the stage of the disease. Studying the mechanisms leading to the dissociation between transcriptional activity and

maintenance of protein level may help understanding the transition to overt heart failure.

Results obtained in the LV contrast with those observed in the RV and GAS. Even though the LV is not affected by pressure overload in PH, an intrinsic left ventricular cardiomyopathy has been described (1, 7, 29) and attributed to PH-induced neurohumoral activation (7, 17, 29). In our experiment, we did not find any significant changes in expression of genes implicated mitochondrial biogenesis, whatever the stage of disease. Our findings are consistent with those of a study of the myocardium proteome showing a significant decrease in several proteins involved in the synthesis of ATP in the RV, but not in the LV of MT rats. Rather, the LV showed an increase in a few proteins contributing to ATP synthesis (ATP synthase alpha chain, acetyl-coenzyme A dehydrogenase) (26). In our MT rats with overt heart failure, the decrease in the LV mitochondrial oxidative capacity was small compared to that of the RV and GAS (15% vs ~30%) and did not reach significance, even at the decompensated stage of the disease. This contrasts with the decrease in citrate synthase activity observed in the LV of our MT4d rats. However, it has been shown that citrate synthase activity is not a limiting factor for mitochondrial respiration (4). Moreover, supporting our results, a study reported neither increase in oxidative stress nor changes in the activity of the respiratory chain complex II of the LV in overt RV failure (24). Taken together, these results suggest that, compared to skeletal muscles, which are also exposed to systemic inflammation and neurohumoral activation, the LV is able to better preserve mitochondrial activities till an advanced stage of the disease. This may be explained by the intrinsic characteristics of the cardiac muscle, which may have better defenses against aggressions than the skeletal muscle (6). The role of deconditioning on skeletal muscle is likely not preeminent, since disease-specific muscle metabolic alterations have been described in animal models and in the vastus lateralis of heart failure patients (20).

In conclusion, this study showed that the magnitude and time course of the mitochondrial activity and biogenesis alterations differ greatly according to the muscle phenotype in PH rats. The earliest alterations occurred in a skeletal muscle, and not in the RV. A concomitant decrease in mRNA expression, protein levels, and mitochondrial respiration characterized overt heart failure, whereas dissociations between changes in mRNA expression and protein levels were found at the

compensated stage of the disease. Taking into account these time-related alterations should help elaborating treatments aimed at maintaining cardiac and skeletal muscle function in PH.

Conflict of interests: none

Table 1**Primer Sequences Used for Quantitative Real-Time PCR Amplification.**

Target gene	Forward primer 5' ----->3' Reverse primer 5' ----->3'	Accession number
SIRT1	AGCATCACACGCAAGCTCTA GTGCCAATCATGAGGTGTTG	NM 001107627
PGC-1 α	CACCAAACCCACAGAGAACAG GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA	NM 031347
NRF1	GGCCCTTAACAGTGAAGCTG CATCTGGGCCATTAGCATCT	NM 001100708
TFAm	GAAAGCACAAATCAAGAGGAG CTGCTTTTCATCATGAGACAG	NM 031326
Citrate synthase	TATGGCATGACGGAGATGAA CATGGACTTGGGCCTTTCTA	DQ 403126
GCB	GCACAACCTTCAGCCTCCCAGA CTTCCCATTACCGCTCCATT	BC 166732

SIRT1: sirtuin 1; PGC-1 α : peroxisome proliferators-activated receptor gamma co-activator 1 α ; NRF1: nuclear respiratory factor 1; TFAm: mitochondrial transcription factor A; GCB: glucocerebrosidase gene

Table 2**Anatomic parameters of control and monocrotaline rats**

	CL2	MT2	CL4	MT4c	MT4d
N	11	15	10	7	5
Weight gain, g	90.45 ± 5.27	60.0 ± 4.95***	132.20 ± 10.34	73.86 ± 18.65*	58.40 ± 21.76*
RV, g	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01*	0.18 ± 0.01	0.24 ± 0.02**	0.39 ± 0.02***§
LV+S, g	0.61 ± 0.01	0.60 ± 0.03	0.68 ± 0.02	0.68 ± 0.04	0.60 ± 0.03
RV/LV+S, g/g	0.26 ± 0.01	0.31 ± 0.02*	0.26 ± 0.02	0.36 ± 0.04*	0.65 ± 0.06***§
RV/body mass, mg/g	0.51 ± 0.03	0.63 ± 0.04*	0.46 ± 0.02	0.71 ± 0.05**	1.22 ± 0.07***§
LV+S/body mass, mg/g	1.96 ± 0.03	2.03 ± 0.05	1.77 ± 0.03	1.99 ± 0.13	1.91 ± 0.12

n: number of rats. CL2 and CL4, controls at 2 and 4 weeks, respectively; MT2: monocrotaline rats at 2 weeks; MT4c and MT4d, monocrotaline rats with compensated and decompensated disease, respectively; RV: right ventricle; LV: left ventricle; S: septum. Results were expressed as mean ± SEM.

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001 vs CL;

§ P<0.001 vs MT4c

Figure legends

Figure 1

Relative mRNA expression level of sirtuin1 (SIRT1), peroxisome proliferators-activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) in the gastrocnemius (GAS), right ventricle (RV), and left ventricle (LV)

CL: control rats; MT: monocrotaline rats; MTc and MT4d: monocrotaline rats with compensated and decompensated disease, respectively. Results were expressed as mean \pm SEM.

*P<0.05, **P<0.01, MT vs CL

Figure 2

Relative mRNA expression level of citrate synthase in the gastrocnemius (GAS), right ventricle (RV), and left ventricle (LV)

CL: control rats; MT: monocrotaline rats; MTc and MT4d: monocrotaline rats with compensated and decompensated disease, respectively. Results were expressed as mean \pm SEM.

*P<0.05, MT vs CL

Figure 3

PGC-1 α protein level in the gastrocnemius (GAS), right ventricle (RV), and left ventricle (LV)

CL: control rats; MT: monocrotaline rats; MTc and MT4d: monocrotaline rats with compensated and decompensated disease, respectively. Results were expressed as mean \pm SEM

* $P < 0.05$, MTd vs CL; § $P < 0.05$, MTd vs MTc

Figure 4

Citrate synthase activity in the gastrocnemius (GAS), right ventricle (RV), and left ventricle (LV)

CL: control rats; MT: monocrotaline rats; MTc and MT4d: monocrotaline rats with compensated and decompensated disease, respectively. Results were expressed as mean \pm SEM

* $P < 0.05$, MTd vs CL

Figure 5

Mitochondrial oxygen consumption rate measured with glutamate/malate/ADP (V_{max}), succinate (V_{succ}), and ascorbate/TMPD ($V_{TMPD/asc}$) as substrate, in skinned fibres of gastrocnemius (GAS), right ventricle (RV), and left ventricle (LV)

CL: control rats; MT: monocrotaline rats; MTc and MT4d: monocrotaline rats with compensated and decompensated disease, respectively. Results were expressed as mean \pm SEM

* $P < 0.05$, MTd vs CL at 4 weeks; ** $P < 0.01$, MTd vs CL at 4 weeks;

§§ $P < 0.01$, MTd vs MTc at 4 weeks

Figure 1

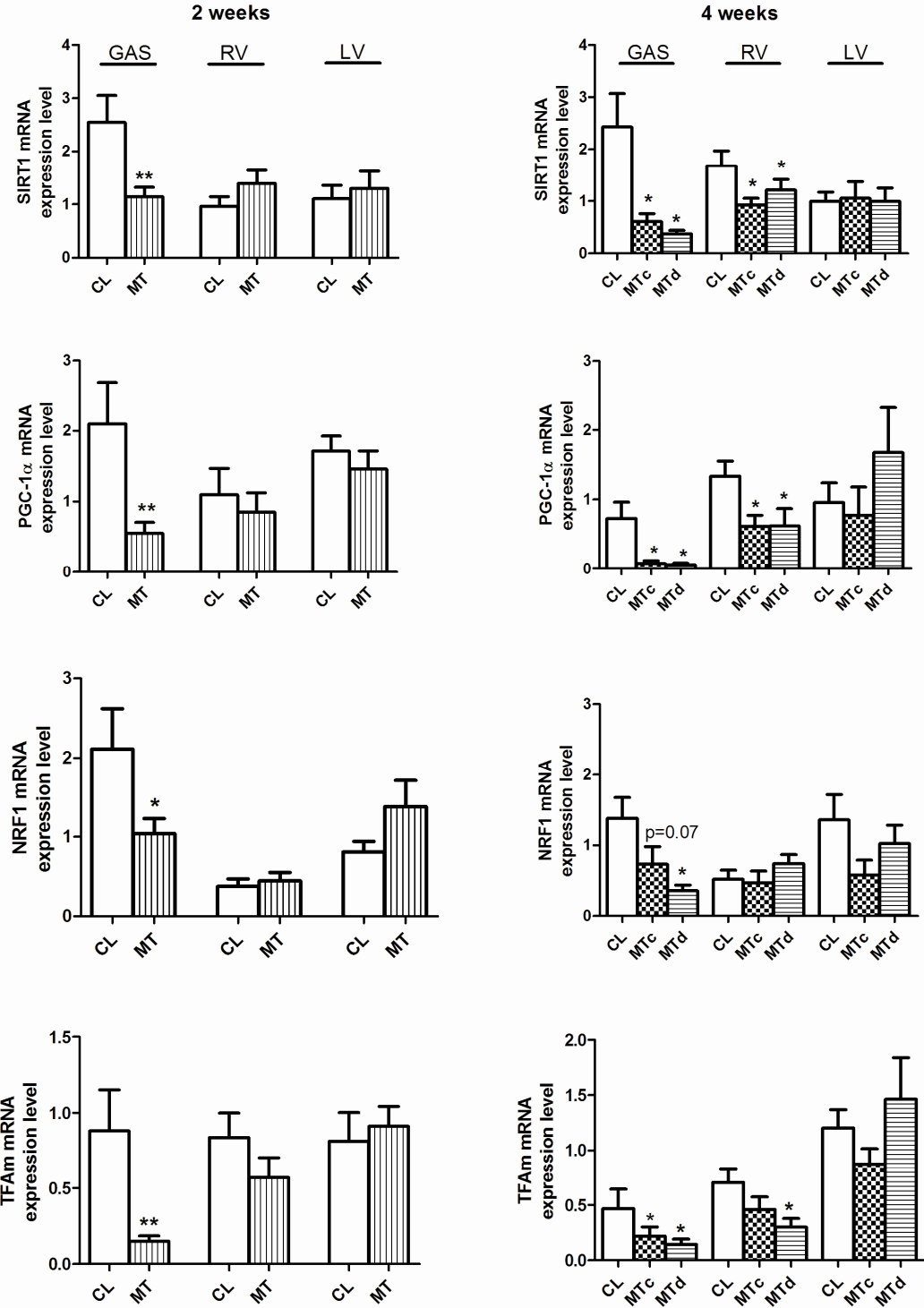


Figure 2

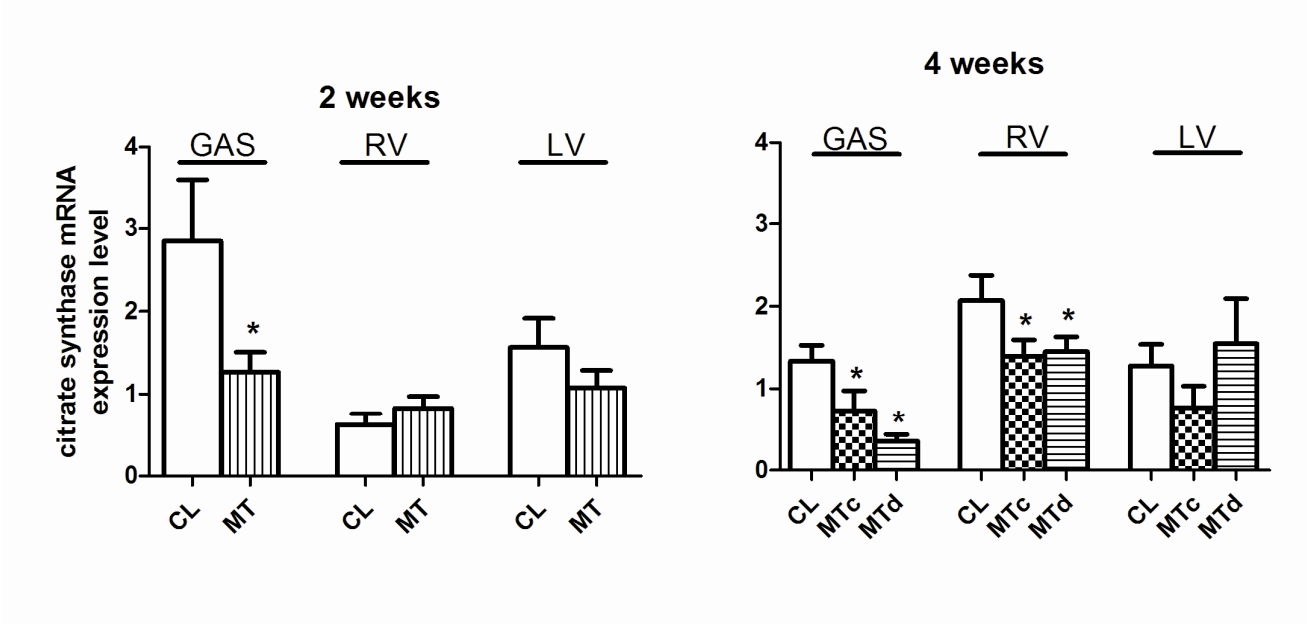


Figure 3

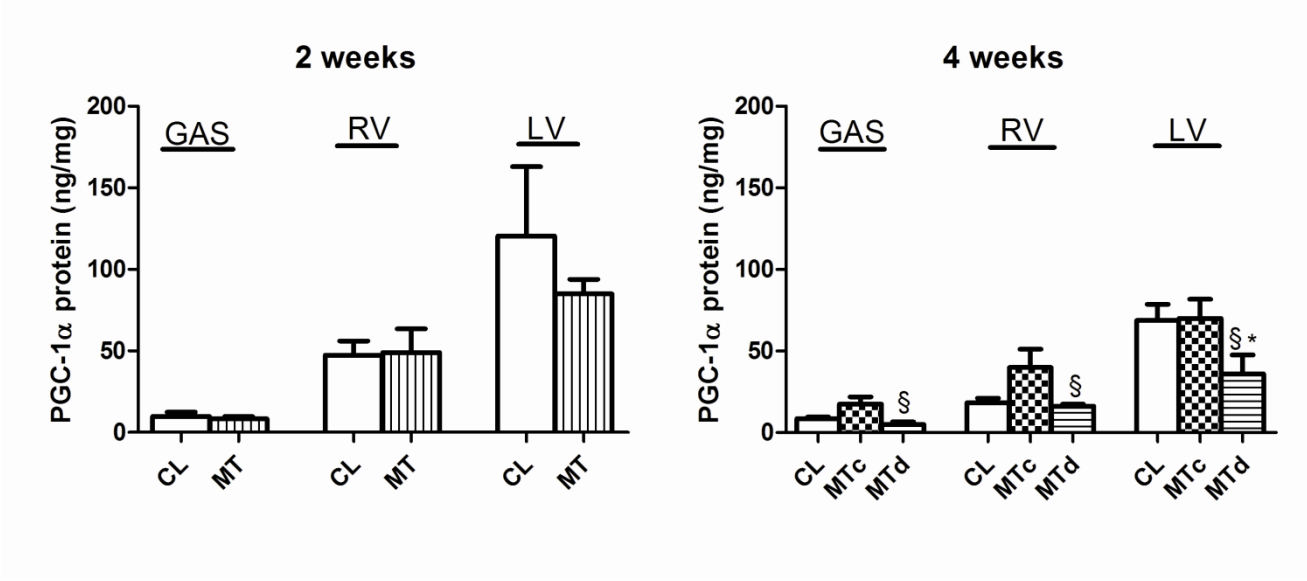


Figure 4

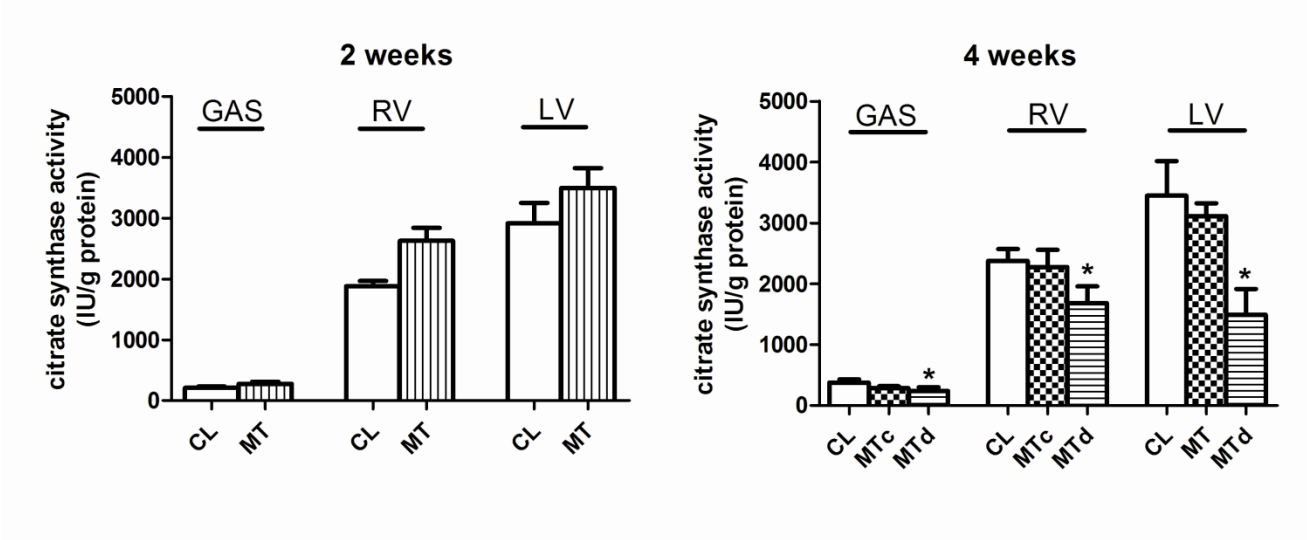
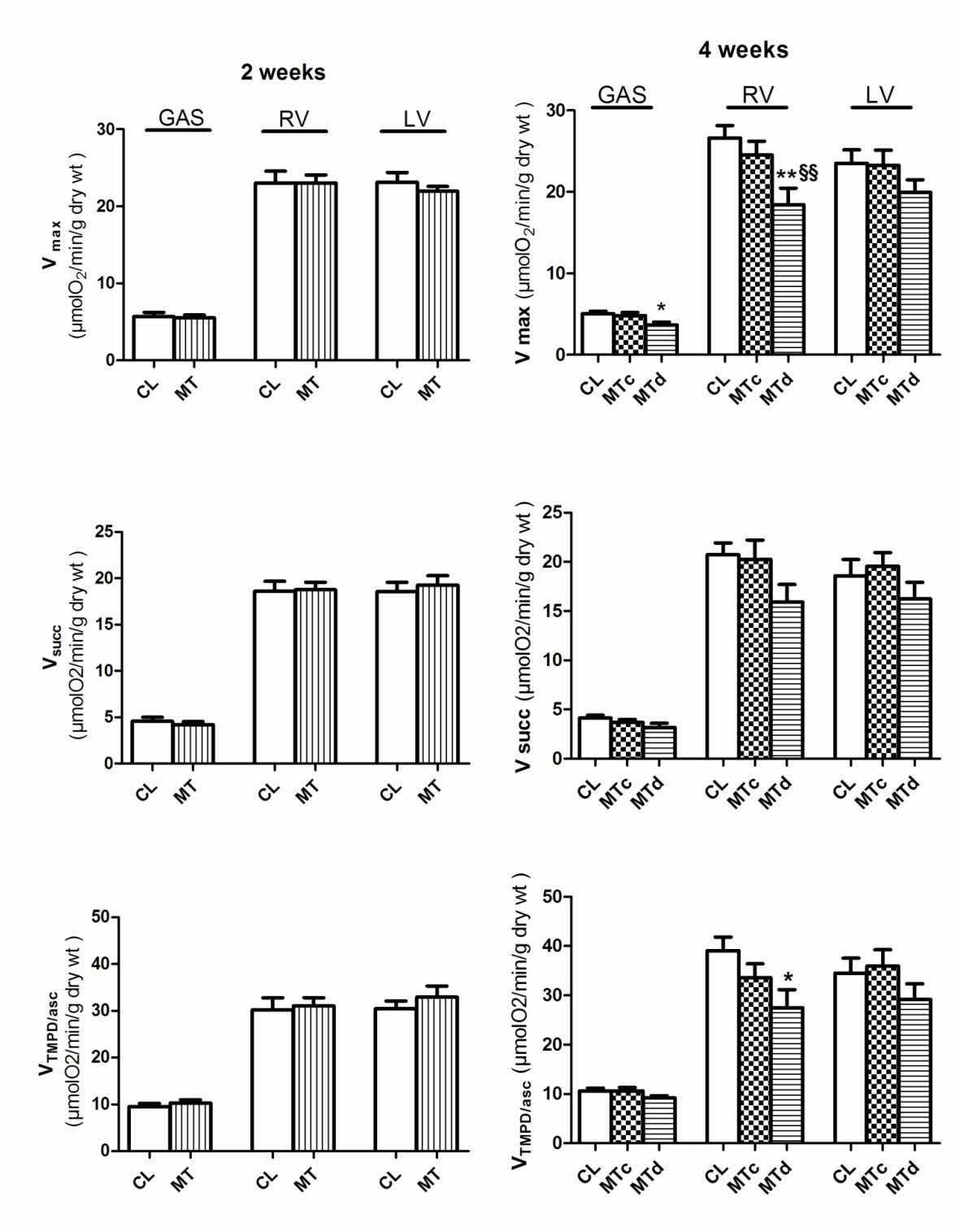


Figure 5



References

- Akhavain F, St-Michel EJ, Seifert E, Rohlicek CV (2007) Decreased left ventricular function, myocarditis, and coronary arteriolar medial thickening following monocrotaline administration in adult rats. *J Appl Physiol* 103: 287-295.
- Bauer R, Dehnert C, Schoene P, Filusch A, Bartsch P, Borst MM, Katus HA, Meyer FJ (2007) Skeletal muscle dysfunction in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 101: 2366-2369.
- Bernocchi P, Cargnoni A, Vescovo G, Dalla Libera L, Parrinello G, Boraso A, Ceconi C, Ferrari R (2003) Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy and failure. *Basic Res Cardiol* 98: 114-123.
- Blomstrand E, Radegran G, Saltin B (1997) Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. *J Physiol* 501 (Pt 2): 455-460.
- Bogaard H J, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF (2009) The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 135: 794-804.
- Boutbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, Piquard F, Geny B, Zoll J (2011) Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J*.
- Correia-Pinto J, Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque JR, Lourenco AP, Melo-Rocha G, Vasques-Novoa F, Gillebert TC, Leite-Moreira AF (2009) Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Basic Res Cardiol* 104: 535-545.
- Daicho T, Yagi T, Abe Y, Ohara M, Marunouchi T, Takeo S, Tanonaka K (2009) Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 111: 33-43.
- De Sousa E, Lechene P, Fortin D, N'guessan B, Belmadani S, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R (2002) Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. *Cardiovasc Res* 56: 260-268.
- Estep JE, Lame MW, Morin D, Jones AD, Wilson DW, Segall HJ (1991) Monocrotaline kinetics and metabolism in the rat. *Drug Metab Dispos* 19: 135-139.
- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R (2003) Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551: 491-501.

- Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, Del Monte F, Tian R (2010) Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res* 106: 1541-1548.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127: 1109-1122.
- Liu W , Saint DA (2002) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 302: 52-59.
- Lourenco AP, Roncon-Albuquerque R, Jr, Bras-Silva C, Faria B, Wieland J, Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF (2006) Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1587-1594.
- Mainguy V, Maltais F, Saey D, Gagnon P, Martel S, Simon M , Provencher S (2010) Peripheral muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 65: 113-117.
- Mettauer B, Zoll J, Garnier A, Ventura-Clapier R (2006) Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflugers Arch* 452: 653-666.
- 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: 947-954.
- Meyer F J, Lossnitzer D, Kristen AV, Schoene AM, Kubler W, Katus HA, Borst MM (2005) Respiratory muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 25: 125-130.
- Mudd JO , Kass DA (2008) Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451: 919-928.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH , Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339: 62-66.
- Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJ, Van Hardeveld C, Paulus WJ, Simonides WS (2007) Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 75: 770-781.
- Rimbaud S, Garnier A, Ventura-Clapier R (2009) Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep* 61(1): 131-138.

- Schott P, Singer SS, Kogler H, Neddermeier D, Leineweber K, Brodde OE, Regitz-Zagrosek V, Schmidt B, Dihazi H, Hasenfuss G (2005) Pressure overload and neurohumoral activation differentially affect the myocardial proteome. *Proteomics* 5: 1372-1381.
- Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN (2000) Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2361-2367.
- Tolle J, Waxman A, Systrom D (2008) Impaired systemic oxygen extraction at maximum exercise in pulmonary hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 40(1): 3-8.
- Usui S, Yao A, Hatano M, Kohmoto O, Takahashi T, Nagai R, Kinugawa K (2006) Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 70: 1208-1215.
- Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio G B, Libera LD (1998a) Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc Res* 39: 233-241.
- Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Angelini A, Dalla Libera L (2005) Skeletal muscle fibres synthesis in heart failure: role of PGC-1 α , calcineurin and GH. *Int J Cardiol* 104: 298-306.
- Vescovo G, Zennaro R, Sandri M, Carraro U, Leprotti C, Ceconi C, Ambrosio G B, Dalla Libera L (1998b) Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2449-2459.
- Wust RC, Jaspers RT, Van Heijst a F, Hopman MT, Hoofd LJ, Van Der Laarse WJ, Degens H (2009) Region-specific adaptations in determinants of rat skeletal muscle oxygenation to chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H364-374.
- Wust RC, Myers DS, Stones R, Benoist D, Robinson PA, Boyle JP, Peers C, White E, Rossiter HB (2012) Regional skeletal muscle remodeling and mitochondrial dysfunction in right ventricular heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H402-411.
- Zoll J, Monassier L, Garnier A, N'guessan B, Mettauer B, Veksler V, Piquard F, Ventura-Clapier R, Geny B (2006) ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J Appl Physiol* 101: 385-391.

2^{ème} ETUDE: EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE SUR LA TOLERANCE HEMODYNAMIQUE, LA SURVIE ET LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE

1. PRESENTATION

L'objectif de cette deuxième série expérimentale a été d'étudier si l'entraînement en modalité excentrique des rats chez qui nous avons induit une hypertension artérielle pulmonaire par la monocrotaline n'était pas délétère en termes de survie et de paramètres hémodynamiques et s'il pouvait avoir un effet bénéfique sur la fonction musculaire.

2. RESULTATS

Les résultats de cette étude feront l'objet d'une soumission pour publication, et ils seront présentés sous forme de poster au *European Respiratory Society Annual Congress*, à Vienne, le 4 septembre 2012

Paramètres morphologiques et survie

Le poids des rats CLsed et CLecc a augmenté progressivement pendant les six semaines après l'injection, mais cette augmentation a été moins importante chez les rats témoins entraînés (CLecc vs. CLsed, $p < 0,05$) (**tableau 3**). Par contre, le poids des rats monocrotaline était moindre par rapport aux rats témoins ($p < 0,01$), sans différence significative entre les groupes MTsed et MTecc. L'évolution du poids en pourcentage du poids initial est montrée dans la **figure 22A**.

Trois rats dans le groupe MTecc (23%) et 2 dans le groupe MTsed (15%) sont morts entre 3 et 5 semaines après l'injection de monocrotaline (**figure 21**). La mortalité dans le groupe MTecc n'était pas différente de celle dans le groupe MTsed.

Les rats MT ont montré un degré important d'hypertrophie du VD 6 semaines après l'injection, indiqué par l'augmentation de l'index de Fulton (VD/VG+septum) et du rapport VD/poids du corps, qui figurent dans le **tableau 3**. Le rapport VD/poids corporel était significativement plus important dans le groupe MTecc par rapport au groupe MTsed ($p < 0,05$), mais pas l'index de Fulton.

Le poids du poumon est aussi un indicateur de la sévérité de l'hypertension pulmonaire et il a été démontré que l'augmentation de ce paramètre observée dans le modèle rat-monocrotaline n'est pas due à l'œdème pulmonaire, mais au remodelage vasculaire pulmonaire (BuermansHPJ, 2005). Effectivement, tant le rapport poids du poumon/poids corporel que le ratio poids sec/poids humide du poumon étaient élevés chez les rats monocrotaline par rapport aux rats témoins.

Si le poids du VG+septum était comparable dans les différents groupes, la normalisation par le poids corporel montrait des valeurs significativement plus élevées chez les rats MTecc en comparant avec les rats MTsed ($p < 0,01$) et avec les rats témoins, entraînés ou non ($p < 0,01$).

	CLsed	CLecc	MTsed	MTecc
<i>n</i>	7	7	11	10
Weight gain, g	202.6 ± 19.1	164.0 ± 11.1 [£]	149.5 ± 5.0**	126.4 ± 15.87**
RV, g	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.29 ± 0.01**	0.31 ± 0.02**
LV+S, g	0.70 ± 0.03	0.66 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.69 ± 0.03
RV/LV+S, g/g	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.44 ± 0.02***	0.46 ± 0.03***
RV/body mass, mg/g	0.41 ± 0.02	0.48 ± 0.05	0.77 ± 0.04***	0.88 ± 0.07*** [§]
LV/body mass, mg/g	1.67 ± 0.03	1.77 ± 0.08	1.76 ± 0.04	1.93 ± 0.04** ^{§§}
Wet lung/body mass, mg/g	3.92 ± 0.35	3.79 ± 0.12	4.60 ± 0.20**	5.05 ± 0.20**
Dry/wet lung, g/g	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.39 ± 0.03***	0.42 ± 0.01***

Tableau 3: Paramètres morphologiques des animaux des groupes témoins sédentaires (CLsed, n=7) et entraînés (CLecc, n=7) et monocrotaline, sédentaires (MTsed, n=11) et entraînés (MTecc, n=10). Valeurs exprimées en moyenne ± SEM.

Différence significative : CL vs. MT; **p<0,01 ; ***p<0,001

Différence significative : CLecc vs. CLsed: [£]p<0,05

Différence significative : MTecc vs .MTsed: [§]p<0,05

Survival Analysis

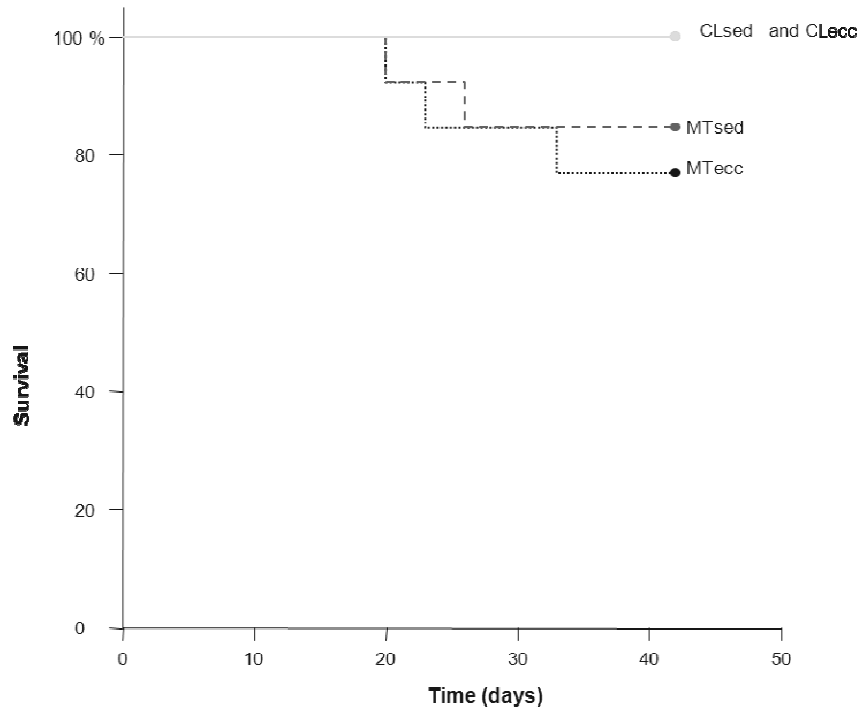


Figure 21: Courbe de Kaplan-Meyer, qui montre l'effet de la monocrotaline et de l'entraînement sur la survie des animaux pendant les 6 semaines d'observation.

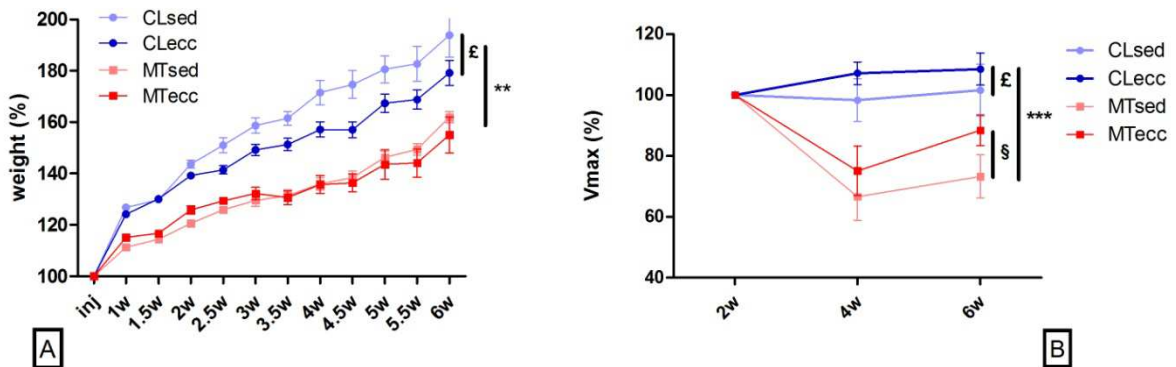


Figure 22 : **A.** Evolution du poids exprimé en pourcentage de la valeur initiale au moment de l'injection chez les rats témoins sédentaires (CLsed) et entraînés (CLecc) et chez les rats monocrotaline, sédentaires (MTsed) et entraînés (MTecc). **B.** V_{max} déterminées avant (2w) et lors de l'entraînement (4w et 6w)

Différence significative : CL vs. MT, **p<0,01 ; ***p<0,001

Différence significative : CLecc vs. CLsed, £p<0,05

Différence significative : MTecc vs. MTsed §p<0,05

Test incrémental

Les V_{\max} exprimées en pourcentage de la valeur initiale sont illustrées dans la **figure 22B**. Comme il était attendu, les performances des rats malades, similaires à celles des rats témoins à 2 semaines ($78,8 \pm 3,0$ cm/s, tous MT vs. $79,2 \pm 2,6$ cm/s, tous CL, ns) étaient diminuées par rapport aux rats témoins à 4 et 6 semaines ($p < 0,001$). Nous avons aussi observé un effet de l'entraînement puisque dans le groupe des rats témoins ainsi que dans le groupe des rats monocrotaline, les V_{\max} des animaux entraînés, enregistrées à la fin des 4 et 6 semaines, sont supérieures aux V_{\max} des rats sédentaires respectifs (CLEcc vs. CLsed, et MTecc vs. MTsed, $p < 0,05$).

Tous les animaux du groupe CLecc, mais seulement 5 du groupe CLsed ont réalisé toutes les épreuves incrémentales. La V_{\max} des rats CLecc s'est améliorée de + 9 % par rapport à la V_{\max} initiale (84 ± 3 cm/s à 91 ± 5 cm/s, $p < 0,05$). La V_{\max} des rats témoins sédentaires est restée stable à 72 cm/s ± 4 cm/s.

Dans le groupe MTecc, 9 rats ont réalisé tous les tests incrémentaux. La diminution de la V_{\max} était de 11,5%, soit de 83 ± 4 cm/s à 73 ± 4 cm/s (ns). 8 rats du groupe MTsed ont effectué les trois épreuves incrémentales et la diminution de la V_{\max} était de 27% à 6 semaines ($p < 0,05$).

Tous les rats entraînés ont réalisé toutes les séances d'entraînement prévues.

Dosage de la créatine kinase (CK)

Nous avons observé à 2 et 3 semaines d'entraînement que les CK des rats monocrotaline étaient nettement plus élevées que les CK plasmatiques des rats témoins (+88% et +99%, respectivement, $p < 0,01$). Par contre, nous n'avons pas observé de différence significative entre les valeurs mesurées au cours de l'entraînement et la valeur obtenue avant la première séance dans le groupe MTecc. Dans le groupe CLecc, les CK mesurées à 2, 3 et 4 semaines, 24h après une séance d'entraînement, étaient plus basses que les CK mesurées après la première séance d'entraînement (- 40%, -50% et -44%, respectivement, $p < 0,05$).

La **figure 23** montre l'évolution des valeurs de CK déterminées dans le groupe CLecc et le groupe MTecc.

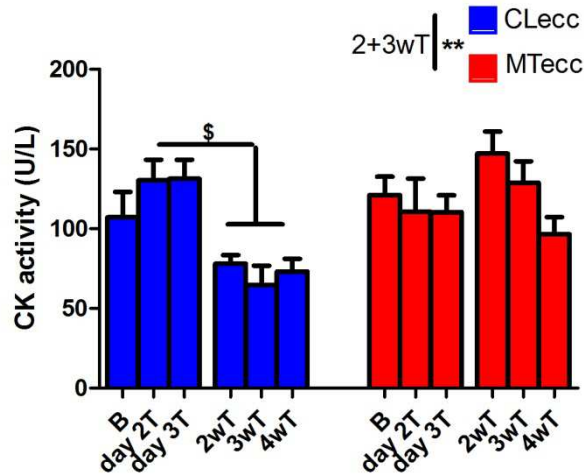


Figure 23 : Evolution de la créatine-kinase (CK) chez les groupes entraînés, témoins (CLecc) et malades (MTecc). B : mesure avant la première séance d'entraînement (T). day 2T et day 3T : mesures avant la 2^{ème} et la 3^{ème} séance d'entraînement ; 2wT, 3wT et 4wT : mesures réalisées à 2, 3 et 4 semaines d'entraînement

Différence significative : MTecc vs. CLecc à 2 et 3 semaines d'entraînement, **p<0,01

Différence significative CLecc à 2,3 et 4 semaines vs. CLecc avant la 2^{ème} séance d'entraînement, \$p<0,05

Echographie cardiaque

La fréquence cardiaque (FC) relevée lors de l'échographie chez les rats anesthésiés a varié dans les groupes monocrotaline entre la 2^{ème} et 4^{ème} ou la 6^{ème} semaine après l'injection (p<0,01). Dans le groupe MTecc, la diminution de la FC avec le temps était plus importante que dans le groupe sédentaire (p<0,05). Chez les rats témoins entraînés, la FC a diminué, la valeur relevée avant étant significativement plus élevée que celle de la fin de l'entraînement (p<0,05). Cette baisse de la FC dans le groupe CLecc suggère un effet de l'entraînement (**Figure 24**).

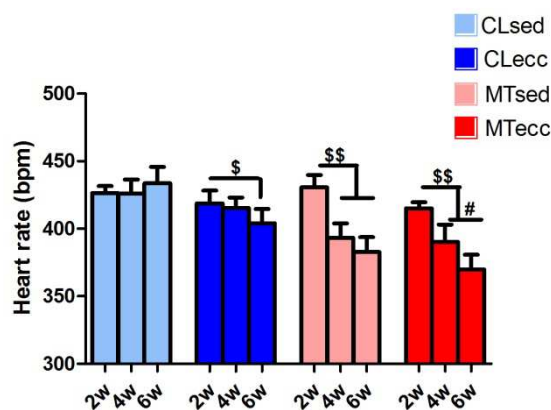


Figure 24 : La fréquence cardiaque mesurée en échographie à la 2^{ème} (2w), la 4^{ème} (4w) et la 6^{ème} (6w) semaine après l'injection, dans les groupes témoins, sédentaires (CLsed) et entraînés (CLEcc), et les groupes monocrotaline, sédentaires (MTsed) et entraînés (MTecc).
 Différence significative : CLecc 6w vs. CLecc 2w, \$p<0,05 ;
 Différence significative : MT 4w et 6w vs. MT 2w, \$\$p<0,01 ;
 Différence significative : MTecc 6w vs. MTecc 4w, #p<0,05

L'entraînement n'a pas eu d'effet significatif sur les paramètres échographiques autres que la FC, ni chez les rats témoins, ni chez les rats monocrotaline.

Il existait par contre des différences importantes entre le groupe monocrotaline et le groupe témoin. Deux semaines après l'injection, l'épaisseur de la paroi libre du VD était significativement plus importante chez les rats monocrotaline ($0,73 \pm 0,02$ mm), que chez les rats témoins ($0,63 \pm 0,01$ mm) ($p < 0,001$, t-test).

4 et 6 semaines après l'injection de monocrotaline, nous avons observé:

- Un remodelage du VD : épaissement de la paroi libre, dilatation du VD (majoration du diamètre télédiastolique du VD et du rapport VD/VG) ($p < 0,001$).
- Une altération fonctionnelle avec dégradation de la fonction systolique (diminution du TAPSE) ($p < 0,001$) (**figures 25 et 26**).
- Une élévation de la pression artérielle pulmonaire. La pression systolique a été calculée à partir de la vitesse de régurgitation du flux tricuspide quand il était visualisé : à 4 semaines chez 10/11 rats MTsed et 7/10 rats MTecc, et à 6 semaines chez seulement 5/11 rats MTsed et chez 4/10 rats MTecc. Les valeurs des pressions étaient beaucoup plus importantes dans le groupe MTecc, à 4 semaines (90 ± 7 vs 70 ± 4 mmHg dans le groupe MTecc et le groupe MTsed, respectivement, $p < 0,001$) et à 6 semaines (93 ± 3 vs. 63 ± 4 mmHg chez les rats MTecc et MTsed, respectivement $p < 0,001$). La diminution du temps d'accélération du flux antérograde pulmonaire

(Tacc) dans les groupes monocrotaline ($p < 0,001$) témoigne d'une élévation des pressions en aval et des résistances vasculaires pulmonaires (**figure 25**)

Dans le groupe monocrotaline, l'hypertension pulmonaire a progressé à la 4^{ème} semaine après l'injection puisque tous ces paramètres cités auparavant ont évolué défavorablement par rapport aux valeurs de la 2^{ème} semaine ($p < 0,001$). Après cette aggravation initiale des paramètres échographiques, à la 6^{ème} semaine la plupart des indices morphologiques et fonctionnels du VD (sauf l'épaisseur de la paroi libre du VD) s'améliorent significativement par rapport aux valeurs précédentes de la 4^{ème} semaine ($p < 0,05$), sans revenir aux valeurs obtenues à la 2^{ème} semaine ($p < 0,001$).

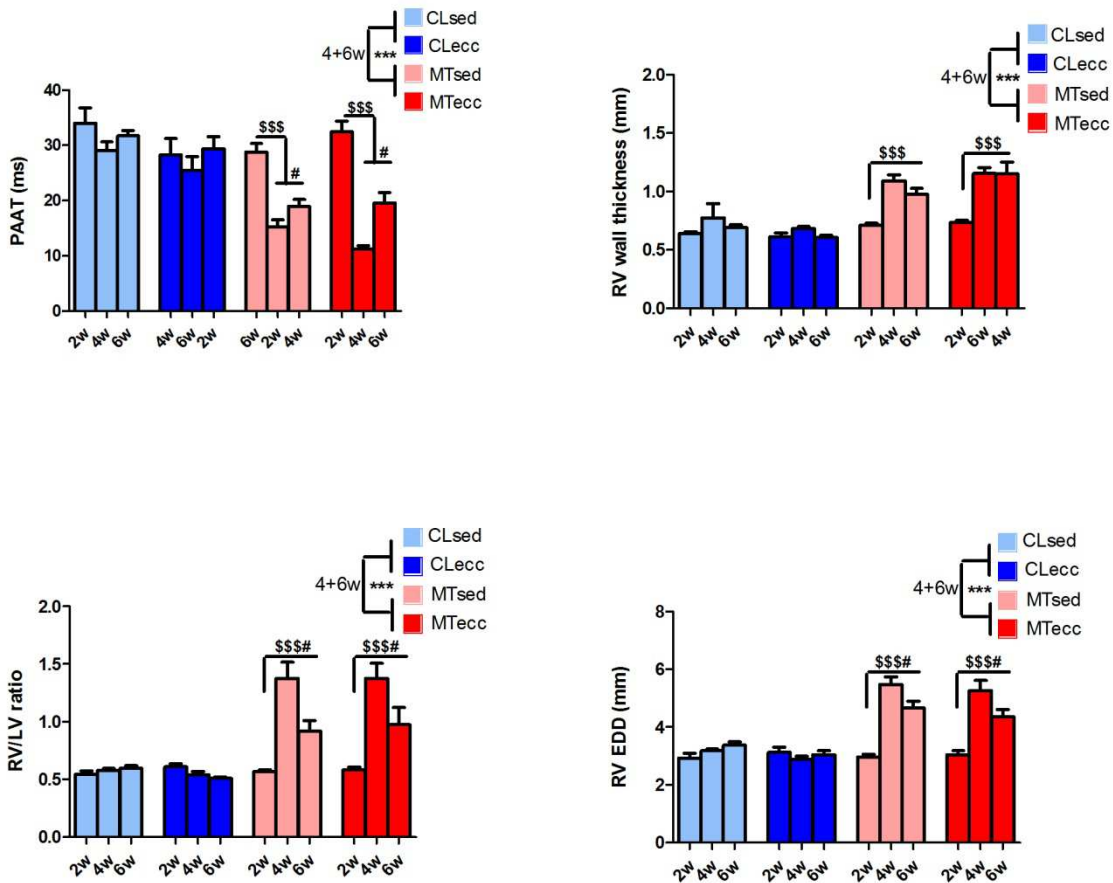


Figure 25 : Le Tacc (PAAT), l'épaisseur de la paroi libre du VD (RV wall thickness), le rapport VD/VG et le diamètre télédiastolique du VD (RV EDD) mesurés à la 2^{ème} (2w), la 4^{ème} (4w) et la 6^{ème} (6w) semaine après l'injection, dans les groupes témoins, sédentaires (CLsed) et entraînés (CLecc), et les groupes monocrotaline, sédentaires (MTsed) et entraînés (MTecc).

Différence significative : CL vs. MT, *** $p < 0,001$

Différence significative : MT 4 et 6w vs MT 2w, \$\$\$ $p < 0,001$

Différence significative : MT 6w vs. MT 4w, # $p < 0,05$

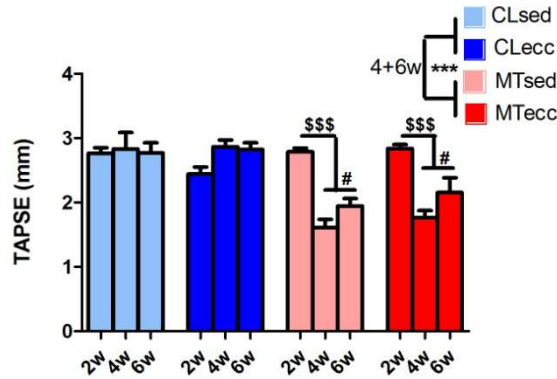


Figure 26 : Le TAPSE mesuré à la 2ème (2w), la 4ème (4w) et la 6ème (6w) semaine après l'injection, dans les groupes témoins, sédentaires (CLsed) et entraînés (CLEcc), et les groupes monocrotaline, sédentaires (MTsed) et entraînés (MTecc).
 Différence significative : CL vs. MT, *** $p < 0,001$
 Différence significative : MT 4 et 6w vs MT 2w, \$\$\$ $p < 0,001$
 Différence significative : MT 6w vs. MT 4w, # $p < 0,05$

Ces modifications des paramètres du VD chez les rats monocrotaline ont été associées à une diminution du débit cardiaque (Q_c) normalisé par le poids corporel, à 4 et 6 semaines après l'injection, par rapport aux valeurs initiales ($p < 0,001$) (**figure 27**). Cette diminution était nettement plus importante que celle observé chez les rats témoins ($p < 0,05$).

L'atteinte morphologique et fonctionnelle du **VG** a été suggérée par la majoration de l'épaisseur du septum et de la paroi libre, ainsi que par la diminution du volume d'éjection à 4 semaines dans le groupe monocrotaline par rapport au groupe témoin ($p < 0,01$). Cette atteinte a été transitoire puisque à 2 et à 6 semaines ces paramètres n'étaient pas différents et comparables à ceux obtenus chez les rats témoins (**figure 27**).

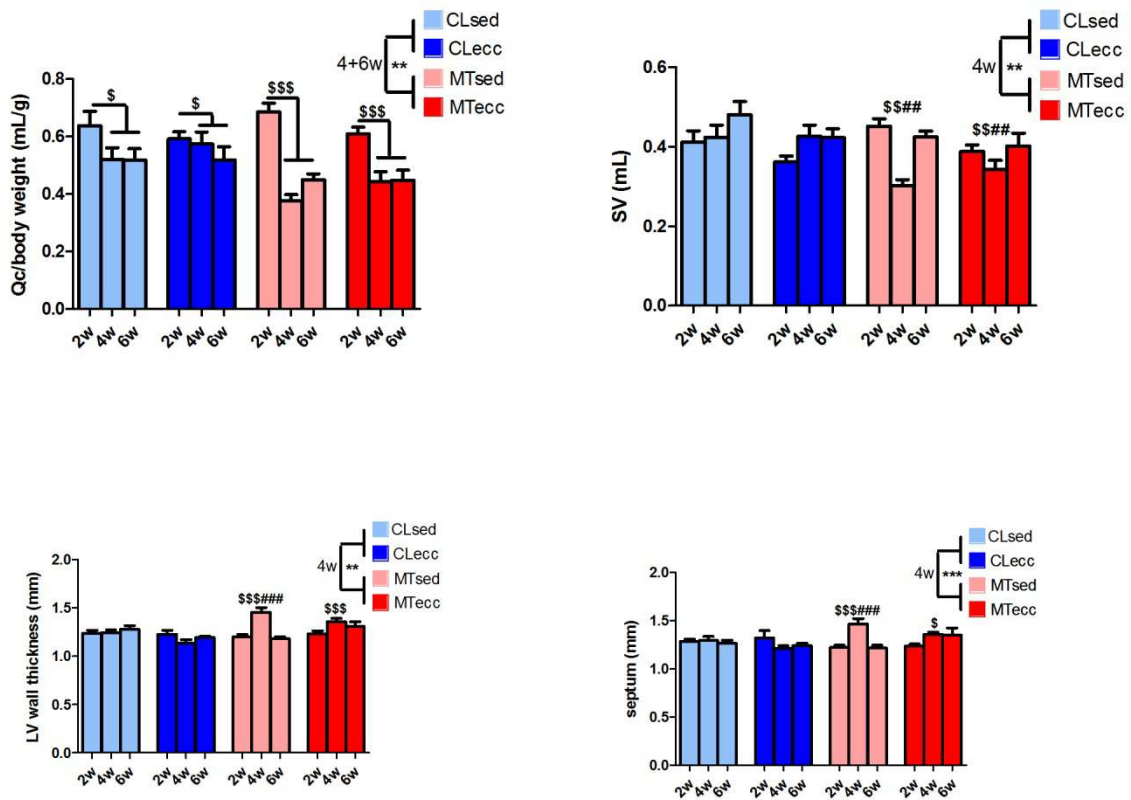


Figure 27 : Le débit cardiaque normalisé par le poids, le volume d'éjection (SV), l'épaisseur de la paroi libre (LV wall thickness) et l'épaisseur du septum mesurés à la 2ème (2w), la 4ème (4w) et la 6ème (6w) semaine après l'injection, dans les groupes témoins, sédentaires (CLsed) et entraînés (CLecc), et les groupes monocrotaline, sédentaires (MTsed) et entraînés (MTecc).

Différence significative CL vs. MT, **p<0,01 ; ***p<0,001

Différence significative MT 4 et 6w vs MT 2w, \$\$\$p< 0,001

Différence significative MT 6w vs. MT 4w, ##p<0,01 ; ###p<0,001

Cathétérisme cardiaque

Les pressions systoliques ventriculaires droites mesurées 6 semaines après l'injection de monocrotaline étaient plus élevées chez les rats malades que chez les rats témoins

(p<0,001)(**figure 28**). Chez ces derniers les pressions systoliques étaient de 22 ± 2 mmHg

dans les deux groupes, CLsed et CLecc. Nous n'avons pas trouvé de différence entre les

pressions systoliques chez les rats MTsed (42 ± 3 mmHg) et les rats MTecc (36 ± 4 mmHg).

Les pressions systémiques, systoliques et moyennes, étaient comparables dans les différents groupes.

Les fréquences cardiaques, échelonnées de 309 à 354 battements/min, étaient comparables dans les différents groupes après anesthésie.

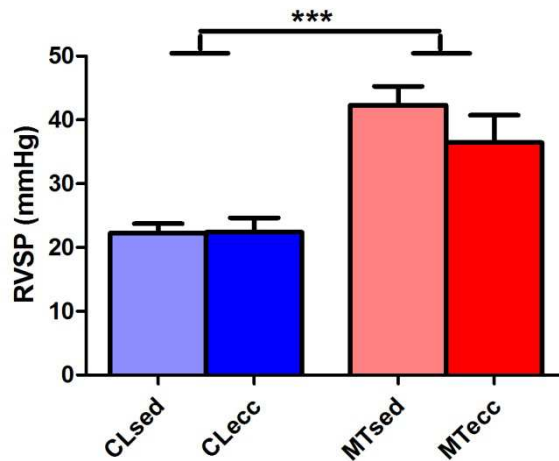


Figure 28 : Les pressions systoliques ventriculaires droites (RVSP) mesurées lors du cathétérisme cardiaque
 CLsed : rats témoins sédentaires ; CLecc : rats témoins entraînés ;
 MTsed : rats monocrotaline sédentaires ; MTecc : rats monocrotaline entraînés
 Différence significative : MT vs. CL, ***p<0,001

Surface transversale des fibres musculaires du muscle vaste intermédiaire

La surface transversale des fibres des rats MT était inférieure à celle des rats CL (p<0,05).

L'entraînement n'a eu d'effet sur la surface de ces fibres, ni dans le groupe témoin, ni dans le groupe malade (MTecc : 31 465 ± 1 740, MTsed : 36 006 ± 3 006, CLecc : 39 796 ± 2 637, CLsed : 40 863 ± 4 497 unités arbitraires)

Biogénèse mitochondriale

Vaste intermédiaire

Chez les rats témoins entraînés, le niveau d'expression de PGC-1 α (p<0,01) et de TFAM (p<0,05) est augmenté par rapport aux témoins sédentaires, mais aussi par rapport aux rats monocrotaline, sédentaires et entraînés. On note une tendance à l'augmentation du niveau d'expression des ARNm de PGC-1 α chez les rats MTecc par rapport aux rats MTsed. Par contre, le niveau d'expression de la citrate-synthase n'est pas modifié par l'entraînement ou par la maladie (**figures 29 et 30**).

Muscle gastrocnémien

Chez les rats monocrotaline, ainsi que chez les rats CLecc, le niveau d'expression des ARNm de TFAm était plus bas par rapport aux rats CLsed ($p < 0,01$). Les autres gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale, ainsi que la citrate-synthase, n'ont pas montré de variations significatives de leur expression ARNm (figures 31 et 32).

Ventricule droit

L'expression des ARNm dans le VD n'était modifiée de façon significative ni par l'hypertension pulmonaire, ni par l'entraînement (figures 33 et 34).

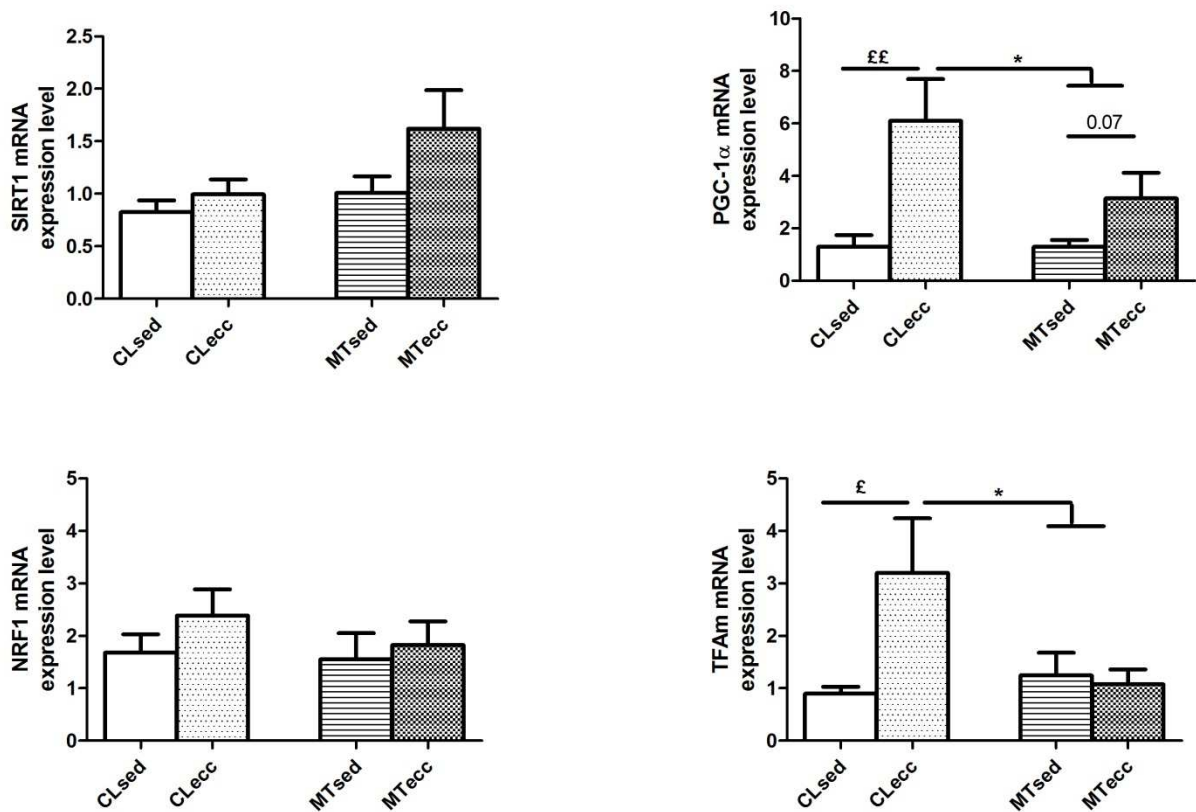


Figure 29 : Le niveau d'expression des ARNm de SIRT1, PGC-1 α , NRF1 et TFAm dans le muscle vaste intermédiaire.

CLsed : rats témoins sédentaires ; CLecc : rats témoins entraînés ; MTsed : rats monocrotaline sédentaires ; MTecc : rats monocrotaline entraînés

Différence significative : CLecc vs. MT, * $p < 0,05$;

Différence significative : CLecc vs. CLsed, £ $p < 0,05$; ££ $p < 0,01$

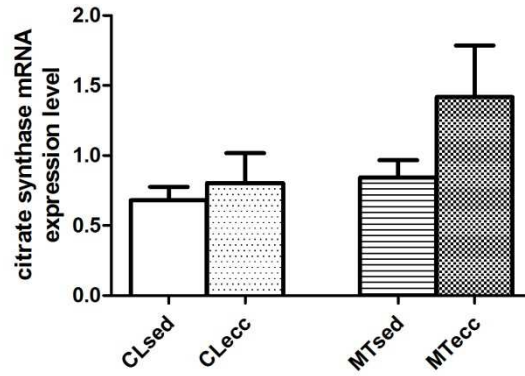


Figure 30 : Le niveau d'expression des ARNm de la citrate-synthase dans le muscle vaste intermédiaire.
 CLsed : rats témoins sédentaires ; CLecc : rats témoins entraînés ;
 MTsed : rats monocrotaline sédentaires ; MTecc : rats monocrotaline entraînés

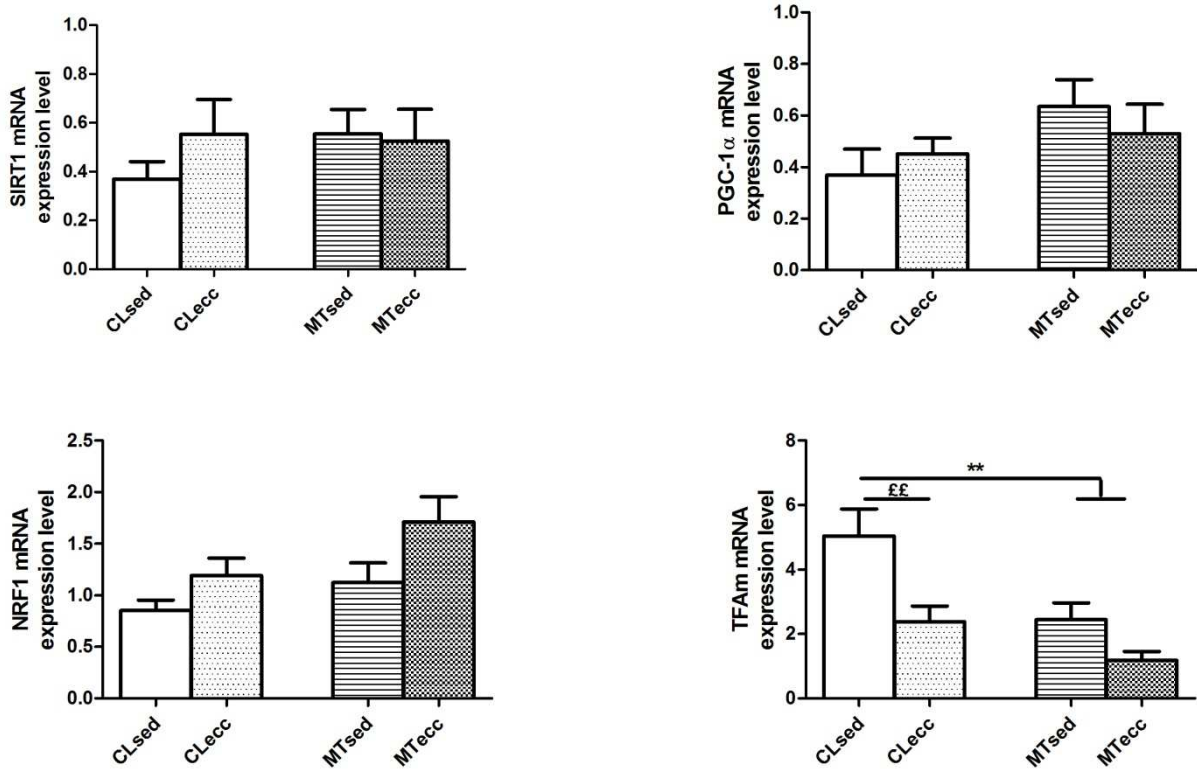


Figure 31 : Le niveau d'expression des ARNm de SIRT1, PGC-1 α , NRF1 et TFAM dans le muscle gastrocnémien
 CLsed : rats témoins sédentaires ; CLecc : rats témoins entraînés ; MTsed : rats monocrotaline sédentaires ; MTecc : rats monocrotaline entraînés
 Différence significative : CLsed vs MT, ** $p < 0,01$;
 Différence significative : CLsed vs. CLecc, ‡ $p < 0,01$

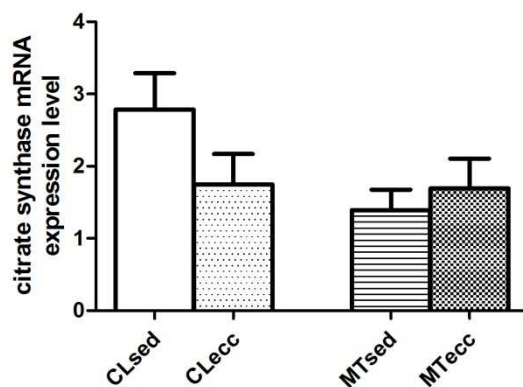


Figure 32 : Le niveau d'expression des ARNm de la citrate-synthase dans le muscle gastrocnémien.

CLsed : rats témoins sédentaires ; CLecc : rats témoins entraînés ; MTsed : rats monocrotaline sédentaires ; MTecc : rats monocrotaline entraînés

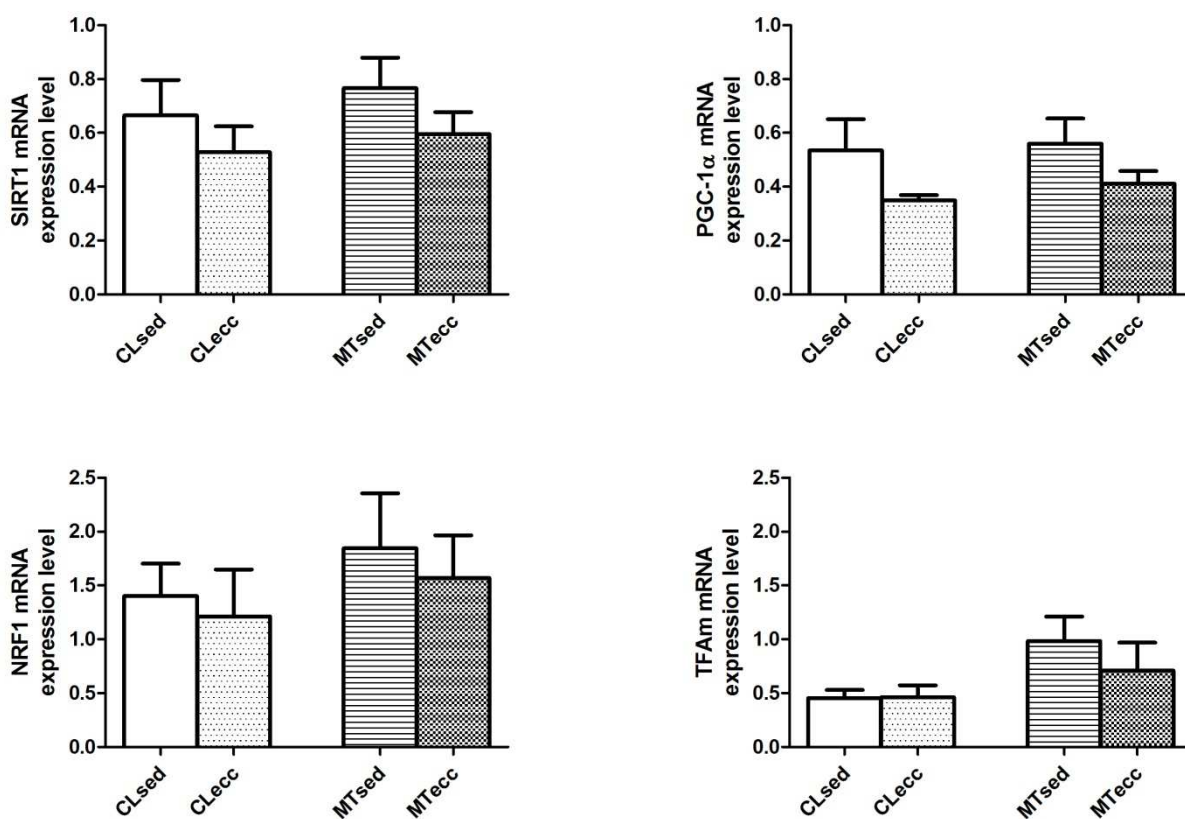


Figure 33 : Le niveau d'expression des ARNm de SIRT1, PGC-1 α , NRF1 et TFAM dans le ventricule droit

CLsed : rats témoins sédentaires ; CLecc : rats témoins entraînés ; MTsed : rats monocrotaline sédentaires ; MTecc : rats monocrotaline entraînés

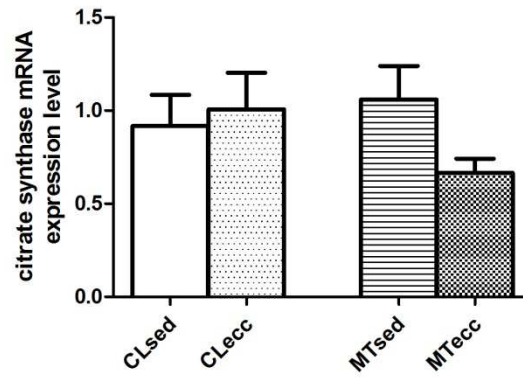


Figure 34 : Le niveau d'expression des ARNm de la citrate-synthase dans le ventricule droit.
CLsed : rats témoins sédentaires ; CLecc : rats témoins entraînés ;
MTsed : rats monocrotaline sédentaires ; MTecc : rats monocrotaline entraînés

DISCUSSION

Les principaux objectifs de cette thèse étaient, dans un premier temps, de caractériser la fonction et la biogénèse mitochondriale dans les ventricules droit et gauche et le muscle squelettique, au cours de l'évolution de l'hypertension pulmonaire induite chez le rat par l'injection de monocrotaline.

Nous avons ainsi souhaité :

1. Savoir si les altérations de la capacité oxydative et de la biogénèse mitochondriale apparaissent d'abord dans le VD, soumis à une post-charge élevée
2. Savoir si les modifications de ces processus s'installent au stade d'hypertrophie ventriculaire droite ou seulement au stade décompensé de l'insuffisance cardiaque
3. Savoir si d'éventuelles altérations de la fonction mitochondriale s'expriment aussi dans le VG

Dans un deuxième temps, ont été étudiés l'intérêt et l'absence d'effet délétère de l'entraînement en modalité excentrique dans un modèle d'hypertension pulmonaire peu évolutive, induite également chez le rat par la monocrotaline.

Nos questions étaient :

1. L'entraînement en modalité excentrique est-il faisable dans le modèle rat-monocrotaline ?
2. L'entraînement en modalité excentrique est-il bien toléré du point de vue hémodynamique dans ce modèle ?
3. Quelles sont les conséquences de l'entraînement sur la biogénèse mitochondriale ?

Cette modalité d'exercice pourrait être une bonne alternative ou un complément à l'entraînement en mode concentrique chez les patients porteurs d'hypertension pulmonaire. Cette étude nous a permis de mieux connaître les réponses hémodynamiques et musculaires induites par ce type d'exercice excentrique.

1^{ère} ETUDE: L'ALTERATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE SQUELETTIQUE PRECEDE CELLE DU VENTRICULE DROIT DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE

Cette étude est la première, à notre connaissance, à s'être intéressée à la biogénèse et la capacité oxydative mitochondriale au cours de l'évolution dans ce modèle d'hypertension pulmonaire, en parallèle dans le VD et le VG, ainsi que dans le muscle squelettique du rat.

Nous avons constaté, 2 semaines après l'injection de monocrotaline :

- L'apparition de l'hypertrophie ventriculaire droite, démontrée par la majoration de *l'index de Fulton* et du rapport *poids VD/poids corporel* (en comparant aux animaux témoins). Nous avons aussi constaté un ralentissement de la *prise du poids* chez les rats malades.
- La diminution du niveau d'*expression des ARNm* des gènes impliqués dans la *biogénèse mitochondriale*, ainsi que de la *citrate-synthase*, dans le muscle gastrocnémien (**GAS**). Cette diminution n'était pas accompagnée par une diminution du niveau de protéine PGC-1 α ou de l'activité de la citrate-synthase. La respiration mitochondriale, mesurée sur les fibres perméabilisées, restait aussi inchangée par rapport à celle des animaux témoins
- Aucune modification des phénomènes étudiés n'a été observée à ce moment dans le VD ou le VG

De façon surprenante, malgré l'apparition de signes d'hypertrophie ventriculaire droite, le muscle cardiaque ne montrait pas d'altérations de la biogénèse ou de la capacité oxydative mitochondriale à ce stade précoce d'évolution. Cela pourrait être dû à une meilleure *protection antioxydante* myocardique par rapport au muscle squelettique. Le *stress oxydant* est un facteur stimulant de la biogénèse mitochondriale, s'il est produit en quantité adéquate (« mitohormesis »), mais délétère s'il est produit en quantité excessive (256). Il n'est pas exclu qu'à ce moment de l'évolution de l'hypertension pulmonaire, le stress oxydant diminue le niveau de PGC-1 α et des autres facteurs de la biogénèse mitochondriale dans le muscle glycolytique, ayant une défense anti-oxydante moins développée. D'ailleurs, il a été suggéré (124) dans ce modèle que l'atrophie musculaire et la diminution de la densité mitochondriale dans le muscle périphérique pourraient constituer un mécanisme protecteur contre l'hypoxie intracellulaire. *Nous nous sommes proposé de compléter l'étude par la mesure en parallèle du stress oxydant (par résonance paramagnétique électronique) et de la capacité antioxydante*

du VD et du GAS grâce à la détermination du contenu en glutathion et du niveau d'expression d'enzymes comme la SOD1 et la SOD2. Ces mesures, réalisées à des différents moments de l'évolution, permettront de mieux comprendre le rôle du stress oxydant dans l'apparition des anomalies mitochondriales.

L'inflammation joue un rôle important dans l'initiation des altérations morphologiques et fonctionnelles du muscle squelettique dans ce modèle, ainsi que dans l'insuffisance cardiaque gauche. Le $TNF-\alpha$ conduit à une diminution de l'expression et de l'activité de PGC-1 α (120, 257) par l'activation de la voie MAPK et de la protéine kinase Akt. Les conséquences sont le déséquilibre entre les voies anaboliques, de synthèse protéique, en faveur des voies cataboliques, ainsi qu'une diminution de l'activité enzymatique oxydative. La mesure de $TNF-\alpha$ dans le GAS et dans le VD, ainsi que dans le plasma, serait intéressante à ce stade précoce de l'évolution, puisque les études précédentes s'intéressant à cet aspect ont été réalisées au stade tardif de l'hypertension pulmonaire (258).

Enfin, le rôle de la monocrotaline ne peut pas être totalement exclu, bien qu'il soit peu probable. Sa concentration plasmatique 24 heures après l'injection sous-cutanée d'une dose de 60mg/kg est de 2 nmol/g (259), beaucoup trop faible pour avoir un effet systémique sur le muscle squelettique. Néanmoins, malgré sa reproductibilité et sa large utilisation, le modèle rat-monocrotaline est critiqué dernièrement et d'autres modèles animaux d'hypertension pulmonaire sont proposés, dont les modifications anatomo-pathologiques vasculaires semblent plus proches de celles observées de la pathologie humaine. Il serait donc intéressant d'étudier la chronologie des événements sur lesquels nous nous sommes focalisés, dans d'autres modèles animaux d'HTAP.

Ces altérations précoces de l'expression des gènes de la biogénèse mitochondriale dans le muscle squelettique ont-elles une traduction fonctionnelle ?

Dans une étude récente il est affirmé que le niveau d'activité physique des rats monocrotaline estimé par télémétrie n'est pas différent de celui des rats témoins jusqu'à 22 jours après l'injection (124). La mesure de la force musculaire sur fibre isolée peut être un des moyens pour apprécier la fonction musculaire périphérique. L'étude de la fonction et du métabolisme des protéines contractiles comme la myosine pourrait être intéressante, puisque il a été montré que dans l'insuffisance cardiaque chez l'homme il existe une diminution sélective des chaînes lourdes de myosine et des ponts actine-myosine actifs (114).

Quatre semaines après l'injection de monocrotaline nous avons distingué deux tableaux cliniques : des animaux qui présentaient des signes d'insuffisance cardiaque droite (léthargie, poils hérissés, inactivité et présence d'un épanchement pleural et ascite lors du sacrifice) et d'autres qui ne manifestaient pas ces signes. Les premiers ont été considérés au stade décompensé et les derniers au stade compensé de l'insuffisance cardiaque droite. Nous avons noté une mortalité importante, de 60%, qui n'est pas toujours soulignée dans les publications. Cette mortalité a été enregistrée entre le 24^{ème} et le 28^{ème} jour après l'administration de monocrotaline. Une fois les signes de décompensation cardiaque installés, l'évolution néfaste était très rapide, en 24h environ. Notre objectif étant de décrire la chronologie des modifications mitochondriales à 4 semaines, environ 40% des rats sont morts avant les 28 jours après l'injection de monocrotaline. Cette mortalité élevée explique probablement la difficulté à réaliser des études sur la transition de l'insuffisance cardiaque stable au stade décompensé.

Au stade compensé nous avons constaté :

- la persistance de la diminution de l'expression ARNm de la biogénèse mitochondriale et de la citrate-synthase dans le GAS et l'apparition des mêmes modifications dans le VD (TFAm exclu pour ce muscle)
- l'absence de changement de niveau d'expression de la protéine PGC-1 α , de l'activité de la citrate-synthase et de la respiration mitochondriale dans ces deux muscle

Cette discordance entre l'expression des ARNm des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale et sa traduction protéique et fonctionnelle dans le VD et le GAS au stade compensé, d'hypertrophie ventriculaire droite, n'a pas une explication claire. Le même phénomène a été décrit dans l'évolution des enzymes anti-oxydantes dans le VD (52), où les pics d'expression ARNm et d'activité enzymatique ne sont pas simultanés. Il pourrait s'agir des mécanismes post-transcriptionnels cytoplasmiques de protection musculaire, tant au niveau cardiaque que dans le muscle squelettique : l'augmentation de l'activité des protéines existantes, le ralentissement de la dégradation des enzymes de la chaînes mitochondriale. D'autre part, la diminution de l'expression des ARNm n'atteint peut-être pas un seuil critique qui se traduit par une diminution de l'expression des protéines, protégeant ainsi le métabolisme oxydatif mitochondrial jusqu'au stade tardif de l'insuffisance cardiaque. Comprendre ces mécanismes protecteurs intracellulaires afin de les renforcer et retarder ainsi la défaillance mitochondriale fait partie actuellement des axes de la recherche qui situe de plus en plus le VD comme l'élément pronostique essentiel de cette pathologie.

Il a été aussi suggéré qu'il existerait un profil différent d'expression des gènes dans le VD, entre les animaux qui vont développer une insuffisance cardiaque droite et ceux qui se maintiennent au stade compensé d'hypertrophie du VD. Ces gènes concernent notamment la biogénèse et la fonction mitochondriale ainsi que la voie MAPK impliquée dans l'apoptose (55). Parmi les gènes étudiés, l'expression du TFAM est diminuée chez les animaux qui vont développer une insuffisance cardiaque droite, mais pas chez les autres. Il est intéressant de noter que dans le stade compensé nos rats n'ont pas montré de diminution significative de l'expression des ARNm de ce gène. Pour cet auteur, les gènes « antiapoptotiques » comme bcl2 s'exprimaient chez les animaux qui ne développaient pas d'insuffisance cardiaque(52). Dans notre étude, caractérisée par une évolution rapide vers la décompensation cardiaque, nous avons observé une augmentation du rapport pro-apoptotique bax/bcl2 et une diminution de l'expression du gène bcl2 à 4 semaines dans le VD, néanmoins sans différence entre le stade compensé et décompensé (résultats non-publiés). Connaître donc le profil d'expression des gènes importants dans la transition du stade compensé au stade décompensé de la maladie pourrait, dans l'avenir, aider à mieux détecter les patients à risque d'évolution rapide de l'HTAP, afin de mettre plus rapidement à leur disposition les moyens thérapeutiques adaptés.

Au stade décompensé, dans le VD et le GAS, il a été observé :

- la diminution de l'expression des gènes, associée à la diminution du niveau de protéine PGC-1 α et de l'activité de la citrate-synthase
- la baisse des capacités oxydatives mitochondriales.

Ce stade est suivi très rapidement du décès de l'animal. Dans le myocarde, la plupart de l'énergie nécessaire au fonctionnement de la pompe cardiaque est produite par la mitochondrie et la défaillance de cette dernière n'est pas compatible avec la survie. En même temps, la diminution de la respiration mitochondriale au niveau du muscle squelettique est concordante avec les données des autres études qui se sont intéressées au métabolisme énergétique du muscle périphérique. Les facteurs impliqués dans ces altérations ont été décrits précédemment (stress oxydant, inflammation systémique). Une cascade reliant les modifications inflammatoires et neuro-hormonales et les anomalies mitochondriales a été proposée, avec le PGC-1 α comme facteur central (120), similaire à ce qui est connu dans l'insuffisance cardiaque gauche. A l'heure actuelle nous ne savons pas si l'altération de la capacité oxydative est liée uniquement à des anomalies structurales ou fonctionnelles

mitochondriales ou à d'autres anomalies associées telles que les transferts énergétiques mitochondrie/cytoplasme et/ou l'utilisation de l'ATP.

Les résultats observés dans le VG diffèrent de ceux obtenus dans le VD et le muscle squelettique :

- absence de modification de l'expression des gènes de la biogénèse mitochondriale, de la citrate-synthase et de la respiration mitochondriale, même au stade avancé de la maladie
- diminution du niveau de protéine PGC-1 α et de l'activité de la citrate-synthase au stade décompensé.

Même si le VG n'est pas soumis à une post-charge élevée, une myocardiopathie ventriculaire gauche intrinsèque a été décrite par plusieurs auteurs. Ces anomalies sont attribuées à une activation neuro-hormonale. Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de modification significative des gènes de la biogénèse mitochondriale. De la même façon, récemment, une réduction de plusieurs protéines impliquées dans la synthèse de l'ATP a été observée dans le VD, mais pas dans le VG de rats monocrotaline.

La diminution de la respiration mitochondriale n'a pas atteint la significativité, malgré la diminution de l'activité de la citrate-synthase. Il a été montré que la diminution de l'activité de la citrate-synthase, marqueur de la densité mitochondriale, n'est pas un facteur limitant des capacités oxydatives (260). Ces données sont également en accord avec celles de Redout et coll. (51), qui n'ont pas trouvé d'altérations de l'activité du complexe II de la chaîne mitochondriale ni d'augmentation du stress oxydant dans le VG des rats monocrotaline. Au total, ces résultats suggèrent que, comparé au muscle squelettique qui est aussi exposé à l'inflammation et à l'activation neuro-hormonale systémique, le VG est capable de préserver l'activité mitochondriale jusqu'à un stade avancé de la maladie.

2^{ème} ETUDE: EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT EN MODALITE EXCENTRIQUE SUR LA TOLERANCE HEMODYNAMIQUE, LA SURVIE ET LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE

Dans cette étude nous avons montré les effets de l'entraînement en mode excentrique utilisé pour la première fois dans un modèle animal d'hypertension pulmonaire modérément évolutive. Nous nous sommes surtout focalisés sur la survie et la tolérance hémodynamique de ce type d'entraînement. Les principaux résultats montrent :

- que la survie des rats malades n'est pas affectée par cette modalité d'entraînement;
- que la tolérance hémodynamique des rats entraînés est bonne pendant les 4 semaines d'entraînement, sans l'apparition de signes de dysfonction cardiaque droite ;
- que cette modalité d'entraînement a permis d'améliorer la vitesse maximale de course ;
- que les effets de l'entraînement sur l'expression des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale sont modestes dans les muscles squelettiques et absents dans le VD.

II.1. CHOIX DU MODELE

Le modèle rat-monocrotaline est souvent utilisé pour l'étude des modifications fonctionnelles, structurales et moléculaires associées à l'hypertrophie et l'insuffisance du VD. L'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline est la conséquence d'une vascularite pulmonaire, suivie par une hypertrophie de la média des artères pulmonaires et une augmentation des résistances vasculaires. L'augmentation de la pression artérielle pulmonaire s'accompagne d'une réponse initialement adaptative du VD par hypertrophie. Cette adaptation initiale progresse vers une dilatation ventriculaire et une insuffisance cardiaque droite en quelques semaines. Les modifications observées et l'évolution sont dose-dépendantes. Après l'injection de 30 mg/kg on observe le développement d'un tableau clinique d'insuffisance cardiaque compensée, alors que l'administration d'une dose de 80 mg/kg conduit à l'apparition précoce de signes d'insuffisance cardiaque et à une mortalité proche de 100% à 4 semaines (55). Un modèle intermédiaire, qui est celui que nous avons utilisé, est obtenu par l'injection de 40 mg/kg de monocrotaline permettant d'obtenir une hypertension pulmonaire d'évolution relativement stable sur 6 à 8 semaines. Ce modèle a été validé dans une étude récente (261). Dans cette étude, l'entraînement sur tapis roulant en mode concentrique n'influçait pas la survie et permettait une augmentation du temps d'endurance de course sur tapis expliquée au moins en partie par une majoration de la capillarisation du VD. Ces résultats encourageants

sont à comparer à l'effet du même entraînement sur un autre groupe de rats chez qui une dose de 60 mg/kg de monocrotaline avait été administrée, entraînement qui avait un effet délétère sur les paramètres hémodynamiques et réduisait la survie.

L'évolution rapide vers l'insuffisance cardiaque après injection de 60 mg/kg a été d'ailleurs confirmée dans notre première étude, où la survie à 4 semaines était de seulement 60% et où, parmi les animaux en vie, 40% manifestaient des signes de décompensation de la maladie. A la lumière de ces résultats, nous avons donc décidé d'utiliser une dose de 40 mg/kg de monocrotaline dans cette nouvelle étude.

II.2. EVOLUTION DES PARAMETRES HEMODYNAMIQUES

Dans notre étude l'entraînement a été débuté **2 semaines** après l'injection, afin que l'hypertension pulmonaire soit établie. Une première échographie cardiaque a permis de faire une première évaluation (« baseline ») et de s'assurer que les animaux injectés avaient bien une hypertension pulmonaire. Bien qu'un calcul direct du niveau de pression pulmonaire n'ait pas pu être réalisé à ce moment (pas de fuite tricuspide), un début de remodelage ventriculaire droit a été observé, avec majoration de l'épaisseur de la paroi antérieure du VD, laissant supposer une élévation des résistances vasculaires pulmonaires chez les rats monocrotaline. L'installation de l'hypertension pulmonaire avec retentissement ventriculaire droit sera confirmée par l'évolution et les contrôles échographiques suivants (à 4 et 6 semaines).

Les paramètres échographiques mesurés **4 semaines** après l'injection de monocrotaline montraient chez les rats malades un remodelage ventriculaire droit anatomique avec une majoration de l'épaisseur de la paroi libre et du diamètre télédiastolique du VD, ainsi que du rapport VD/VG, associé à une probable élévation des résistances pulmonaires (diminution du temps d'accélération du flux antérograde pulmonaire). Ces anomalies s'accompagnaient d'une altération de la fonction systolique du VD avec diminution du TAPSE et diminution significative du débit cardiaque normalisé par le poids.

L'atteinte du VD dans ce groupe entraînait une modification des paramètres morphologiques du VG avec une augmentation de l'épaisseur de la paroi et du septum (hypertrophie du VG) associées à une diminution du volume d'éjection (interaction bi-ventriculaire).

Il est intéressant de noter qu'à **6 semaines**, par rapport à l'échographie réalisée à 4 semaines, les paramètres morphologiques et fonctionnels semblaient meilleurs avec une régression de l'hypertrophie du VG, un VD moins dilaté (en valeur absolue et relative par rapport au VG), une augmentation du TAPSE et une augmentation du temps d'accélération du flux antérograde pulmonaire. Ces données sont à mettre en parallèle avec l'évolution défavorable

de la V_{max} et l'aggravation des signes cliniques des rats (asthénie, difficulté à courir sur le tapis, tachypnée), et suggèrent une détérioration initiale de l'état hémodynamique entre 3 et 4 semaines après l'injection de monocrotaline. Ce moment semble critique dans l'évolution de ce modèle puisque 4 des 5 rats décédés lors de cette étude sont décédés entre J21 et J26 (2 dans le groupe MTecc et 2 dans le groupe MTsed). Les raisons de cette évolution ne sont pas claires, d'autant plus que la majorité des animaux semble en meilleur état après 4 semaines, à la fois sur le plan échographique et sur le plan des capacités d'exercice. *Une telle évolution en deux phases (aggravation initiale puis amélioration) n'a jamais été décrite. Ceci pourrait être dû à l'évolution de l'hypertension pulmonaire en elle-même ou à un effet tardif de la monocrotaline. Afin de répondre à cette question, une étude similaire, mais réalisée sur un autre modèle d'hypertension pulmonaire serait nécessaire.*

Lors du sacrifice, **les mesures hémodynamiques par cathétérisme cardiaque droit** et la mesure des paramètres anatomiques ont confirmé l'existence d'un retentissement ventriculaire droit et d'une hypertension artérielle pulmonaire. Dans notre étude, les pressions télé-systoliques du VD mesurées étaient en moyenne un peu moins élevées que les valeurs retrouvées dans deux autres études utilisant la même dose de monocrotaline. Mais il faut noter que les pressions systoliques du VD sont variables d'une étude à l'autre, pour la même dose de monocrotaline injectée, celle-ci étant le plus souvent de 60 mg/kg (64).

Il est difficile de comparer les pressions obtenues par cathétérisme cardiaque droit à celles calculées à partir des données échographiques dans notre étude. Des pressions pulmonaires n'ont pas pu être obtenues chez tous les rats en échographie (fuite tricuspидienne absente). De plus l'intervalle de temps entre les 2 explorations était de 5 à 7 jours, et la maladie peut évoluer dans ce délai. Enfin, comme chez l'homme, plus que le niveau de pression artérielle pulmonaire, la gravité de l'atteinte et le pronostic sont dus à l'atteinte du VD. Au cours de l'HTAP, la diminution de la pression artérielle pulmonaire peut se voir en fin d'évolution, associée à une diminution de débit cardiaque et signe un tournant défavorable.

II.3. CHOIX DU PROTOCOLE D'ENTRAINEMENT

Une pente d'inclinaison du tapis de 15° a été choisie afin que l'exercice soit excentrique, car un moindre degré avait le risque de générer une activité musculaire contractile plus sur un mode concentrique qu'excentrique. D'autre part, il n'était pas possible de faire courir les animaux en descente au-delà de 17° d'inclinaison car à partir de cette valeur, en effet, ils

glissent vers le bas sur le tapis roulant. Avec la même pente en descente, il a été montré dans notre laboratoire que la vitesse de course à 50% de la vitesse maximale correspond à une VO_2 d'environ 65% de la VO_{2max} mesurée par masque chez des rats Wistar (publication en préparation). Cette valeur correspond en clinique humaine au seuil ventilatoire et dans l'étude de Meyer et coll. (248) l'entraînement des patients coronariens a été réalisé à une intensité similaire en modalité excentrique et concentrique. Nous avons adapté la vitesse de course à la V_{max} individuelle de chaque rat, témoin ou malade, mesurée lors d'un test incrémental au début de la période d'entraînement, mais aussi à 2 semaines d'entraînement, afin de tenir compte de la modification de leur capacité à l'effort.

II.4. EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT

La **mortalité** n'était pas différente dans les 2 groupes de rats monocrotaline et elle n'était pas différente de celle rapportée dans 2 études qui ont utilisé la même dose de monocrotaline, entre 12 et 20%, 6 semaines après l'administration de produit (261, 262).

La courbe d'**évolution du poids** a montré une différence statistiquement significative à partir de la 3^{ème} semaine d'entraînement entre les rats CL_{ecc} et CL_{sed}, mais pas entre le groupe MT_{ecc} et le groupe MT_{sed}. Cette différence pourrait être due à un métabolisme plus intense ou à une diminution de la quantité de nourriture ingérée, ou aux 2 facteurs. *Pour répondre à cette question il serait nécessaire de distribuer la même quantité de nourriture aux rats témoins entraînés aux animaux sédentaires et, si possible, de quantifier le métabolisme énergétique par des mesures de calorimétrie.*

L'entraînement n'a induit la détérioration des **paramètres hémodynamiques** mesurés en échographie ni chez les rats témoins, ni chez les rats monocrotaline puisque les valeurs mesurées 4 et 6 semaines après l'injection ne varient pas en fonction de l'entraînement. Nous avons observé par contre que le poids du VD et du VG + septum normalisés par le poids corporel était plus important dans le groupe MT_{ecc} que dans le groupe MT_{sed}. Cela signifierait que l'entraînement induit une hypertrophie des deux ventricules, mais nous n'avons pas constaté de conséquence sur les valeurs de pression systolique du VD ou de pression systémique entre les deux groupes.

L'évolution de la V_{max} après 4 semaines d'entraînement témoigne d'un bénéfice dans les 2 groupes entraînés, même si le mécanisme central ou périphérique de cette amélioration n'a pas été démontré.

Il serait intéressant de mesurer la VO₂max au début et à la fin de la période d'entraînement. Il n'existe pas de données sur l'évolution de la VO₂ après un entraînement en mode excentrique proche de celui utilisé dans cette étude, chez le rat. Chez l'homme, la VO₂pic s'améliore après un entraînement en excentrique sur ergocycle (248).

Il est peu probable que l'augmentation de la V_{max} soit due à une amélioration de la capacité oxydative mitochondriale. En effet, une étude récente réalisée dans notre laboratoire n'a pas trouvé de modifications des capacités oxydatives mitochondriales chez des rats sains après 20 jours d'entraînement en mode excentrique, mais ceci à une intensité un peu plus faible (33 cm/s) (*Eccentric vs concentric exercise training: effect on mitochondrial function in rat skeletal muscle*, Isner ME, Exp Physiol, en révision).

Il a été montré chez l'homme et chez l'animal que l'exercice excentrique améliore surtout la force musculaire (184, 235-237, 263). Cette amélioration de force est associée classiquement à une hypertrophie musculaire (235, 236, 242) via la stimulation des gènes de la croissance comme l'IGF-1 (244), qui touche surtout les fibres de type II (234). Il semble que cette hypertrophie dépende de l'intensité de l'exercice, mais aussi de la durée d'entraînement et du type d'exercice excentrique, segmentaire ou global. Néanmoins, plusieurs études ont montré que l'augmentation de la force musculaire n'est pas toujours associée à l'augmentation de la masse musculaire ou de la taille de fibres (264). Chez des patients coronariens entraînés pendant 8 semaines à 60% de la VO₂pic, il n'a pas été observé de majoration de la surface des fibres musculaires malgré une amélioration de 12% de la force (186). D'autres modifications de la structure musculaire peuvent être impliquées, comme la réorganisation des protéines du cytosquelette, l'augmentation du nombre de sarcomères en série (229, 240, 246), mais aussi des mécanismes d'adaptation neuro-musculaire (235, 264) et de perception proprioceptive.

Nous n'avons pas pu quantifier un éventuel bénéfice sur la force musculaire. Le grip-test n'a pas été contributif puisque les valeurs obtenues montraient que la force musculaire des pattes avant se maintenait même chez les rats monocrotaline qui manifestaient des signes d'insuffisance cardiaque et qui sont décédés rapidement (résultats non-présentés). Nous n'avons pas trouvé non plus d'augmentation de la surface des fibres musculaires dans le vaste intermédiaire chez les rats entraînés, témoins ou malades. *Une mesure de la force musculaire sur muscle isolé pourrait apporter plus d'information concernant le gain de force après ce type d'entraînement.*

Les dosages des CK plasmatiques, marqueurs du dommage cellulaire musculaire, notamment de la rupture des sarcolemmes (265), ont montré que l'intensité de l'entraînement n'était pas délétère sur plan musculaire, surtout pour les animaux malades, puisque les valeurs obtenues à 24 et 48h après la première séance n'étaient pas significativement plus élevées que les valeurs obtenues avant le début d'entraînement. En revanche, parallèlement à la détérioration des paramètres échographiques observée à 2 semaines d'entraînement, ce qui correspondait aussi à l'ajustement de la vitesse de course en fonction de la V_{max} , nous avons observé une élévation des CK par rapport aux rats témoins. Les faibles valeurs de l'activité de CK observées à 2 et 3 semaines d'entraînement chez les rats témoins par rapport aux rats malades peuvent être dues au fait que pour les rats témoins l'intensité de l'exercice était relativement faible. *Il serait intéressant d'analyser au cours de l'entraînement, dans ce modèle ainsi qu'en clinique humaine, d'une part, les lésions de type dommage musculaire (infiltration inflammatoire et éventuelle nécrose des fibres musculaires et altérations des protéines contractiles) et d'autre part de quantifier le stress oxydant par la mesure des ROS.* Il est connu chez le sujet sain que la répétition des exercices excentriques et l'augmentation progressive de la puissance mécanique réduit le stress induit par cette modalité de contraction musculaire (202, 236, 263), aboutissant à la même augmentation de la force musculaire, mais sur une période de temps plus longue (263).

La **biogénèse mitochondriale** n'a pas été influencée de façon majeure par l'entraînement. Dans le muscle vaste intermédiaire, le muscle le plus sollicité lors d'un exercice excentrique tant chez l'animal que chez l'homme (188, 190), nous avons observé une augmentation significative du niveau d'expression de PGC-1 α dans les groupes entraînés. Le PGC-1 α étant considéré comme le facteur central de contrôle de la biogénèse mitochondriale et de la plasticité musculaire à l'exercice, sa surexpression peut représenter un signal positif d'adaptation musculaire à l'exercice. L'inflammation et la production de ROS qui accompagnent les premières séances d'exercice en mode excentrique peuvent diminuer l'expression de PGC-1 α (266). L'adaptation musculaire au cours de l'entraînement, caractérisée par une diminution de la production de ROS et la disparition ou un moindre degré d'inflammation par rapport à un exercice aigu, peuvent permettre la stimulation de PGC-1 α par l'exercice.

Le niveau d'expression des ARNm de TFAM est aussi plus important dans le muscle vaste intermédiaire du groupe CLecc que dans les 3 autres groupes. Cette augmentation de l'expression du TFAM vient à l'encontre d'une étude qui a montré une diminution de ce

facteur dans le muscle vaste latéral chez des patients coronariens après 8 semaines d'entraînement excentrique (244). Néanmoins, les biopsies musculaires chez ces patients ont été réalisées à 48 heures après la dernière séance d'entraînement, alors que nous avons prélevés les muscles 24h après la dernière séance d'entraînement. La cinétique post-exercice de ce facteur est peu connue (153, 244), ce qui pourrait expliquer la discordance des résultats. Il a été démontré que la stimulation de l'expression des ARNm de TFAM est dépendante de l'intensité de l'exercice (157, 267). Dans notre étude l'intensité de l'entraînement était constante pendant les 2 dernières semaines et il est probable que cette intensité n'était pas suffisante à la fin de l'entraînement pour stimuler la transcription des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale.

Nos résultats doivent être complétés prochainement par la mesure de la concentration de protéine PGC-1 α et de l'activité de la citrate-synthase. En effet, les modifications du niveau ARNm n'ont pas de traduction fonctionnelle avant les modifications de la concentration des protéines codées. De plus, les mécanismes post-transcriptionnels qui peuvent intervenir dans le contrôle de l'expression d'un gène font que la réponse en termes de protéine et de fonction ne peut pas être prédite sur le changement de l'expression des ARNm.

En conclusion, notre étude a montré que l'entraînement en mode excentrique est faisable et bien toléré sur plan hémodynamique dans ce modèle animal d'hypertension pulmonaire stable. Il a permis une moindre détérioration de la vitesse maximale de course chez les rats malades et une amélioration chez les rats témoins. Les effets sur l'expression des ARNm des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale, notamment le PGC-1 α , ont été positifs dans le muscle vaste intermédiaire, mais modestes, et nécessitent des études complémentaires avant de confirmer un effet sur la fonction mitochondriale.

Néanmoins, comme il a été montré dans d'autres pathologies chroniques, l'entraînement excentrique en endurance pourrait apporter un bénéfice chez les patients porteurs d'une hypertension pulmonaire stabilisée par le traitement. Seul ou associé à l'entraînement classique concentrique qui s'impose de plus en plus dans la prise en charge de ces patients, le mode d'exercice excentrique permettra probablement une amélioration de la force musculaire et de la qualité de vie à un moindre coût métabolique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude chronologique des altérations mitochondriales que nous avons réalisée a montré qu'elles se développaient à des temps distincts de l'évolution de la maladie pour chaque type de muscle (VD, VG, muscle gastrocnémien, dans notre étude). Les mécanismes menant à l'altération musculaire diffèrent, au moins en partie, en fonction du muscle (par exemple, la surcharge en pression n'affecte pas le VG, alors que l'inflammation systémique et le stress oxydant touche l'ensemble des muscles), mais les caractéristiques intrinsèques de chaque muscle (comme la capacité anti-oxydante) interviennent probablement, comme cela a été également suspecté dans la myopathie induite par les statines (256). Identifier les mécanismes de défense propre à chaque phénotype musculaire serait un champ de recherche à développer.

Les modifications de la biogenèse mitochondriales que nous avons observées sont précoces en terme de transcription des ARNm, mais très tardives en terme de réduction des niveaux d'expression protéique ou d'activité enzymatique, qui sont concomitantes de la dégradation de la respiration mitochondriale. Cette étude chronologique a montré que la respiration mitochondriale ne chutait qu'au stade décompensé de l'insuffisance cardiaque, dans le VD et le muscle squelettique. Dans l'insuffisance cardiaque gauche, chez l'homme comme chez l'animal, la capacité oxydative mitochondriale est altérée plus précocement. Cette discordance est peut être due à la rapidité de l'évolution de la maladie cardiaque et vasculaire pulmonaire observée dans le modèle d'HTAP que nous avons utilisé. A ce jour, il n'est pas possible de savoir si cette détérioration de la respiration mitochondriale est une conséquence ou un facteur contribuant à la décompensation. Il a été montré dans l'insuffisance cardiaque gauche que la détérioration de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique est, au moins partiellement, réversible par des différentes thérapies (95). Une des potentielles cibles de recherche dans ce sens pourrait être l'augmentation de l'activité de PGC-1 α , un des principaux facteurs régulateurs de la structure et la fonction mitochondriale.

Enfin, cette première étude a montré que les anomalies mitochondriales survenaient plus précocement dans le muscle squelettique que dans le VD. Ces résultats permettaient donc d'envisager un réentraînement à l'effort dans cette pathologie. En effet, la survenue d'une atteinte précoce du VD aurait mis en question la tolérance hémodynamique de l'exercice.

Au cours de la seconde étude, au cours de laquelle des rats « monocrotaline » ont été réentraînés en utilisant l'exercice excentrique, nous avons montré que la survie n'était pas diminuée et que la tolérance hémodynamique était bonne. Il s'agit d'un résultat important car

l'exercice a longtemps été considéré comme délétère, et donc contre-indiqué chez les patients HTAP. Il s'agit de la première étude appliquant un exercice excentrique dans cette pathologie. L'intérêt est qu'il permet un travail musculaire important pour une stimulation métabolique plus faible que celle induite par un exercice concentrique. Ceci implique donc une moindre sollicitation cardiaque chez le patient. Quelques données comme l'amélioration de la vitesse maximale de course permettent de penser que les modalités que nous avons adoptées sont non seulement bien tolérées mais ont également un effet bénéfique. Mais le modèle animal ne permet pas d'étudier aisément les améliorations fonctionnelles qui pourraient être obtenues. Il serait intéressant de proposer une étude chez l'homme, chez qui l'on évaluerait les éventuelles améliorations de la $VO_2\text{pic}$, de la force musculaire, de temps d'endurance. Cette modalité d'entraînement en excentrique vise surtout à améliorer la force musculaire. Il serait donc pertinent d'associer les deux modalités d'entraînement et d'évaluer leur bénéfice chez les patients.

BIBLIOGRAPHIE

1. Galie, N., M.M. Hoeper, M. Humbert, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2009;34;(6)1219-63.
2. Humbert, M., N.W. Morrell, S.L. Archer, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43;(12 Suppl S)13S-24S.
3. Humbert, M., O. Sitbon, A. Chaouat, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173;(9)1023-30.
4. Humbert, M., O. Sitbon, A. Yaici, et al. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2010;36;(3)549-55.
5. Chin, K.M., N.H. Kim, and L.J. Rubin. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis.* 2005;16;(1)13-8.
6. Barst, R.J., J.S. Gibbs, H.A. Ghofrani, et al. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54;(1 Suppl)S78-84.
7. Galie, N., L. Rubin, M. Hoeper, et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2008;371;(9630)2093-100.
8. Hachulla, E., D. Launay, A. Yaici, et al. Pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in patients with functional class II dyspnoea: mild symptoms but severe outcome. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49;(5)940-4.
9. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166;(1)111-7.
10. Miyamoto, S., N. Nagaya, T. Satoh, et al. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161;(2 Pt 1)487-92.
11. Sitbon, O., M. Humbert, H. Nunes, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40;(4)780-8.
12. Paciocco, G., F.J. Martinez, E. Bossone, et al. Oxygen desaturation on the six-minute walk test and mortality in untreated primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2001;17;(4)647-52.
13. Mereles, D., N. Ehlken, S. Kreuzer, et al. Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation.* 2006;114;(14)1482-9.

14. Degano, B., O. Sitbon, L. Savale, et al. Characterization of pulmonary arterial hypertension patients walking more than 450 m in 6 min at diagnosis. *Chest*. 2010;137;(6)1297-303.
15. Wensel, R., C.F. Opitz, S.D. Anker, et al. Assessment of survival in patients with primary pulmonary hypertension: importance of cardiopulmonary exercise testing. *Circulation*. 2002;106;(3)319-24.
16. Sun, X.G., J.E. Hansen, R.J. Oudiz, et al. Exercise pathophysiology in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;104;(4)429-35.
17. Deboeck, G., C. Scoditti, S. Huez, et al. Exercise to predict outcome in idiopathic vs associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2012;
18. Raymond, R.J., A.L. Hinderliter, P.W. Willis, et al. Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39;(7)1214-9.
19. Zhang, R., L.Z. Dai, W.P. Xie, et al. Survival of Chinese patients with pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Chest*. 2011;140;(2)301-9.
20. Badano, L.P., C. Ginchina, J. Easaw, et al. Right ventricle in pulmonary arterial hypertension: haemodynamics, structural changes, imaging, and proposal of a study protocol aimed to assess remodelling and treatment effects. *Eur J Echocardiogr*. 2010;11;(1)27-37.
21. Miller, D., M.G. Farah, A. Liner, et al. The relation between quantitative right ventricular ejection fraction and indices of tricuspid annular motion and myocardial performance. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17;(5)443-7.
22. Forfia, P.R., M.R. Fisher, S.C. Mathai, et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174;(9)1034-41.
23. Tei, C., K.S. Dujardin, D.O. Hodge, et al. Doppler echocardiographic index for assessment of global right ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr*. 1996;9;(6)838-47.
24. Yeo, T.C., K.S. Dujardin, C. Tei, et al. Value of a Doppler-derived index combining systolic and diastolic time intervals in predicting outcome in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 1998;81;(9)1157-61.
25. Ghio, S., C. Klersy, G. Magrini, et al. Prognostic relevance of the echocardiographic assessment of right ventricular function in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2010;140;(3)272-8.

26. Alkon, J., T. Humpl, C. Manlihot, et al. Usefulness of the right ventricular systolic to diastolic duration ratio to predict functional capacity and survival in children with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol.* 2010;106;(3)430-6.
27. Simonneau, G., I.M. Robbins, M. Beghetti, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54;(1 Suppl)S43-54.
28. van de Veerdonk, M.C., T. Kind, J.T. Marcus, et al. Progressive right ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58;(24)2511-9.
29. Thenappan, T., S.J. Shah, S. Rich, et al. Survival in pulmonary arterial hypertension: a reappraisal of the NIH risk stratification equation. *Eur Respir J.* 2010;35;(5)1079-87.
30. Benza, R.L., D.P. Miller, M. Gomberg-Maitland, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation.* 2010;122;(2)164-72.
31. Humbert, M., O. Sitbon, A. Chaouat, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation.* 2010;122;(2)156-63.
32. Bogaard, H.J., K. Abe, A. Vonk Noordegraaf, et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest.* 2009;135;(3)794-804.
33. Bogaard, H.J., R. Natarajan, S.C. Henderson, et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation.* 2009;120;(20)1951-60.
34. Faber, M.J., M. Dalinghaus, I.M. Lankhuizen, et al. Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291;(4)H1580-6.
35. Haddad, F., E. Ashley, and E.D. Michelakis. New insights for the diagnosis and management of right ventricular failure, from molecular imaging to targeted right ventricular therapy. *Curr Opin Cardiol.* 2010;25;(2)131-40.
36. Mann, D.L. Basic mechanisms of left ventricular remodeling: the contribution of wall stress. *J Card Fail.* 2004;10;(6 Suppl)S202-6.
37. Lowes, B.D., W. Minobe, W.T. Abraham, et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997;100;(9)2315-24.

38. Chaponnier, C. and G. Gabbiani. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol.* 2004;204;(4)386-95.
39. Khan, R. and R. Sheppard. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology.* 2006;118;(1)10-24.
40. Marcus, J.T., C.T. Gan, J.J. Zwanenburg, et al. Interventricular mechanical asynchrony in pulmonary arterial hypertension: left-to-right delay in peak shortening is related to right ventricular overload and left ventricular underfilling. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51;(7)750-7.
41. Vonk-Noordegraaf, A., J.T. Marcus, C.T. Gan, et al. Interventricular mechanical asynchrony due to right ventricular pressure overload in pulmonary hypertension plays an important role in impaired left ventricular filling. *Chest.* 2005;128;(6 Suppl)628S-630S.
42. Gan, C.T., J.W. Lankhaar, J.T. Marcus, et al. Impaired left ventricular filling due to right-to-left ventricular interaction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290;(4)H1528-33.
43. Mauritz, G.J., J.T. Marcus, N. Westerhof, et al. Prolonged right ventricular post-systolic isovolumic period in pulmonary arterial hypertension is not a reflection of diastolic dysfunction. *Heart.* 2011;97;(6)473-8.
44. Sano, M., T. Minamino, H. Toko, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature.* 2007;446;(7134)444-8.
45. Partovian, C., S. Adnot, S. Eddahibi, et al. Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1998;275;(6 Pt 2)H1948-56.
46. Piao, L., G. Marsboom, and S.L. Archer. Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *J Mol Med (Berl).* 2010;88;(10)1011-20.
47. Sharma, S., H. Taegtmeyer, J. Adroge, et al. Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286;(3)H1185-92.
48. Graham, R.M., D.P. Frazier, J.W. Thompson, et al. A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J Exp Biol.* 2004;207;(Pt 18)3189-200.
49. Do, E., S. Baudet, M. Verdys, et al. Energy metabolism in normal and hypertrophied right ventricle of the ferret heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29;(7)1903-13.

50. Daicho, T., T. Yagi, Y. Abe, et al. Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 2009;111;(1)33-43.
51. Redout, E.M., M.J. Wagner, M.J. Zuidwijk, et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res.* 2007;75;(4)770-81.
52. Ecartot-Laubriet, A., M. Assem, F. Poirson-Bichat, et al. Stage-dependent activation of cell cycle and apoptosis mechanisms in the right ventricle by pressure overload. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1586;(3)233-42.
53. Farahmand, F., M.F. Hill, and P.K. Singal. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem.* 2004;260;(1-2)21-9.
54. Janicki, J.S., G.L. Brower, J.D. Gardner, et al. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res.* 2006;69;(3)657-65.
55. Buermans, H.P., E.M. Redout, A.E. Schiel, et al. Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. *Physiol Genomics.* 2005;21;(3)314-23.
56. Reddy, S., M. Zhao, D.Q. Hu, et al. Dynamic microRNA expression during the transition from right ventricular hypertrophy to failure. *Physiol Genomics.* 2012;44;(10)562-75.
57. Rimbaud, S., A. Garnier, and R. Ventura-Clapier. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep.* 2009;61;(1)131-8.
58. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, V. Veksler, et al. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1813;(7)1360-72.
59. Garnier, A., J. Zoll, D. Fortin, et al. Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail.* 2009;2;(4)342-50.
60. Sebastiani, M., C. Giordano, C. Nediani, et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50;(14)1362-9.
61. Garnier, A., D. Fortin, C. Delomenie, et al. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol.* 2003;551;(Pt 2)491-501.

62. Kemi, O.J., M.A. Hoydal, P.M. Haram, et al. Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan. *Cardiovasc Res.* 2007;76;(1)91-9.
63. van Albada, M.E., R.M. Berger, M. Niggebrugge, et al. Prostacyclin therapy increases right ventricular capillarisation in a model for flow-associated pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2006;549;(1-3)107-16.
64. Gomez-Arroyo, J.G., L. Farkas, A.A. Alhussaini, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302;(4)L363-9.
65. Hessel, M.H., P. Steendijk, B. den Adel, et al. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291;(5)H2424-30.
66. Campian, M.E., M. Hardziyenka, K. de Bruin, et al. Early inflammatory response during the development of right ventricular heart failure in a rat model. *Eur J Heart Fail.* 2010;12;(7)653-8.
67. Wilson, D.W., H.J. Segall, L.C. Pan, et al. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res.* 1989;38;(1)57-80.
68. Akhavein, F., E.J. St-Michel, E. Seifert, et al. Decreased left ventricular function, myocarditis, and coronary arteriolar medial thickening following monocrotaline administration in adult rats. *J Appl Physiol.* 2007;103;(1)287-95.
69. Taraseviciene-Stewart, L., Y. Kasahara, L. Alger, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *Faseb J.* 2001;15;(2)427-38.
70. Simonini, A., C.S. Long, G.A. Dudley, et al. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circ Res.* 1996;79;(1)128-36.
71. Vescovo, G., F. Serafini, L. Facchin, et al. Specific changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition in cardiac failure: differences compared with disuse atrophy as assessed on microbiopsies by high resolution electrophoresis. *Heart.* 1996;76;(4)337-43.

72. Stratton, J.R., W.C. Levy, M.D. Cerqueira, et al. Cardiovascular responses to exercise. Effects of aging and exercise training in healthy men. *Circulation*. 1994;89;(4)1648-55.
73. Naeije, R. Breathing more with weaker respiratory muscles in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2005;25;(1)6-8.
74. Meyer, F.J., D. Lossnitzer, A.V. Kristen, et al. Respiratory muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2005;25;(1)125-30.
75. Kabitz, H.J., A. Schwoerer, H.C. Bremer, et al. Impairment of respiratory muscle function in pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114;(2)165-71.
76. Anker, S.D., P. Ponikowski, S. Varney, et al. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet*. 1997;349;(9058)1050-3.
77. Naeije, R. and P. van de Borne. Clinical relevance of autonomic nervous system disturbances in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2009;34;(4)792-4.
78. de Man, F.S., H.W. van Hees, M.L. Handoko, et al. Diaphragm muscle fiber weakness in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183;(10)1411-8.
79. Granton, J.T., M.T. Naughton, D.C. Benard, et al. CPAP improves inspiratory muscle strength in patients with heart failure and central sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153;(1)277-82.
80. Mancini, D.M., D. Henson, J. La Manca, et al. Benefit of selective respiratory muscle training on exercise capacity in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation*. 1995;91;(2)320-9.
81. Bauer, R., C. Dehnert, P. Schoene, et al. Skeletal muscle dysfunction in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2007;101;(11)2366-9.
82. Mainguy, V., F. Maltais, D. Saey, et al. Peripheral muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2010;65;(2)113-7.
83. Harrington, D., S.D. Anker, and A.J. Coats. Preservation of exercise capacity and lack of peripheral changes in asymptomatic patients with severely impaired left ventricular function. *Eur Heart J*. 2001;22;(5)392-9.
84. Jondeau, G., S.D. Katz, L. Zohman, et al. Active skeletal muscle mass and cardiopulmonary reserve. Failure to attain peak aerobic capacity during maximal bicycle exercise in patients with severe congestive heart failure. *Circulation*. 1992;86;(5)1351-6.

85. Mettauer, B., E. Lampert, P. Petitjean, et al. Persistent exercise intolerance following cardiac transplantation despite normal oxygen transport. *Int J Sports Med.* 1996;17;(4)277-86.
86. Minotti, J.R. and B.M. Massie. Exercise training in heart failure patients. Does reversing the peripheral abnormalities protect the heart? *Circulation.* 1992;85;(6)2323-5.
87. Harridge, S.D., G. Magnusson, and A. Gordon. Skeletal muscle contractile characteristics and fatigue resistance in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J.* 1996;17;(6)896-901.
88. Piepoli, M., A.L. Clark, M. Volterrani, et al. Contribution of muscle afferents to the hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in patients with chronic heart failure: effects of physical training. *Circulation.* 1996;93;(5)940-52.
89. Ponikowski, P.P., T.P. Chua, D.P. Francis, et al. Muscle ergoreceptor overactivity reflects deterioration in clinical status and cardiorespiratory reflex control in chronic heart failure. *Circulation.* 2001;104;(19)2324-30.
90. Piepoli, M.F., C. Davos, D.P. Francis, et al. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *Bmj.* 2004;328;(7433)189.
91. Rolland, Y., G. Abellan van Kan, S. Gillette-Guyonnet, et al. Cachexia versus sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14;(1)15-21.
92. Dalla Libera, L., G. Vescovo, and M. Volterrani. Physiological basis for contractile dysfunction in heart failure. *Curr Pharm Des.* 2008;14;(25)2572-81.
93. Filippatos, G.S., C. Kanatselos, D.D. Manolatos, et al. Studies on apoptosis and fibrosis in skeletal musculature: a comparison of heart failure patients with and without cardiac cachexia. *Int J Cardiol.* 2003;90;(1)107-13.
94. Georgiadou, P. and S. Adamopoulos. Skeletal muscle abnormalities in chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2012;9;(2)128-32.
95. Mettauer, B., J. Zoll, A. Garnier, et al. Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflugers Arch.* 2006;452;(6)653-66.
96. Schulze, P.C., S. Gielen, V. Adams, et al. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2003;98;(4)267-74.
97. Adams, V., H. Jiang, J. Yu, et al. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33;(4)959-65.

98. Massie, B.M., M. Conway, R. Yonge, et al. 31P nuclear magnetic resonance evidence of abnormal skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1987;60;(4)309-15.
99. Drexler, H. Skeletal muscle failure in heart failure. *Circulation.* 1992;85;(4)1621-3.
100. Mettauer, B., J. Zoll, H. Sanchez, et al. Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure patients versus sedentary or active control subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38;(4)947-54.
101. Williams, A.D., S. Selig, D.L. Hare, et al. Reduced exercise tolerance in CHF may be related to factors other than impaired skeletal muscle oxidative capacity. *J Card Fail.* 2004;10;(2)141-8.
102. Zoll, J., H. Sanchez, B. N'Guessan, et al. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2002;543;(Pt 1)191-200.
103. Garnier, A., D. Fortin, J. Zoll, et al. Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *Faseb J.* 2005;19;(1)43-52.
104. Vescovo, G., R. Zennaro, M. Sandri, et al. Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30;(11)2449-59.
105. Yamaguchi, F., K. Kawana, K. Tanonaka, et al. Improvement of exercise capacity of rats with chronic heart failure by long-term treatment with trandolapril. *Br J Pharmacol.* 1999;126;(7)1585-92.
106. Zoll, J., L. Monassier, A. Garnier, et al. ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J Appl Physiol.* 2006;101;(2)385-91.
107. Munkvik, M., T.A. Rehn, G. Slettalokken, et al. Training effects on skeletal muscle calcium handling in human chronic heart failure. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42;(5)847-55.
108. Esposito, F., O. Mathieu-Costello, P.L. Entin, et al. The skeletal muscle VEGF mRNA response to acute exercise in patients with chronic heart failure. *Growth Factors.* 2010;28;(2)139-47.
109. Richardson, T.E., C.A. Kindig, T.I. Musch, et al. Effects of chronic heart failure on skeletal muscle capillary hemodynamics at rest and during contractions. *J Appl Physiol.* 2003;95;(3)1055-62.

110. Rehn, T.A., M. Munkvik, P.K. Lunde, et al. Intrinsic skeletal muscle alterations in chronic heart failure patients: a disease-specific myopathy or a result of deconditioning? *Heart Fail Rev.* 2012;17;(3)421-36.
111. Toth, M.J., M.S. Miller, K.A. Ward, et al. Skeletal muscle mitochondrial density, gene expression, and enzyme activities in human heart failure: minimal effects of the disease and resistance training. *J Appl Physiol.* 2012;112;(11)1864-74.
112. De Sousa, E., V. Veksler, X. Bigard, et al. Dual influence of disease and increased load on diaphragm muscle in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33;(4)699-710.
113. Miller, M.S., P. VanBuren, M.M. LeWinter, et al. Chronic heart failure decreases cross-bridge kinetics in single skeletal muscle fibres from humans. *J Physiol.* 2010;588;(Pt 20)4039-53.
114. Miller, M.S., P. Vanburen, M.M. Lewinter, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle weakness in human heart failure: alterations in single fiber myosin protein content and function. *Circ Heart Fail.* 2009;2;(6)700-6.
115. Toth, M.J., M.S. Miller, P. VanBuren, et al. Resistance training alters skeletal muscle structure and function in human heart failure: effects at the tissue, cellular and molecular levels. *J Physiol.* 2011;590;(Pt 5)1243-59.
116. Toth, M.J., A.O. Shaw, M.S. Miller, et al. Reduced knee extensor function in heart failure is not explained by inactivity. *Int J Cardiol.* 2010;143;(3)276-82.
117. Ceconi, C., E. Condorelli, M. Quinzanini, et al. Noradrenaline, atrial natriuretic peptide, bombesin and neurotensin in myocardium and blood of rats in congestive cardiac failure. *Cardiovasc Res.* 1989;23;(8)674-82.
118. Vescovo, G., C. Ceconi, P. Bernocchi, et al. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc Res.* 1998;39;(1)233-41.
119. Libera, L.D., R. Zennaro, M. Sandri, et al. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am J Physiol.* 1999;277;(5 Pt 1)C982-6.
120. Vescovo, G., B. Ravara, V. Gobbo, et al. Skeletal muscle fibres synthesis in heart failure: role of PGC-1alpha, calcineurin and GH. *Int J Cardiol.* 2005;104;(3)298-306.
121. Lin, J., H. Wu, P.T. Tarr, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002;418;(6899)797-801.
122. Bernocchi, P., C. Ceconi, P. Pedersini, et al. Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28;(11)2263-73.

123. Bernocchi, P., A. Cargnoni, G. Vescovo, et al. Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy and failure. *Basic Res Cardiol.* 2003;98;(2)114-23.
124. Wust, R.C., D.S. Myers, R. Stones, et al. Regional skeletal muscle remodeling and mitochondrial dysfunction in right ventricular heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302;(2)H402-11.
125. Remels, A.H., H.R. Gosker, P. Schrauwen, et al. TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia? *Faseb J.* 2010;24;(12)5052-62.
126. Michelakis, E.D. Mitochondrial medicine: a new era in medicine opens new windows and brings new challenges. *Circulation.* 2008;117;(19)2431-4.
127. Wiesner, R.J., T.T. Kurowski, and R. Zak. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol.* 1992;6;(9)1458-67.
128. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6;(5)389-402.
129. Anflous, K., O. Blondel, A. Bernard, et al. 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.* 1998;1399;(1)47-50.
130. Duchen, M.R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med.* 2004;25;(4)365-451.
131. Brand, M.D., C. Affourtit, T.C. Esteves, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 2004;37;(6)755-67.
132. Echtay, K.S., D. Roussel, J. St-Pierre, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 2002;415;(6867)96-9.
133. Veltri, K.L., M. Espiritu, and G. Singh. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol.* 1990;143;(1)160-4.
134. Lesnefsky, E.J. and C.L. Hoppel. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 2003;420;(2)287-97.
135. Pieczenik, S.R. and J. Neustadt. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol.* 2007;83;(1)84-92.
136. Stock, D., A.G. Leslie, and J.E. Walker. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* 1999;286;(5445)1700-5.

137. Chance, B. Reaction of oxygen with the respiratory chain in cells and tissues. *J Gen Physiol.* 1965;49;(1)Suppl:163-95.
138. Tager, J.M., R.J. Wanders, A.K. Groen, et al. Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.* 1983;151;(1)1-9.
139. Murphy, M.P. Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 1989;977;(2)123-41.
140. Weibel, E.R., C.R. Taylor, and H. Hoppeler. The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88;(22)10357-61.
141. Spees, J.L., S.D. Olson, M.J. Whitney, et al. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103;(5)1283-8.
142. Scarpulla, R.C. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 2006;97;(4)673-83.
143. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res.* 2008;79;(2)208-17.
144. Gerhart-Hines, Z., J.T. Rodgers, O. Bare, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *Embo J.* 2007;26;(7)1913-23.
145. Aquilano, K., P. Vigilanza, S. Baldelli, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285;(28)21590-9.
146. Chabi, B., P.J. Adhihetty, M.F. O'Leary, et al. Relationship between Sirt1 expression and mitochondrial proteins during conditions of chronic muscle use and disuse. *J Appl Physiol.* 2009;107;(6)1730-5.
147. Gurd, B.J., Y. Yoshida, J. Lally, et al. The deacetylase enzyme SIRT1 is not associated with oxidative capacity in rat heart and skeletal muscle and its overexpression reduces mitochondrial biogenesis. *J Physiol.* 2009;587;(Pt 8)1817-28.
148. Gurd, B.J., Y. Yoshida, J.T. McFarlan, et al. Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301;(1)R67-75.

149. Puigserver, P. and B.M. Spiegelman. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003;24;(1)78-90.
150. Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999;98;(1)115-24.
151. Mootha, V.K., C. Handschin, D. Arlow, et al. ERRalpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101;(17)6570-5.
152. Schreiber, S.N., R. Emter, M.B. Hock, et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101;(17)6472-7.
153. Pilegaard, H., B. Saltin, and P.D. Neuffer. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2003;546;(Pt 3)851-8.
154. Weitzel, J.M., K.A. Iwen, and H.J. Seitz. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol.* 2003;88;(1)121-8.
155. Arany, Z., M. Novikov, S. Chin, et al. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103;(26)10086-91.
156. Lehman, J.J., P.M. Barger, A. Kovacs, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 2000;106;(7)847-56.
157. Baar, K., A.R. Wende, T.E. Jones, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J.* 2002;16;(14)1879-86.
158. Russell, A.P., J. Feilchenfeldt, S. Schreiber, et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes.* 2003;52;(12)2874-81.
159. Akimoto, T., S.C. Pohnert, P. Li, et al. Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 2005;280;(20)19587-93.
160. Adhihetty, P.J., T. Taivassalo, R.G. Haller, et al. The effect of training on the expression of mitochondrial biogenesis- and apoptosis-related proteins in skeletal

- muscle of patients with mtDNA defects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293;(3)E672-80.
161. St-Pierre, J., J.A. Buckingham, S.J. Roebuck, et al. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002;277;(47)44784-90.
 162. Kressler, D., S.N. Schreiber, D. Knutti, et al. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 2002;277;(16)13918-25.
 163. Lin, J., P. Puigserver, J. Donovan, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem.* 2002;277;(3)1645-8.
 164. Scarpulla, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008;88;(2)611-38.
 165. Meirhaeghe, A., V. Crowley, C. Lenaghan, et al. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J.* 2003;373;(Pt 1)155-65.
 166. Ekstrand, M.I., M. Falkenberg, A. Rantanen, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet.* 2004;13;(9)935-44.
 167. Scarpulla, R.C. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29;(2)109-19.
 168. Menshikova, E.V., V.B. Ritov, L. Fairfull, et al. Effects of exercise on mitochondrial content and function in aging human skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006;61;(6)534-40.
 169. Bengtsson, J., T. Gustafsson, U. Widegren, et al. Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. *Pflugers Arch.* 2001;443;(1)61-6.
 170. Gordon, J.W., A.A. Rungi, H. Inagaki, et al. Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2001;90;(1)389-96.
 171. Ljubcic, V., A.M. Joseph, A. Saleem, et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800;(3)223-34.
 172. Ljubcic, V. and D.A. Hood. Kinase-specific responsiveness to incremental contractile activity in skeletal muscle with low and high mitochondrial content. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295;(1)E195-204.

173. Nader, G.A. and K.A. Esser. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol*. 2001;90;(5)1936-42.
174. Pilegaard, H., G.A. Ordway, B. Saltin, et al. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279;(4)E806-14.
175. Marin-Garcia, J. and M.J. Goldenthal. Mitochondrial centrality in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2008;13;(2)137-50.
176. Sayen, M.R., A.B. Gustafsson, M.A. Sussman, et al. Calcineurin transgenic mice have mitochondrial dysfunction and elevated superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284;(2)C562-70.
177. Bueno, O.F., E. van Rooij, J.D. Molkentin, et al. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res*. 2002;53;(4)806-21.
178. Watson, P.A., J.E. Reusch, S.A. McCune, et al. Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293;(1)H246-59.
179. Wall, J.A., J. Wei, M. Ly, et al. Alterations in oxidative phosphorylation complex proteins in the hearts of transgenic mice that overexpress the p38 MAP kinase activator, MAP kinase kinase 6. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291;(5)H2462-72.
180. Nisoli, E., C. Tonello, A. Cardile, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005;310;(5746)314-7.
181. Abbott, B.C., B. Bigland, and J.M. Ritchie. The physiological cost of negative work. *J Physiol*. 1952;117;(3)380-90.
182. Cavanagh, P.R. and P.V. Komi. Electromechanical delay in human skeletal muscle under concentric and eccentric contractions. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1979;42;(3)159-63.
183. Faulkner, J.A. Terminology for contractions of muscles during shortening, while isometric, and during lengthening. *J Appl Physiol*. 2003;95;(2)455-9.
184. Reich, T.E., S.L. Lindstedt, P.C. LaStayo, et al. Is the spring quality of muscle plastic? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;278;(6)R1661-6.
185. Blazeovich, A.J., D. Cannavan, D.R. Coleman, et al. Influence of concentric and eccentric resistance training on architectural adaptation in human quadriceps muscles. *J Appl Physiol*. 2007;103;(5)1565-75.

186. Steiner, R., K. Meyer, K. Lippuner, et al. Eccentric endurance training in subjects with coronary artery disease: a novel exercise paradigm in cardiac rehabilitation? *Eur J Appl Physiol*. 2004;91;(5-6)572-8.
187. Fang, Y., V. Siemionow, V. Sahgal, et al. Distinct brain activation patterns for human maximal voluntary eccentric and concentric muscle actions. *Brain Res*. 2004;1023;(2)200-12.
188. McHugh, M.P., T.F. Tyler, S.C. Greenberg, et al. Differences in activation patterns between eccentric and concentric quadriceps contractions. *J Sports Sci*. 2002;20;(2)83-91.
189. Sogaard, K., H. Christensen, B.R. Jensen, et al. Motor control and kinetics during low level concentric and eccentric contractions in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1996;101;(5)453-60.
190. Armstrong, R.B., R.W. Ogilvie, and J.A. Schwane. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1983;54;(1)80-93.
191. Newham, D.J., G. McPhail, K.R. Mills, et al. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci*. 1983;61;(1)109-22.
192. Lindstedt, S.L., P.C. LaStayo, and T.E. Reich. When active muscles lengthen: properties and consequences of eccentric contractions. *News Physiol Sci*. 2001;16;(256-61).
193. Perrey, S., A. Betik, R. Candau, et al. Comparison of oxygen uptake kinetics during concentric and eccentric cycle exercise. *J Appl Physiol*. 2001;91;(5)2135-42.
194. Bonde-Petersen, F., H.G. Knuttgen, and J. Henriksson. Muscle metabolism during exercise with concentric and eccentric contractions. *J Appl Physiol*. 1972;33;(6)792-5.
195. Abbott, B.C. and B. Bigland. The effects of force and speed changes on the rate of oxygen consumption during negative work. *J Physiol*. 1953;120;(3)319-25.
196. Knuttgen, H.G. and K. Klausen. Oxygen debt in short-term exercise with concentric and eccentric muscle contractions. *J Appl Physiol*. 1971;30;(5)632-5.
197. Thomson, D.A. Cardiac output during positive and negative work. *Scand J Clin Lab Invest*. 1971;27;(3)193-200.
198. Dufour, S.P., E. Lampert, S. Doutreleau, et al. Eccentric cycle exercise: training application of specific circulatory adjustments. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36;(11)1900-6.
199. Bigland-Ritchie, B. and J.J. Woods. Integrated electromyogram and oxygen uptake during positive and negative work. *J Physiol*. 1976;260;(2)267-77.

200. Dufour, S.P., S. Doutreleau, E. Lonsdorfer-Wolf, et al. Deciphering the metabolic and mechanical contributions to the exercise-induced circulatory response: insights from eccentric cycling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292;(4)R1641-8.
201. Lieber, R.L. and J. Friden. Morphologic and mechanical basis of delayed-onset muscle soreness. *J Am Acad Orthop Surg.* 2002;10;(1)67-73.
202. Friden, J., J. Seger, M. Sjoström, et al. Adaptive response in human skeletal muscle subjected to prolonged eccentric training. *Int J Sports Med.* 1983;4;(3)177-83.
203. McHugh, M.P. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports.* 2003;13;(2)88-97.
204. Murayama, M., K. Nosaka, T. Yoneda, et al. Changes in hardness of the human elbow flexor muscles after eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2000;82;(5-6)361-7.
205. Warren, G.L., C.P. Ingalls, D.A. Lowe, et al. Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev.* 2001;29;(2)82-7.
206. Eston, R.G., A.B. Lemmey, P. McHugh, et al. Effect of stride length on symptoms of exercise-induced muscle damage during a repeated bout of downhill running. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10;(4)199-204.
207. Friden, J. and R.L. Lieber. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc.* 1992;24;(5)521-30.
208. Friden, J. and R.L. Lieber. Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell Tissue Res.* 1998;293;(1)165-71.
209. Clarkson, P.M., K. Nosaka, and B. Braun. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc.* 1992;24;(5)512-20.
210. Nosaka, K. and P.M. Clarkson. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28;(8)953-61.
211. Byrnes, W.C., P.M. Clarkson, J.S. White, et al. Delayed onset muscle soreness following repeated bouts of downhill running. *J Appl Physiol.* 1985;59;(3)710-5.
212. Schwane, J.A. and R.B. Armstrong. Effect of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats. *J Appl Physiol.* 1983;55;(3)969-75.
213. Gordon, A.M., A.F. Huxley, and F.J. Julian. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol.* 1966;184;(1)170-92.
214. Seale, P. and M.A. Rudnicki. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000;218;(2)115-24.

215. Maughan, R.J., A.E. Donnelly, M. Gleeson, et al. Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve*. 1989;12;(4)332-6.
216. Thompson, H.S., S.P. Scordilis, P.M. Clarkson, et al. A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP70 in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2001;171;(2)187-93.
217. McArdle, F., S. Spiers, H. Aldemir, et al. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J Physiol*. 2004;561;(Pt 1)233-44.
218. Van Der Meulen, J.H., A. McArdle, M.J. Jackson, et al. Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: the role of vitamin E. *J Appl Physiol*. 1997;83;(3)817-23.
219. Pizza, F.X., T.J. McLoughlin, S.J. McGregor, et al. Neutrophils injure cultured skeletal myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281;(1)C335-41.
220. Jackson, M.J. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med*. 2008;44;(2)132-41.
221. Lander, H.M., A.J. Milbank, J.M. Tauras, et al. Redox regulation of cell signalling. *Nature*. 1996;381;(6581)380-1.
222. McHugh, M.P., D.A. Connolly, R.G. Eston, et al. Electromyographic analysis of repeated bouts of eccentric exercise. *J Sports Sci*. 2001;19;(3)163-70.
223. Maruhashi, Y., K. Kitaoka, Y. Yoshiki, et al. ROS scavenging activity and muscle damage prevention in eccentric exercise in rats. *J Physiol Sci*. 2007;57;(4)211-6.
224. Proske, U. and D.L. Morgan. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol*. 2001;537;(Pt 2)333-45.
225. Close, G.L., T. Ashton, T. Cable, et al. Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur J Appl Physiol*. 2004;91;(5-6)615-21.
226. Nosaka, K., P.M. Clarkson, M.E. McGuiggin, et al. Time course of muscle adaptation after high force eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1991;63;(1)70-6.
227. Nosaka, K. and P.M. Clarkson. Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27;(9)1263-9.

228. Lapiere, T.K., H.W. Burton, R. Almon, et al. Alterations in intramuscular connective tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. *J Appl Physiol.* 1995;78;(3)1065-9.
229. Lynn, R. and D.L. Morgan. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. *J Appl Physiol.* 1994;77;(3)1439-44.
230. Lynn, R., J.A. Talbot, and D.L. Morgan. Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. *J Appl Physiol.* 1998;85;(1)98-104.
231. Morgan, D.L. New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophys J.* 1990;57;(2)209-21.
232. Brockett, C.L., D.L. Morgan, and U. Proske. Human hamstring muscles adapt to eccentric exercise by changing optimum length. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33;(5)783-90.
233. Pizza, F.X., B.H. Davis, S.D. Henrickson, et al. Adaptation to eccentric exercise: effect on CD64 and CD11b/CD18 expression. *J Appl Physiol.* 1996;80;(1)47-55.
234. Hortobagyi, T., J. Barrier, D. Beard, et al. Greater initial adaptations to submaximal muscle lengthening than maximal shortening. *J Appl Physiol.* 1996;81;(4)1677-82.
235. Hortobagyi, T., J.P. Hill, J.A. Houmard, et al. Adaptive responses to muscle lengthening and shortening in humans. *J Appl Physiol.* 1996;80;(3)765-72.
236. LaStayo, P.C., D.J. Pierotti, J. Pifer, et al. Eccentric ergometry: increases in locomotor muscle size and strength at low training intensities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278;(5)R1282-8.
237. Lastayo, P.C., T.E. Reich, M. Urquhart, et al. Chronic eccentric exercise: improvements in muscle strength can occur with little demand for oxygen. *Am J Physiol.* 1999;276;(2 Pt 2)R611-5.
238. LaStayo, P.C., J.M. Woolf, M.D. Lewek, et al. Eccentric muscle contractions: their contribution to injury, prevention, rehabilitation, and sport. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2003;33;(10)557-71.
239. Higbie, E.J., K.J. Cureton, G.L. Warren, 3rd, et al. Effects of concentric and eccentric training on muscle strength, cross-sectional area, and neural activation. *J Appl Physiol.* 1996;81;(5)2173-81.
240. Butterfield, T.A. and W. Herzog. Is the force-length relationship a useful indicator of contractile element damage following eccentric exercise? *J Biomech.* 2005;38;(9)1932-7.

241. Hather, B.M., P.A. Tesch, P. Buchanan, et al. Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiol Scand.* 1991;143;(2)177-85.
242. Hortobagyi, T., L. Dempsey, D. Fraser, et al. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol.* 2000;524 Pt 1;(293-304.
243. Chen, Y.W., G.A. Nader, K.R. Baar, et al. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *J Physiol.* 2002;545;(Pt 1)27-41.
244. Zoll, J., R. Steiner, K. Meyer, et al. Gene expression in skeletal muscle of coronary artery disease patients after concentric and eccentric endurance training. *Eur J Appl Physiol.* 2006;96;(4)413-22.
245. Spector, S.A., P.F. Gardiner, R.F. Zernicke, et al. Muscle architecture and force-velocity characteristics of cat soleus and medial gastrocnemius: implications for motor control. *J Neurophysiol.* 1980;44;(5)951-60.
246. Butterfield, T.A. and W. Herzog. Effect of altering starting length and activation timing of muscle on fiber strain and muscle damage. *J Appl Physiol.* 2006;100;(5)1489-98.
247. Mahieu, N.N., P. McNair, A. Cools, et al. Effect of eccentric training on the plantar flexor muscle-tendon tissue properties. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40;(1)117-23.
248. Meyer, K., R. Steiner, P. Lastayo, et al. Eccentric exercise in coronary patients: central hemodynamic and metabolic responses. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35;(7)1076-82.
249. Rooyackers, J.M., D.A. Berkeljon, and H.T. Folgering. Eccentric exercise training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Rehabil Res.* 2003;26;(1)47-9.
250. Dibble, L.E., T.F. Hale, R.L. Marcus, et al. High-intensity resistance training amplifies muscle hypertrophy and functional gains in persons with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2006;21;(9)1444-52.
251. Dibble, L.E., T.F. Hale, R.L. Marcus, et al. High intensity eccentric resistance training decreases bradykinesia and improves Quality Of Life in persons with Parkinson's disease: a preliminary study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15;(10)752-7.
252. Marcus, R.L., S. Smith, G. Morrell, et al. Comparison of combined aerobic and high-force eccentric resistance exercise with aerobic exercise only for people with type 2 diabetes mellitus. *Phys Ther.* 2008;88;(11)1345-54.

253. LaStayo, P.C., G.A. Ewy, D.D. Pierotti, et al. The positive effects of negative work: increased muscle strength and decreased fall risk in a frail elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003;58;(5)M419-24.
254. Mueller, M., F.A. Breil, M. Vogt, et al. Different response to eccentric and concentric training in older men and women. *Eur J Appl Physiol*. 2009;107;(2)145-53.
255. LaStayo, P.C., R.L. Marcus, L.E. Dibble, et al. Eccentric exercise versus usual-care with older cancer survivors: the impact on muscle and mobility--an exploratory pilot study. *BMC Geriatr*. 2011;11;(5).
256. Bouitbir, J., A.L. Charles, A. Echaniz-Laguna, et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J*. 2011;
257. Haq, S., G. Choukroun, H. Lim, et al. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation*. 2001;103;(5)670-7.
258. Dalla Libera, L., B. Ravara, M. Volterrani, et al. Beneficial effects of GH/IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286;(1)C138-44.
259. Estep, J.E., M.W. Lame, D. Morin, et al. [14C]monocrotaline kinetics and metabolism in the rat. *Drug Metab Dispos*. 1991;19;(1)135-9.
260. Blomstrand, E., G. Radegran, and B. Saltin. Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. *J Physiol*. 1997;501 (Pt 2);(455-60).
261. Handoko, M.L., F.S. de Man, C.M. Happe, et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation*. 2009;120;(1)42-9.
262. Kawaguchi, A.T., T. Mizuta, H. Matsuda, et al. Single lung transplantation in rats with chemically induced pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;103;(3)483-9.
263. Flann, K.L., P.C. LaStayo, D.A. McClain, et al. Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain? *J Exp Biol*. 2010;214;(Pt 4)674-9.
264. Colliander, E.B. and P.A. Tesch. Effects of eccentric and concentric muscle actions in resistance training. *Acta Physiol Scand*. 1990;140;(1)31-9.
265. Clarkson, P.M. Eccentric exercise and muscle damage. *Int J Sports Med*. 1997;18 Suppl 4;(S314-7).

266. Ji, L.L., J.R. Dickman, C. Kang, et al. Exercise-induced hormesis may help healthy aging. *Dose Response*. 2010;8;(1)73-9.
267. Dumke, C.L., J. Mark Davis, E. Angela Murphy, et al. Successive bouts of cycling stimulates genes associated with mitochondrial biogenesis. *Eur J Appl Physiol*. 2009;107;(4)419-27.

ANNEXE 1

PROTOCOLES D'ETUDE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE SUR FIBRES PERMEABILISEES

Il comporte trois étapes : la préparation des fibres musculaires (dissection des fibres), leur perméabilisation à la saponine et leur respiration (**figure 34**).

Les solutions de respiration

Les solutions de dissection (S) et de respiration (R) utilisées reconstituent le contenu en ions intracellulaires de la fibre musculaire. Les solutions S et R ont une base commune : CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM (100 nM de Ca²⁺ libre), MgCl₂ 6,56 mM (1mM de Mg²⁺ libre), imidazole 20 mM, taurine 20 mM, dithiothreitol 0,5 mM, K-sulfonate de méthane 50mM (160mM de force ionique). Le pH des solutions a été ajusté à 7. La solution S contient également : Na₂ATP 5,7 mM et PCr 15 mM. La solution R contient, quant à elle : 5 mM de glutamate, 2 mM de malate, 3 mM de phosphate, à laquelle est ajoutée 2 mg/ml d'albumine (BSA).

Préparation des fibres

Après prélèvement musculaire, l'échantillon est immédiatement placé dans la solution S, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées à l'aide de pinces de précision, sous loupe binoculaire. Cette étape est essentielle afin de permettre l'accès de la saponine aux membranes des fibres musculaires.

Puis intervient l'étape de perméabilisation, les fibres étant placées dans un tube de solution S + saponine (50 µg/ml) sous agitation durant 30 minutes à 4°C (KuznetsovAV, 2008). Cette étape permet de détruire sélectivement le sarcolemme sans endommager les membranes mitochondriales, moins riches en cholestérol.

Les fibres sont ensuite replacées dans un tube de solution S pendant 10 minutes, toujours sous agitation, afin d'éliminer la saponine. Finalement, elles sont placées dans des tubes contenant de la solution R (2x5 minutes), afin d'éliminer l'ATP, l'ADP et la phosphocréatine (PCr), tout en maintenant l'homéostasie cellulaire.

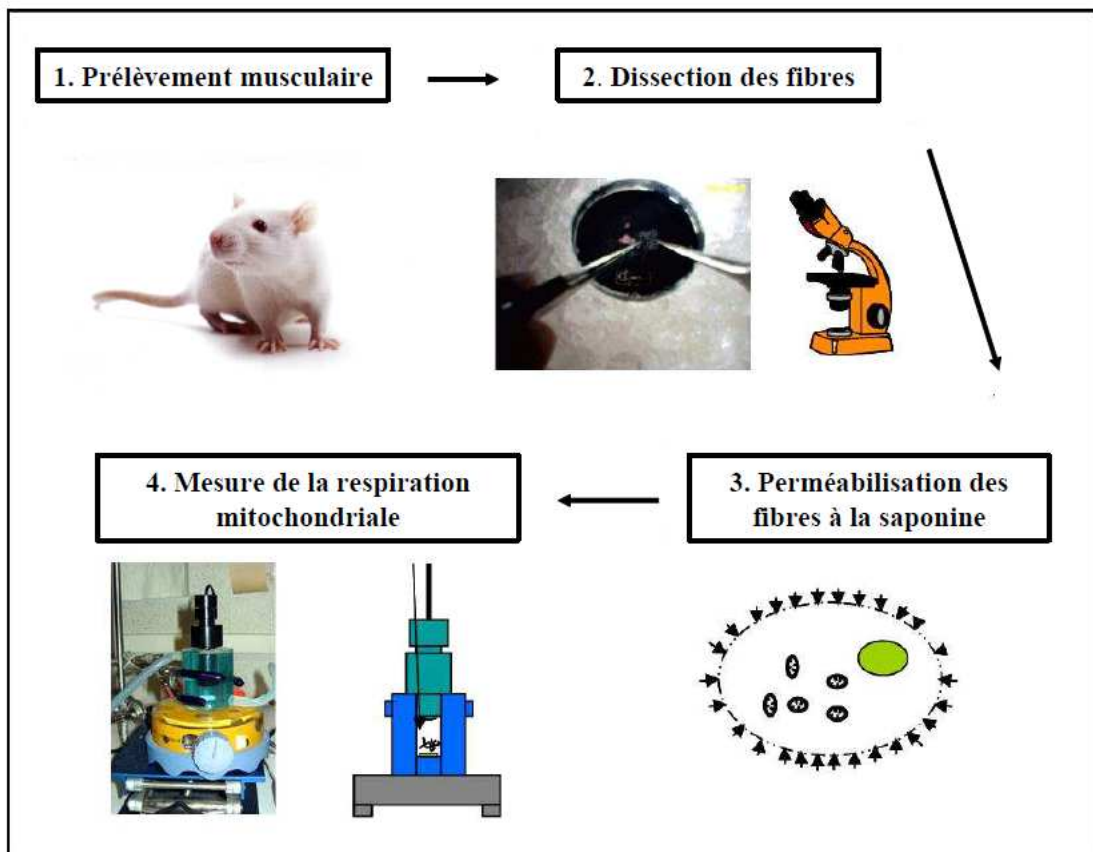


Figure 35: Technique de la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées. 1) Les muscles sont prélevés chez le rat. 2) Les fibres sont disséquées dans une solution de respiration à 4°C. 3) Les fibres sont perméabilisées à l'aide de la saponine dans un bain sous agitation pendant 30 minutes. 4) Les fibres sont ensuite placées dans une chambre à 22°C sous agitation et le fonctionnement des mitochondries est analysé par acquisition informatique du signal.

Le 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 0,6-0,7mV 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, 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. En absence de fibre, on enregistre la vitesse initiale de respiration (V_i) qui représente l'oxygène consommé par les électrodes. Après avoir ajouté les fibres, on enregistre V_0 , la vitesse de respiration des fibres sans ADP exogène. On remarque que V_i est inférieure à V_0 mais non négligeable. Par conséquent, elle est soustraite de l'ensemble des vitesses de respiration. Les chaînes respiratoires des mitochondries vont être activées et l'oxygène présent dans le tampon commencera à être consommé, ce qui entraînera une diminution de l'intensité du courant. La diminution de quantité d'oxygène du milieu se traduira à l'écran par une courbe décroissante (**figure 35**).

Protocole d'étude de la chaîne de respiration mitochondriale

Les analyses se font dans des chambres oxygraphiques thermostatées reliées à un bainmarie à 22,1°C (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). Pour mesurer la décroissance de la concentration d'oxygène dans les chambres, des électrodes de Clark, reliées à un logiciel, analysent les variations de concentration en oxygène (Oxygen 571®). Ceci va permettre de calculer la vitesse de consommation d'oxygène pour les différentes chambres qui est un reflet de l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale. Différents substrats sont injectés pour activer les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale :

- initialement, les fibres musculaires sont placées dans la solution R, contenant les substrats (glutamate (5mM) et malate (2mM)) qui vont générer du NADH, équivalent réducteur qui donne des électrons au complexe I. La consommation d'oxygène ainsi mesurée correspond à l'activité de base de la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV (V_0).
- on injecte ensuite de l'ADP (2mM), permettant une stimulation maximale de la chaîne de respiration mitochondriale au travers de ces complexes I, III et IV (V_{ADP}).
- l'adjonction d'amytal (0,02mM) va bloquer le complexe I et entraîner un arrêt du fonctionnement de la chaîne de respiration mitochondriale.
- l'adjonction de succinate (25mM), substrat qui va générer du FADH₂ grâce à la succinate déshydrogénase, va permettre de stimuler la chaîne respiratoire à partir du complexe II, (activation des complexes II, III et IV, (V_{succ})).
- l'adjonction du TMPD (0,5mM) et de l'ascorbate (0,5mM) stimule l'activité du complexe IV à son maximum ($V_{tmpd/asc}$), ce qui permet son étude indépendamment du fonctionnement des autres complexes. A la fin de la manipulation, les fibres sont récupérées, déshydratées et pesées. Toutes les vitesses sont ainsi exprimées en $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ de fibres en poids sec.

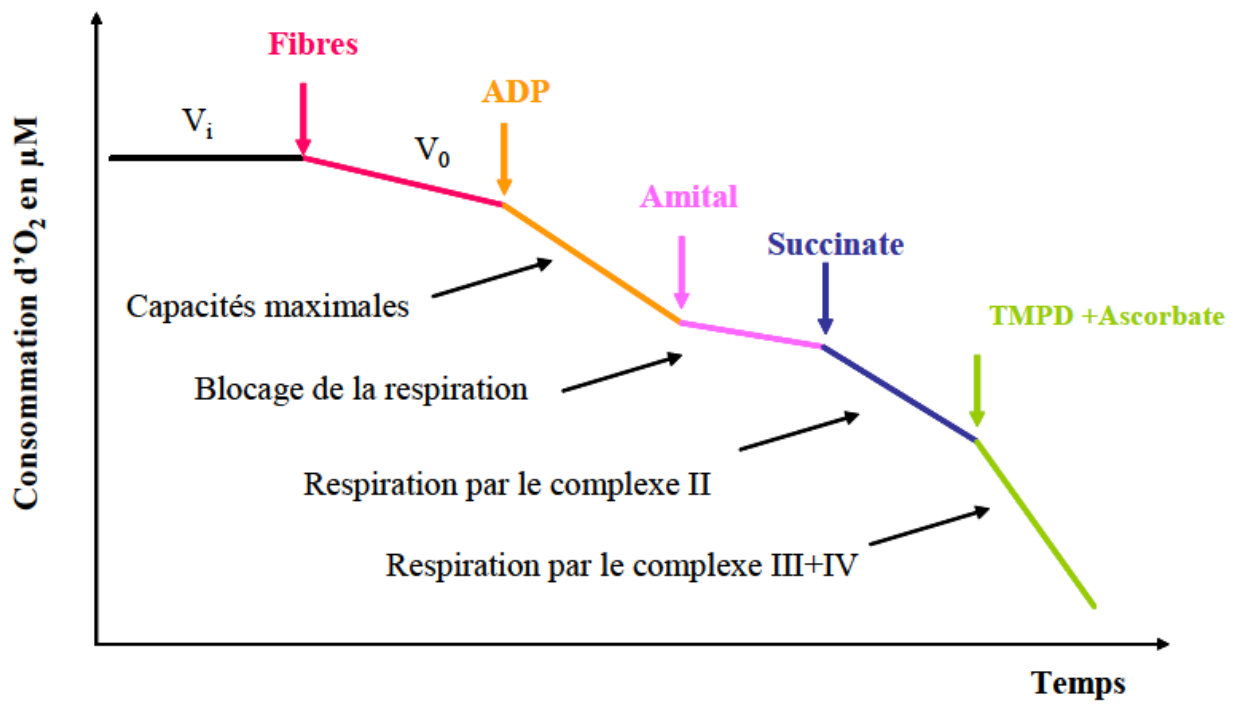


Figure 36: Etude de la respiration mitochondriale complexe par complexe. V_i : vitesse initiale. V_0 : vitesse de respiration des fibres sans ADP exogène

ANNEXE 2

EVALUATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ARNm PAR q-RT-PCR

Extraction de l'ARN

L'ARN total est extrait avec le TRIzol® selon le protocole du fournisseur Invitrogen. Le TRIzol® est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN tout en détruisant les cellules et en dissolvant les autres composés cellulaires. Les échantillons tissulaires (environ 50 mg) sont broyés mécaniquement dans l'azote liquide puis placés immédiatement dans 1 ml de TRIzol®. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont ensuite laissés au repos pendant 5 minutes à température ambiante. L'adjonction de chloroforme (0,2 ml par échantillon) est suivie d'une agitation vigoureuse pendant 15 secondes puis d'un contact prolongé à température ambiante (5 à 10 minutes). Les échantillons sont centrifugés à 11000 rpm pendant 15 minutes à 4°C ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement l'ARN. On récupère uniquement la phase supérieure. L'ARN est ensuite précipité dans la phase aqueuse supérieure par addition de 0,5 volume d'isopropanol. Les tubes sont ensuite agités pendant 30 secondes, laissés à température ambiante pendant dix minutes puis centrifugés à 11000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 75 % et centrifugé pendant 5 minutes à 7000 rpm à 4°C. Le culot est récupéré et séché à l'air puis remis en suspension dans 10 µl d'eau à 0,1% de diéthyl-pyrocabonate (DEPC), un inhibiteur de nucléase. La pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (Nanodrop). Un rapport égal ou supérieur à 1,7 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par l'ADN.

Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)

Cette étape est réalisée à l'aide d'un enzyme : le SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). La transcription réverse (RT) est réalisée dans un volume de 20 µl, en présence de 2 µg d'ARN dans 10µl d'eau DEPC, 5µl Buffer 5X, 0,5µl de transcriptase réverse, 2µl de DTT (0.1M), 1,5 µl désoxynucléotides triphosphates (10 mM) et 1 µL d'hexamères p(dN)₆

(200 μ M). Ce mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer l'ARNm. L'ADNc est ensuite synthétisé à 42°C pendant 50 minutes. La transcription reverse est stoppée en chauffant les échantillons à 72°C pendant 15 minutes.

Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel

L'ADNc a été amplifié par le LightCycler (Roche Diagnostic, Meylan, France), en utilisant le kit Invitrogen. La PCR quantitative est également réalisée dans un volume de 8 μ l en présence d'amorces spécifiques sens et antisens du gène d'intérêt (10 μ M) mais cette fois-ci avec 4 μ l tampon de réaction MasterMix (Roche) et 2,5 μ l d'ADNc. Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). Chaque échantillon a été analysé en triple et quantifié selon le protocole du fournisseur (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de la β -actin considérée comme le gène domestique.

**RETENTISSEMENT MUSCULAIRE CARDIAQUE ET
PERIPHERIQUE DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE
PULMONAIRE INDUITE PAR LA MONOCROTALINE CHEZ LE
RAT : DYSFONCTION MITOCHONDRIALE ET EFFET DE
L'EXERCICE EXCENTRIQUE**

Résumé

Dans un premier temps, nous avons observé la chronologie des altérations de la biogenèse et de la fonction mitochondriale dans les ventricules droit (VD) et gauche (VG) et le muscle gastrocnémien (GAS) dans un modèle animal d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Nous avons constaté une diminution précoce des facteurs impliqués dans la biogénèse mitochondriale du GAS. Plus tard, les mêmes anomalies apparaissaient dans le VD. Au stade décompensé de l'insuffisance cardiaque droite s'ajoutaient une diminution de la protéine PGC-1 α , de l'activité de la citrate-synthase et de la respiration mitochondriale. L'expression des ARNm et la respiration mitochondriale du VG n'étaient pas modifiées de façon significative.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'entraînement en mode excentrique sur le même modèle d'HTAP. La survie des rats entraînés n'était pas différente de celle des rats sédentaires et la tolérance hémodynamique évaluée par échocardiographie et cathétérisme cardiaque a été bonne. Le bénéfice de l'entraînement s'est traduit par une augmentation de la vitesse maximale de course dans les deux groupes entraînés, malades et témoins.

Monocrotaline, biogénèse mitochondriale, PGC-1 α , entraînement en mode excentrique

Résumé en anglais

We assessed the time courses of mitochondrial biogenesis factors and respiration in the right ventricle (RV), gastrocnemius (GAS) and left ventricle (LV) in a model of pulmonary-hypertensive (PH) rats induced by monocrotaline (MT). The expression of the studied genes was decreased early in the MT GAS. At 4 weeks, the MT GAS and MT RV showed decreased mRNA levels whatever the stage of disease, but PGC-1 α protein and citrate-synthase activity were significantly reduced only at the decompensated stage. The functional result was a significant fall in mitochondrial respiration at the decompensated stage in the RV and GAS. The mRNA expression and mitochondrial respiration were not significantly modified in the MT LV.

Secondly, we assessed the effects of eccentric exercise training (ECct) in MT rats with PH. ECct was initiated 2 weeks after MT injection for 4 weeks. The trained MT rats survival was not different from that of sedentary rats. ECct was not detrimental on hemodynamic condition estimated by echocardiography and right heart catheterization. Maximal speed significantly increased in trained rats. The mRNA expression of mitochondrial biogenesis factors were not significantly modified in skeletal muscle and in RV.

Monocrotaline, right ventricular failure, mitochondrial biogenesis, PGC-1 α , eccentric training