

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Mouvement et Comportement pour la santé et l'Autonomie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marie LE GUEN

Thèse dirigée par **Christophe PISON** et
codirigée par **Hervé DUBOUCHAUD**

préparée au sein du **Laboratoire de Bioénergétique
Fondamentale et Appliquée**
dans l'**École Doctorale Ingénierie de la Santé, la Cognition et
l'Environnement**

Supplémentation en DHA et muscle squelettique de rat adulte en hypoxie

Thèse soutenue publiquement le **25 octobre 2013**,
devant le jury composé de :

M. Noël CANO

PU-PH Clermont Université, Président

M. Xavier BIGARD

Pr agrégé du Val de Grâce, AFLD, Paris, Rapporteur

M. Sébastien BONNET

Pr Université Laval, Rapporteur

Mme Nathalie BOISSEAU

PU Clermont Université, Membre

M. Christophe PISON

PU-PH Université Grenoble I, Membre

M. Hervé DUBOUCHAUD

MCU Université Grenoble I, Membre



Remerciements :

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de ce jury pour le temps ainsi que l'intérêt qu'ils portent à juger ce travail :

A M. Xavier Bigard et M. Sébastien Bonnet qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Je suis consciente de l'implication que cela requiert et je vous remercie d'avoir consacré du temps à examiner et juger ce travail, malgré un envoi un peu tardif du manuscrit. J'espère sincèrement que vous trouverez ce travail intéressant.

A Mme Nathalie Boisseau et M. Cano pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux en acceptant de les examiner.

Je suis honorée de votre participation à l'examen de cette thèse et je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier le Ministère de la recherche et l'association AGIR à DOM qui m'ont accordé les financements me permettant de mener à bien ce projet. Mes remerciements vont également à la société ASL qui nous a gracieusement fourni la supplémentation en DHA nécessaire à ce projet.

J'exprime également mes remerciements aux Professeurs Xavier Leverve et Uwe Schlattner qui m'ont accueillie au sein du laboratoire de bioénergétique fondamentale et appliquée et m'ont fourni les moyens de mener ce travail.

Je tiens à remercier mon directeur, le Pr Christophe Pison, pour son soutien, les opportunités qu'il m'a apporté, sa réactivité, son savoir, sa confiance envers les étudiants STAPS et pour m'avoir fait partager son intérêt pour les patients BPCO.

Je voudrais remercier tout particulièrement mon co-directeur, Hervé Dubouchaud, pour tout ce qu'il m'a apporté au cours de ces années, son aide au jour le jour, son écoute,

ses connaissances scientifiques. Cela a été un plaisir de travailler avec toi pendant un peu plus de 4 ans, j'espère vivement que nous aurons l'occasion de collaborer à nouveau.

Mes remerciements vont également aux personnes qui ont participé à ce travail : Béatrice Morio et Brigitte Laillet, Mireille Osman et Isabelle Hininger. Un grand merci également à Joëlle Demaison pour sa gentillesse et son aide, ainsi qu'à Cindy Tellier qui prend soin de nos petits rats et a contribué à rendre plus agréables les heures passées à les entraîner. Merci à Régis pour son aide avec le tapis de course et le caisson hypoxique, sa patience et sa sympathie. Merci à Valérie Chaté pour sa participation aux manips, mais surtout pour sa joie de vivre à toute épreuve.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux, les bons moments passés ensemble, le soutien qu'ils m'ont témoigné.

Un très grand merci à tous les thésards : ceux qui m'ont accueillie Anna, Sacnicté, Guillaume, Séverine et Zineb. Puis les co-thésards, merci d'avoir été là pendant les bons moments comme pendant les périodes plus difficiles, pour les soirées ensemble, les activités sportives, les gâteaux du vendredi... Evi qui est avec moi depuis le M2 et qui m'a fait découvrir son pays, Sarah pour les moments passés à discuter et pour l'animation du bureau, Shuijie pour sa gentillesse et ses fameuses crevettes aux oignons, Marcela, pour notre voyage aux USA, les conversations en « fragnolglais », les trajets à vélo, Farida pour son sourire et ses spécialités indonésiennes, Clovis pour son humour et le sport, Martin pour sa « fonction chaine de radio », même si le choix des chansons n'est pas toujours bien à mon goût ! Rafaela, Emmanuel,.... nos post-docs : Xavier, Fayçal au rire inoubliable et Florence pour son humour. Un grand merci pour tout !

Merci aux copines du volley, à mes amis de Grenoble, du Chili et de Haute-Savoie qui m'ont changé les idées tout au long de ces années.

Je remercie également ma famille, qui me soutient toujours et m'encourage : mes parents bien sûr, Inès et François, ma sœur Solène, mon frère Loïc et mes grands-parents, avec une pensée particulière pour mon grand-père qui nous a quitté cette année et aurait été, je crois, fier de me voir finir cette thèse.

Enfin un énorme merci à Patrice pour sa patience, son soutien, pour m'avoir supportée, aidée, réconfortée, pour avoir été là tout simplement.

Sommaire

REMERCIEMENTS :	1
SOMMAIRE	3
LISTE DES ABREVIATIONS	9
PREAMBULE	11
REVUE DE LITTERATURE	14
1. LA BPCO : UNE PATHOLOGIE PULMONAIRE AU RETENTISSEMENT SYSTEMIQUE.....	14
1.1 DEFINITION ET ETIOLOGIE	14
1.2 HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE.....	16
1.3 L'INDEX BODE	17
1.4 ÉPIDEMIOLOGIE ET COUT POUR LA SOCIETE	18
1.5 PHYSIOPATHOLOGIE	19
1.5.1 <i>Inflammation</i>	19
1.5.2 <i>Stress oxydant</i>	21
1.5.3 <i>Comorbidités</i>	26
2. DYSFONCTION MUSCULAIRE	27
2.1 CACHEXIE ET MASSE MUSCULAIRE	27
2.2 DISTINCTION MUSCLES LOCOMOTEURS ET MUSCLES RESPIRATOIRES	29
2.3 MANIFESTATIONS DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE	30
2.3.1 <i>Evolution de la force</i>	30
2.3.2 <i>Evolution de l'endurance musculaire</i>	31
2.4 LES ATTEINTES DES MUSCLES LOCOMOTEURS DANS LA BPCO	33
2.4.1 <i>L'atrophie</i>	33
2.4.2 <i>Typologie musculaire</i>	40
2.4.3 <i>Capillarisation</i>	41
2.4.4 <i>Métabolisme musculaire</i>	42
2.5 CONSEQUENCES DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE DANS LA BPCO	56
2.5.1 <i>L'intolérance à l'effort</i>	56
2.5.2 <i>Autres conséquences</i>	57
2.6 ORIGINES POSSIBLES DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE.....	58
2.6.1 <i>Hypoxie/hypoxémie, hypercapnie et dysfonction musculaire</i>	58
2.6.2 <i>Inactivité et dysfonction musculaire</i>	64
2.6.3 <i>Déficit nutritionnel et dysfonction musculaire</i>	66
2.6.4 <i>Inflammation systémique et dysfonction musculaire</i>	67

2.6.5	<i>Stress oxydant et dysfonction musculaire</i>	69
2.6.6	<i>Déséquilibres hormonaux et dysfonction musculaire</i>	72
2.6.7	<i>Corticoïdes et dysfonction musculaire</i>	72
2.6.8	<i>Sarcopénie et BPCO</i>	74
3.	PRISE EN CHARGE DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE DANS LA BPCO	76
3.1	REENTRAINEMENT A L'EFFORT	77
3.1.1	<i>Nature du réentraînement et ses bénéfices</i>	78
3.1.2	<i>Limites du réentraînement</i>	82
3.2	HORMONES ANABOLIQUES	84
3.2.1	<i>Hormones stéroïdiennes</i>	84
3.2.2	<i>Hormones de croissance et IGF-1</i>	85
3.3	INTERVENTION NUTRITIONNELLE	86
4.	ACIDES GRAS POLYINSATURES ET DYSFONCTION MUSCULAIRE	89
4.1	STRUCTURE GENERALE DES ACIDES GRAS ET NOMENCLATURE	89
4.2	LES ACIDES GRAS POLYINSATURES (AGPI)	92
4.2.1	<i>Sources et métabolisme des AGPI</i>	92
4.2.2	<i>Le ratio n-6/n-3</i>	94
4.2.3	<i>Les AGPI dans l'alimentation occidentale</i>	95
4.2.4	<i>Rôles des AGPI</i>	98
4.3	N-3, BPCO ET DYSFONCTION MUSCULAIRE	106
4.3.1	<i>n-3 et prévalence de la BPCO</i>	106
4.3.2	<i>n-3 et inflammation</i>	107
4.3.3	<i>n-3 et stress oxydant</i>	108
4.3.4	<i>n-3 et tolérance à l'effort</i>	110
4.3.5	<i>n-3 et cachexie</i>	111
4.3.6	<i>n-3 et muscle</i>	112
4.4	IMPORTANCE DU VECTEUR D'AGPI N-3	116
	MATERIELS ET METHODES	121
1.	CONDITIONNEMENT DES ANIMAUX	121
1.1	SUPPLEMENTATION EN GPL-DHA®	121
1.2	HYPOXIE	122
1.3	ENTRAINEMENT EN ENDURANCE	122
1.4	GROUPES EXPERIMENTAUX	122
2.	EVALUATION DE LA PERFORMANCE AEROBIE	124
2.1	HABITUATION A LA COURSE SUR TAPIS ROULANT	124

2.2	EPREUVE D'ENDURANCE MAXIMALE	124
2.3	CALORIMETRIE INDIRECTE	124
2.4	ANESTHESIE ET EUTHANASIE DES ANIMAUX	124
3.	EXPLORATION DE LA FONCTION CARDIAQUE IN SITU	125
3.1	LA SONDE DE PRESSION MINIATURE « MILLAR »	125
3.2	PROTOCOLE D'EXPLORATION DES FONCTIONS VENTRICULAIRES DROITE ET GAUCHE	125
3.3	LES DIFFERENTES VARIABLES ENREGISTREES	126
4.	PRELEVEMENTS TISSULAIRES.....	126
5.	ETUDE DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE	127
5.1	ISOLEMENT DES MITOCHONDRIES	127
5.2	DETERMINATION DES CONCENTRATIONS PROTEIQUES.....	127
5.3	PREPARATION DE FIBRES ISOLEES PERMEABILISEES DE MUSCLES SQUELETTIQUES	128
5.3.1	<i>Principe de la perméabilisation</i>	<i>128</i>
5.3.2	<i>Etapas de dilacération et perméabilisation</i>	<i>128</i>
5.3.3	<i>Etapas de rinçage et pesée</i>	<i>129</i>
5.4	OXYGRAPHIE	129
5.4.1	<i>Principe</i>	<i>129</i>
5.4.2	<i>Protocole expérimental sur mitochondries isolées.....</i>	<i>130</i>
5.4.3	<i>Protocole expérimental sur fibres isolées perméabilisées</i>	<i>131</i>
5.5	MESURE DE LA CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE SUR MITOCHONDRIES ISOLEES.....	133
5.5.1	<i>Principe</i>	<i>133</i>
5.5.2	<i>Protocole expérimental.....</i>	<i>134</i>
5.6	MESURE DE LA PRODUCTION DE ROS SUR MITOCHONDRIES ISOLEES	135
5.6.1	<i>Principe</i>	<i>135</i>
5.6.2	<i>Protocole expérimental.....</i>	<i>136</i>
6.	MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	137
6.1	PREPARATION DE HOMOGENATS MUSCULAIRES.....	137
6.2	MESURES DE L'ACTIVITE DES COMPLEXES DE LA CHAINE RESPIRATOIRE	137
6.2.1	<i>Principe</i>	<i>137</i>
6.2.2	<i>Mesure de l'activité du complexe I.....</i>	<i>137</i>
6.2.3	<i>Mesure de l'activité du complexe II.....</i>	<i>138</i>
6.2.4	<i>Mesure de l'activité du complexe III.....</i>	<i>139</i>
6.2.5	<i>Mesure de l'activité du complexe IV.....</i>	<i>139</i>
6.3	MESURE DE L'ACTIVITE DE LA CITRATE SYNTHASE	140
6.3.1	<i>Principe</i>	<i>140</i>
6.3.2	<i>Protocole expérimental.....</i>	<i>141</i>

7.	MARQUEURS PLASMATIQUES	141
7.1	PEROXYDATION DES LIPIDES PAR MESURE DES TBARS	141
7.1.1	<i>Principe</i>	141
7.1.2	<i>Protocole expérimental</i>	142
7.2	OXYDATION DES PROTEINES PAR MESURE DES THIOLS	142
7.2.1	<i>Principe</i>	142
7.2.2	<i>Protocole expérimental</i>	142
7.3	LA CAPACITE TOTALE DE REDUCTION DU FER DANS LE PLASMA	143
7.3.1	<i>Principe</i>	143
7.3.2	<i>Protocole expérimental</i>	143
7.4	CHOLESTEROL ET TRIGLYCERIDES	143
7.5	DETERMINATION DES COMPOSITIONS LIPIDIQUES DES MEMBRANES	143
8.	ANALYSE DE L'EXPRESSION RELATIVE DES ARNM	144
8.1	PURIFICATION DES ARNM	144
8.2	MESURE DES CONCENTRATIONS DES ARNM	144
8.3	DIGESTION DE L'ADN GENOMIQUE.....	145
8.4	SYNTHESE DE L'ADNC	145
8.5	RT-PCR.....	145
9.	ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN-BLOT.....	147
9.1	PREPARATION DES ECHANTILLONS	148
9.2	ELECTROPHORESE SUR GEL SDS-PAGE	148
9.2.1	<i>Principe</i>	148
9.2.2	<i>Protocole expérimental</i>	148
9.3	ELECTROTRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE.....	150
9.3.1	<i>Principe</i>	150
9.3.2	<i>Protocole expérimental</i>	150
9.4	IMMUNOREVELATION DES PROTEINES D'INTERET	151
9.4.1	<i>Principe</i>	151
9.4.2	<i>Protocole expérimental</i>	151
9.4.3	<i>Quantification</i>	152
10.	ANALYSES STATISTIQUES	152
	CONTRIBUTION PERSONNELLE	153
1.	ETUDE 1 : 9 SEMAINES DE SUPPLEMENTATION EN DHA AMELIORENT LA CAPACITE D'ENDURANCE ET LE METABOLISME MITOCHONDRIAL DU MUSCLE SQUELETTIQUE DE RATS ADULTES	153
1.1	INTRODUCTION	153
1.4	RESULTATS.....	155

1.4.1	<i>Données morphologiques et métaboliques</i>	155
1.4.2	<i>Composition corporelle</i>	155
1.4.3	<i>Composition en acides gras des phospholipides membranaires</i>	156
1.4.4	<i>Fonction cardiaque</i>	158
1.4.5	<i>Dosages plasmatiques</i>	158
1.4.6	<i>Capacité d'endurance</i>	159
1.4.7	<i>Fonction mitochondriale</i>	160
1.4.8	<i>Voies de signalisation :</i>	166
1.3	DISCUSSION	167
2.	ETUDE 2 : EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN DHA SUR LA TOLERANCE A L'EFFORT ET SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE CHEZ DES RATS ADULTES EN HYPOXIE	177
2.1	INTRODUCTION	177
2.2	RESULTATS.....	179
2.2.1	<i>Prise alimentaire et données anthropométriques</i>	179
2.2.2	<i>Calorimétrie indirecte</i>	183
2.2.3	<i>Fonction cardiaque</i>	185
2.2.4	<i>Dosages biologiques</i>	186
2.2.5	<i>Stress oxydant</i>	187
2.2.6	<i>Capacité d'endurance</i>	188
2.2.7	<i>Fonction mitochondriale</i>	189
2.2.8	<i>Expression protéique</i>	197
2.2.9	<i>Expression génique</i>	199
2.3	DISCUSSION	200
3.	ETUDE 3 : EFFET COMBINE D'UNE SUPPLEMENTATION EN DHA ET DE L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE SUR LA FONCTION MUSCULAIRE DE RATS ADULTES EN HYPOXIE	220
3.1	INTRODUCTION	220
3.2	RESULTATS.....	222
3.2.1	<i>Prise alimentaire et données anthropométriques</i>	222
3.2.2	<i>Calorimétrie indirecte</i>	226
3.2.3	<i>Fonction cardiaque</i>	228
3.2.4	<i>Dosages biologiques</i>	229
3.2.5	<i>Stress oxydant</i>	230
3.2.6	<i>Epreuve d'endurance</i>	231
3.2.7	<i>Fonction mitochondriale</i>	231
3.2.8	<i>Expression protéique</i>	238
3.2.9	<i>Expression génique</i>	239
3.3	DISCUSSION	240

CONCLUSION	256
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	261
ANNEXE 1	307
<i>Publication dans une revue à comité de lecture international</i>	<i>307</i>
<i>Communications orales et affichées.....</i>	<i>307</i>
ANNEXE 2	309
<i>Composition du mélange enrichi en GPL-DHA produit par l'entreprise Application Santé des</i> <i>Lipides.....</i>	<i>309</i>

Liste des abréviations

4E-BP1	eIF4E-binding protein	Cyp-D	cyclophiline D
AA	antimycine A	DCIP	2,6-dichloroindophénol
ACC	acétyl CoA carboxylase	DGLA	acide dihomog- γ -linoléique
Acétyl CoA	Acétyl coenzyme A	DHA	acide docosahexaénoïque
adipoq	adiponectine	DHEA	Déhydroépiandrostérone
ADN	acide désoxyribonucléique	DNP	2,4-Dinitrophénol
ADNmt	ADN mitochondrial	DPA	acide docosapentaénoïque
ADP	adénosine diphosphate	DTA	acide docosatétranoïque
AG	acide gras	DTNB	5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque)
AGCM	acide gras à chaîne moyenne	DTT	dithiothréitol
AGLC	acide gras à chaîne longue	EDL	extenseur long des doigts
AGMI	acide gras monoinsaturé	EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
AGPI	acide gras polyinsaturé	EFR	exploration fonctionnelle respiratoire
AGS	acide gras saturé	EGTA	Acide éthylène glycérol tétra-acétique
AMP	adénosine monophosphate	eIF2α	eukaryotic translation initiation factor 2 α
AMPK	AMP-activated protein kinase	EPA	acide eicosapentaénoïque
ANOVA	analyse de variance	FAD⁺/FADH2	Flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite
ANT	transporteur des nucléotides adényliques	FAS	fatty acid syntase
ANT	adénine nucléotide translocase	FC	fréquence cardiaque
APS	persulfate d'ammonium	Fe²⁺	fer ferreux
ARA	Acide arachidonique	Fe³⁺	fer ferrique
ARNm	ARN messenger	FiO₂	fraction inspirée en oxygène
ARNr	ARN ribosomal	Foxo	Forkhead box O transcription factor
ARNt	ARN transfert	FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
Asc	Ascorbate	GH	growth hormone
ATP	adénosine triphosphate	GLA	acide γ -linoléique
BCA	acide bicinchoninique	GM	glutamate/malate
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3	GMS	glutamate/malate/succinate
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive	GPL	glycérophospholipides
BPR	benzodiazépine peripheral receptor	GR	globule rouge
BSA	albumine sérique de bœuf	GSK	Glycogen synthase kinase
Ca²⁺	ion calcium	H	groupe Hypoxie
CIF-2	Classification Internationale du Fonctionnement	H⁺	ion hydrogène
CO₂	dioxyde de carbone	H + DHA	groupe hypoxie et DHA
cox	cyclo-oxygénase	H₂O	eau
COX	cytochrome oxydase	H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
CPT-1	carnitine-palmitoyl-transferase	HAD	hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
Cr	créatine	HADH	hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
CRC	capacité de rétention calcique	HE	groupe Hypoxie + Entraînement
CS	citrate synthase	HE + DHA	groupe hypoxie entraînement et DHA
CsA	ciclosporine A	HEX	hexokinase
Cu⁺	cation cuivre	HIF-1	hypoxia inducible factor 1
Cu²⁺	cuiivre	HNE	hydroxynonenal
CVF	capacité vitale forcée	HRE	hypoxia responsive element
		HRP	horseradish peroxidase,

IFN-γ	interferon γ	PK	pyruvate kinase
IGF-1	insulin like growth factor	PKB	protein kinase B ou Akt
IκB	NF- κ B light polypeptide gene enhancer in B-cell	PPAR α -γ -δ	peroxysome proliferator activated receptor - α - γ - δ
IKK	Inhibitor of κ B kinase	PTP	pore de transition de perméabilité
IL-1, 6, 8	interleukine 1, 6 et 8	PVDF	Polyvinylidène difluorure
IMC	indice de masse corporelle	pVHL	protéine von Hippel-Lindau
IMM	index de masse maigre	QR	quotient respiratoire
IMP	inosine monophosphate	RCI	index de contrôle respiratoire
IRC	insuffisance respiratoire chronique	RCR	ratio de contrôle respiratoire
K₂HPO₄	Hydrogénophosphate de potassium	REDD1	DNA-damaging-inducible transcript 4 protéine
KCl	chlorure de potassium	RMN	résonance magnétique nucléaire
KH₂PO₄	Dihydrogénophosphate de potassium	RNS	reactive nitrogen species
K-MES	sel de potassium acide 2-(N-morpholino) éthanol sulfonique	ROS	reactive oxygen species
LA	acide linoléique	RXR	retinoïde X récepteur
LDH	lactate déshydrogénase	S	succinate
LOX	lipo-oxygénase	S6K	S6 kinase
LPS	lipopolysaccharide	SDH	succinate déshydrogénase
LXR	liver X récepteur	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
MAFbx	Muscle Atrophy Fbox	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophorese
MAPK p38	Mitogen Activated Protein Kinase p38	SODc	superoxyde dismutase cytosolique
MDA	malondialdéhyde	SODm	superoxyde dismutase mitochondriale
MgCl₂	chlorure de magnésium	STA	acide stéaridonique
MSTN	myostatine	TARP	tissu adipeux rétro-péritonéal
MtCK	créatine kinase mitochondriale	TAV	tissu adipeux viscéral
mTOR	mammalian target of rapamycin	TBARS	thiobarbituric acide
MuRF-1	muscle-specific RING-finger protein 1	TBS	Tris Buffer Saline
N	groupe normoxie	TEMED	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
NAD⁺/ NADH	nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/ réduite	Tfam	facteur de transcription mitochondrial A
NE	groupe normoxie et entraînement	TM6M	test de marche de 6 minutes
NF-κB	nuclear factor kappa B	TMPD	tétraméthyl-p-phénylènediamine
O₂	dioxygène	TNF-α	tumeur necrosis factor- α
O₂^{•-}	anion superoxyde	TSC 1/2	tuberous sclerosis 1 et 2
Oct	octanoïl-carnitine	TXA	thromboxane
OH⁻	radical hydroxyl	UCP	uncoupling protein
OXPHOS	oxydation phosphorylante	VCO₂	dioxyde de carbone rejeté
P70S6K	ribosomal protein S6 kinase beta-1, S6	VD	ventricule droit
PaO₂	pression artérielle en O ₂	VDAC	voltage dependent anion channel
PCr	phosphocréatine	VE	ventilation
PD	pression développée	VEGF	vascular endothelial growth factor
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1	VEMS	volume d'expiration forcée en 1 seconde
PFK	phosphofructokinase	VG	Ventricule gauche
PGC1-α	peroxysome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α	VO₂	consommation d'oxygène
PGE	prostaglandine E	VO₂max	consommation d'oxygène maximale
PHD	prolyl hydroxylase	$\Delta\psi$	potentiel de membrane mitochondrial
Pi	phosphate inorganique		
PI-3K	phospho-inositide 3 kinase		

PREAMBULE

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie peu connue du grand public mais qui représente un problème majeur de santé publique en termes de mortalité, morbidité et coût. Elle touche près de 64 millions de personnes à travers le monde et se positionne aujourd'hui comme la 4^{ème} cause de décès en Europe et aux Etats-Unis. Outre l'atteinte pulmonaire qui la caractérise originellement, la BPCO est aujourd'hui considérée comme une pathologie systémique du fait du syndrome inflammatoire chronique et des nombreuses comorbidités qui lui sont associées. La dysfonction musculaire est l'une des atteintes systémiques intervenant de manière centrale dans la physiopathologie de la BPCO. Elle se caractérise par une diminution de la force et de l'endurance musculaire, en lien avec des atteintes qualitatives et quantitatives du muscle. Les origines de ces atteintes peuvent être multiples. De nombreux facteurs semblent ainsi participer à la mise en place de cette dysfonction, comme l'inactivité, l'hypoxie et le vieillissement. Les conséquences de cette atteinte musculaire apparaissent prépondérantes dans la BPCO. La quantité de masse musculaire des patients est ainsi un puissant facteur prédictif de leur mortalité. De plus, la dysfonction musculaire impacte négativement la tolérance à l'effort des patients, leur qualité de vie et augmente le recours aux soins.

Dans le but de limiter la dysfonction musculaire, différentes prises en charge ont été envisagées. La réhabilitation permet des gains importants en termes de restauration des capacités d'endurance et de force, de gain de masse musculaire et d'amélioration de la tolérance à l'effort et de la qualité de vie. Cependant, près d'un tiers des patients BPCO ne présente pas les bénéfices attendus à la suite d'un réentraînement. De plus, à cette non-réponse au réentraînement s'ajoute le fait que certains patients sont réticents, voire sont incapables, de suivre une réhabilitation. D'autres pistes sont donc explorées parmi lesquelles les compléments hormonaux et les approches nutritionnelles. Les traitements hormonaux semblent provoquer des effets positifs sur le gain de masse musculaire. En revanche, ils ne s'accompagnent pas nécessairement d'amélioration des capacités de force et d'endurance.

Certains nutriments présentent des propriétés qui pourraient s'avérer intéressantes dans le but de limiter les atteintes musculaires par une approche nutritionnelle. Cela semble être le cas des acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3). En effet, les bienfaits de ces AGPI, notamment de par leurs propriétés anti-inflammatoires et également antioxydantes, ont été montrés dans de nombreuses maladies chroniques. Ils interviennent également dans le métabolisme et pourraient agir sur les voies de la protéolyse/protéosynthèse et le fonctionnement mitochondrial. Les AGPI n-3, et plus particulièrement l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui induit souvent des effets plus prononcés que les autres AGPI n-3, semblent donc être un apport nutritionnel aux effets potentiellement prometteurs dans le cadre de la prise en charge de la dysfonction musculaire. Une étude montre d'ailleurs un gain de tolérance à l'effort plus marqué chez un groupe de patients BPCO supplémentés en AGPI n-3 en parallèle d'un programme de réentraînement, comparativement à un groupe de patients simplement réentraînés. Les mécanismes à l'origine de ces améliorations ne sont toutefois pas complètement élucidés.

Nous nous proposons d'étudier les effets d'une supplémentation en AGPI n-3 DHA, ainsi que les mécanismes qui les sous-tendent, sur le métabolisme du muscle squelettique et sur la tolérance à l'effort. Nous utiliserons pour cela un modèle animal de rats d'âge moyen soumis à une condition de baisse de disponibilité en oxygène dans le but de nous rapprocher des atteintes musculaires liées à la BPCO. Afin de préciser si le type de métabolisme du muscle entraîne des réponses au DHA spécifiques, il conviendra d'étudier un muscle à dominante oxydative comme le soléaire et un muscle à dominante glycolytique comme les parties blanches du gastrocnémien.

La réhabilitation par l'activité physique faisant partie intégrante de la prise en charge des patients BPCO, toute supplémentation nutritionnelle est à envisager en combinaison avec de tels programmes de réhabilitation. Dans l'éventualité de l'efficacité d'une telle supplémentation, elle serait fréquemment proposée aux patients BPCO dans le cadre des programmes de réhabilitation pulmonaire. Nous avons donc également évalué les effets et les mécanismes d'action de cette supplémentation en DHA lorsqu'elle est associée à un entraînement physique.

Ce manuscrit est structuré en 4 parties. La première est une revue de la littérature permettant d'introduire la problématique générale. La deuxième partie s'attachera à décrire

les matériels et méthodes appliqués dans les études expérimentales que nous avons menées. La troisième partie exposera 3 études expérimentales originales. Nous terminerons ensuite sur une conclusion générale confrontant ces 3 études.

La revue de littérature présentée dans ce manuscrit est elle-même divisée en 4 parties. Dans un premier temps, nous présenterons de manière générale la BPCO. Dans un deuxième temps, nous décrirons la dysfonction musculaire liée à la BPCO, ses origines probables et ses conséquences. Nous en viendrons ensuite à la prise en charge de cette dysfonction. Nous terminerons enfin cette revue de littérature par une partie portant sur les AGPI n-3 et leurs propriétés, au regard notamment du tissu musculaire.

REVUE DE LITTERATURE

1. LA BPCO : UNE PATHOLOGIE PULMONAIRE AU RETENTISSEMENT SYSTEMIQUE

1.1 Définition et étiologie

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie respiratoire caractérisée par une limitation progressive et non-complètement réversible des voies respiratoires en réponse à une inflammation anormale due à des particules et/ou gaz nocifs inhalés, contenus en particulier dans le tabac et aussi dans certains agents polluants. Elle se traduit par des répercussions extra-pulmonaires qui contribuent à la sévérité de l'atteinte de chacun des patients. Sa composante pulmonaire se caractérise par un trouble ventilatoire obstructif progressif et non-complètement réversible en réponse à une inflammation anormale due à des particules et/ou gaz nocifs inhalés, contenus en particulier dans le tabac et aussi dans certains agents polluants (Celli et MacNee 2004; Vestbo et al. 2013).

Le trouble ventilatoire obstructif de la BPCO s'évalue par la mesure, avant et après administration d'un broncho-dilatateur, du volume expiratoire maximal à la première seconde (VEMS) et de la capacité vitale forcée (CVF). Un rapport VEMS/CVF inférieur à 70% après bronchodilatateur est le signe d'une BPCO (ATS 1999).

Une classification des patients en fonction de la sévérité de leur atteinte ventilatoire a été établie par le programme GOLD (Vestbo et al. 2013). Elle distingue les patients selon 4 stades présentés dans le tableau 1:

Tableau 1:

Classification GOLD du niveau de sévérité de la BPCO. Exploration fonctionnelle respiratoire (EFR), volume d'expiration maximal en 1 seconde (VEMS), Insuffisance respiratoire chronique (IRC). D'après (SPLF 2009)

Stade	Obstruction	VEMS/CVF	VEMS	Symptômes
Stade I	Légère	<70%	VEMS > 80% valeur prédite	Avec ou sans symptômes chroniques (toux, expectoration)

Stade II	Modérée	<70%	80% > VEMS > 50% prédit	Avec ou sans symptômes chroniques (toux, expectoration)
Stade III	Sévère	<70%	50% > VEMS > 30% prédit	Avec ou sans symptômes chroniques (toux, expectoration)
Stade IV	Très sévère	<70%	30% > VEMS prédit Ou 50% > VEMS avec IRC grave	Avec ou sans symptômes chroniques (toux, expectoration)

C'est une pathologie lentement progressive qui ne possède pas à ce jour de traitement curatif. Il existe cependant différentes prises en charge permettant de ralentir son évolution et d'améliorer la qualité de vie des patients en agissant sur les symptômes.

Le facteur de risque principal de la BPCO est le tabagisme. Jusqu'à très récemment, le tabagisme était considéré comme étant à l'origine de 80 à 90% des cas de BPCO (Feenstra et al. 2001). Une revue de la littérature confirme effectivement la place prépondérante du tabagisme dans l'étiologie de la BPCO, mais pointe aussi l'importance d'autres facteurs (Eisner et al. 2010). Elle rappelle ainsi que la part de BPCO causée par le tabac ne serait en fait « que » de 52 à 54% pour les hommes, et de 19 à 24% pour les femmes (Ezzati et Lopez 2003). Les autres facteurs de risque sont l'exposition professionnelle à des agents nocifs comme les poussières, les vapeurs, les gaz et les fumées (Trupin et al. 2003), le tabagisme maternel, l'asthme et les épisodes infectieux durant l'enfance (Svanes et al. 2010), des prédispositions génétiques (Mayer et Newman 2001), la pollution de l'air et le tabagisme passif (Eisner et al. 2010).

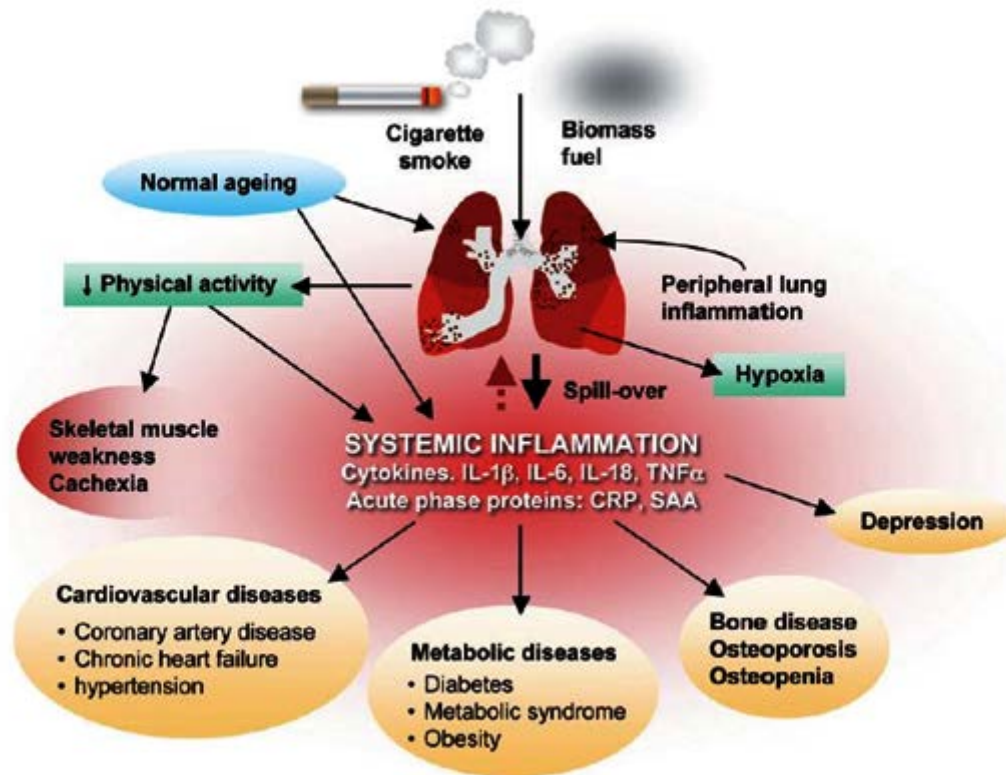


Figure 1:
Etiologie et conséquences pulmonaires et systémiques de la BPCO. (Boschetto et al. 2012)

D'origine pulmonaire, cette affection a pour particularité d'évoluer et d'atteindre finalement tout l'organisme, dont le tissu musculaire (figure 1).

1.2 Histoire naturelle de la maladie

La BPCO reste longtemps peu symptomatique et est donc souvent diagnostiquée tardivement. Les premiers symptômes observés sont une toux et des expectorations matinales. Ils sont fréquemment banalisés et donc peu rapportés par les patients eux-mêmes, car assimilés à la bronchite chronique du fumeur. Puis, progressivement, une dyspnée s'installe, d'abord à l'effort et ensuite également au repos, ce qui va peu à peu s'avérer limitant dans les actions de la vie quotidienne.

L'évolution de la BPCO est progressive. Il a d'ailleurs été établi en 1995 qu'entre 25 et 27 ans sépare le diagnostic de la pathologie et le décès pour les hommes et les femmes de plus de 45 ans (Feenstra et al. 2001).

Une majoration des symptômes, appelée exacerbation, peut survenir de manière aiguë, notamment au cours d'épisodes infectieux (pour 78% des cas (Papi et al. 2006)), et engager le pronostic vital (Soler-Cataluna et al. 2005). Miravittles et al (Miravittles et al. 2007) rapportent qu'en moyenne, 89% des patients atteints de BPCO subissent au moins une exacerbation dans l'année ; de celles-ci, 89% requièrent au minimum le suivi d'un médecin et 21% entraînent une hospitalisation. Ces exacerbations induisent une aggravation brutale des symptômes et détérioration rapide de la qualité de vie des patients (Miravittles et al. 2004) et contribuent à la variabilité de la vitesse de progression de la maladie d'un patient à l'autre.

De plus, la BPCO est fréquemment associée à diverses pathologies concomitantes (ou comorbidité) dont le nombre s'élève à 3,7 en moyenne par patient (Mapel et al. 2000; Vanfleteren et al. 2013). Celles-ci sont reconnues comme facteurs aggravants des symptômes et du pronostic des patients (Marti et al. 2006).

En résumé, la BPCO est une atteinte pulmonaire progressive mais dont les symptômes et le pronostic peuvent être aggravés brutalement lors des exacerbations. Les fréquentes comorbidités associées influencent aussi l'évolution de la pathologie et le pronostic vital.

1.3 L'index BODE

La BPCO est une pathologie pulmonaire mais elle a un retentissement sur tout l'organisme car elle s'accompagne d'une inflammation et d'un stress oxydant systémique que nous détaillerons dans les parties suivantes. Ces paramètres systémiques ont un retentissement non négligeable sur l'évolution de la maladie, la qualité de vie des patients et le pronostic vital, ce qui a conduit à l'élaboration d'un indice permettant de classer et de prédire le pronostic vital des patients de manière plus globale, et non plus uniquement en fonction de leur degré d'obstruction bronchique. Cet indice est le BODE (Celli et al. 2004), pour Body mass index (IMC), Obfstruction (obstruction bronchique), Dyspnoea (dyspnée), Exercise capacity (capacité d'exercice) (tableau 2). Il prend donc en compte non seulement l'obstruction bronchique, mesurée par le VEMS (en pourcentage de la valeur prédite), mais aussi le niveau de dyspnée, qui est très lié à la qualité de vie des patients, la tolérance à l'effort évaluée par le test du périmètre de marche en 6 min, et enfin l'état nutritionnel. Il est considéré comme un facteur prédictif de la survie des patients (SPLF 2009).

Tableau 2:

Score composite du BODE. IMC : Indice de Masse Corporelle. MMRC : échelle modifiée du Medical Research Council incluant 5 stades : Stade 0 : dyspnée pour des efforts soutenus (montée 2 étages) ; stade 1 : dyspnée lors de la marche rapide ou en pente ; stade 2 : dyspnée à la marche sur terrain plat en suivant quelqu'un de son âge ; stade 3 : dyspnée obligeant à s'arrêter pour reprendre son souffle après quelques minutes ou une centaine de mètres sur terrain plat; stade 4 : dyspnée au moindre effort.

		0	1	2	3
B	IMC	21<	≤21		
O	VEMS (% valeur prédite)	65≤	50-64	36-49	≤35
D	MMRC	0-1	2	3	4
E	Distance parcourue lors du test de marche de 6 min (m)	350≤	250-349	150-249	≤149

1.4 Épidémiologie et coût pour la société

Alors qu'elle est relativement peu connue du grand public, la BPCO représente un problème majeur de santé publique en termes de mortalité, morbidité et coût. En effet, cette atteinte respiratoire touche près de 64 millions de personnes à travers le monde et a causé environ 3 millions de décès en 2004 (OMS 2004; OMS 2008). Elle se positionne aujourd'hui comme la 2^{ème} cause de handicap aux Etats-Unis, la 4^{ème} cause de mortalité en Europe et aux Etats-Unis et pourrait être en 2030 la 3^{ème} cause de décès dans le monde selon les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2004).

Dans le monde, l'étude BOLD retrouve une prévalence de 11% d'adultes de plus de 40 ans porteurs d'une BPCO Gold II et plus (Buist et al. 2007). En France, la prévalence de la BPCO est estimée à 7,5% chez les adultes de plus de 45 ans. Elle touche plus particulièrement les hommes, mais l'incidence augmente plus fortement chez les femmes en raison principalement d'un accroissement des habitudes tabagiques féminines. Chez les français de plus de 45 ans, le taux de mortalité relié à la BPCO (sans qu'elle n'en soit nécessairement la cause initiale) est de 63/100 000 (Fuhrman et Delmas 2010).

De plus, la BPCO représente un coût important en termes de morbidité : 100 000 patients sont sous oxygénothérapie de longue durée et/ou ventilation à domicile, 40 000 patients sont admis en Affection de Longue Durée chaque année, et 100 000 séjours en

hôpitaux par an sont liés à des complications de la BPCO et notamment aux épisodes d'exacerbations (Biron et al. 2006).

La BPCO est la deuxième source de handicap aux Etats-Unis et se révèle également invalidante (Murray et Lopez 2013). Elle se situait ainsi en 2004 au 13^{ème} rang des principales causes d'années de vie perdue en raison de capacités réduites et devrait atteindre en 2030 la 5^{ème} position de ce classement (Lopez et al. 2006).

En termes de coût économique, la BPCO représente un lourd fardeau. Ainsi, en France, le montant moyen de la prise en charge des patients s'élève à 4 366 euros/an/patient et augmente avec le degré de sévérité de l'atteinte (Fournier et al. 2005). En moyenne, l'oxygénothérapie à domicile coûte 10 000 euros par an (Biron et al. 2006). En fonction des estimations, la BPCO pèserait de 2,2 à 3,5 milliards d'euros dans les dépenses de santé (Fournier et al. 2005 ; Biron et al. 2006).

Du fait de l'importance du coût humain et économique de cette pathologie, il apparaît nécessaire d'élaborer des stratégies visant à limiter la rapidité d'évolution de la maladie afin de retarder la survenue des incapacités, synonyme de perte d'autonomie des patients et de hausse du coût de prise en charge.

1.5 Physiopathologie

La BPCO est une maladie d'origine pulmonaire mais elle est également systémique, avec une inflammation et un stress oxydant présents dans tout l'organisme.

1.5.1 Inflammation

1.5.1.1 Atteinte pulmonaire

Lors de l'inhalation d'agents nocifs, les cellules pulmonaires (épithéliales, structurelles et inflammatoires) des patients BPCO libèrent en excès des médiateurs de l'inflammation qui vont agir de manière autocrine et paracrine sur les macrophages et les neutrophiles. Ceux-ci produisent alors des protéases et des radicaux libres qui attaquent en retour les cellules pulmonaires et induisent une augmentation de l'épaisseur de la paroi bronchique, une augmentation du tonus des muscles lisses bronchiques, une hypersécrétion des glandes muqueuses et une perte de structure élastique (pour revue (Repine et al. 1997; Aubier et al. 2010).

La caractéristique principale de la BPCO est donc la limitation chronique des flux dans les voies aériennes, qui se trouve accélérée comparativement à la diminution naturelle liée au vieillissement. Cette limitation des flux peut avoir deux origines dont la part relative dans l'incidence de la pathologie varie d'une personne à l'autre. Elle est causée d'une part par une obstruction des bronchioles, induite par l'inflammation, qui provoque un remodelage et un rétrécissement des petites voies aériennes. D'autre part, elle résulte d'une destruction des parois alvéolaires, c'est-à-dire de l'apparition d'un emphysème, lui aussi causé par l'inflammation. Ceci provoque des difficultés d'expiration, liées à la perte du pouvoir de rétraction du poumon découlant des destructions parenchymateuses. Finalement, ces difficultés d'expiration aboutissent à une hyperinflation dynamique à l'origine de la sensation de dyspnée qui se trouve être l'un des symptômes les plus limitant de la tolérance à l'effort des patients BPCO (O'Donnell 2006).

1.5.1.2 Atteinte systémique

En parallèle de l'inflammation au niveau pulmonaire, il existe une inflammation systémique dans la BPCO. En effet, des auteurs ont mis en évidence des taux élevés de certains médiateurs de l'inflammation dans la circulation sanguine de patients atteints de BPCO (Wedzicha et al. 2000; Gan et al. 2004; Barnes et Celli 2009). Ainsi, une méta-analyse de Gan et al (2004) indique que la protéine C-Réactive, les leucocytes, le fibrinogène et le TNF- α sont à des niveaux supérieurs chez les BPCO, même lorsqu'ils sont en état stable, par rapport aux sujets sains. Plusieurs auteurs ont par ailleurs montré que le statut inflammatoire des patients était corrélé à leur déclin respiratoire, à leur capacité d'exercice et à leur qualité de vie (Donaldson et al. 2005; Broekhuizen et al. 2006). De plus, les épisodes d'exacerbation, au cours desquels la fonction respiratoire est fortement diminuée, correspondent à des périodes d'augmentation marquée et brutale de médiateurs de l'inflammation, tant au niveau pulmonaire que systémique (Wedzicha et al. 2000), suggérant une relation entre l'inflammation et la fonction respiratoire. Néanmoins, cela doit être nuancé puisque que dans l'étude ECLIPSE, 30 % des patients n'ont aucun signe biologique d'inflammation systémique de bas grade et seulement 16% ont une inflammation systémique chronique (Agusti et al. 2012).

Ces données mettant en lumière le statut inflammatoire systémique et pulmonaire des patients ont conduit à proposer que la BPCO soit incluse dans le syndrome plus général d'inflammation chronique systémique (Fabbri et Rabe 2007) afin que cette pathologie soit envisagée de manière plus globale, et pas seulement du point de vue pulmonaire. Car si la

BPCO est reconnue comme touchant principalement la fonction pulmonaire, elle s'accompagne d'un risque marqué de comorbidité. De nombreux marqueurs de l'inflammation comme le TNF- α et les IL-6 et 8, dont le contenu est plus élevé chez les patients BPCO, sont communs aux différentes comorbidités (Decramer et al. 2012). Les auteurs font l'hypothèse que ce statut inflammatoire systémique chronique pourrait être lié à l'installation de ces pathologies (Sevenoaks et Stockley 2006). Parmi ces comorbidités, nous nous intéresserons dans ce travail de thèse plus particulièrement à la dysfonction musculaire.

1.5.2 Stress oxydant

Les radicaux libres, générés lors du métabolisme cellulaire normal, sont des espèces chimiques, atomes ou molécules, qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires sur une de leurs orbitales moléculaires (Halliwell 1989). Il en existe une multitude : atomes d'hydrogènes, radicaux carbonates, ions métalliques... Mais ceux dérivant de l'oxygène et/ou de l'azote (les acronymes anglais étant les plus couramment utilisés avec ROS pour Reactive Oxygen Species et RNS pour Reactive Nitrogen Species) représentent la classe la plus importante de radicaux libres générés par notre organisme. A faible concentration, ils participent à des processus physiologiques comme la signalisation cellulaire, mais s'ils se trouvent à des concentrations trop élevées dans les tissus, ils induisent des dommages cellulaires touchant notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Gomez-Cabrera et al. 2008). Il existe dans les organismes aérobies des systèmes antioxydants, enzymatiques ou non, pour piéger et limiter dans le temps l'action des espèces radicalaires. Lorsque la quantité d'espèces pro-oxydantes (les radicaux libres) dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme, et que les effets néfastes surviennent, on parle alors de stress oxydant (Halliwell 1989). Celui-ci se définit comme un déséquilibre de la balance redox, c'est-à-dire de l'ensemble des réactions d'oxydoréduction d'un tissu (Figure 2).

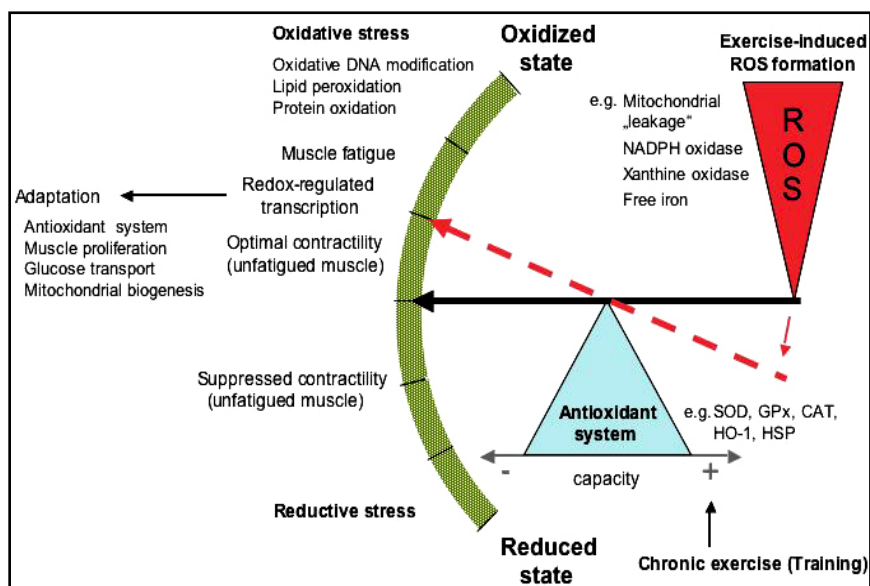


Figure 2:

Représentation des déterminants potentiels et des conséquences de modifications de la balance redox dans le muscle squelettique. (Niess et Simon, 2007)

De nombreux composants cellulaires, par réactions enzymatiques ou auto-oxydation, donnent naissance aux ROS, et en particulier à l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), au cours de leur métabolisme normal.

Grâce à des marqueurs sanguins, Rahman et al, montrent en 1996 (Rahman et al. 1996) un déséquilibre de la balance redox dans le contexte de la BPCO. Chez ces patients, ils observent notamment une augmentation des peroxydations lipidiques qui sont des effets délétères reconnus des radicaux libres, et ils mettent également en évidence une réduction de la capacité du système antioxydant.

De même, plusieurs études ont montré une hausse de la quantité de marqueurs du stress oxydant dans le condensat d'expiration de patients BPCO stables tels qu'une élévation des TBARS (marqueurs de peroxydations lipidiques), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Nowak et al. 1999) et aussi du 8-isoprostane qui est un produit de la peroxydation de l'acide arachidonique (Montuschi et al. 2000). L'étude de Nowak compare des groupes de patients BPCO fumeurs, anciens fumeurs ou n'ayant jamais fumé, et met en lumière un stress oxydant augmenté chez les patients BPCO quelles que soient leurs habitudes tabagiques. Le stress oxydant dans la BPCO n'est donc pas uniquement dû au tabac et serait au moins partiellement intrinsèque à la pathologie (figure 3). L'élévation des TBARS dans le condensat expiré est par ailleurs corrélée négativement avec le VEMS de ces patients (Nowak et al. 1999). Ceci suggère une possible implication du stress oxydant dans le déclin de la fonction respiratoire

(MacNee 2005). Toutefois, ses effets restent difficilement dissociables de ceux liés à l'inflammation.

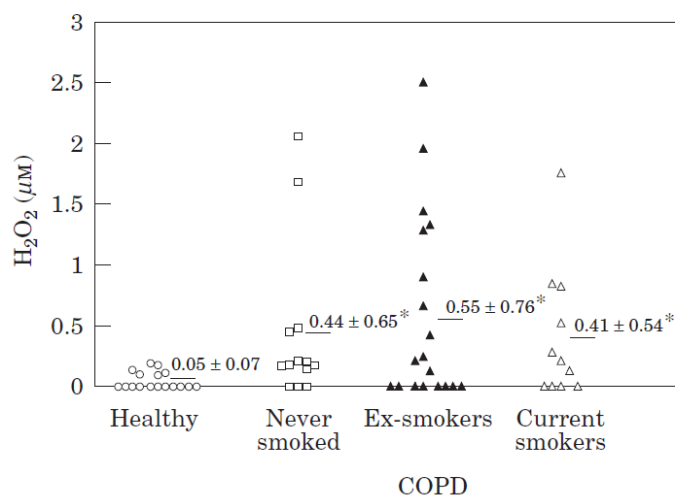


Figure 3:

Concentration de peroxyde d'hydrogène dans le condensat d'air expiré de sujets sains et de patients BPCO. ○ sujet sain n'ayant jamais fumé, □ patient BPCO n'ayant jamais fumé, ▲ patient BPCO ancien fumeur, △ patient BPCO fumeur. * significativement différent de la valeur des sujets sains n'ayant jamais fumé ; $p < 0.05$. D'après (Nowak et al. 1999).

Ces différentes études confirment la présence d'un stress oxydant dans la BPCO. Mais la question concernant son origine reste posée. Elle semblerait à la fois exogène et endogène.

Une partie du stress oxydant observé dans le cas de patients BPCO fumeurs ou anciens fumeurs peut être directement causée par le tabagisme lui-même. En effet, la fumée de cigarette et le goudron qu'elle contient sont riches en radicaux libres (Bluhm et al. 1971; Church et Pryor 1985; Pryor et Stone 1993). De même, la pollution de l'air est aussi à l'origine d'une génération de radicaux libres accrue (Miller et al. 2012). Les attaques de ces radicaux libres exogènes se concentrent alors particulièrement au niveau pulmonaire.

Les cellules immunitaires activées pendant l'inflammation représentent une source endogène majeure d'espèces réactives de l'oxygène. Le statut inflammatoire élevé des patients BPCO laisse à penser que cette source serait particulièrement impliquée dans le stress oxydant observé lors de cette pathologie. Les neutrophiles, les macrophages et les éosinophiles sont ainsi fortement augmentés et génèrent des radicaux libres massivement chez les patients BPCO (Repine et al. 1997; MacNee 2005).

Dans la BPCO, l'atteinte pulmonaire peut conduire à une hypoxie tissulaire, *via* des effets shunts secondaires à des anomalies de la distribution de la ventilation, empêchant la bonne oxygénation du sang et donc des tissus. En situation d'hypoxie, ou lorsque le tissu est

soumis à des phénomènes d'ischémie/reperfusion, la voie de la xanthine oxydase est stimulée et peut alors jouer un rôle prépondérant dans la production endogène de radicaux libres (Gomez-Cabrera et al. 2003). Dans les conditions de stress énergétique comme l'hypoxie, l'ATP est converti en ADP, puis AMP, qui forme finalement de l'hypoxanthine, le substrat principal de la xanthine oxydase. Cette dernière est une enzyme convertie à partir de la xanthine déshydrogénase en condition de manque d'oxygène (ischémie, hypoxie) (Kayyali et al. 2001; Nishino et al. 2008) (figure 4). Contrairement à son précurseur, elle ne fonctionne pas en transférant au NAD^+ les électrons libérés lors de la dégradation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, mais en réduisant préférentiellement l'oxygène moléculaire, ce qui génère donc des radicaux libres. Dans la BPCO, l'activité de la xanthine oxydase est effectivement augmentée dans les voies aériennes par rapport à des sujets sains (Ichinose et al. 2003; Komaki et al. 2005). Cette voie de production de ROS est donc activée au cours de cette pathologie

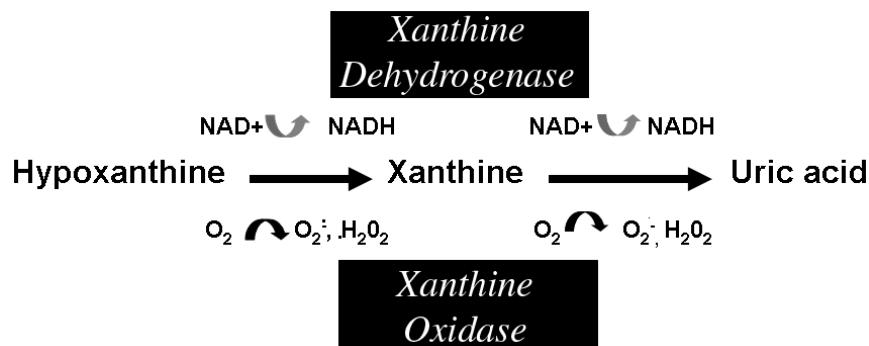


Figure 4:

La xanthine oxydase est une enzyme interconvertible entre sa forme réduite (xanthine déshydrogénase) et sa forme oxydée (xanthine oxydase). D'après (Terkeltaub 2006)

La mitochondrie est elle aussi une source endogène de ROS. En effet, une partie des électrons transportés par la chaîne respiratoire peut s'en échapper et se lier directement à l'oxygène pour former l'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), un radical libre très réactif rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (moins réactif) par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). Chez les patients BPCO, Picard et al, démontrent une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène par les mitochondries musculaires *in situ*. La mitochondrie en tant que source de ROS apparaît donc elle aussi impliquée au cours de la BPCO (Picard et al. 2008).

Ce stress oxydant associé à la BPCO peut avoir des conséquences sur l'état de santé du patient (figure 5).

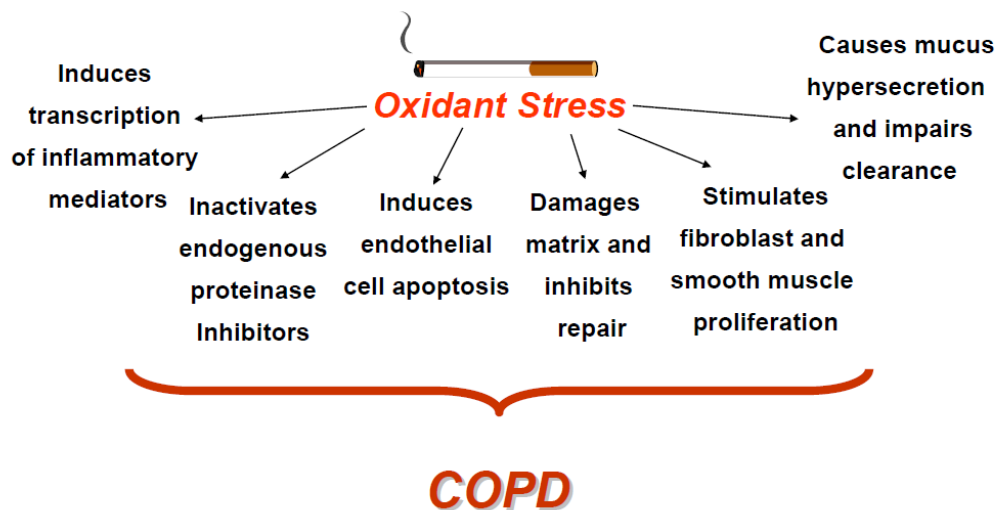


Figure 5:

Stress oxydant et pathogénèse de la BPCO. Les ROS et les RNS jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire de nombreux processus cellulaires. Cependant, quand leur concentration dépasse un certain seuil, l'équilibre redox est rompu et ils ont alors des effets délétères conduisant à de nombreuses pathologies associées à la BPCO. D'après (Stevenson et al. 2006).

Le stress oxydant est considéré comme un acteur potentiel de la mise en place des atteintes pulmonaires. Ainsi, les espèces oxydantes pourraient modifier l'équilibre protéases/antiprotéases dans les poumons en inhibant les antiprotéases, ce qui serait à l'origine de la destruction du parenchyme et donc de l'installation de l'emphysème. De plus, la génération d'espèces radicalaires induit une hypersécrétion de mucus par les cellules épithéliales des voies aériennes et donc contribuerait à la limitation ventilatoire (MacNee 2005). Enfin, le stress oxydant contribue au maintien du statut inflammatoire, notamment *via* la stimulation de la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation parmi lesquels le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappaB) (Schreck et al. 1991; Rahman et al. 2002).

Ce stress oxydant décrit dans les poumons (Rahman et al. 2002) est aussi observé dans d'autres tissus de l'organisme, parmi lesquels le muscle (Allaire et al. 2002; Couillard et al. 2003; Koechlin et al. 2004; Picard et al. 2008), renforçant l'idée que la BPCO est une maladie systémique.

Les effets particuliers du stress oxydant sur la dysfonction musculaire seront décrits plus extensivement dans les parties suivantes.

1.5.3 Comorbidités

Comme mentionné plus tôt, la BPCO s'accompagne généralement d'autres pathologies, appelées comorbidités, qui se surajoutent à l'atteinte initiale. Les comorbidités massivement associées à la BPCO sont : l'ischémie myocardique, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'anémie normocytaire, le diabète, le syndrome métabolique, les apnées du sommeil obstructives, la dysfonction musculaire, la cachexie, l'ostéoporose, la dépression et les cancers du poumon (figure 6) (Barnes et Celli 2009; Decramer et al. 2012; Vanfleteren et al. 2013).

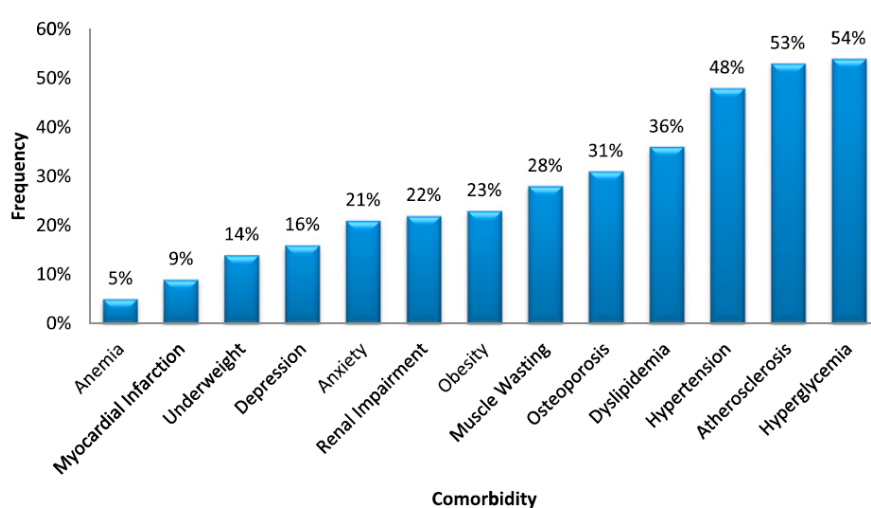


Figure 6:
Fréquence des comorbidités objectivement identifiées. (Vanfleteren et al. 2013)

Ainsi, près de 98% des patients atteints de BPCO sont également diagnostiqués pour au moins une comorbidité et 53% en présentent 4 et plus (Vanfleteren et al. 2013). Ce grand nombre de comorbidité peut s'expliquer en partie par le fait que ces pathologies présentent des facteurs de risques communs avec la BPCO, parmi lesquels le tabac, la sédentarité, le vieillissement, un statut inflammatoire élevé... La dysfonction musculaire est parfois classée parmi ces comorbidités. Elle a en effet un impact non négligeable sur l'état de santé des patients, leur pronostic vital, leur qualité de vie, leur capacité d'exercice.

En résumé, la BPCO est une pathologie très fréquente, souvent diagnostiquée, mal connue du grand public et au coût élevé en termes économique et humain. Cette maladie pulmonaire est associée à une inflammation et à un stress oxydant systémique qui ont des répercussions sur le pronostic vital et la qualité de vie des patients. Elles

s'accompagnent de nombreuses comorbidités parmi lesquelles une dysfonction musculaire que nous détaillerons plus amplement dans la partie suivante.

2. DYSFONCTION MUSCULAIRE

La BPCO est une pathologie pulmonaire, mais comme décrit précédemment, elle a un retentissement sur tout l'organisme. Parmi les atteintes systémiques qui l'accompagnent, la dysfonction musculaire apparaît comme un facteur clé de la BPCO et de son évolution puisqu'elle aggrave la dyspnée et la sédentarisation des patients, les engageant dans une spirale de déconditionnement. Ces altérations qui touchent l'ensemble de la masse musculaire, bien qu'à des degrés différents selon les groupes musculaires, conduit à s'interroger sur l'existence d'une véritable myopathie périphérique dans la BPCO. Les auteurs définissent la myopathie comme une pathologie musculaire qui n'est reliée à aucun trouble de l'innervation ou de la jonction neuromusculaire (Couillard et Prefaut 2005). Cette question autour de la myopathie fait d'ailleurs l'objet d'une controverse et le débat n'est à ce jour toujours pas résolu (Couillard et Prefaut 2005; Wagner 2006; Polkey et Rabe 2009). Une partie des auteurs soutient que les altérations touchant à la fonction musculaire des patients BPCO seraient uniquement dues au déconditionnement musculaire lié à leur faible niveau d'activité physique (revue (Wagner 2006; Polkey et Rabe 2009). Les partisans de la présence d'une myopathie dans la BPCO avancent quant à eux que les atteintes musculaires observées dans la BPCO vont au-delà du déconditionnement et ne sont d'ailleurs pas complètement rétablies par un réentraînement (Couillard et Prefaut 2005). Dans cette partie, nous nous proposons de caractériser les atteintes musculaires observées dans la BPCO et les mécanismes potentiellement à l'origine de ces altérations.

2.1 Cachexie et masse musculaire

La cachexie est une comorbidité touchant près d'un quart des patients BPCO (Congleton 1999; Wagner 2008). Elle se définit comme un état de poids sévèrement et pathologiquement faible, principalement dû à une perte de tissus autres que le tissu adipeux (Wagner 2008). Or Vandenberg et al, (Vandenberg et al. 1967) montrent dès 1967 que la perte de poids chez le patient BPCO s'associe à un risque de mortalité supérieur. Ceci fut confirmé par Wilson et al, qui ajoutent que le poids corporel des patients est un facteur de pronostic indépendant du VEMS (Wilson et al. 1989). La cachexie et principalement la perte

de masse musculaire diminue de manière concomitante avec le déclin respiratoire (Engelen et al. 1994). La cachexie est encore aujourd'hui couramment évaluée par l'indice de masse corporelle (IMC), un patient étant reconnu cachectique pour un $IMC < 21 \text{ kg/m}^2$. Mais cet indice ne prend pas en compte la composition corporelle et notamment les parts de masses grasse et maigre. Un patient pourrait donc conserver un IMC supérieur à 21 kg/m^2 tout en ayant perdu une forte part de sa masse musculaire, ce qui n'aura pas les mêmes conséquences en terme de pronostic vital. En effet, la survie du patient BPCO apparaît plus fortement réduite lorsqu'il y a perte de masse musculaire, qu'elle soit évaluée par impédance bioélectrique (Schols et al. 2005) (figure 7) ou par mesure de la surface de section à mi-cuisse (Marquis et al. 2002), que par la perte de poids globale (figure 4).

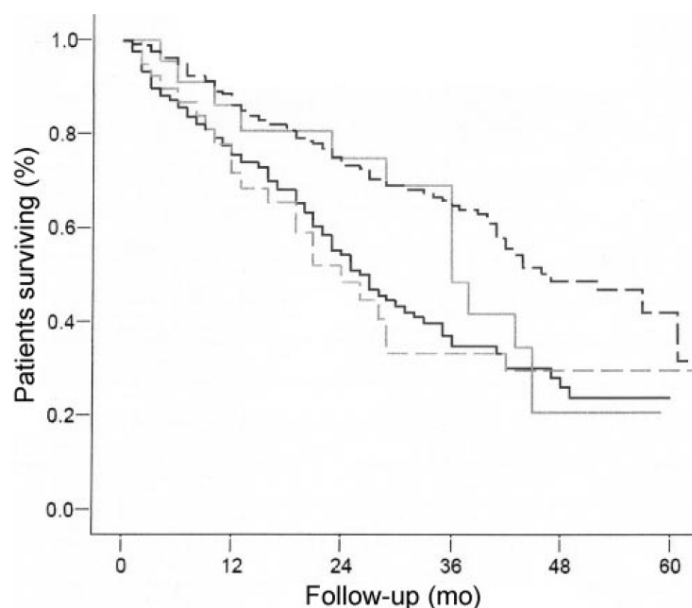


Figure 7:

Survie des patients BPCO selon leur composition corporelle. Ligne continue noire = cachexie ($IMC < 21 \text{ kg/m}^2$ et $IMM < 16 \text{ kg/m}^2$), ligne continue grise = dénutrition ($IMC < 21 \text{ kg/m}^2$ et $IMM > 16 \text{ kg/m}^2$), ligne discontinue grise = atrophie ($IMC > 21 \text{ kg/m}^2$ et $IMM < 16 \text{ kg/m}^2$), ligne discontinue noire = aucune détérioration ($IMC > 21 \text{ kg/m}^2$ et $IMM > 16 \text{ kg/m}^2$). La médiane de survie (95% CI) est significativement plus faible ($p < 0.0001$) chez les patients avec cachexie ou atrophie par rapport aux patients dénutris ou sans détérioration. La survie des patients de la catégorie dénutrition n'est pas significativement différente de celle sans détérioration lors des trois premières années. D'après (Schols et al. 2005)

Il semble donc plus pertinent de se référer à l'indice de masse maigre (IMM) en plus de l'IMC pour caractériser la cachexie des patients. Schols et al (Schols et al. 2005) proposent ainsi que la cachexie soit établie lorsque l'IMM est inférieur à 16 kg/m^2 pour les hommes et à 15 kg/m^2 pour les femmes. Ces remarques ont été suivies en 2008 de l'élaboration d'une

nouvelle définition de la cachexie par un groupe de scientifiques dans le but d'harmoniser les diagnostics et la prise en charge. Leur réflexion a abouti à la définition suivante : « la cachexie est un syndrome métabolique complexe associé à des pathologies sous-jacentes et caractérisé par une perte musculaire avec ou sans perte de masse grasse » (Evans et al. 2008). Cette définition souligne l'importance de la prise en compte de la masse musculaire dans le diagnostic de la cachexie.

La perte de masse musculaire devient ainsi un facteur majeur dans la définition de la cachexie car elle ressort mieux corrélée à des paramètres de survie et de qualité de vie que ne le sont l'IMC ou la masse adipeuse, comme le suggèrent des analyses multivariées (Schols et al. 2005).

2.2 Distinction muscles locomoteurs et muscles respiratoires

Lorsque l'on s'intéresse aux atteintes musculaires rencontrées dans la BPCO, il convient de distinguer celles touchant les muscles locomoteurs de celles propres aux muscles respiratoires. En effet, ces deux ensembles de muscles sont exposés à un même environnement d'inflammation et de stress oxydant dont les effets délétères sont reconnus. Cependant les muscles respiratoires sont soumis à une charge accrue de travail mécanique imposée par les limitations respiratoires, alors qu'à l'inverse, les muscles locomoteurs (ou parfois appelés muscles périphériques) sont en général moins sollicités dans la BPCO du fait de la sédentarisation liée à la dyspnée. Les muscles respiratoires présentent donc des altérations communes avec les muscles locomoteurs (qui seront précisées par la suite dans ce manuscrit) tout en démontrant des adaptations à la surcharge de travail. Ils deviennent ainsi plus oxydatifs avec une plus grande proportion de fibres I montrée dans le diaphragme (Levine et al. 1997), mais aussi avec une modification de la densité mitochondriale et une augmentation de l'activité des enzymes du métabolisme oxydatif (pour revue (Orozco-Levi 2003; Caron et al. 2011; Levine et al. 2013)).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéresserons aux atteintes des muscles locomoteurs.

2.3 Manifestations de la dysfonction musculaire

On parle de dysfonction musculaire dès lors qu'au moins une des deux principales propriétés du muscle est diminuée, l'endurance ou la force. A cela peut s'ajouter un troisième critère qui impacte la fonction musculaire, l'augmentation de fatigabilité.

Ces trois composantes de la dysfonction musculaire vont être touchées chez le patient BPCO.

2.3.1 Evolution de la force

Certains définissent la force comme la capacité motrice qui permet à l'homme de vaincre une résistance ou de s'y opposer par un effort intense de sa musculature. La force dépend principalement de la masse musculaire, de la longueur du muscle au repos, de la vitesse de raccourcissement des sarcomères (les unités contractiles musculaires) et du recrutement des unités motrices.

La dysfonction musculaire observée chez un certain nombre de patients BPCO se manifeste par une diminution de la force développée, que ce soit dans les muscles des membres supérieurs (Gosselink et al. 1996; Gosker et al. 2003; Franssen et al. 2005; Cortopassi et al. 2011), ou inférieurs (Hamilton et al. 1995; Bernard et al. 1998; Franssen et al. 2005; Hopkinson et al. 2007). Mais il est généralement reconnu que ce sont les muscles inférieurs qui sont les plus touchés (Bernard et al. 1998; Gea et al. 2001). La perte de force s'élève en moyenne à 20-30% chez des patients modérés à sévères (Hamilton et al. 1995; Gosselink et al. 1996), mais elle est très variable d'un sujet à l'autre selon l'âge, le sexe, le degré de cachexie... (Hamilton et al. 1995; Franssen et al. 2005)

On estime à 32-33% la part de patients BPCO présentant une faiblesse musculaire au niveau du quadriceps (Seymour et al. 2010) et ces valeurs atteignent 38% pour les patients de stade GOLD IV. Il est à noter que cette réduction de force musculaire apparaît même en l'absence d'obstruction sévère des voies aériennes et n'en serait donc pas totalement dépendante (Seymour et al. 2010).

Cette diminution de force ne peut être imputée uniquement à l'effet du vieillissement puisque la mesure de la force lors d'une contraction maximale volontaire du quadriceps est plus faible de 21,5% pour des patients BPCO comparés à des sujets sains du même âge (Hopkinson et al. 2004). La différence observée entre les deux valeurs met en évidence un effet propre de la BPCO sur le muscle, indépendamment de l'âge.

Une étude de 2007 indique par ailleurs que la force isométrique du quadriceps s'avère être un puissant facteur prédictif de la mortalité des patients BPCO, devant l'âge, l'IMC et le VEMS (Swallow et al. 2007) (figure 8). Ceci conforte l'importance de la prise en compte de ce paramètre dans l'évaluation de l'avancée de la maladie et dans la prise en charge des patients.

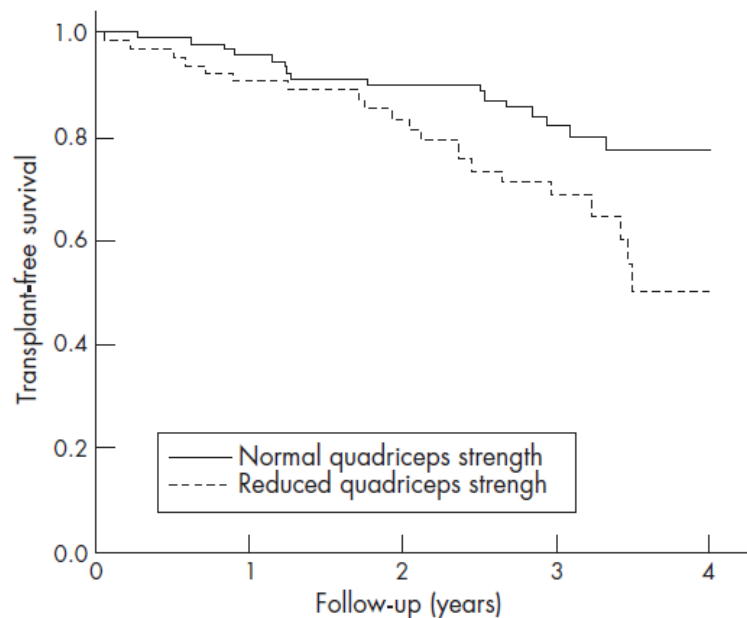


Figure 8:

Survie de patients BPCO avec une force du quadriceps normale ou réduite. Le caractère normal de la force est défini telle que la force développée lors d'une contraction maximale volontaire du quadriceps >120% de l'IMC ou inférieure à 120% de l'IMC. Les courbes sont significativement différentes, $p=0,017$. D'après (Swallow et al. 2007)

2.3.2 Evolution de l'endurance musculaire

L'endurance musculaire est la capacité à maintenir un effort d'une intensité donnée au cours du temps, et donc de résister à la fatigue. Elle dépend de la capacité de transport de l'oxygène depuis l'air jusqu'aux mitochondries et de l'activité des mitochondries. Plusieurs facteurs peuvent jouer sur ces paramètres comme la proportion de fibres de type I, la capillarisation, les enzymes du métabolisme oxydatif... (ATS 1999)

L'endurance musculaire a été moins étudiée que la force dans le contexte de la BPCO. Néanmoins, dès 1998, Serres et al mettent en évidence une diminution significative de l'endurance du quadriceps chez les patients BPCO comparés à des sujets contrôle appariés en âge mais pas en niveau d'activité (Serres et al. 1998; Coronell et al. 2004). Depuis, ces résultats ont été confirmés : l'endurance du muscle des patients BPCO est très nettement

diminuée en comparaison de sujets sains appariés en âge et niveau d'activité (Couillard et al. 2003; Allaire et al. 2004). De plus, cette diminution marquée de l'endurance du quadriceps survient alors même qu'une diminution de la force développée au cours d'une contraction maximale volontaire n'est pas encore observée (Couillard et al. 2002). La capacité d'endurance des patients BPCO serait donc altérée avant leur capacité de force. Dans l'étude de Couillard et al, (Couillard et al. 2002), les sujets contrôles et BPCO étaient appariés en niveau d'activité global et une baisse d'endurance n'a pourtant été rapportée que chez les patients BPCO, l'atteinte de l'endurance du quadriceps des patients BPCO ne serait donc pas uniquement causée par l'inactivité, ce qui soutient l'hypothèse de la présence d'une myopathie dans la BPCO.

Cette diminution de l'endurance musculaire se retrouve aussi au niveau des membres supérieurs et notamment pour le fléchisseur du coude (Newell et al. 1989). Ces auteurs montrent par ailleurs une corrélation positive entre l'endurance du fléchisseur du coude et le VEMS.

La fatigabilité musculaire est également l'une des propriétés fonctionnelles du muscle. Elle correspond à une diminution anormalement rapide de la force produite suite à un effort préalable. Ainsi, la force générée pour une commande nerveuse donnée est réduite en situation de fatigue. Une fatigabilité accrue peut être considérée comme un marqueur d'atteinte de la capacité de force et donc d'une dysfonction musculaire.

La fatigue possède une composante centrale, notamment liée à la motivation, et une composante périphérique directement liée au muscle. Des techniques mettant en jeu la stimulation directe de nerfs efférents musculaires permettent de s'affranchir de la composante centrale et donc de se centrer sur la composante périphérique seulement. Mador et al, (Mador et al. 2003) a appliqué cette technique à des patients BPCO et des sujets sains qui venaient d'effectuer un exercice de pédalage jusqu'à épuisement dont l'intensité relative était égale d'un groupe de sujets à l'autre. Ils montrent une augmentation plus marquée de la fatigue du quadriceps activé par stimulation du nerf fémoral chez les patients BPCO. Mais le type d'effort choisi pour produire une pré-fatigue met en jeu tout l'organisme et ne permet pas de discriminer l'atteinte musculaire elle-même. Ce même groupe a donc mesuré ensuite la fatigabilité du quadriceps, toujours par stimulation du nerf fémoral, après un exercice de contraction maximale volontaire du quadriceps. Ils montrent là encore une fatigabilité du quadriceps plus élevée chez les patients BPCO sévères comparés à des sujets sains. Ces résultats ont été confirmés dans le quadriceps et les muscles des avant-bras (Gosker et al.

2003; Franssen et al. 2005). Il est à noter que la fatigabilité est plus importante chez des patients sévères comparés à des patients BPCO modérés (Mador et al. 2003). Cette fatigabilité n'est d'ailleurs pas retrouvée dans le quadriceps et les muscles des avant-bras si les patients ont une BPCO modérée et sont non-cachectiques (Degens et al. 2005). Saey et al, (Saey et al. 2005) montrent également qu'une partie des patients BPCO présentant une atteinte respiratoire, un IMC et une surface de section du quadriceps identiques aux autres patients, présentent une fatigabilité accrue par rapport à ces derniers. La population de patients BPCO n'est donc pas homogène concernant la fatigue musculaire.

Ces patients plus sensibles à la fatigue présentent une perception de la fatigue supérieure, une capillarisation plus faible de leurs fibres musculaires, une plus forte activité glycolytique par rapport à l'activité oxydative et un niveau de lactate lors d'un exercice sus-maximal plus élevé (Saey et al. 2005). Ce dernier paramètre, qui découle des 2 précédents, pourrait expliquer la plus faible tolérance à l'effort de ces patients, probablement au moins partiellement engendrée par la fatigabilité musculaire plus importante (Gagnon et al. 2009).

La perte de force et d'endurance ainsi que l'augmentation de la fatigabilité observées chez les patients BPCO confirment la présence d'une dysfonction musculaire. Les atteintes musculaires et les mécanismes impliqués dans cette dysfonction seront décrits dans la partie suivante.

2.4 Les atteintes des muscles locomoteurs dans la BPCO

2.4.1 L'atrophie

2.4.1.1 Perte de masse musculaire chez le patient BPCO

Depuis un certain temps déjà, les auteurs ont montré que la perte de poids souvent visible dans la BPCO comportait une perte de masse musculaire. Ainsi, Schols et al, signalent en 1993 sur une cohorte de 255 patients BPCO, que jusqu'à 40 à 50% des patients les plus sévères présentent une diminution de leur masse musculaire. En outre, ils ajoutent que même dans des cas moins sévères (avec une obstruction bronchique modérée) près de 25% des patients voyaient leur masse musculaire diminuée, prouvant que la fonte musculaire n'est pas l'apanage des patients sévèrement atteints (Schols et al. 1993; Steuten et al. 2006).

Cette atrophie musculaire a été mesurée à de nombreuses reprises et par différentes techniques, comme la tomographie (Bernard et al. 1998; Roig et al. 2011) et l'imagerie à résonance magnétique (Mathur et al. 2008). Quelle que soit la technique employée, les auteurs mettent en évidence une diminution de la surface de section du quadriceps que ce soit en comparant les patients BPCO à des sujets contrôles sains et appariés en âge, ou en prenant les patients pour leurs propres contrôles (Hopkinson et al. 2007) (figure 9).

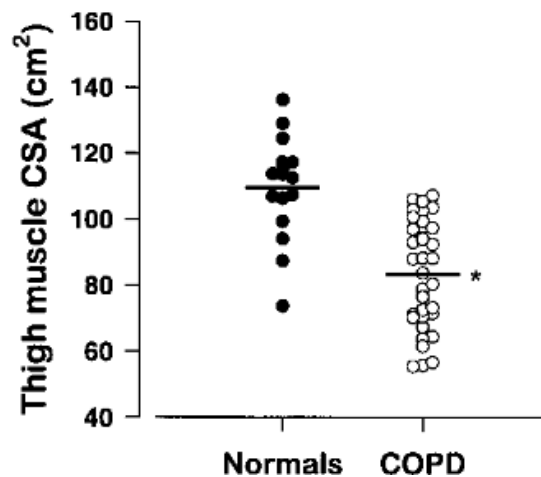


Figure 9:

Comparaison surface de section musculaire. Valeurs individuelles de la surface de section de la cuisse obtenues sur des sujets contrôles sains et des patients BPCO. La barre horizontale représente la valeur moyenne dans le groupe concerné. La surface de section musculaire de la cuisse était significativement diminuée chez les patients BPCO par rapport aux sujets sains (* $p < 0,0001$). (Bernard et al. 1998).

Il existe différents types de fibres musculaires, chacun possédant des caractéristiques particulières. Les fibres de type I ont un profil de contraction lent. Elles présentent une grande résistance à la fatigue mais la force qu'elles développent se révèle limitée. Elles sont souvent riches en mitochondries et très vascularisées. Les fibres de type IIx (ou IIb) ont quant à elles un profil de contraction rapide, Elles sont peu résistantes à la fatigue mais sont capables de produire une force importante. Elles ont généralement une faible densité mitochondriale comparativement aux fibres de type I. Les fibres de type IIa possèdent des caractéristiques intermédiaires aux deux autres types évoqués. Il existe enfin une dernière catégorie, les fibres IIab, qui sont une forme hybride. Elles apparaissent lors de la transition des fibres de type IIb vers le type IIa et inversement, ce sont des fibres en remodelage.

Selon les travaux de Witthom, l'atrophie du muscle quadriceps vaste latéral des patients BPCO serait due à une diminution de la surface de section des fibres de type I, IIa et

IIab (Whitton et al. 1998). De plus, ils montrent que la réduction de surface transversale des fibres I et IIa est proportionnelle à la réduction de la surface de section transversale à mi-cuisse, suggérant que la perte de masse musculaire du quadriceps est due plus spécifiquement à la diminution du diamètre des fibres I et IIa, et non au type IIab. Gosker et son équipe rapportent quant à eux une réduction de 17,4% de la surface de section des fibres de type Ix uniquement, chez des patients BPCO comparés à des sujets sains (Gosker et al. 2002). La raison avancée par les auteurs pour expliquer cette différence entre les deux études est que les sujets sains des travaux de Witthom avaient une surface de section des fibres de type I semble-t-il anormalement élevée par rapport aux valeurs habituellement obtenues, ce qui augmentait de fait la différence de surface entre les sujets sains et BPCO. Mais quoiqu'il en soit, Caron et al résumant la situation en déclarant que malgré que tous les types de fibres puissent être touchés par l'atrophie, ce sont les fibres de type Ix qui semblent les plus concernées (Caron et al. 2011). Cette prévalence possible de l'atrophie des fibres de type II est différente de celle observée lors de l'atrophie liée à l'inactivité qui touche préférentiellement les fibres de type I. Ceci suggère que des causes et mécanismes autres que la simple inactivité sont impliqués dans l'atrophie liée à la BPCO (Rabinovich et Vilaro 2010).

2.4.1.2 Déséquilibre de la balance protéosynthèse/protéolyse

L'atrophie musculaire résulte également d'une diminution du contenu protéique dans les fibres musculaires. Elle est le résultat d'un déséquilibre entre la balance «protéosynthèse/protéolyse » qui peut provenir soit d'un catabolisme trop important, soit d'un anabolisme trop faible, soit d'une combinaison des deux.

Chez le patient BPCO, des études indiquent qu'il existe un renouvellement protéique plus rapide dans l'organisme entier (Engelen et al. 2000) par rapport à des sujets sains, et une dégradation protéique supérieure dans l'organisme (Broekhuizen et al. 2005; Ubhi et al. 2012) et dans les myofibrilles des patients cachectiques (Rutten et al. 2006) comparativement à des sujets sains et des patients BPCO non-cachectiques.

Il y aurait donc effectivement un déséquilibre de la balance protéosynthèse/protéolyse chez les patients BPCO.

- Protéolyse

L'un des principaux processus responsables de la dégradation des protéines dans le muscle est le système ubiquitine-protéasome (Lecker et al. 1999). Il se base sur le marquage,

ou ubiquitinylation, de la protéine à dégrader par une protéine spécifique, l'ubiquitine. La protéine cible est ensuite adressée au protéasome, un grand complexe protéolytique, qui la dégrade. Ce système met en jeu des enzymes, les ubiquitine ligases, qui fixent la protéine ubiquitine sur la protéine à dégrader. Certaines ont été caractérisées comme intervenant spécifiquement dans l'atrophie musculaire, il s'agit des enzymes MAFbx (Muscle Atrophy Fbox, également appelée atrogin-1) et MuRF-1 (muscle-specific RING-finger protein 1) (Bodine et al. 2001) (figure 9).

Dans la BPCO, une augmentation de l'expression du contenu en ARNm de MAFbx et MuRF-1 a été mise en évidence dans le quadriceps (Doucet et al. 2007). Cette hausse est accentuée en situation d'exacerbation (Crul et al. 2010). Le niveau d'expression protéique de MAFbx est également augmenté, mais pas celui de MuRF-1 (Lemire et al. 2012). Le degré de polyubiquitinylation, marqueur de l'activité protéolytique, est lui aussi augmenté dans le quadriceps des patients BPCO (Fermoselle et al. 2012; Lemire et al. 2012).

Ces résultats vont dans le sens d'une activation du système ubiquitine-protéasome dans la BPCO. Plusieurs voies de signalisation pourraient être stimulées en amont de ces ubiquitines ligases. D'une part la voie incluant MAPK p38 pourrait être impliquée *via* une activation de MAFbx, mais des résultats contradictoires ne permettent pas de conclure (Lemire et al. 2012; Riddoch-Contreras et al. 2012). D'autre part, le facteur de transcription Foxo (Forkhead box O transcription factor) pourrait lui aussi jouer un rôle en activant la transcription de MAFbx et MuRF-1 (figure 10). Toutefois, il est inhibé par la protéine Akt phosphorylée (pour revue : (Glass 2005) et il est montré que la phosphorylation d'Akt est augmentée chez les patients BPCO (Doucet et al. 2007; Vogiatzis et al. 2010). Le rôle de Foxo dans la fonte musculaire des patients BPCO et les mécanismes qui le régulent, restent donc à éclaircir. Toutefois, Akt n'est pas le seul régulateur connu de Foxo, il est également activé par l'AMPK (Greer et al. 2009), ce qui pourrait limiter l'effet de l'inhibition par Akt, d'autant que le contenu en ARNm de Foxo est effectivement augmenté chez les patients BPCO (Doucet et al. 2007; Fermoselle et al. 2012), suggérant qu'une autre voie est bien impliquée.

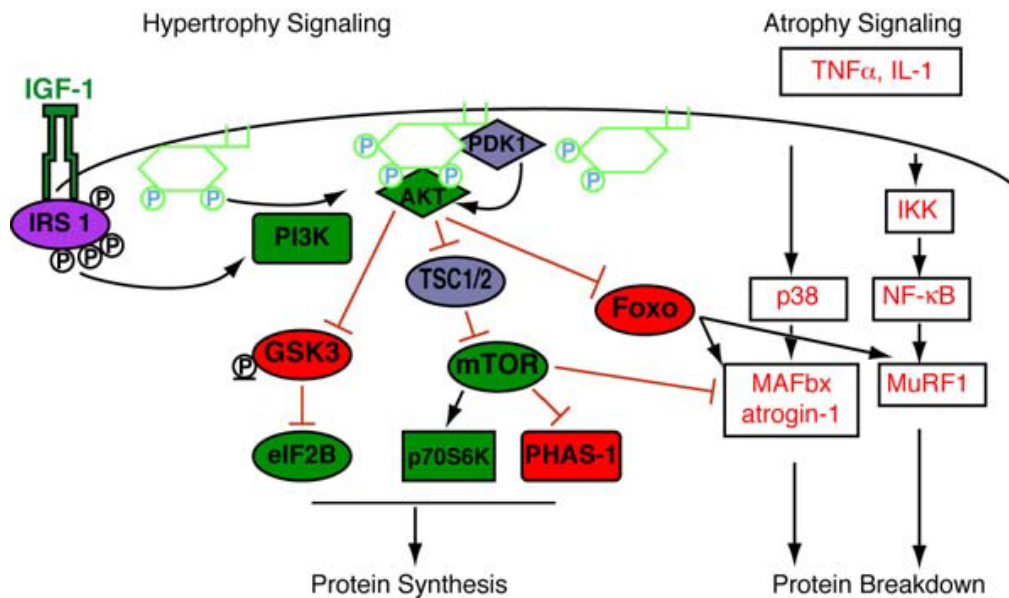


Figure 10:

La voie IGF-1/PI3K/Akt induit la synthèse protéique et bloque les voies de l'atrophie. (Glass 2005)

Glycogen synthase kinase 3 (GSK), mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), insulin growth factor (IGF-1), Phosphoinositide-dependent kinase-1(PDK1), tuberous sclerosis 1 et 2 (TSC1/2), Forkhead box O transcription factor (Foxo), Muscle Atrophy Fbox (MAFbx), muscle-specific RING-finger protein 1 (MuRF1), Nuclear factor-kappa B (NF-κB), Inhibitor of κB kinase (IKK), tumour necrosis factor α (TNF-α), interleukine-1 (IL-1).

Le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans la transcription de nombreuses protéines de l'inflammation et de la réponse au stress cellulaire (figure 10). Il se trouve sous une forme inactive lorsqu'il est lié à la protéine IκBα dans le cytoplasme. Lorsque cette dernière est phosphorylée par IKK (Inhibitor of κB kinase) puis ubiquitinylée et adressée au protéasome, NF-κB est transloqué dans le noyau où il devient actif et son rôle est alors d'activer la transcription génique. Son activité est augmentée dans la BPCO (Agusti et al. 2004) et le serait plus spécialement chez les patients cachectiques (Vogiatzis et al. 2010). Il apparaît lui aussi impliqué dans la protéolyse puisqu'il serait inducteur de l'expression de MuRF-1 (Cai et al. 2004; Doucet et al. 2007), mais en revanche il n'agit pas sur MAFbx (Doucet et al. 2007).

De plus, une étude chez l'animal met en évidence qu'une augmentation de l'acidose, dont on sait qu'elle débute précocement à l'exercice chez les patients BPCO et pour de faibles intensités de travail, active le système ubiquitine-protéasome (Mitch et al. 1994).

Ces différentes voies concourent donc indubitablement à l'élévation des dégradations protéiques mise en évidence dans le muscle des patients BPCO. Elles représentent donc des

cibles thérapeutiques pour essayer de freiner la perte de masse musculaire. Il apparaît intéressant et prometteur de trouver les moyens permettant de les moduler.

- Protéosynthèse

Outre la dégradation protéique augmentée, il est également possible que la protéosynthèse soit altérée par la BPCO.

La principale voie de régulation de la synthèse protéique dans le muscle est la voie de signalisation impliquant Akt (ou PKB pour protein kinase B) et mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin).

mTOR est principalement régulée par l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) qui active PI-3K (phospho-inositide 3 kinase), celle-ci phosphorylant ensuite Akt. Ainsi phosphorylée, Akt active à son tour mTOR *via* une phosphorylation inhibitrice de TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2) (Glass 2005) (figure 10). Or, une diminution de l'IGF-1 plasmatique lors d'exacerbations (Spruit et al. 2003; Crul et al. 2007; Ye et al. 2012) et des contenus de son ARNm et de sa protéine dans le muscle quadriceps de patients BPCO a été observée (Crul et al. 2007; Vogiatzis et al. 2010). Cela suggère une éventuelle altération de cette voie de synthèse protéique dans la BPCO.

Toutefois, la voie Akt apparaît bel et bien activée dans la BPCO puisque le niveau de phosphorylation d'Akt est augmenté, ainsi que celui de certains de ses facteurs en aval comme 4E-BP1 et P70S6K (Doucet et al. 2007; Vogiatzis et al. 2010). L'activation de cette voie demeure cependant étonnante dans ce contexte d'atrophie et nécessite des éclaircissements.

La protéine MyoD est un facteur de transcription de la myogénèse qui intervient notamment dans la régénération musculaire. Sa transcription et son expression protéique sont diminuées chez les patients cachectiques, possiblement sous l'action de NF- κ B, par rapport à des patients non-cachectiques (Vogiatzis et al. 2010). Cet effet est retrouvé chez les patients au cours des exacerbations (Crul et al. 2007; Gayan-Ramirez et Decramer 2013). De même, l'expression de la myogénine, un facteur de transcription myogénique impliqué dans la régénération musculaire, apparaît elle aussi diminuée chez les patients BPCO sévères (Fermoselle et al. 2012). Cette capacité de régénération musculaire diminuée pourrait contribuer à un plus faible anabolisme.

La BPCO, et principalement l'état cachectique qui peut lui être associé, se caractérise donc par un déséquilibre de la balance protéique qui provoque une atrophie musculaire. Différents stimuli peuvent activer ou inhiber sur ces voies de protéolyse et protéosynthèse,

parmi lesquelles l'inactivité, l'inflammation, le déficit nutritionnel, l'hypoxie, le stress oxydant, les déséquilibres hormonaux... que nous détaillerons dans les prochaines parties.

2.4.1.3 Conséquences de l'atrophie dans la BPCO

Cette perte de masse n'est pas sans conséquence. Évaluée au niveau du quadriceps par la mesure de la surface de section musculaire à mi-cuisse par CT scan, elle ressort comme un puissant facteur prédictif de la mortalité (Marquis et al. 2002) (figure 11).

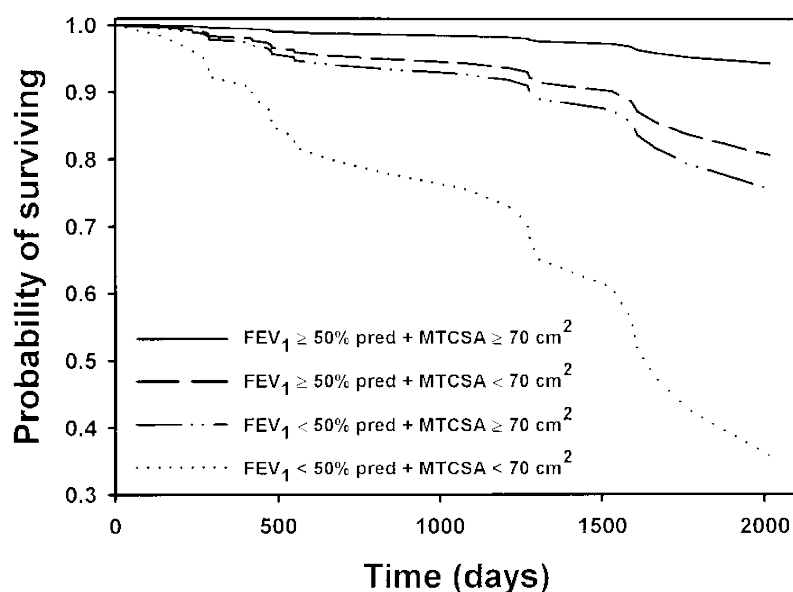


Figure 11:

Courbe de survie des patients en fonction de leur obstruction bronchique et de leur surface de section du quadriceps à mi-cuisse (Marquis et al. 2002)

En outre, elle induit des conséquences fonctionnelles puisqu'elle est systématiquement associée à la diminution de tolérance à l'effort (Bernard et al. 1998), de mobilité (Roig et al. 2011) et de force (Bernard et al. 1998).

L'atrophie serait même directement responsable de la diminution de capacité de force. En effet, des études indiquent que la force développée rapportée à la surface de section musculaire est semblable entre des sujets sains et des patients BPCO (Bernard et al. 1998; Franssen et al. 2005; Rabinovich et al. 2007). De même, des résultats in vitro confirment que les propriétés contractiles des fibres chez le patient BPCO ne diffèrent pas de celles d'un sujet sain (Debigare et al. 2003). Ces résultats abondent dans le sens d'une absence de myopathie dans la BPCO, la capacité de production de force de la fibre étant directement dépendante de

sa surface de section. Ces constats peuvent cependant être nuancés du fait de l'existence de cas où la perte de force s'avère disproportionnée à la perte de masse musculaire, comme notamment lors des exacerbations (Spruit et al. 2003), où l'inflammation pourrait être alors à l'origine de la perte de force chez ces patients.

L'atteinte musculaire au cours de la BPCO n'est pas seulement quantitative, elle est aussi qualitative. Ces changements qualitatifs décrits dans les parties suivantes, ont un impact plus marqué sur l'altération de la capacité d'endurance.

2.4.2 Typologie musculaire

Dans le contexte de la BPCO, plusieurs auteurs montrent une diminution de plus de moitié de la proportion de fibres de type I dans les muscles des membres inférieurs des patients (Whittom et al. 1998 ; Gosker et al. 2002; Gosker et al. 2007) et une augmentation parallèle de la proportion des fibres de type II (Satta et al. 1997; Richardson et al. 2004) (figure 12).

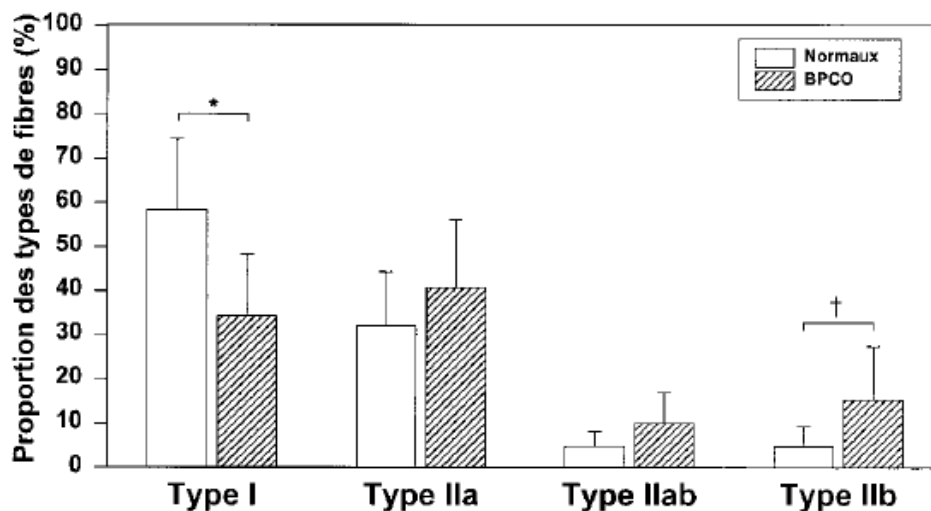


Figure 12:

Proportion des différents types de fibres du muscle vaste latéral chez des sujets sains et chez des sujets atteints de BPCO. Les valeurs sont des moyennes \pm DS. * $p < 0,0005$, † $p < 0,015$. D'après (Whittom et al. 1998).

Maltais montre également en 1999 sur le vaste latéral de patients BPCO une diminution de la proportion des isoformes de chaînes lourdes de myosine de type I avec une

augmentation concomitante de la proportion des isoformes de type IIa, et ceci sans variation du pourcentage de l'isoforme de type IIx (Maltais et al. 1999). Gosker confirme ce résultat en 2002 et ajoute que la proportion de fibres présentant plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine est aussi modifiée avec un accroissement de la proportion de fibres hybrides I/IIa et IIa/IIx (Gosker et al. 2002).

On observe donc dans le muscle quadriceps du BPCO un glissement d'un profil de contraction plutôt lent vers un profil contractile plus rapide. Ce changement de typologie ne peut être imputé au vieillissement puisque qu'à l'inverse de ce qui est observé dans la BPCO, le vieillissement normal du muscle se caractérise plutôt par une diminution de la proportion des fibres II et un maintien des fibres I (von Haehling et al. 2012). En revanche, ce type de redistribution de la typologie a été décrit dans les situations d'hypoxie (Itoh et al. 1990).

2.4.3 Capillarisation

L'étude de la capillarisation des fibres musculaires dans le contexte de la BPCO montre une réduction du rapport capillaire/fibre musculaire dans le quadriceps de patients atteints de BPCO, suggérant effectivement une altération d'approvisionnement en oxygène (Whittom et al. 1998). Cependant, lorsque les auteurs rapportent la capillarisation à la surface de section des fibres plutôt qu'à leur nombre, il n'y a alors pas de différence entre les témoins appariés et les patients BPCO, notamment du fait de l'atrophie des fibres. Les auteurs indiquent cependant dans cette même étude qu'une diminution des contacts entre les capillaires et les fibres de type I et IIa est en revanche bien observée. Eliason et al, obtiennent le même type de résultats et ajoutent que ces modifications surviennent à partir du stade GOLD II (Eliason et al. 2010). Afin de compléter leur étude, ils calculent également l'indice du périmètre d'échange capillaire-fibre (l'interface fibre musculaire-capillaire) qui est reconnu comme un marqueur efficace pour rendre compte des modifications du réseau capillaire chez l'humain. Ils observent alors une baisse de cet indice pour les fibres de type I du muscle tibial antérieur, qui apparaît corrélée au degré d'obstruction bronchique et à la distance parcourue au test de marche de 6 minutes. Saey et al, montrent quant à eux qu'il existe un lien significatif entre la fatigabilité du muscle quadriceps et le ratio contact capillaire/fibre pour les fibres de type I et IIa (Saey et al. 2005). Cette baisse de la capillarisation du muscle du BPCO pourrait s'expliquer notamment par une diminution de l'expression de facteurs angiogéniques. Ainsi, une surexpression du facteur suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (pVHL) a été mise en évidence dans le muscle tibial antérieur de

patients BPCO (Jatta et al. 2009). Or, cette protéine limite l'accumulation du facteur de transcription HIF (Hypoxia-Inducible Factor), et donc la transcription de gènes HIF-dépendants comme le facteur angiogénique VEGF (vascular endothelial growth factor) (Kondo et Kaelin 2001). Barreiro et al montrent d'ailleurs une réduction du taux de protéines VEGF dans le quadriceps des patients BPCO (Barreiro et al. 2008) comparativement à des sujets contrôles.

Les modifications de capillarisation observées dans la BPCO pourraient donc être causées par la répression de facteurs angiogéniques, comme VEGF, par des inhibiteurs tels que pVHL.

2.4.4 Métabolisme musculaire

Les modifications de capacité d'endurance observées dans la BPCO pourraient avoir pour origine des altérations du métabolisme musculaire.

2.4.4.1 Statut énergétique musculaire dans la BPCO

La mesure des composés phosphates énergétiques par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique non invasive qui peut renseigner sur le statut énergétique d'un organe et permettre de révéler un éventuel déséquilibre énergétique. Ainsi, des concentrations élevées d'ATP, de créatine phosphate (PCr), et de NADH reflètent un état hautement énergétique, supposant le renouvellement efficace de ces métabolites. A l'inverse, des concentrations élevées d'ADP, d'AMP (produit de la réaction $ADP + ADP \rightleftharpoons AMP + ATP$), de phosphate inorganique (Pi), de créatine (Cr) et de NAD^+ sont le signe d'un état faiblement énergétique où les composés hautement énergétiques ne sont plus renouvelés à un rythme suffisant. Les besoins en énergie dépassent les capacités de production d'ATP ou PCr. En cas d'altération du métabolisme oxydatif, la perte d'énergie pourra être compensée par glycolyse anaérobie qui est un processus néanmoins moins rentable et producteur d'acide lactique, potentiellement inducteur d'une baisse de pH dans le muscle.

A l'exercice, les muscles des membres inférieurs et supérieurs de patients insuffisants respiratoires présentent un rapport PCr/Pi et un pH abaissé pour une même intensité absolue de travail que les sujets sains contrôles (Tada et al. 1992; Wuyam et al. 1992; Thompson et al. 1993; Sala et al. 1999). Ces auteurs rapportent également qu'au cours d'un exercice, le pH et le rapport PCr/Pi décroissent plus rapidement (Tada et al. 1992; Wuyam et al. 1992; Thompson et al. 1993), avec une resynthèse de PCr lors de la récupération plus lente chez les

patients BPCO par rapport aux contrôles (Tada et al. 1992; Wuyam et al. 1992; Sala et al. 1999). L'acidose lactique, qui débute précocement chez le patient BPCO et contribue fortement à l'intolérance à l'exercice, serait principalement due à une détérioration du métabolisme oxydatif plutôt qu'à un moindre apport en oxygène aux muscles (Maltais et al. 1998).

Ces résultats obtenus en situation d'exercice vont donc dans le sens d'un état énergétique plus faible chez le patient BPCO qui serait causé par un métabolisme oxydatif altéré et insuffisamment suppléé par le métabolisme glycolytique anaérobie.

Au repos, alors que les précédentes études ne rapportaient pas de différence entre les sujets sains et insuffisants respiratoires, Pouw et al, (Pouw et al. 1998) montrent dans le muscle tibial antérieur du patient BPCO que les rapports PCr/Cr et ATP/ADP sont diminués par rapport à ceux de sujets sains du même âge. De plus, dans cette étude, de l'inosine monophosphate (IMP) est également détectée à des niveaux plus élevés chez les patients BPCO que chez les sujets sains. Or ce composé est un produit de la désamination de l'AMP, supposé refléter un déséquilibre entre l'utilisation d'ATP et sa resynthèse.

Il semblerait donc qu'au repos, alors que la demande énergétique n'est pas spécifiquement augmentée, il existe également un déséquilibre énergétique.

Ces mesures par RMN permettent de mettre en évidence des modifications de l'équilibre énergétique. Cependant, elles ne renseignent pas sur les causes des altérations et les mécanismes impliqués. Les résultats obtenus doivent donc être mis en regard avec d'autres mesures du métabolisme comme par exemple des activités enzymatiques et des mesures du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

2.4.4.2 Activités des enzymes du métabolisme glycolytique

Le métabolisme glycolytique, étudié à travers les activités d'enzymes qui le constituent, n'apparaît pas clairement impacté par la BPCO. Certains auteurs montrent une absence d'augmentation d'activité d'enzymes telles que la lactate déshydrogénase (LDH), l'hexokinase (HEX) et la phosphofructokinase (PFK) (Maltais et al. 1996), alors qu'une autre étude met en évidence une augmentation de l'activité de la PFK et une tendance à la hausse de l'activité de la LDH (Jakobsson et al. 1995). Enfin, Green et al observent une augmentation de l'activité de l'HEX sans augmentation de la LDH, de la PFK ni de la pyruvate kinase (PK) (Green et al. 2008). Ces résultats contradictoires ne permettent pas de conclure quant à l'activité des enzymes glycolytiques dans le contexte de la BPCO.

Il semble donc que les modifications métaboliques probablement impliquées dans la BPCO sont à rechercher sur le versant oxydatif du métabolisme.

2.4.4.3 La mitochondrie

- Généralités :

La mitochondrie est un organite cellulaire dont le rôle dans la production d'ATP est prépondérant. Elle est d'ailleurs considérée de manière imagée comme la centrale énergétique de la cellule. Présentes dans la majorité des cellules eucaryotes, les mitochondries furent observées pour la première fois dans le muscle par Kolliker en 1857. Elles se situent dans le cytosol, le plus souvent aux abords des zones de haute consommation énergétique et à proximité du noyau. Récemment l'hypothèse a été avancée que l'ensemble des mitochondries serait organisé en un réseau dont la morphologie serait régulée de manière dynamique par des phénomènes de fusion et de fission, à l'origine de changements de taille et de forme des organites, pour s'adapter aux variations de demandes énergétiques (Youle et van der Bliek 2012).

La structure des mitochondries se compose invariablement de 2 membranes lipidiques : l'une interne, qui délimite un espace intérieur appelé matrice, et l'autre externe qui sépare le milieu extra-mitochondrial de l'espace intermembranaire (figure 13).

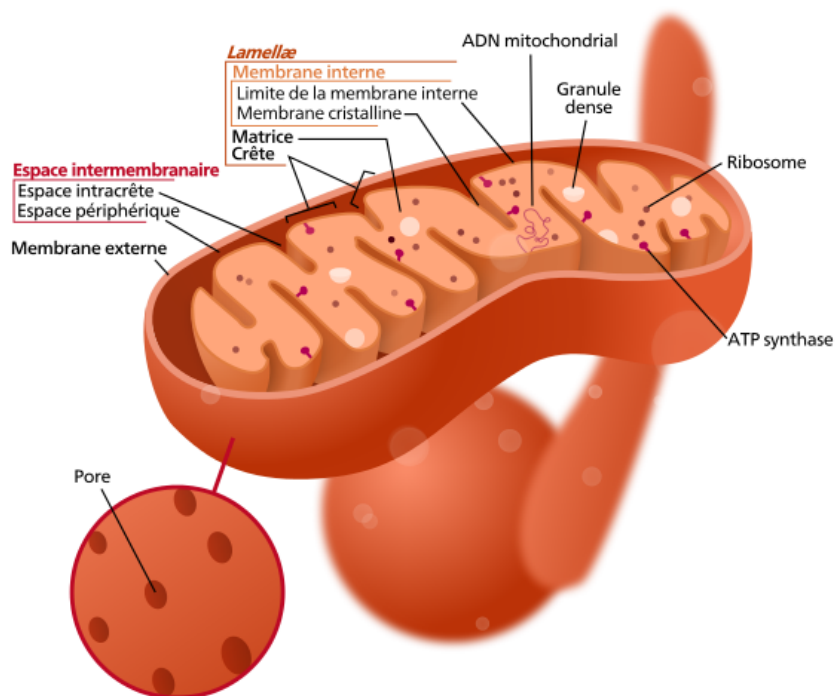


Figure 13:
Représentation schématique d'une mitochondrie et de certains de ses composants.

La membrane externe est une bicouche phospholipidique qui permet l'échange libre d'un grand nombre de composés avec le compartiment cytosolique. La présence de protéines en quantités abondantes de types porines ou VDAC (Voltage-Dependant Anion Channel) lui confère une perméabilité élevée pour les molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (Ha et al. 1993). Elle contient aussi des translocases ou transporteurs protéiques, impliqués dans l'import en provenance du cytosol des protéines les plus grosses.

L'espace intermembranaire possède le même contenu en petites molécules que le cytosol puisqu'elles y diffusent librement. En revanche, le contenu en protéines plus grosses est différent.

La membrane interne forme de nombreuses invaginations, nommées crêtes mitochondriales, qui s'avancent dans la matrice, et augmentent ainsi la surface d'échange entre l'espace intermembranaire et la matrice. La composition lipidique de la membrane interne est particulière : elle contient une majorité de phosphatidylcholine et de cardiolipine qui lui confèrent une imperméabilité aux ions. Elle ne permet la diffusion libre que de l'oxygène, de l'eau et du dioxyde de carbone mais elle contient elle aussi des translocases impliquées dans l'import des protéines.

C'est au niveau des crêtes mitochondriales de la membrane interne que se situent les chaînes de transport des électrons, aussi appelées chaînes respiratoires, ainsi que l'ATP synthase, où est phosphorylé l'ADP, et de nombreux transporteurs spécifiques qui assurent le passage des éléments nécessaires à la production d'ATP.

La matrice mitochondriale contient l'ADN mitochondrial (ADNmt). Chez l'homme, il est long de 16 kilobases et code pour 13 protéines, 22 gènes ARNt et 2 ARNr. Cependant, la majorité des protéines mitochondriales demeure toutefois codée dans le génome nucléaire (Anderson et coll, 1981).

La matrice mitochondriale est également le siège du cycle de Krebs et de la β -oxydation (Kennedy et Lehninger 1950), ensembles de réactions enzymatiques au cours desquelles l'acétyl-CoA, issu de la dégradation du pyruvate ou des acides gras, va être lui-même dégradé en produisant du CO₂, de l'ATP et des équivalents réduits NADH et FADH₂. Ces équivalents réduits vont ensuite fournir des électrons à la chaîne de transport des électrons (figure 14) située sur la membrane interne mitochondriale.

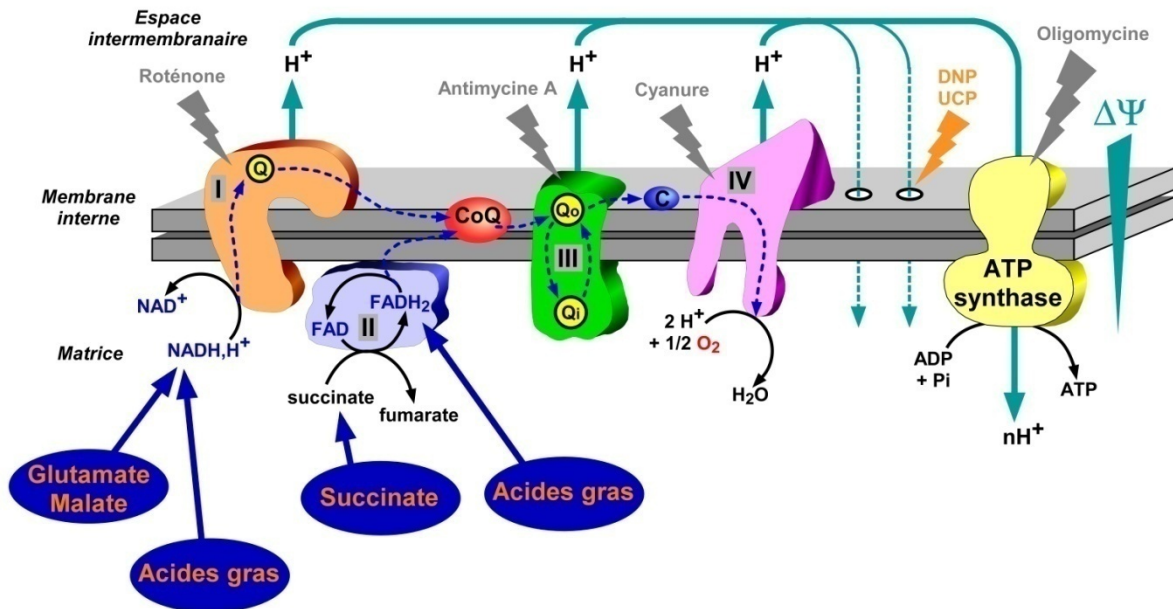


Figure 14:
Représentation schématique de la chaîne respiratoire, ou chaîne de transport des électrons, et de l'ATP-synthase (voir le texte pour explication).

Elle contient 4 complexes enzymatiques qui sont tour à tour accepteurs et donneurs d'électrons. Lors du transfert d'électron d'un complexe à l'autre de l'énergie est libérée et permet le transport vectoriel de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV, comme le montre la figure 14. Lorsque les électrons arrivent finalement au complexe IV, ils sont acceptés dans la matrice par l'oxygène moléculaire pour former avec lui de l' H_2O dans la matrice. Le gradient de pH, créé par l'accumulation des protons passés de la matrice vers le compartiment intermembranaire, représente une force protomotrice ($\Delta\psi$) dirigée vers la matrice, et qui active un 5^{ème} complexe enzymatique appelé ATP-synthase (figure 14). Ce complexe fournit un moyen de transport pour les protons qui retournent vers la matrice. Leur passage par cette structure libère une quantité d'énergie utilisable par l'enzyme pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de Pi présents dans la matrice. La respiration mitochondriale est activée par l'apport d'équivalents réduits à la chaîne respiratoire et par des concentrations élevées d'ADP. A l'inverse, des concentrations élevées d'ATP l'inhibent.

2.4.4.4 Densité et biogénèse mitochondriale dans la BPCO

Etant donné le rôle central de la mitochondrie dans le métabolisme oxydatif, elle apparaît comme un objet d'étude primordial.

Une approche dans l'étude de la mitochondrie consiste à évaluer sa densité. Une altération du métabolisme oxydatif pourrait en effet provenir d'une plus faible densité mitochondriale. Pour cela, il est possible de s'appuyer sur des marqueurs parmi lesquels l'un des plus utilisés est la citrate synthase (CS). La CS est une enzyme matricielle intervenant dans le cycle de Krebs et dont l'activité est directement dépendante de sa quantité. Son efficacité en tant que marqueur de la densité mitochondriale a été réaffirmée récemment (Larsen et al. 2012).

Chez les patients BPCO, l'activité de cette enzyme est fréquemment rapportée comme diminuée dans le quadriceps (Maltais et al. 1996; Maltais et al. 2000; Allaire et al. 2004; Picard et al. 2008; Puente-Maestu et al. 2009), suggérant une baisse de la densité mitochondriale. Cette diminution a été confirmée par Gosker et al, en utilisant la microscopie électronique. Ils montrent une diminution du nombre de mitochondries et de leur surface dans le muscle vaste latéral de patients BPCO (Gosker et al. 2007). Or il semble qu'il existe une corrélation entre l'activité de la CS et la fatigabilité du muscle (Allaire et al. 2004), ainsi qu'entre l'activité de la CS et la capacité d'exercice maximale, et ceci indépendamment de l'atteinte pulmonaire des patients (Maltais et al. 2000). Cette réduction d'activité de la CS ne touche toutefois pas tous les muscles locomoteurs des patients BPCO : elle n'est retrouvée ni dans le muscle tibial antérieur (Pouw et al. 2000), malgré que la diminution du nombre de mitochondries et de leur taille soit visualisée par microscopie (Gosker et al. 2007), ni dans le deltoïde (Gea et al. 2001).

La biogénèse mitochondriale est le processus par lequel se produit la formation de nouvelles mitochondries. La biogénèse mitochondriale repose sur la division d'une mitochondrie en deux mitochondries. Pour cela, la mitochondrie initiale augmente la quantité des phospholipides qui forment ses membranes, ainsi que des protéines mitochondriales matricielles et membranaires. Elle se scinde ensuite en deux parties qui deviennent deux nouvelles mitochondries autonomes. La biogénèse mitochondriale permet le renouvellement des mitochondries. Si le processus de synthèse des mitochondries est altéré et devient insuffisant par rapport à la dégradation des mitochondries, alors cela pourra avoir comme conséquence une diminution de la densité mitochondriale. La biogénèse mitochondriale est régulée par des facteurs de transcription.

Le peroxysome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC1- α) est l'un des facteurs de transcription et coactivateurs de facteurs de transcription qui jouent un rôle clé dans la régulation de la biogénèse mitochondriale (Wu et al. 1999) (figure 15). Il est notamment activé par l'exercice et participerait à la mise en place des adaptations induites par un entraînement en endurance (Baar et al. 2002; Pilegaard et al. 2003; Norrbom et al. 2004) conduisant à l'amélioration des capacités oxydatives. Dans le contexte de la BPCO, le contenu en ARNm de PGC1- α dans le muscle apparaît diminué (Remels et al. 2007; Puente-Maestu et al. 2011). Chez les patients cachectiques, cette diminution de transcrite de PGC1- α s'accompagne de la baisse d'expression en ARNm du mitochondrial transcription factor A (Tfam), un facteur de transcription en aval de PGC1- α et lui aussi impliqué dans la biogénèse mitochondriale (Remels et al. 2007).

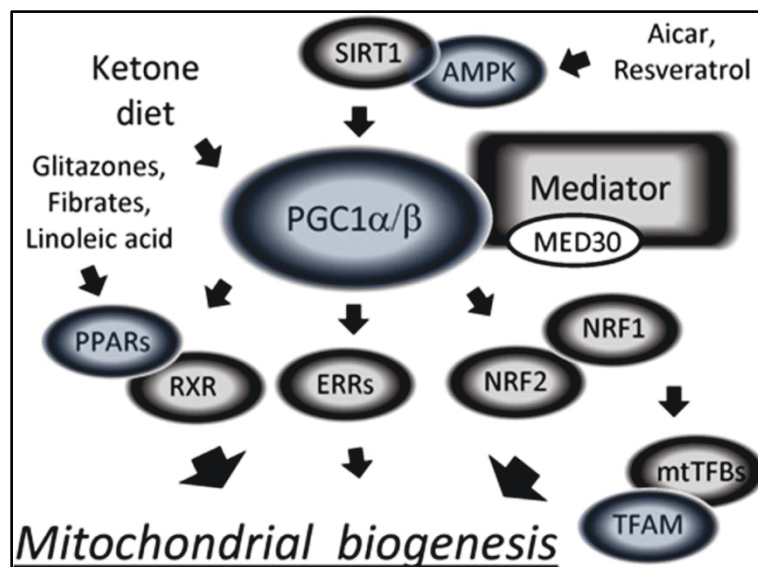


Figure 15: Facteurs de transcription impliqués dans la biogénèse mitochondriale et leurs activateurs. Adapté de (Benit et Rustin 2012)

La famille des récepteurs activés par le proliférateur du peroxysome (PPAR pour Peroxysome proliferator activated receptors) semble également touchée dans la BPCO. Ces protéines sont des récepteurs nucléaires qui lient les lipides et agissent comme facteurs de transcription. Ils sont impliqués dans le métabolisme oxydatif et la lipolyse. Il en existe plusieurs isoformes : PPAR α , PPAR γ et PPAR δ , toutes exprimées dans le muscle avec PPAR δ comme forme prédominante. Ces facteurs de transcription activent PGC1- α (Tanaka et al. 2003) et certains des gènes codant pour des protéines mitochondriales (Dressel et al. 2003), ce qui laisse penser qu'ils seraient eux aussi impliqués dans la biogénèse mitochondriale (figure 15). Remels et al, montrent une diminution du contenu en ARNm de

PPAR α chez les patients cachectiques par rapport aux non-cachectiques et du contenu en protéines de PPAR δ chez les patients BPCO par rapport à des sujets contrôles (Remels et al. 2007). Ces protéines favorisant le métabolisme oxydatif, cette diminution de leur expression est concordante avec la perte d'efficacité du métabolisme oxydatif.

La chute de densité mitochondriale observée dans certains muscles de patients BPCO apparaît au moins partiellement liée à une baisse d'expression de facteurs et coactivateurs de facteurs de transcription impliqués dans la biogénèse mitochondriale.

2.4.4.5 Activités des enzymes du métabolisme oxydatif

Au sein des mitochondries, l'activité des enzymes peut aussi être modifiée et avoir des conséquences sur le métabolisme oxydatif.

De nombreuses études, portant essentiellement sur les muscles des membres inférieurs de patients BPCO, rapportent une diminution de l'activité d'enzymes du cycle de Krebs comme la citrate synthase (CS) et la succinate déshydrogénase (SDH), mais aussi de l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HADH), impliquée dans la β -oxydation (Jakobsson et al. 1995; Maltais et al. 1996; Maltais et al. 2000; Allaire et al. 2004; Picard et al. 2008; Puente-Maestu et al. 2009). La réduction de l'activité de ces enzymes oxydatives suggère un trouble du métabolisme oxydatif dans les muscles des membres inférieurs des patients BPCO. Toutefois, ces résultats obtenus dans le quadriceps ne sont pas retrouvés de manière aussi nette dans d'autres muscles comme le tibial antérieur, dont les activités des enzymes du métabolisme oxydatif n'apparaissent pas modifiées (Pouw et al. 2000). Cette divergence pourrait s'expliquer par une sensibilité aux stimuli différente d'un muscle à l'autre, notamment en fonction de leur typologie. Les muscles glycolytiques sont ainsi plus sensibles à l'ischémie-reperfusion et présenteront des dégradations de l'activité mitochondriale plus marquées que les muscles oxydatifs (Meyer et al. 2013). Le tibial antérieur est un muscle dont les fibres sont majoritairement oxydatives et il pourrait donc être moins impacté par la BPCO que le quadriceps dont la répartition fibres oxydatives/fibres glycolytiques est plus homogène.

Alors que les activités des enzymes oxydatives le plus souvent étudiées sont réduites, la mesure de l'activité de la cytochrome oxydase (COX) dans la BPCO est plus contradictoire. L'activité de la COX, le dernier complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale, apparaît augmentée dans le muscle de patients BPCO selon certaines études (Sauleda et al. 1998; Puente-Maestu et al. 2009), mais d'autres auteurs ne confirment pas ce résultat (Green et al. 2008). Cette augmentation peut paraître paradoxale au premier abord, cependant, à l'inverse de la CS, de la SDH et de la HADH, qui sont des enzymes du cycle de

Krebs et de la β -oxydation, la COX est une enzyme de la chaîne respiratoire qui est en lien direct avec l'oxygène tissulaire et son utilisation. Les auteurs de cette étude montrent une corrélation entre l'activité de la COX et le degré d'hypoxémie (Sauleda et al. 1998). On peut donc imaginer que l'activité supérieure de la COX serait un moyen de pallier une diminution de disponibilité en oxygène par une meilleure efficacité dans l'utilisation de l'oxygène présent par la chaîne respiratoire (Gosker et al. 2000).

Les différences de variations des activités des enzymes oxydatives vont dans le sens d'un phénomène de « découplage » entre l'oxydation phosphorylante et le cycle de Krebs et la β -oxydation. Puente-Maestu et al, montrent d'ailleurs une corrélation inverse entre l'activation de la chaîne respiratoire et la PaO₂, alors même que Sauleda et al, voyaient une corrélation entre l'hypoxémie et l'activité de la COX (Sauleda et al. 1998; Puente-Maestu et al. 2009). Ces deux classes d'enzymes semblent donc bien répondre de manière différente au contexte induit par la BPCO.

Il ressort d'une manière générale que le métabolisme oxydatif est détérioré chez les patients BPCO alors que le métabolisme glycolytique serait préservé voire même amélioré. Ceci concorde avec ce qui est observé en termes de typologie des fibres musculaires où l'on remarque un glissement vers une proportion supérieure de fibres préférentiellement glycolytiques par rapport aux fibres plus oxydatives.

L'étude des activités enzymatiques, généralement indépendamment les unes des autres et dans des conditions très artificielles, ne permet pas de rendre compte du fonctionnement de la mitochondrie. Elle doit être complétée par des mesures de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, soit sur mitochondries isolées, soit sur fibres perméabilisées permettant de maintenir la mitochondrie intacte et dans un environnement relativement préservé.

2.4.4.6 Respiration mitochondriale dans la BPCO :

La mesure de la respiration mitochondriale permet de rendre compte de l'activité de la mitochondrie et plus spécifiquement de la chaîne respiratoire. Pour l'étudier, nous disposons de plusieurs outils. Elle peut être évaluée en état basal, c'est-à-dire non-phosphorylant, qui correspond à la condition appelée état 2 où les mitochondries ne sont en présence que de substrats de la chaîne respiratoire. L'état 4 est également un état non-phosphorylant similaire au 2, mais l'absence de phosphorylation provient d'une inhibition de l'ATP-synthase alors que dans l'état 2 c'était une absence d'ADP. La respiration en état 3 correspond à la

respiration en état phosphorylant, c'est-à-dire en présence d'ADP en concentration saturante. L'utilisation de différents substrats et inhibiteurs permet de différencier l'activité des complexes (figure 14).

Dans le muscle de patients BPCO, plusieurs études montrent une réduction de la respiration en état 3, c'est-à-dire en condition phosphorylante, que ce soit avec des substrats alimentant la chaîne respiratoire par le complexe I (Picard et al. 2008) ou par le complexe II (Rabinovich et al. 2007; Picard et al. 2008; Puente-Maestu et al. 2009; Naimi et al. 2011). La mitochondrie ne semble donc pas capable de répondre de manière adéquate à une stimulation accrue de sa respiration. En outre, une diminution du ratio de contrôle respiratoire (RCR) obtenu par le calcul de la vitesse de consommation de l'oxygène en condition phosphorylante (état 3) rapportée à la vitesse de consommation de l'oxygène en condition basale (état 2 ou 4) est généralement observée (Rabinovich et al. 2007; Puente-Maestu et al. 2009; Naimi et al. 2011). Le RCR permet de rendre compte de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante. Lorsqu'il est diminué, cela peut être le signe d'un découplage entre le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons et l'ATP-synthase, l'utilisation de l'oxygène étant alors moins bien couplée à la production d'ATP. Mais ce découplage est-il bénéfique ou délétère pour le muscle des patients ? Cette question reste en suspens car un faible découplage mitochondrial qui permet le retour de protons vers la matrice sans formation d'ATP permettrait d'allonger l'espérance de vie et de limiter la perte de capacité oxydative du muscle en prévenant la formation de ROS (Dietrich et Horvath 2010; Duteil et al. 2010).

La majorité de ces résultats a été obtenue sur mitochondries isolées, c'est-à-dire lorsqu'elles sont hors de leur environnement, ce qui ne permet pas de prendre en compte d'éventuels effets du milieu dans lequel elles évoluent et qui pourraient modifier leur activité. De plus, l'isolation des mitochondries peut mener à des dommages qui modifieront les mesures ultérieures (Picard et al. 2011) Pour étudier la mitochondrie dans son environnement, il est possible de mesurer sa consommation d'oxygène sur fibres perméabilisées. Pour cela, les fibres musculaires sont finement et délicatement dilacérées avant d'être perméabilisées par de la saponine, un détergent qui agit préférentiellement sur le cholestérol dont les membranes du sarcoplasme sont riches comparativement aux membranes mitochondriales (Kuznetsov et al. 2008). Ceci permet donc de conserver la mitochondrie dans son environnement, avec ses membranes intactes, tout en autorisant l'apport des substrats et inhibiteurs voulus dans le sarcoplasme. Seuls Picard et Naimi (Picard et al. 2008; Naimi et al. 2011) ont utilisé cette technique pour l'étude de la fonction mitochondriale de muscles de patient BPCO. Ils observent eux aussi une diminution de la respiration mitochondriale en état 3, ce qui concorde

avec les résultats sur mitochondries isolées (Rabinovich et al. 2007; Picard et al. 2008; Puente-Maestu et al. 2009; Naimi et al. 2011). Avec cette technique, la consommation d'oxygène est habituellement rapportée au poids sec des fibres. Toutefois, ces auteurs proposent un nouveau type de normalisation qui ne se réfère plus au poids sec des fibres, mais à la quantité de mitochondries qu'elles contiennent évaluée par la mesure de l'activité de la citrate synthase. La baisse de consommation d'oxygène par la mitochondrie en état 3 n'est alors plus visible une fois normalisée par unité de citrate synthase. La fonction mitochondriale qualitativement touchée dans le contexte de la BPCO résulterait donc principalement d'une baisse de la densité mitochondriale, mais pas uniquement puisque le RCR demeure malgré tout plus faible, même avec cette nouvelle normalisation. Dans l'étude de Picard et al, aucune baisse du RCR n'est reportée. Cependant cette étude ne porte que sur des patients dont la masse maigre n'est pas significativement réduite par rapport aux sujets contrôles. Il serait intéressant de l'étendre à une population de patients plus sévères et souffrant de cachexie avec perte de masse maigre. D'autant que selon l'IMC des patients, l'activité mitochondriale n'apparaît pas impactée de la même manière, ceux avec l'IMC le plus faible voyant leurs mitochondries plus touchées (Rabinovich et al. 2007).

2.4.4.7 Mitochondries productrices et cibles des ROS dans la BPCO

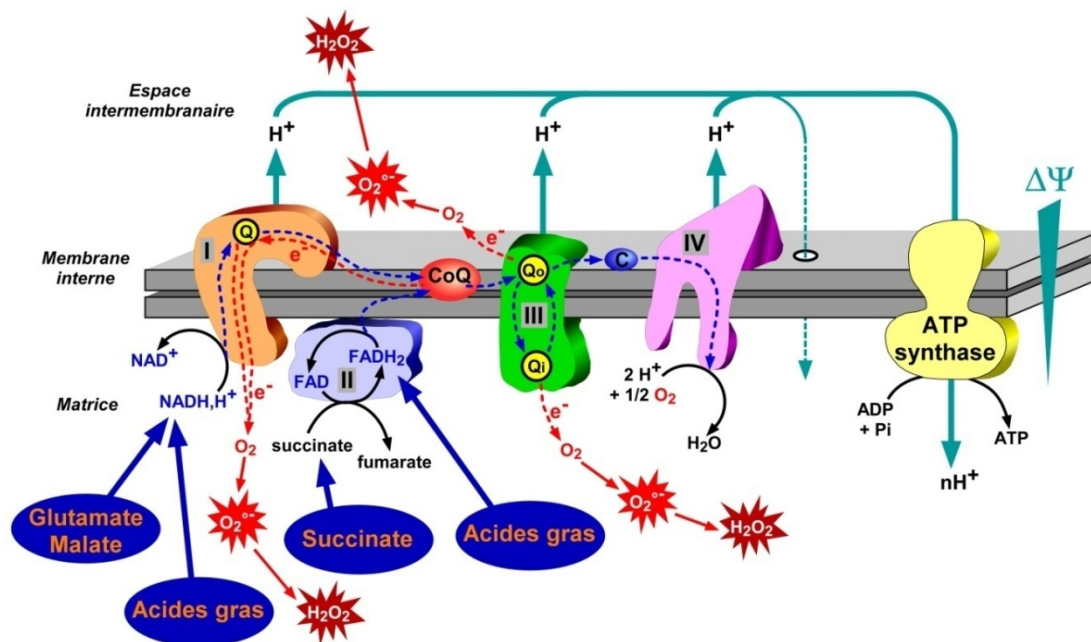


Figure 16: La production mitochondriale au niveau de la chaîne de transport des électrons (voir le texte pour explication)

Du fait de leur métabolisme aérobie normal, les mitochondries sont une source majeure de ROS, produits au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (figure 16).

En effet, la chaîne de transport des électrons est reconnue comme l'un des sites principaux de génération d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de radical hydroxyl (OH^{\cdot}). Sous certaines conditions comme l'hypoxie et l'exercice, une quantité plus ou moins élevée d'électrons s'échappe de la chaîne respiratoire (Boveris et Chance 1973; Brand et al. 2004) au niveau des complexes I et III et se lie à l'oxygène présent dans la matrice ou dans l'espace intermembranaire pour former de l' $O_2^{\cdot-}$. Celui-ci possède une demi-vie très courte puisqu'il est presque immédiatement dismuté par la SOD mitochondriale (Mn-SOD ou SOD2) en H_2O_2 (Boveris et Cadenas 1975). Ensuite, la catalase, qui est une enzyme antioxydante, catalyse la réaction convertissant l' H_2O_2 en H_2O et O_2 inoffensifs.

Les mitochondries musculaires de patients BPCO génèrent plus de ROS que celles de sujets contrôles. Ainsi, une production accrue d'espèces réactives en général (Puente-Maestu et al. 2009) et de peroxyde d'hydrogène en particulier (Picard et al. 2008) est observée dans le muscle vaste latéral de patients BPCO, sur mitochondries isolées mais aussi sur fibres perméabilisées, c'est-à-dire sur mitochondries *in situ*. La production de ROS apparaît proportionnelle à l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire, attestant de leur implication dans la génération d'espèces oxydantes (Puente-Maestu et al. 2009).

La mitochondrie participerait donc dans le muscle à la mise en place de l'état de stress oxydant habituellement rapporté chez les patients BPCO (Allaire et al. 2002; Couillard et al. 2003; Koechlin et al. 2004; Picard et al. 2008; Fermoselle et al. 2012).

Ce stress oxydant est tout de même limité au niveau de la mitochondrie par le système antioxydant qui se trouve activé et même renforcé dans le contexte de la BPCO puisque la concentration en SOD2 est à un niveau supérieur chez les patients BPCO par rapport aux sujets contrôles (Barreiro et al. 2003; Puente-Maestu et al. 2009; Puente-Maestu et al. 2011; Fermoselle et al. 2012). En revanche, le contenu en catalase et en glutathion réduit, un autre composé antioxydant, n'est pas différent de celui de sujets contrôles sains (Rabinovich et al. 2001; Barreiro et al. 2003; Rabinovich et al. 2006; Rabinovich et al. 2007; Fermoselle et al. 2012). Il semble donc qu'il y ait une adaptation du système antioxydant à la hausse de génération de ROS dans la BPCO, mais cette adaptation pourrait être insuffisante car des dommages liés aux ROS sont malgré tout observés. De même, le système antioxydant est en général mieux armé dans les fibres oxydatives que dans les fibres glycolytiques rapides. Or la

transition vers des fibres plus glycolytiques dans la BPCO a certainement des conséquences sur le statut antioxydant d'un muscle entier.

2.4.4.8 PTP et apoptose dans la BPCO

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) correspond à un processus d'autodestruction de la cellule. L'apoptose fait partie du fonctionnement physiologique de l'organisme et permet d'éliminer toute cellule défailante. Elle est activée par deux voies distinctes, l'une dite extrinsèque et mettant en jeu des récepteurs cellulaires, et l'autre dite intrinsèque et dont l'acteur central est la mitochondrie. L'un des processus clé de la mort cellulaire liée à la mitochondrie est la transition de perméabilité qui peut se définir comme une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne pour toutes les molécules de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa. S'il est prolongé, ce phénomène se traduit par un effondrement de la force protomotrice et des principaux gradients ioniques, un découplage de la phosphorylation oxydative, un gonflement de grande amplitude de la matrice mitochondriale pouvant aller jusqu'à briser la membrane externe. Ceci conduirait à un rejet dans le cytosol de composés contenus dans l'espace intermembranaire, dont des facteurs pro-apoptotiques, conférant à la mitochondrie un rôle important dans l'initiation de la mort cellulaire. Ce phénomène de transition de perméabilité est régulé par l'ouverture d'un canal protéique à haute conductance, le Pore de Transition de Perméabilité (PTP) (Szabo et Zoratti 1992; Petronilli et al. 1998). Celui-ci se situe sur la membrane interne de la mitochondrie et relie l'espace matriciel au milieu extracellulaire. La structure exacte de ce canal est à ce jour incomplètement caractérisée. Toutefois, il existe un certain consensus suggérant qu'il impliquerait au moins la cyclophiline-D (Cyp-D) située dans la matrice, l'adénine nucléotide translocase (ANT) sur la membrane interne et la porine VDAC (figure 17).

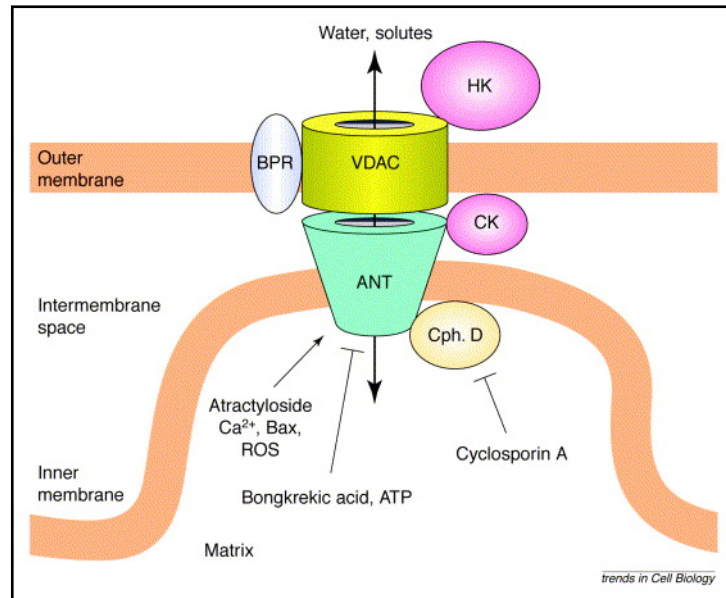


Figure 17:

Les composants possibles du pore de transition de perméabilité (PTP) et différents inducteurs et inhibiteurs de l'ouverture du PTP. La CphD (Cyclophiline D), l'ANT (adénine nucléotide translocase), le VDAC (voltage-dépendent anion channel), l'HK (hexokinase), la CK (créatine kinase) et le BPR (benzodiazépine peripheral receptor). D'après (Desagher et Martinou 2000)

Hunter et Haworth ont étudié de manière très complète la régulation de ce phénomène de transition de perméabilité par l'utilisation de différents composés physiologiques (Hunter et al. 1976; Haworth et Hunter 1979; Hunter et Haworth 1979; Hunter et Haworth 1979). Ils ont ainsi mis en évidence que le Ca^{2+} était un inducteur suffisant de la transition de perméabilité, les autres composés étant soit seulement potentialisateurs de l'effet du Ca^{2+} (Pi, acides gras libres, oxydation du NADH, ROS), soit seulement inhibiteurs (H^+ , magnésium, strontium, ADP, réduction du NAD). Il apparaît également que ce phénomène et ses différents inducteurs et inhibiteurs sont très tissu-dépendants.

Une suractivation des voies apoptotiques peut survenir dans certaines pathologies et mener à un catabolisme trop important qui pourrait être responsable en partie de l'atrophie musculaire (Allen et al. 1997) observée dans la BPCO.

La technique de TUNEL, qui repère les noyaux de cellules apoptotiques, indique qu'il existe une augmentation des phénomènes d'apoptose dans le muscle des patients, surtout si leur IMC est faible (Agusti et al. 2002; Gosker et al. 2003; Barreiro et al. 2011). Cependant, toute conclusion quant à l'implication de la mitochondrie dans l'induction de cette apoptose observée chez les patients BPCO reste aventureuse du fait de résultats contradictoires. En effet, d'une part une étude portant sur des mitochondries isolées de différents muscles, dont le vaste latéral, montre chez ces patients une ouverture plus rapide du PTP, ainsi qu'une

libération plus marquée de cytochrome c dans le cytosol, un composé rejeté de l'espace intermembranaire à l'ouverture du PTP. De plus, ces auteurs mettent en évidence une corrélation entre l'ouverture du PTP et l'IMC des patients (Puente-Maestu et al. 2009). D'autre part, Picard et al, qui ont étudié l'ouverture du PTP sur fibres perméabilisées, montrent une meilleure résistance à l'ouverture du PTP des mitochondries de patients BPCO (Picard et al. 2008). De nouvelles études de l'ouverture du PTP sur le muscle de patients BPCO sont donc nécessaires pour pouvoir conclure.

Ces différents résultats sur le fonctionnement mitochondrial dans le muscle de patients BPCO indiquent qu'il est modifié dans la BPCO. Mais encore peu d'études ont été menées, notamment sur fibres perméabilisées, et nous manquons donc d'informations sur l'impact de cette pathologie sur des paramètres comme l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP, l'implication de chacun des complexes dans le fonctionnement et la régulation de la mitochondrie par son environnement. Il apparaît donc nécessaire de poursuivre la caractérisation de la fonction mitochondriale dans la BPCO afin de mieux cerner les éventuelles dysfonctions et de déterminer des moyens de les limiter.

En résumé, la dysfonction musculaire dans la BPCO se manifeste par une diminution de la force et de l'endurance, ainsi que par une augmentation de la fatigabilité. Cette dysfonction proviendrait d'altérations du muscle à la fois quantitatives et qualitatives. Une atrophie est ainsi observée, qui s'accompagne de modifications de la typologie musculaire et de la capillarisation des fibres musculaires. Le métabolisme musculaire est lui aussi affecté par la BPCO, tant au niveau des activités enzymatiques qu'au niveau du fonctionnement mitochondrial. Les changements observés vont dans le sens d'une transition des muscles vers un métabolisme plus glycolytique.

2.5 Conséquences de la dysfonction musculaire dans la BPCO

2.5.1 L'intolérance à l'effort

A l'origine, il était considéré que les facteurs pulmonaires étaient les principaux déterminants de l'intolérance à l'effort chez le patient BPCO (ATS 1999). L'incapacité à augmenter de manière adéquate la ventilation pour répondre aux besoins, du fait d'un travail

respiratoire plus élevé et de troubles de la perfusion-diffusion, résulte effectivement en des niveaux de PaO₂ faibles et de PaCO₂ élevés. Mais ces troubles ventilatoires ne peuvent expliquer à eux seuls l'intolérance à l'effort qui caractérise les patients BPCO et survient très précocement dans la mise en place de la pathologie. D'une part, les données concernant l'atteinte pulmonaire ne sont que très peu corrélées à la tolérance à l'effort des patients BPCO (Maltais et al. 2002; Gosker et al. 2003; Coronell et al. 2004), et d'autre part la tolérance à l'effort n'est pas complètement rétablie après une transplantation pulmonaire qui supprime pourtant les limitations respiratoires (Williams et Snell 1997; Lands et al. 1999; Guerrero et al. 2005; Guzun et al. 2012). De même, une étude montre que la prise de bronchodilatateurs échoue à améliorer la tolérance à l'effort de certains patients (Saey et al. 2003).

Outre les gênes respiratoires habituellement rapportées (dyspnée, difficultés d'expiration), l'inconfort ressenti au niveau des jambes par les patients BPCO est plus important que pour des sujets contrôles. Il est souvent rapporté comme facteur limitant, que ce soit lors d'un exercice de pédalage (Hamilton et al. 1996) ou lors d'un exercice de force-endurance du quadriceps (Coronell et al. 2004), alors que ce dernier type d'effort possède la particularité de très peu solliciter les paramètres cardiorespiratoires (Richardson et al. 1999). Le ressenti d'inconfort entraînant l'arrêt de l'effort peut survenir alors même que la capacité maximale aérobie musculaire n'est pas atteinte (Richardson et al. 1999; Murray et al. 2009). La limitation de capacité d'exercice n'est donc pas uniquement liée à l'altération des paramètres cardio-respiratoires, il y a bien une atteinte périphérique, responsable de la moindre tolérance à l'effort des patients BPCO.

L'ensemble de ces résultats confirme la présence d'une composante musculaire périphérique dans la limitation de la tolérance à l'effort chez les patients BPCO (pour revue (Vogiatzis et al. 2012), qui vient s'ajouter aux limitations ventilatoires.

2.5.2 Autres conséquences

Hormis la tolérance à l'effort, la dysfonction musculaire impacte aussi négativement la qualité de vie des patients (Shoup et al. 1997; Mostert et al. 2000; Vogiatzis et al. 2010), augmente le recours aux soins et les hospitalisations (Decramer et al. 1997; Garcia-Aymerich et al. 2006) et, comme indiqué précédemment, diminue la survie des patients (Marquis et al. 2002; Schols et al. 2005; Swallow et al. 2007).

2.6 Origines possibles de la dysfonction musculaire

2.6.1 Hypoxie/hypoxémie, hypercapnie et dysfonction musculaire

2.6.1.1 Hypoxémie et hypoxie dans la BPCO

L'hypoxémie se définit comme un contenu artériel en O₂ réduit. Elle est causée dans la BPCO par un rapport ventilation/perfusion inadéquat dû à l'emphysème et/ou à l'obstruction des voies aériennes qui limitent la diffusion de l'O₂ dans le sang. Sa prévalence dans la BPCO est mal connue. Une hypoxémie sévère ne serait retrouvée que chez 2% des patients (Tashkin et al, 2008) mais des hypoxémies intermittentes toucheraient une plus large population (Kent et al.). L'hypoxémie peut résulter en une hypoxie tissulaire qui consiste en un niveau d'oxygène dans un tissu inadéquat pour assurer sa fonction normale.

Les principaux régulateurs de la réponse cellulaire à l'hypoxie appartiennent à la famille des facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factors). Les membres de cette famille sont des hétéodimères composés d'une sous-unité HIF α et d'une sous-unité HIF β . En condition de normoxie, HIF1 α est dégradé rapidement *via* son hydroxylation par une prolyl-hydroxylase (PHD) permettant sa liaison avec l'enzyme ligase von Hippel-Lindau (VHL) qui l'adresse au protéasome. En condition d'hypoxie, elle n'est pas dégradée et va pouvoir se lier à HIF β pour former un complexe HIF capable de reconnaître les éléments de réponse de l'hypoxie (HRE pour Hypoxia Responsive Elements) sur les gènes cibles situés dans le noyau et activer leur transcription (pour revue (Lundby et al. 2009; de Theije et al. 2011). Leurs gènes cibles codent essentiellement pour des protéines impliquées dans l'érythropoïèse, le métabolisme du fer, la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et le métabolisme, notamment glycolytique (Semenza 1999; Lundby et al. 2009).

Koechlin et al, (Koechlin et al. 2005) montrent une corrélation entre l'endurance musculaire et la PaO₂ chez des patients BPCO suggérant que la dysfonction musculaire serait reliée à l'hypoxie. Il a par ailleurs été montré chez la souris que l'hypoxie entraîne une fatigabilité accrue (Gamboa et Andrade 2012).

Des mécanismes responsables de ces effets de l'hypoxie sont décrits dans les parties suivantes.

2.6.1.2 Hypoxie et protéosynthèse/protéolyse

Les effets de l'hypoxie sur le muscle ont été principalement étudiés dans le cadre de travaux sur la haute altitude, mais dans lesquels le niveau d'activité physique n'était pas forcément contrôlé. Suite à ces études, il est admis que l'hypoxie induit une perte de poids associée à une perte de masse musculaire (Boyer et Blume 1984; Hoppeler et al. 1990), indépendamment du niveau d'activité physique (Mizuno et al. 2008), ce qui a été confirmé chez l'animal (Favier et al. 2010). La perte de volume musculaire serait due à une réduction de la surface de section des fibres musculaires de type I et II (Hoppeler et al. 1990; MacDougall et al. 1991).

Cette atrophie musculaire serait causée par un déséquilibre de la balance protéosynthèse/protéolyse en situation d'hypoxie (figure 18).

La protéosynthèse est ainsi affectée du fait d'une plus faible activité traductionnelle en situation de stress notamment hypoxique (Koritzinsky et al. 2007). Dans un modèle cellulaire, le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α apparaît en effet inactivé lorsqu'il est phosphorylé par des kinases stimulées par l'hypoxie.

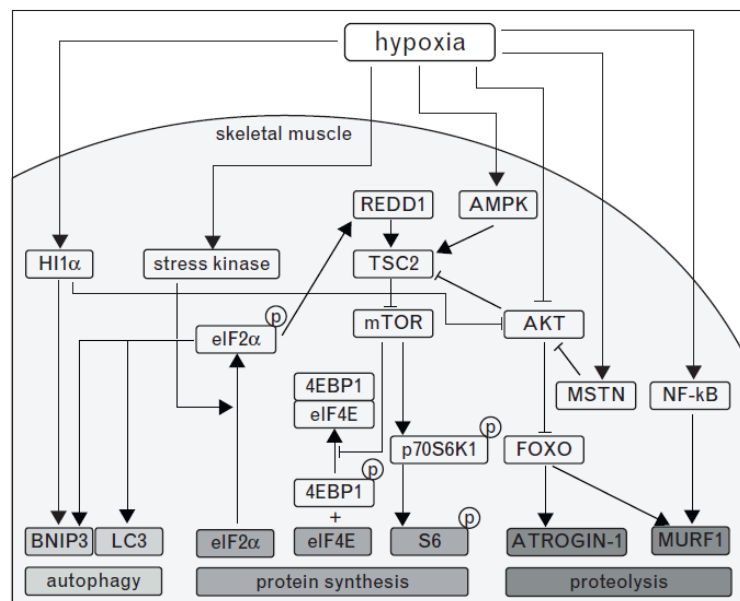


Figure 18:

Vue schématique de potentiels signaux hypoxiques directs ou indirects dans le contrôle du renouvellement protéique. HIF1 α (Hypoxia inducible factor 1 α), BNIP3 (BCL2/adonavirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3), LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain-3), eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α), REDD1 (DNA-dmaging-inducible transcript 4 protein), TSC2 (tuberous sclerosis protein 2), mTOR (mammalian target of rapamycin), 4EBP1 (eIF4E-binding protein), eIF4E (eukariotic initiation factor 4E), P70S6K1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1, S6 (ribosomal protein S6), AMPK (AMP-activated protein kinase), Akt (serine/threonine protein kinase Akt), MSTN (myostatine), FOXO (forkhead box O), NF- κ B

(Nuclear factor-kappa B), MAFbx (muscle atrophy F-box), MuRF-1 (muscle-specific ring finger). D'après (de Theije et al. 2011)

La voie de signalisation de l'hypertrophie IGF-1/PI-3K/Akt (figure 18) semble également impactée par l'hypoxie puisque, sur un modèle cellulaire, l'activité myogénique d'IGF-1 serait réduite dans cette condition et serait alors convertie en une activité mitogénique (Ren et al. 2010), en provoquant une activation de la voie MAPK au lieu de la voie d'Akt.

En situation d'hypoxie chronique, les phosphorylations d'Akt, de mTOR, de TSC2 et de la GSK3 β sont diminuées. C'est donc toute la voie de protéosynthèse Akt/mTOR qui apparait impactée (Arsham et al. 2003; Favier et al. 2010).

Dans la BPCO, il convient toutefois de rappeler que contrairement à ce qui est observé en hypoxie, il n'est pas systématiquement retrouvé de diminution de la phosphorylation d'Akt (Doucet et al. 2007; Plant et al. 2010; Vogiatzis et al. 2010), même si certains auteurs ont pu la mettre évidence chez des patients hypoxémiques (Favier et al. 2010). Les mécanismes induisant la baisse de synthèse protéique observée dans la BPCO ne seraient donc pas tout à fait identiques à ceux observés en hypoxie.

L'inhibition de mTOR peut cependant être régulée par d'autres voies indépendamment d'Akt, comme par exemple par la voie impliquant l'AMPK (Bolster et al. 2002) qui agit en stimulant TSC2, un répresseur de mTOR (figure 18). Mais si une hausse de la phosphorylation d'AMPK a pu être observée dans certaines conditions d'hypoxie sur cellule (Liu et al. 2006), elle n'a pu être démontrée chez l'animal (Favier et al. 2010) où elle est même réduite en situation d'hypoxie.

REDD1 (Regulated in Development and DNA Damage responses 1) est un autre facteur activé par l'hypoxie (Favier et al. 2010) susceptible de jouer un rôle dans la diminution de synthèse protéique. Il est en effet activateur de TSC2 comme peut l'être l'AMPK et peut donc inhiber l'action de mTOR dans la protéosynthèse. Dans la BPCO, l'activité de REDD1 est d'ailleurs augmentée chez des patients hypoxémiques comparés à des patients non-hypoxémiques (Favier et al. 2010) et pourrait donc inhiber mTOR sans que le niveau de phosphorylation d'Akt ne varie.

Enfin, la myostatine qui est un facteur limitant la croissance du tissu musculaire, et dont l'expression est augmentée en situation d'hypoxie et de BPCO (Hayot et al. 2011), est capable d'inactiver Akt (Trendelenburg et al. 2009).

La protéolyse *via* le système ubiquitine protéasome pourrait aussi être activée par l'hypoxie. Ainsi, une augmentation du renouvellement mais surtout de la dégradation protéique a pu être mise en évidence dans le muscle de rongeurs en condition d'hypoxie (Chaudhary et al. 2012). De plus, Razeghi et al, (Razeghi et al. 2006) montrent sur homogénats de coeur de rats qu'une exposition à l'hypoxie s'accompagne d'une hausse du contenu en ARNm des ubiquitines ligases Mafbx et MuRF-1. La réduction de phosphorylation d'Akt en situation d'hypoxie permet en outre le maintien du facteur de transcription Foxo dans le noyau où il est actif et où il entretient donc la stimulation de synthèse des ubiquitines ligases.

Il a également été montré que le facteur de transcription NF-κB est activé par l'hypoxie (revue (Taylor et Cummins 2009; Fitzpatrick et al. 2011). Il est un inducteur connu de MuRF-1 (Cai et al. 2004; Doucet et al. 2007) et participerait donc à l'atrophie induite par l'hypoxie. Le niveau de NF-κB est généralement augmenté dans la BPCO (Agusti et al. 2004; Vogiatzis et al. 2010) bien que pas de façon systématique (Plant et al. 2010), suggérant que ce mécanisme pourrait être effectivement engagé dans le processus de fonte musculaire lors de cette pathologie.

Du fait de leurs effets sur les voies de la protéosynthèse et de la protéolyse, l'atrophie musculaire observée dans la BPCO pourraient être due en partie à l'hypoxémie et à l'hypoxie qui en découle.

2.6.1.3 Hypoxie, typologie et phénotype oxydatif

L'exposition à l'hypoxie au cours du développement semble induire une transition des fibres lentes vers un profil de contraction plus rapide (Itoh et al. 1990) qui reposent majoritairement sur un métabolisme plus glycolytique. Dans le contexte de la BPCO, la perte de fibres de type I que subissent les patients a été corrélée à une faible PaO₂ (Jakobsson et al. 1990). La densité capillaire est elle augmentée mais le nombre de capillaires par fibres ne l'est pas. Cette augmentation de la densité proviendrait donc simplement de la diminution du volume musculaire (Green et al. 1989; Hoppeler et al. 1990; MacDougall et al. 1991), ce qui permettrait un maintien de l'oxygénation du tissu musculaire malgré la raréfaction de l'oxygène disponible.

Les études observationnelles des effets de l'hypoxie sur le muscle ont par ailleurs permis de mettre en évidence une diminution du phénotype oxydatif. Ceci se manifeste notamment par une réduction du volume mitochondrial, de l'activités de certaines enzymes

oxydatives, comme la citrate synthase, la cytochrome oxydase, la succinate déshydrogénase et l'hexokinase (revue (Hoppeler et Weibel 2000).

Ceci pourrait être dû au facteur de transcription HIF décrit précédemment dont on sait qu'il promeut la transcription de gènes majoritairement impliqués dans le métabolisme glycolytique. Par ailleurs, une étude sur des souris n'exprimant pas HIF1 α montre que ces animaux présentent une activité de leurs enzymes mitochondriales plus élevée en situation de stress induit par un exercice réalisé en normoxie (Mason et al. 2004). On peut alors supposer qu'en situation d'hypoxie, où le facteur HIF-1 α est surexprimé, l'activité des enzymes mitochondriales serait réprimée.

De plus, l'hypoxie semble réguler négativement l'expression de PGC1- α et l'activité transcriptionnelle des PPAR (Regnault et al. 2010) impliqués dans le métabolisme oxydatif et la biogénèse mitochondriale.

La diminution d'activité de la citrate synthase et d'autres enzymes mitochondriales dont le complexe IV de la chaîne de transport des électrons était déjà mise en évidence sur cellules musculaires squelettiques en hypoxie (Murphy et al. 1984). Une étude plus récente chez la souris confirme la chute de contenu en complexe IV en hypoxie et montre une réduction de la respiration mitochondriale lorsqu'elle est activée par un substrat spécifique du complexe I de la chaîne respiratoire, que ce soit en condition basale ou phosphorylante (Gamboa et Andrade). Chez des sujets sains sportifs, l'exposition à un stimulus hypoxique sévère (très haute altitude) de 66 jours induit une perte de masse et une diminution de la densité mitochondriale et de l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire. Le contenu protéique en PGC1- α était également réduit chez ces sujets (Levett et al. 2012). Toutefois, ces résultats ne sont pas retrouvés ou seulement sous forme de tendance pour des personnes ne faisant pas d'exercice et restant à une altitude d'environ 5300m pendant 19 jours (Levett et al. 2012).

L'activation de NF- κ B par l'hypoxie et notamment HIF évoquée précédemment peut également participer à la perte du phénotype oxydatif comme le montrent les travaux de Remels et al, (Remels et al. 2010) qui présentent une limitation de l'activité transcriptionnelle de PPAR, PGC1- α et Tfam (Transcription Factor A mitochondrial) sur un modèle cellulaire. Or des niveaux réduits d'expression de PPAR et PGC1- α ont été rapportés chez le patient BPCO (Remels et al. 2007), suggérant l'implication de ce mécanisme dans l'étiologie de la dysfonction musculaire de la BPCO.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'hypoxie pourrait effectivement jouer un rôle dans la mise en place d'un phénotype plus glycolytique chez les patients BPCO.

2.6.1.4 Hypoxie : inflammation et stress oxydant

Le concept de l'hypoxie inductrice d'inflammation gagne de l'importance et est de plus en plus admis (Eltzschig et Carmeliet 2011). Elle a été montrée comme étant inductrice de l'expression d'IL-6 dans des cellules musculaires (Prior et al. 2003). De même, *in vivo*, l'hypoxémie augmente le taux d'IL-6, d'IL-1, de la protéine c-réactive et de TNF- α circulant (Ertel et al. 1995; Klausen et al. 1997; Hartmann et al. 2000). Une étude rapporte également une augmentation de l'activation de NF- κ B, un régulateur clé de l'inflammation, en condition d'hypoxie (Taylor et Cummins 2009; Fitzpatrick et al. 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que le stress hypoxique est capable de provoquer une inflammation, et notamment de stimuler l'expression de TNF- α et IL-6.

L'hypoxémie chez des patients BPCO a par ailleurs été reliée à une élévation du TNF- α plasmatique (Takabatake et al. 2000), ce qui concorde avec l'augmentation de l'activation de NF- κ B (Agusti et al. 2004).

L'hypoxie est aussi reconnue comme inductrice de stress oxydatif dans le muscle. En effet, sur un modèle de souris soumises à une hypoxie sévère, plusieurs marqueurs du stress oxydant ont été modifiés. Les auteurs observent ainsi une augmentation des groupements carbonyles qui rendent compte de dommages cellulaires. Ils mettent également en évidence une diminution de l'activité de l'aconitase et du taux circulant de groupements thiols, ce qui reflète une production accrue d'espèces réactives (Magalhaes et al. 2005). De plus, en condition hypoxique, la lipofuscine, qui est un produit de dégradation de la peroxydation lipidique causée par les ROS, a été mesurée chez des himalayistes et elle est effectivement augmentée dans le muscle à la suite d'un séjour en altitude (Martinelli et al. 1990).

Une étude sur cardiomyocytes indique que la production cellulaire de ROS induite par l'hypoxie est fortement diminuée lorsque des inhibiteurs des complexes I et II de la chaîne respiratoire sont apportés indiquant que la mitochondrie joue un rôle clé dans la production de ROS en hypoxie (Duranteau et al. 1998). De plus, dans des cellules dont le contenu en ADN mitochondrial a été enlevé, l'hypoxie échoue à induire une génération de ROS (Chandel et al. 1998). En hypoxie, la baisse de disponibilité en oxygène ralentit le fonctionnement de la chaîne respiratoire, les électrons sont alors plus susceptibles de s'en échapper et d'aller réagir avec l'oxygène matriciel pour former des espèces réactives de l'oxygène. La mitochondrie apparaît donc comme la principale source de ROS en situation d'hypoxie (pour revue (Clanton 2007)).

Un haut niveau de lipofuscine a été observé chez des patients BPCO hypoxémiques (Koechlin et al. 2005) et confirme la présence d'un stress oxydant chez ces patients.

2.6.1.5 Hypercapnie et BPCO

L'hypercapnie est également assez courante dans la BPCO, notamment en phases d'exacerbation (Karadag et al. 2009). Or elle induit une diminution rapide de la force contractile chez des sujets sains (Vianna et al. 1990) et des lapins (Nioka et al. 1992). Ceci s'accompagnait dans l'étude de Nioka et al, d'une plus faible formation d'ATP. Gertz et al, observent également une plus faible concentration en ATP chez les patients hypercapniques (Gertz et al. 1977), mais déterminer la cause de cet effet est complexe car il est difficilement discriminable de l'effet de l'hypoxie concomitante.

2.6.2 Inactivité et dysfonction musculaire

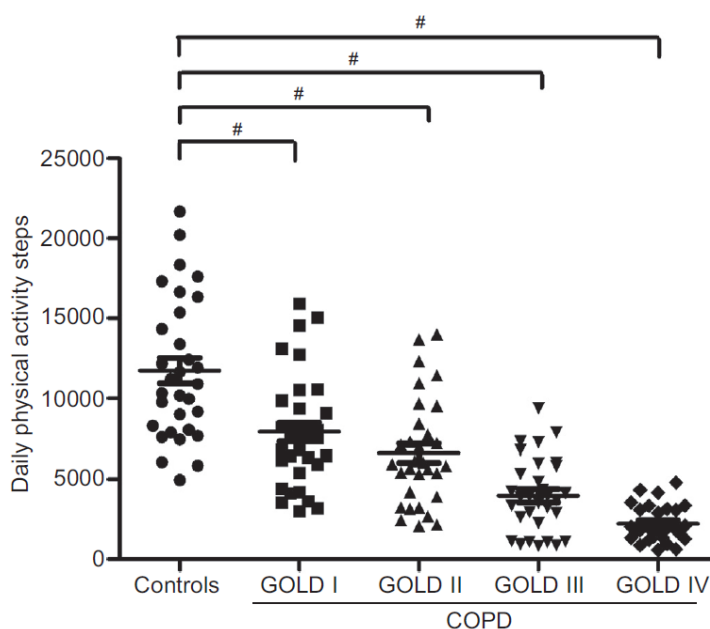


Figure 19:

Activité physique journalière (nombre de pas) de sujets contrôles sédentaires et de patients BPCO en fonction de leur stade GOLD. D'après (Shrikrishna et al. 2012)

Les patients BPCO sont largement plus inactifs que les personnes d'un âge similaire, même sédentaires (Schonhofer et al. 1997; Pitta et al. 2005; Vorrink et al. 2011) (figure 19). La dyspnée est un symptôme majeur de la BPCO qui se manifeste d'abord à l'effort, puis également dans les activités de la vie quotidienne. L'inconfort qu'amène la dyspnée rend les patients très intolérants à l'effort, impacte leur autonomie, leur état de santé général et leur

humeur (Bestall et al. 1999). Ils cherchent alors à éviter les situations susceptibles d'induire une dyspnée et limitent peu à peu leurs activités. Or l'inactivité est un inducteur de dysfonction musculaire. Elle entraîne une atrophie même chez les patients de stade GOLD I (Shrikrishna et al. ; Shrikrishna et al. 2012) . Cette atrophie serait liée en partie à un déséquilibre entre protéosynthèse et protéolyse. Elle s'accompagne d'une perte de force (Udaka et al. 2011), due notamment à une baisse de l'activité des neurones moteurs (Berg et al. 1997), d'une diminution de la proportion de fibres de type I (Larsson et Ansved 1985), du contenu en enzymes oxydatives, de la densité et de l'activité des mitochondries, du nombre de capillaires, du contenu en ARNm de PGC1- α , de la SOD mitochondriale... (pour revue : (Mador et Bozkanat 2001; Franssen et al. 2002; Wagner 2008; Meyer et al. 2013). Le facteur de transcription NF- κ B apparaît également activé dans un modèle d'atrophie par inactivité (Hunter et al. 2002).

Tous ces effets de l'inactivité sur le muscle ressemblent fortement à ce qui est observé chez le patient BPCO. De plus, le niveau d'altération de la fonction musculaire varie d'un muscle à l'autre chez ces patients et pourrait être relié au degré de sollicitation de ceux-ci. Ainsi, les muscles des membres supérieurs restent généralement davantage sollicités par rapport à ceux des membres inférieurs, de même que les muscles respiratoires qui font face à un surcroît de travail présentent moins d'altérations que les muscles des membres inférieurs moins actifs (Gea et al. 2001).

De plus, le rétablissement possible par un réentraînement physique de certains paramètres impactés par l'inactivité, que nous détaillerons dans une prochaine partie, corrobore l'hypothèse de son implication dans la dysfonction musculaire du patient BPCO. Toutefois, des données indiquent que l'inactivité ne peut expliquer à elle seule l'atteinte musculaire. En effet, Maltais et al, (Maltais et al. 1999) montrent que les modifications d'expression des chaînes lourdes de myosine chez le patient BPCO ne seraient pas liées aux capacités d'exercice et donc au niveau d'activité. Bigard et al, (Bigard et al. 1998) n'observent pas de diminution de la fonction mitochondriale dans un modèle animal de déconditionnement musculaire par suspension par la queue, bien que les muscles acquièrent par ailleurs un profil plus anaérobie. Mais surtout, une étude portant sur l'induction d'un emphysème chez des hamsters montre qu'en cas d'atteinte respiratoire, malgré un niveau d'activité physique équivalent, les animaux présentent une atrophie des muscles périphériques et une réduction de l'activité de la CS (Mattson et Poole 1998; Mattson et al. 2004). Ces derniers résultats corroborent l'hypothèse de la présence d'une myopathie dans la BPCO.

L'inactivité tient donc une place importante, voire centrale, dans l'étiologie de la dysfonction musculaire des patients BPCO, mais elle n'en est pas la seule cause.

2.6.3 Déficit nutritionnel et dysfonction musculaire

Un état de malnutrition est retrouvé chez un tiers des patients BPCO (Ferreira et al. 2012) et aboutirait à ce qu'environ un quart des patients souffre de cachexie (Wagner 2008).

Il pourrait être la conséquence d'un trop faible apport en énergie par l'alimentation et d'une dépense accrue (Schols et al. 1991). En effet, plusieurs études indiquent que la dépense énergétique au repos, à l'exercice et au cours de la vie quotidienne est supérieure chez les patients BPCO par rapport aux sujets sains (Schols et al. 1991; Baarends et al. 1995; Baarends et al. 1997; Creutzberg et al. 1998; Sergi et al. 2006). Sans un apport adéquat en énergie pour contrebalancer cet excès de consommation d'énergie, les patients perdent inexorablement du poids. Cependant, des auteurs rapportent que les patients augmentent généralement naturellement leurs apports caloriques pour maintenir leur poids (Schols et al. 1991), excepté en situation d'exacerbation, où la prise alimentaire est fortement réduite du fait des dyspnées et de la fatigue (Vermeeren et al. 1997). Chez les patients plus gravement atteints, leur capacité à hausser l'apport calorique naturellement se perdant, on assiste alors à une réduction de l'appétit et de la masse musculaire (Schols et al. 1991; Koehler et al. 2007).

Outre l'aspect quantitatif, la dénutrition du patient BPCO présente également un versant qualitatif avec notamment des carences en vitamines C et E qui favorisent le stress oxydant (Gosker et al. 2005; Keranis et al. 2010; Cristovao et al. 2013), en vitamine D (Finklea et al. 2011; Mahlin et al. 2013) et magnésium (Cerci Neto et al. 2006; Ruljancic et al. 2007).

De plus, l'apport en acides aminés essentiels, et notamment en phénylalanine, apparaît primordial comme l'indiquent les travaux de Jonker et al, qui montrent une forte corrélation entre le niveau de protéosynthèse et les apports en phénylalanine rapportés à la masse non-grasse (Jonker et al. 2013).

Les conséquences au niveau musculaire de la dénutrition sont une perte de force et d'endurance, une atrophie des fibres, principalement de type II, une diminution de l'activité d'enzymes glycolytiques et oxydatives, une augmentation des niveaux d'ADP et une réduction de ceux de phosphocréatine (pour revue (ATS 1999; Mador et Bozkanat 2001; Langen et al. 2013). La dénutrition peut donc effectivement participer à la dysfonction musculaire dans la BPCO. Cependant, le fait qu'elle ne touche qu'une partie des patients et

qu'elle affecte préférentiellement les fibres de type II, alors que dans la BPCO les fibres de type I sont également impactées, indique qu'elle n'est pas la cause principale de la dysfonction.

2.6.4 Inflammation systémique et dysfonction musculaire

La BPCO est associée à un syndrome inflammatoire chronique, se manifestant par l'augmentation du nombre et de l'activité des cellules inflammatoires, des cytokines et des protéines inflammatoires de phase aiguë.

L'inflammation est souvent considérée comme une cause possible de la dysfonction musculaire dans la BPCO (Sin et Man 2006). Quelques études montrent qu'il y a bien une inflammation dans le muscle des patients BPCO (Montes de Oca et al. 2005; Barreiro et al. 2011) et qu'une augmentation de facteurs inflammatoires plasmatiques (IL-6, TNF- α , CRP) chez ces patients s'associe à une perte de capacité d'exercice, de masse maigre (figure 20) et de force du quadriceps (Schols et al. 1996; Broekhuizen et al. 2006; Pinto-Plata et al. 2006; Yende et al. 2006). Une élévation plus marquée du taux d'IL-8 a été mise en évidence chez des patients en situation d'exacerbation qu'en situation stable (Spruit et al. 2003). Cette élévation des facteurs de l'inflammation et ses conséquences sur le muscle seraient donc encore plus marquées en situation d'exacerbation.

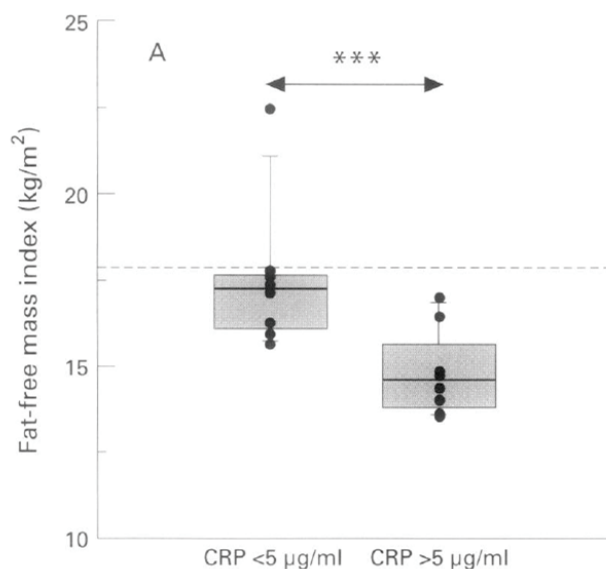


Figure 20:

Indice de masse non-grasse chez des patients BPCO hypermétaboliques regroupés en fonction de la présence de protéine C réactive, indicatrice d'une phase de réponse inflammatoire aiguë. La ligne pointillée représente la valeur médiane obtenue chez des sujets sains. *** $p < 0,001$. (Schols et al. 1996)

Plusieurs observations faites sur des modèles cellulaires, animaux et sur l'Homme permettent de relier plus ou moins directement l'inflammation à des atteintes quantitatives et qualitatives du muscle. Ainsi, lors des exacerbations, la flambée inflammatoire s'accompagne d'une baisse de facteur anabolique comme IGF-1 (Spruit et al. 2003). L'activité d'IGF-1 pourrait être inhibée par le TNF- α , comme l'indique l'étude de Strle et al, sur myotubes exposés au TNF- α (Strle et al. 2006). De plus, chez le rat, un traitement à base d'IL-6 produit une atrophie musculaire dose-dépendante et touchant tous les types de fibres (Janssen et al. 2005). Sur culture de myotubes, une exposition à du TNF- α provoque une diminution de la surface de cellules et du contenu en chaînes de myosines lourdes (Langen et al. 2006; De Larichaudy et al. 2012), ainsi qu'une inhibition de la respiration mitochondriale et du contenu protéique en complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale (Remels et al. 2010). Des travaux sur la souris indiquent que le TNF- α détériorerait la fonction contractile des cellules musculaires et réduirait la force développée en affaiblissant la réponse des myofilaments à l'activation calcique (Reid et al. 2002). Les cytokines auraient aussi comme capacité d'activer la voie de l'ubiquitine-protéasome (pour revue (Mitch et Goldberg 1996) responsable de la dégradation des protéines.

Le TNF- α ressort comme un facteur clé dans ces processus. Il est en effet associé à de nombreuses caractéristiques de l'atteinte musculaire. Parmi celles-ci nous retrouvons : l'atrophie évaluée sur myotubes (De Larichaudy et al. 2012), la diminution de force et de fonction contractile mesurée sur des modèles murins (Reid et al. 2002; Hardin et al. 2008), la baisse des capacités oxydatives et du contenu musculaire en facteurs de la biogénèse mitochondriale de patients BPCO (Remels et al. 2010). L'un des médiateurs de son action serait le facteur de transcription NF- κ B (Li et Reid 2000; Langen et al. 2001) qui contrôle l'expression de nombreux gènes codant pour des cytokines, des facteurs de croissance, des protéines inflammatoires de phase aiguë, d'autres facteurs de transcription et des enzymes impliquées dans le système de dégradation ubiquitine-protéasome (pour revue (Li et al. 2008). L'action du TNF- α *via* NF- κ B passerait par la stimulation de l'activité du système ubiquitine-protéasome du fait d'une augmentation de l'expression de MuRF-1 (Cai et al. 2004), l'augmentation d'expression de facteurs pro inflammatoires et l'altération de la différenciation des cellules musculaires satellites qui permettent normalement la régénération du muscle (Guttridge et al. 2000; Langen et al. 2001).

Cependant, la question d'une hausse du niveau de TNF- α , dans le muscle et dans le sang des patient BPCO est toujours en suspens. Certains auteurs ont pu mettre en évidence une élévation de sa concentration dans le muscle (Montes de Oca et al. 2005; Remels et al.

2010), dans le sang (Takabatake et al. 2000; Reid et Li 2001), alors que d'autres ne confirment ce résultat ni dans le muscle (Crul et al. 2007; Vogiatzis et al. 2010; Fermoselle et al. 2012), ni dans le plasma (Broekhuizen et al. 2005). Enfin certains montrent même une diminution du contenu musculaire en TNF- α par rapport à des sujets sains (Barreiro et al. 2008). En revanche, une augmentation de l'activité de liaison de NF- κ B à l'ADN a bien été mise en évidence dans le quadriceps de patients BPCO avec un faible IMC (Agusti et al. 2004) et qui pourrait être induite par le TNF- α (Langen et al. 2001).

Au vu de ces résultats, il peut être considéré que l'inflammation joue un rôle dans la mise en place de la dysfonction musculaire observée dans la BPCO. La réduction du niveau d'inflammation apparaît donc comme une piste prometteuse en vue de l'amélioration de la fonction musculaire du patient BPCO.

Toutefois, les mécanismes et éléments impliqués dans l'inflammation chez les patients BPCO ne sont pas complètement élucidés. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour cibler les acteurs de l'inflammation dans la BPCO et tester des molécules qui pourraient limiter leur action délétère. Cependant, cette approche n'est pas triviale puisque des traitements anti-TNF- α donnés à des insuffisants cardiaques, présentant le même type de dysfonction musculaire que les patients BPCO, n'induisent pas spécifiquement de gain pour les patients (Anker et Coats 2002). Ceci questionne par ailleurs l'importance de ce facteur-ci chez les patients, alors qu'il est souvent mis en avant sur les modèles non-humains d'inflammation. Les processus inflammatoires et leur utilité ou nocivité dans le contexte de la BPCO restent donc à éclaircir (Sin et Reid 2008).

Les effets propres de l'inflammation sont souvent difficilement dissociables de ceux induits par le stress oxydant tant ces deux phénomènes sont en interrelation et se potentialisent, notamment du fait du facteur de transcription NF- κ B qui se trouve à la croisée de ces deux phénomènes.

2.6.5 Stress oxydant et dysfonction musculaire

Comme indiqué dans des parties précédentes de ce manuscrit, la BPCO est associée à une production d'espèces réactives de l'oxygène accrue, que ce soit au niveau des poumons ou de l'organisme entier et plus particulièrement au niveau des muscles. De plus, il suffit d'un faible stress comme l'exercice, pour que cette production augmente plus fortement (Barreiro et al. 2009) et pour des stimuli d'intensités plus faibles que chez des sujets sains (Couillard et

al. 2003). Ces radicaux libres, s'ils ne sont pas limités par un système antioxydant suffisamment efficace comme cela semble être le cas dans la BPCO, vont avoir des conséquences sur le muscle des patients (figure 21).

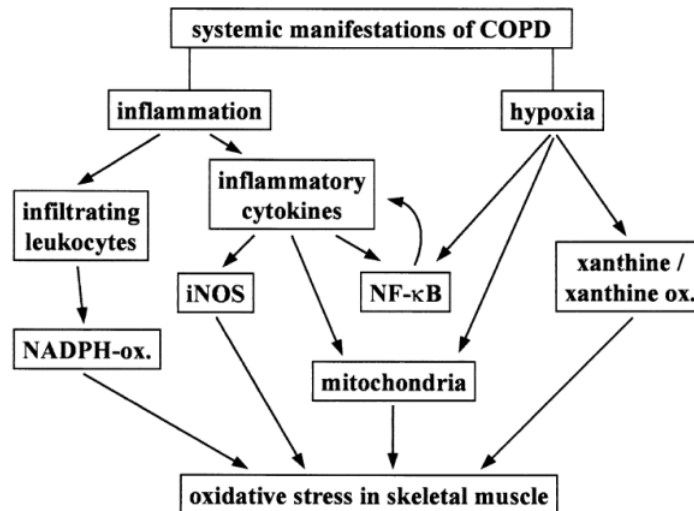


Figure 21:

Sources potentielles du stress oxydant suspecté de contribuer à la dysfonction musculaire dans la BPCO. D'après (Langen et al. 2013).

Les radicaux libres sont en effet à l'origine de plusieurs types de dommages qui peuvent impacter le muscle : les peroxydations lipidiques, les dommages à l'ADN et l'oxydation des protéines.

- Lorsque les phospholipides des membranes cellulaires et subcellulaires sont attaqués par les radicaux libres, une chaîne de réactions de peroxydations lipidiques s'installe et perturbe la fluidité membranaire. Cette perturbation engendre des modifications des activités des enzymes situées dans les membranes ou à proximité et du transport d'éléments de part et d'autre de la membrane. L'homéostasie et l'activité métabolique de la cellule seraient en conséquence affectées.

- Les radicaux libres réagissent avec tous les composants de la molécule d'ADN, affectant à la fois les purines et les pyrimidines ainsi que le squelette de désoxyribose. La modification permanente du matériel génétique induite par ces dommages oxydatifs représente la première étape de mutagénèse. L'ADN mitochondrial est lui aussi soumis aux attaques radicalaires, et de manière encore plus marquée que pour l'ADN nucléaire car il n'est pas protégé par des histones.

- les ROS causent des modifications oxydatives au niveau des acides aminés et des protéines des milieux extra et intracellulaire (Stadtman 1993). Ces réactions d'oxydation

peuvent conduire à une modification structurale des protéines potentiellement inductrices de conséquences fonctionnelles majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (Stadtman et Levine 2000).

Il a ainsi été montré qu'une élévation trop importante de la production d'espèces réactives dans un muscle altère la production de force et induit une fatigue plus précoce *via* notamment des perturbations de la réponse des myofilaments au Ca^{2+} et de la recapture par le réticulum sarcoplasmique de ce dernier (revue (Reid 2001; Smith et Reid 2006)). D'ailleurs, la prise d'un antioxydant permet d'améliorer la performance en endurance de patients BPCO dont la production de ROS est augmentée lors d'un exercice (Koechlin et al. 2004), suggérant qu'il y a bien un lien entre le stress oxydant et la dysfonction musculaire. De même, des souris traitées pour développer un profil cachectique reviennent à un poids corporel similaire à celui des souris non-cachectiques si elles sont supplémentées en antioxydant, confirmant bien que le stress oxydant est impliqué dans la cachexie et donc dans la fonte musculaire présente en situation de cachexie (Buck et Chojkier 1996). Des études sur modèles non-humains donnent des pistes explicatives quant aux mécanismes impliqués. Sur culture de cellules endothéliales exposées à des radicaux libres, il a été montré une diminution rapide et marquée de la quantité d'ATP (Spragg et al. 1985). Sur culture de myoblastes de rats, Stangel et al, montrent quant à eux une augmentation de l'apoptose (Stangel et al. 1996). Ces résultats semblent indiquer que le métabolisme et la production d'énergie sont altérés par les espèces radicalaires. L'induction d'un stress oxydant chez des rats provoque également une atteinte des protéines musculaires et une dégradation accrue des protéines myofibrillaires (Nagasawa et al. 1997), qui pourrait s'expliquer par une plus grande activation du système ubiquitine-protéasome (Li et al. 2003). Chez des rats déficients en vitamine E antioxydante, Thomas et al, (Thomas et al. 1993) mettent en évidence une fonte musculaire et une diminution des activités d'enzymes oxydatives, notamment des complexes enzymatiques mitochondriaux I et IV. Le ratio de contrôle respiratoire est lui aussi diminué chez ces rats, certainement du fait d'une altération des membranes, probablement imputable aux peroxydations lipidiques.

Les dommages induits par la production d'espèces radicalaires dans la BPCO semblent donc impacter directement le muscle en réduisant la masse musculaire et en modifiant le métabolisme ce qui provoque des conséquences fonctionnelles en terme de force développée et de capacités oxydatives.

Les ROS jouent également un rôle dans la mise en place de l'inflammation. En effet, plusieurs facteurs de transcription ROS-dépendants (HIF, NF- κ B, AP-1) (Livolsi et al. 2001; Lee et Yang 2012) activent l'expression de facteurs de l'inflammation tels que IL-1 et TNF- α ,

qui eux-mêmes activent d'autres facteurs de l'inflammation (pour revue (Lee et Yang 2012) et stimulent en retour NF- κ B (Janssen-Heininger et al. 1999). Or l'inflammation elle-aussi provoque des conséquences (décrites précédemment) pour la dysfonction musculaire.

2.6.6 Déséquilibres hormonaux et dysfonction musculaire

Près d'un tiers des patients BPCO présente un hypogonadisme (Laghi et al. 2005), avec un niveau de testostérone et de DHEA encore amoindri en situation d'exacerbation (Karadag et al. 2009). La diminution de sécrétion de ces hormones apparait corrélée à l'hypoxie (Semple et al. 1980) et à l'inflammation (Debigare et al. 2003). De plus, Debigare et al, (Debigare et al. 2003) rapportent que le niveau de DHEA est significativement plus faible chez des patients BPCO dont la surface de section du quadriceps est inférieure à 70 cm² par rapport à des patients pour qui elle est supérieure à 70 cm². On s'attendrait donc à un effet de cet hypogonadisme sur la fonction musculaire chez les patients BPCO, toutefois il semblerait qu'il n'en soit rien : le niveau de force et d'endurance du quadriceps, ainsi que la capacité d'exercice sont similaires entre des sujets non hypogonadiques et hypogonadiques et cet état n'aurait pas non plus de conséquences sur la qualité de vie (Laghi et al. 2005). Creutzberg et al, (Creutzberg et al. 2003) montrent cependant qu'en situation de réhabilitation, la prise de stéroïdes anabolisants permet un gain de masse maigre supérieur comparativement à la prise d'un placebo. Cet effet classiquement observé chez les sujets sains est donc retrouvé chez les patients BPCO. Ceci indique que les patients BPCO n'ont pas perdu leur capacité de réponse aux stimuli anaboliques et que des traitements de la fonte musculaire utilisés chez des sujets sains peuvent donc leur être appliqués.

L'hormone de croissance (GH pour growth hormone) et le facteur de croissance IGF-1 pourraient eux aussi être impliqués dans la dysfonction et notamment l'atrophie musculaire. Comme indiqué précédemment, l'IGF-1 a été retrouvé dans plusieurs travaux à un niveau plus faible chez les patients BPCO (Crul et al. 2007; Vogiatzis et al. 2010).

2.6.7 Corticoïdes et dysfonction musculaire

De fortes doses de corticoïdes sont prescrites en aigu aux patients BPCO lors des exacerbations, et également parfois de manière chronique chez certains patients, même si leur efficacité dans ce dernier cas est controversée (Schols et al. 2001; Vestbo et al. 2013).

Dès 1996, les effets négatifs de ce type de traitement au long cours sur les muscles des patients BPCO ont été observés. La prise de corticoïdes chez les patients BPCO est ainsi associée à une perte de masse maigre (Hopkinson et al. 2007), une faiblesse musculaire (Decramer et al. 1994; Decramer et al. 1996; Bernard et al. 1998), une atrophie touchant préférentiellement les fibres de type II (Lieu et al. 1993) et enfin une diminution de la survie (Decramer et al. 1996).

Les corticoïdes semblent agir sur l'atrophie musculaire par une réduction d'activité de la voie IGF-1/PI3K/Akt. En effet, l'étude de Kuo et al, sur myotubes semble indiquer que les glucocorticoïdes augmentent l'expression d'une sous-unité inhibitrice du complexe PI3K, ce qui résulte en l'inactivation d'Akt (Kuo et al. 2012). La réduction de la phosphorylation d'Akt est également observée chez des rats traités avec des glucocorticoïdes et peut être rétablie par la surexpression d'IGF-1 (Schakman et al. 2008).

Une augmentation de l'expression de la myostatine, un inhibiteur de synthèse protéique, à la suite d'un traitement aux glucocorticoïdes participerait également à l'inhibition de la synthèse protéique (Gilson et al. 2007).

Outre cette diminution de synthèse protéique, les corticoïdes semblent également stimuler la dégradation protéique. Ils induisent ainsi une augmentation de l'expression des ubiquitines ligases MuRF1 et MAFbx et de leur facteur de transcription FOXO (Zheng et al. 2010).

Au delà de changements quantitatifs, des études se sont intéressées à d'éventuels changements qualitatifs induits par les corticoïdes.

L'effet éventuel de ces traitements sur la mitochondrie n'est pas clair, avec beaucoup d'études sur l'animal ou sur cellules aux résultats contradictoires (pour revue (Meyer et al. 2013)). Certaines études ne mettent en évidence aucun changement de l'activité de la CS mesurée sur muscle de rats (You et al. 2009), alors que d'autres montrent une diminution de l'activité de la CS et de la respiration mitochondriale sur mitochondries isolée à la suite d'une administration de corticoïdes (Duclos et al. 2004). Néanmoins, une étude effectuée sur des muscles de patients BPCO ne montre pas d'effet d'un traitement de longue durée sur l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme (CS, HAD, PFK, HK, LDH) et sur le contenu en ADP et ATP (Pouw et al. 2000).

La prise de corticoïdes en aigu ne semble en revanche pas avoir pour conséquence une dysfonction musculaire, ni une altération des paramètres métaboliques au cours d'un exercice (Hopkinson et al. 2004).

2.6.8 Sarcopénie et BPCO

Avec l'âge, apparaît une évolution musculaire propre au vieillissement et que l'on nomme sarcopénie. La sarcopénie est un syndrome caractérisé par une perte progressive et généralisée de masse musculaire squelettique et de la force, avec un risque de conséquences défavorables comme les incapacités physiques, une qualité de vie altérée et finalement la mort (Cruz-Jentoft et al. 2010).

La BPCO et la dysfonction musculaire qui en résulte apparaissent chez des sujets d'âge moyen ou âgé manifestant déjà des signes de sarcopénie. Les atteintes du muscle liées à l'âge se surajoutent donc à celles liées aux causes évoquées dans cette partie et aggravent la dysfonction. Certains auteurs utilisent même parfois le terme sarcopénie pour désigner la fonte musculaire observée chez le patient BPCO (Cesari et al. 2012).

La sarcopénie se caractérise par une perte de masse musculaire avec l'avancée en âge (Vandervoort 2002; Delmonico et al. 2009; Mitchell et al. 2012). Elle s'explique par une diminution du nombre de fibres musculaires, touchant les fibres de type I et II de manière indiscriminée (Aniansson et al. 1986; Lexell et al. 1988). Le diamètre des fibres est également diminué mais préférentiellement celui des fibres de type II (Lexell et al. 1988; Hikida et al. 2000) induisant une perte de force plus marquée lorsque la vitesse d'exécution du mouvement est élevée (Yu et al. 2007). La surface occupée par les fibres de type I dans un muscle de sujet âgé reste donc relativement préservée.

La bioénergétique est elle aussi touchée par le vieillissement.

La VO_2 max diminue ainsi avec l'âge de 8% tous les dix ans environ (Short et al. 2005). Si l'on s'affranchit de la quantité de masse maigre, qui diminue avec l'âge et peut l'impacter, la VO_2 max est toujours diminuée de 3% par tranche de 10 ans (Short et al. 2005). Le métabolisme de repos diminue lui aussi avec l'âge indépendamment de la quantité de masse maigre (Short et al. 2004), indiquant que la quantité de mitochondries ou leur fonctionnement pourraient être réduits avec l'âge. En effet, des études montrent qu'avec l'âge le contenu en ADN mitochondrial est diminué, limitant le renouvellement des protéines (Welle et al. 2003). La densité mitochondriale et l'activité des enzymes mitochondriales sont elles aussi abaissées (Short et al. 2005; Crane et al. 2010; Joseph et al. 2012). La biogénèse mitochondriale apparaît par ailleurs altérée avec l'âge puisque le contenu en protéines de PGC1- α , un régulateur clé de la biogénèse mitochondrial, est retrouvé abaissé chez les personnes âgées, quel que soit leur niveau d'activité physique, par rapport à des individus plus jeunes (Joseph et al. 2012).

La respiration mitochondriale mesurée sur fibres musculaires perméabilisées est par ailleurs significativement diminuée en état non-phosphorylant (états 2 ou 4) chez les sujets âgés, même actifs, comparés à des sujets jeunes. En état phosphorylant (état 3), elle est abaissée significativement chez les sujets âgés peu actifs mais montre seulement une tendance à la diminution chez les sujets âgés actifs (Joseph et al. 2012). La production d'ATP diminue avec l'âge (Petersen et al. 2003) et elle est corrélée à la VO_2 max (Short et al. 2005) et à des critères de définition de la sarcopénie comme la baisse de vitesse de marche choisie sur 400m (Coen et al. 2013).

Au niveau fonctionnel, la sarcopénie se traduit par une perte de force généralisée. Celle-ci va même au-delà de la perte de masse musculaire (Delmonico et al. 2009; Dey et al. 2009) du fait d'une perte de contractilité des fibres avec des vitesses de raccourcissement et une tension développée par fibres plus faibles (Yu et al. 2007).

Dans la BPCO, les patients subissent eux aussi une atrophie touchant préférentiellement les fibres rapides (Gosker et al. 2002). En revanche, les patients BPCO perdent également des fibres musculaires, mais majoritairement des fibres lentes (Whittom et al. 1998 ; Gosker et al. 2002; Gosker et al. 2007), contrairement à ce qu'il se produit au cours du vieillissement.

Les mécanismes sous-jacents de la sarcopénie présentent des similitudes avec ceux impliqués dans la dysfonction musculaire observée dans la BPCO : déséquilibre de la balance protéique, changements hormonaux, faible niveau d'activité physique et stress oxydant accru (pour revue, (Mitchell et al. 2012). Cependant, les atteintes musculaires observées dans la BPCO ne correspondent pas uniquement à la sarcopénie. En effet, qualitativement, les modifications de typologie musculaire visibles dans la BPCO sont différentes de celles inhérentes à la sarcopénie. De plus, les patients BPCO présentent une atteinte plus sévère comparativement à des sujets du même âge.

Ces données suggèrent donc que, dans la BPCO, la sarcopénie s'ajouterait aux autres causes de la dysfonction musculaire déjà évoquées.

En résumé, les patients BPCO sont majoritairement inactifs, souvent âgés et dénutris. De manière inhérente à la pathologie, ils présentent un statut inflammatoire et un stress oxydatif élevé, ainsi que des déséquilibres hormonaux. Enfin, leur état de santé nécessite parfois le recours à des traitements aux corticoïdes. Toutes ces conditions et états sont associés à des altérations de la masse, du métabolisme et de la fonction musculaire et seraient impliqués dans l'étiologie de la dysfonction musculaire rencontrée

dans la BPCO. Ces constats plaident en faveur de la présence d'une myopathie aux origines multiples dans la BPCO, plutôt qu'en faveur d'un simple déconditionnement. L'hypoxémie, et l'hypoxie tissulaire qu'elle peut engendrer, semblent également prendre une part prépondérante dans l'étiologie de cette dysfonction par une action à différents niveaux : la balance énergétique, l'inflammation, le stress oxydant et provoqueraient une transition d'un métabolisme musculaire oxydatif vers un métabolisme plus glycolytique.

3. PRISE EN CHARGE DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE DANS LA BPCO

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement capable de guérir la BPCO. La chirurgie reste le seul recours pour améliorer l'atteinte pulmonaire par réduction du volume pulmonaire ou transplantation pulmonaire. Toutefois, il est possible de limiter la rapidité du déclin respiratoire et de maintenir voire d'améliorer les capacités fonctionnelles des patients.

Les objectifs généraux de la prise en charge de la BPCO, établis par la Société de pneumologie de langue française (SPLF 2009), sont de :

- réduire la mortalité ;
- limiter le handicap en soulageant les symptômes et en améliorant la tolérance à l'exercice et la qualité de vie ;
- réduire la fréquence et la sévérité des exacerbations ;
- ralentir la dégradation progressive de la fonction respiratoire;
- diminuer le risque de complications (insuffisance respiratoire chronique, hypertension artérielle pulmonaire) ;
- limiter l'impact des comorbidités ;
- au prix d'un minimum d'effets indésirables des traitements.

Or, comme indiqué dans les parties précédentes, la dysfonction musculaire impacte négativement plusieurs de ces facteurs : elle est liée à une réduction de la survie, une diminution de la qualité de vie et de la tolérance à l'effort et à une augmentation du recours aux soins. Différentes stratégies ont donc été pensées pour ralentir voire empêcher la dysfonction musculaire (réentraînement physique, intervention nutritionnelle, prise d'anabolisants, oxygénothérapie au long cours). Elles sont souvent combinées dans les protocoles de réhabilitation pulmonaire.

Deux méta-analyses ont mis en évidence que la réhabilitation pulmonaire, qui est un programme multidisciplinaire de soins pour des patients BPCO, conçu et ajusté individuellement pour optimiser les performances physiques et sociales et l'autonomie (Nici et al. 2006), permet de réduire la dyspnée et la fatigue, d'améliorer des paramètres émotionnels et de contrôle de la maladie, et enfin d'améliorer la qualité de vie et d'augmenter la capacité d'exercice des patients (Lacasse et al. 1996; Lacasse et al. 2006). Le programme de réhabilitation pulmonaire est variable et peut inclure :

- une aide au sevrage tabagique,
- un réentraînement physique,
- l'apprentissage de la maîtrise du souffle
- une prise en charge nutritionnelle,
- l'éducation thérapeutique
- une prise en charge psychosociale
- l'optimisation des traitements médicamenteux, de l'oxygénothérapie et des appareillages éventuels.

Les points de ces programmes de réhabilitation qui concernent la prise en charge de la dysfonction musculaire sont le réentraînement physique et la prise en charge nutritionnelle. Ils sont abordés dans les parties suivantes.

3.1 Réentraînement à l'effort

Comme indiqué dans une précédente partie, le niveau d'activités physiques quotidiennes des patients BPCO est plus faible que celui de sujets contrôles du même âge. Or, la mortalité ainsi que le recours aux soins et aux hospitalisations sont réduits chez des patients même modérément actifs par rapport à des patients dont le niveau d'activité est faible (Puhan et al. 2005; Garcia-Aymerich et al. 2006).

Il semble donc intéressant d'élever le niveau d'activité physique chez ces patients, d'autant que bon nombre d'effets positifs de l'entraînement physique sont bénéfiques pour lutter contre la dysfonction musculaire liée à la BPCO. En effet, chez le sujet sain, en fonction de l'intensité et de la durée de l'entraînement, celui-ci peut provoquer une augmentation de la masse musculaire, de la densité mitochondriale, de la capillarisation et de l'activité des enzymes oxydatives, ce qui accroît les capacités oxydatives et les performances aérobies. De plus, après un entraînement intense, la proportion de fibres de type I apparaît augmentée alors que les fibres de type IIb sont converties en type IIa (Howald et al. 1985). Les effets de

l'entraînement observés chez les sujets sains se révéleraient particulièrement intéressants dans le contexte de la BPCO qui induit une fonte musculaire et une diminution des capacités oxydatives.

Si la capacité du muscle des sujets BPCO à répondre à un entraînement physique de la même manière que pour un sujet sain a pu être mise en doute (Belman et Kendregan 1981), plusieurs études ont ensuite démontré que l'entraînement physique était efficace pour lutter contre la dysfonction musculaire chez ces patients (Maltais et al. 1996; Whittom et al. 1998; Bernard et al. 1999; Sala et al. 1999).

Chez le patient BPCO, le réentraînement induit une amélioration de paramètres généraux tels que : les symptômes de dyspnée, la fatigue musculaire, la tolérance à l'effort (Ries et al. 1995; Vogiatzis et al. 2011), la dépression (Kozora et al. 2002), le nombre d'exacerbations (Guell et al. 2000) et le volume de marche journalier (Pitta et al. 2008).

La réhabilitation par l'activité physique est donc désormais reconnue comme partie intégrante de la réhabilitation pulmonaire (Nici et al. 2006). De plus, elle peut être proposée à des patients même sévèrement atteints puisqu'un effet de l'entraînement a été retrouvé chez des patients de stades GOLD III et IV (Vogiatzis et al. 2011).

3.1.1 Nature du réentraînement et ses bénéfices

Différentes modalités d'entraînement ont été proposées aux patients BPCO. Dans un premier temps, l'endurance était privilégiée, en continu ou par intervalle, et peu à peu s'est ajouté le travail de la force, soit seul, soit associé à l'endurance.

3.1.1.1 Entraînement en endurance

Dès 1991, Casaburi et al, montrent qu'un entraînement en endurance chez des patients BPCO entraîne une amélioration des paramètres ventilatoires, une diminution de l'acidose lactique, de la production de CO₂ et de la ventilation pour un niveau d'activité donnée (Casaburi et al. 1991). Ces progrès étaient plus marqués lorsque le niveau d'intensité de l'entraînement pour une même charge de travail était plus élevé. L'amélioration de la ventilation ainsi que de l'acidose lactique (avec un seuil lactique plus élevé) (Vogiatzis et al. 2005) est confirmée dans l'étude de Maltais et al, (Maltais et al. 1996) (figure 22).

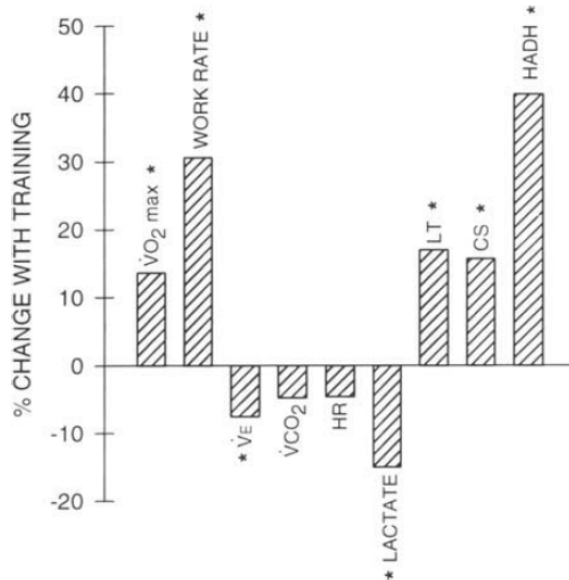


Figure 22:
Effets d'un entraînement en endurance de 12 semaines sur des paramètres ventilatoires et métaboliques mesurés lors d'un test physique à incrémentation. (Maltais et al. 1996).

Une augmentation de l'endurance du quadriceps de patients BPCO a pu être mise en évidence après seulement 3 semaines de réentraînement en endurance (Serres et al. 1997). Une cadence de pédalage (Maltais et al. 1996) et une puissance plus élevées sont également observés après un réentraînement chez le patient BPCO (Maltais et al. 1996; Vogiatzis et al. 2005; Vogiatzis et al. 2011). Creutzberg et al, montrent eux aussi un effet bénéfique de l'entraînement en endurance sur la force isométrique maximale des membres inférieurs et supérieurs, sur la consommation maximale d'O₂ et sur la charge de travail (Creutzberg et al. 2003). Ces améliorations s'accompagnent dans le muscle vaste latéral d'une augmentation de la surface de section des fibres et de la capillarisation des fibres de type I et IIa (Maltais et al. 1996; Whittom et al. 1998; Vogiatzis et al. 2005; Vogiatzis et al. 2010; Vogiatzis et al. 2011). La protéosynthèse pourrait avoir été stimulée comme l'indique un contenu en ARNm d'IGF-1 plus élevé chez ces patients (Vogiatzis et al. 2007; Vogiatzis et al. 2010). La proportion de fibres de type I est également augmentée alors que celle des fibres de type IIb diminue significativement quelque soit le stade GOLD du patient (Vogiatzis et al. 2011). Puente-Maestu et al (Puente-Maestu et al. 2003) montrent en outre une meilleure oxygénation des tissus suite à un entraînement en endurance. Il y aurait donc avec le réentraînement une transition des fibres vers un métabolisme plus oxydatif.

Au niveau bioénergétique, les patients BPCO montrent, à la suite d'un réentraînement, une récupération plus rapide du niveau de PCr, ainsi qu'un ratio Pi/PCr et un pH

intracellulaire réduits pour une intensité d'exercice sous-maximale donnée (Sala et al. 1999). Ils ont donc une meilleure capacité à synthétiser les composés phosphates et donc à fournir l'énergie nécessaire à la contraction. Ces modifications concordent avec une augmentation de l'activité d'enzymes mitochondriales (CS et HAD) dans le muscle vaste latéral, suggérant une transition vers un métabolisme plus oxydatif dans ce muscle après entraînement (Maltais et al. 1996; Puente-Maestu et al. 2003; Vogiatzis et al. 2005). D'une manière générale, l'entraînement en endurance permet un retour à un métabolisme plus oxydatif, à l'inverse de ce qui est observé dans la mise en place de la dysfonction musculaire.

D'éventuels effets de la forme et de l'intensité de l'entraînement en endurance ont été explorés afin de déterminer les modalités d'entraînement les plus à même d'améliorer la fonction musculaire des patients. D'une manière générale, les programmes d'entraînement d'intensité élevée sont plus efficaces car ils permettent un degré d'amélioration de la performance plus élevé que ceux d'intensité plus faible (Casaburi et al. 1991; Ries et al. 1995; Clark et al. 1996; Maltais et al. 1996). Cependant, ils peuvent se révéler plus pénibles pour les patients, causant plus de dyspnées et d'inconfort (Rochester 2003).

L'efficacité d'un entraînement continu ou fractionné (par intervalle) a également été étudiée. Il ressort que bien qu'il n'y ait que peu d'effet de la forme d'entraînement sur les performances finales à charges de travail équivalentes, l'entraînement par intervalle présente l'avantage de minorer les symptômes à l'effort (dyspnée et inconfort au niveau des jambes) (Coppoolse et al. 1999; Vogiatzis et al. 2002; Vogiatzis et al. 2005; Arnardottir et al. 2007; Nasis et al. 2009; Kortianou et al. 2010). Ce type d'entraînement a donc été recommandé (Kortianou et al. 2010). Il pourrait favoriser une meilleure adhésion au programme d'entraînement et l'inclusion de patients sévèrement atteints, car la dyspnée est considérée comme un facteur de risque de faible adhésion à la réhabilitation pulmonaire (Sabit et al. 2008).

3.1.1.2 Entraînement en force

L'entraînement en force apparaît comme une modalité potentiellement intéressante pour les patients BPCO. En effet, chez le sujet sain, l'entraînement en force permet un meilleur gain en force et en masse musculaire. Appliqué au patient BPCO, un tel type d'entraînement pourrait mieux cibler la dysfonction musculaire et plus particulièrement la perte de masse.

L'entraînement en force est associé chez le patient BPCO à une augmentation de la force (Ricci-Vitor et al. 2013) et de la masse musculaire (Vogiatzis et al. 2010; Menon et al.

2012). Cette augmentation est proportionnellement similaire à celle d'un sujet sain contrôle du même âge (Constantin et al. 2013). Un tel mode d'entraînement conduit aussi à une meilleure endurance lors d'un exercice de pédalage à intensité sous-maximale (Simpson et al. 1992; Clark et al. 1996; Clark et al. 2000). Cependant, les auteurs ne notent pas d'augmentation de la VO_2 max symptôme limitée (Clark et al. 1996) ni de la distance parcourue lors du test de marche de 6 minutes (Simpson et al. 1992). La fatigabilité du muscle quadriceps est également diminuée suite à un entraînement en force chez le patient BPCO (Mador et Bozkanat 2001). Comme pour les entraînements en endurance, certaines études rapportent une amélioration pour une intensité donnée des rapports VO_2/VE et VCO_2/VE , signe d'un meilleur travail respiratoire (Clark et al. 1996). Ces améliorations s'accompagnent donc d'un meilleur score de dyspnée et aussi d'une meilleure gestion des activités de la vie quotidienne, comparativement à un groupe de patients non-entraînés (Simpson et al. 1992). L'entraînement en force semble donc une modalité intéressante à appliquer dans le cadre de la prise en charge des patients BPCO du fait de ses effets bénéfiques sur la masse et la fonction musculaire.

L'efficacité d'un entraînement en force et celle d'un entraînement en endurance ont été comparées. Spruit et al, (Spruit et al. 2002) observent des adaptations similaires avec les deux types d'entraînement. Ortega et al, (Ortega et al. 2002) notent quant à eux que, malgré des effets bénéfiques des deux modalités d'entraînement, les paramètres améliorés ne sont pas exactement les mêmes selon le type d'entraînement. L'endurance sous-maximale est ainsi augmentée de manière plus marquée avec l'entraînement en endurance, alors que la force et la distance de marche le sont plus avec l'entraînement en résistance.

La combinaison d'un entraînement en endurance et en force permet d'obtenir de meilleurs résultats. Ortega et al (Ortega et al. 2002) montrent ainsi une amélioration de l'endurance sous-maximale et de la force avec ce type d'entraînement et ces résultats sont encore visibles 12 semaines après la fin de la réhabilitation. De même, Bernard et al (Bernard et al. 1999) comparent un entraînement en endurance seule avec une combinaison force et endurance. Ils mettent en évidence une augmentation plus marquée de la force du quadriceps dans cette dernière modalité, ce type de résultat se retrouvant aussi pour les membres supérieurs. En revanche, la combinaison endurance-force n'a pas permis de provoquer une augmentation plus marquée des paramètres de qualité de vie, de dyspnée, de distance parcourue au TM6M, ni de charge de travail maximale qu'avec la condition endurance seule (Bernard et al. 1999; Ortega et al. 2002).

3.1.2 Limites du réentraînement

Nous venons de le voir, l'entraînement des patients BPCO permet un gain en termes de fonction musculaire et de qualité de vie. Il fait donc naturellement partie intégrante de la réhabilitation pulmonaire. Cependant, près d'un tiers des patients BPCO ayant suivi un protocole de réentraînement de 3 mois n'en retirent pas les bénéfices attendus, que ce soit en termes de qualité de vie et d'amélioration de la tolérance à l'effort (Garrod et al. 2006). Il apparaît que les patients présentant un IMC inférieur à 25 kg/m² sont les moins susceptibles de répondre au réentraînement (Vagaggini et al. 2009). Vogiatzis et al, montrent en 2010 que la réponse des patients cachectiques à un entraînement en endurance de haute intensité est différente de celle de patients non-cachectiques (Vogiatzis et al. 2010). Bien que la surface de section du quadriceps soit augmentée dans les deux populations suite à la réhabilitation, elle l'est de manière moins marquée dans le groupe de patients cachectiques ($7 \pm 2\%$ d'augmentation contre $11 \pm 2\%$ dans le groupe non cachectique). Ces réponses différentes peuvent s'expliquer en partie par des modifications d'expression protéique de facteurs de régulation de l'hypertrophie. Les auteurs montrent ainsi que l'expression protéique d'IGF-1 est significativement moins élevée par l'entraînement chez les patients cachectiques. Le contenu protéique en MyoD est augmenté et celui en myostatine diminué dans le groupe de patients non-cachectiques, alors qu'ils restent inchangés chez les cachectiques (Vogiatzis et al. 2010). Outre ces différences de régulation de la synthèse protéique, le versant protéolyse est également impacté différemment selon le statut cachectique ou non du patient. L'expression des ubiquitines ligases MAFbx et MuRF1 est ainsi augmentée chez les patients cachectiques alors qu'elle ne varie pas chez les patients à l'IMC normal (Vogiatzis et al. 2010). Cette non-réponse au réentraînement constatée chez une part non-négligeable des patients BPCO n'est qu'incomplètement expliquée et comprise. Certains auteurs avancent que l'inflammation et le stress oxydant pourraient être impliqués du fait de leur rôle dans la mise en place de la cachexie (Eagan et al. 2010; Remels et al. 2013). De plus, le contrôle épigénétique de la traduction de gènes de réponse à l'entraînement paraît altéré chez les patients cachectiques, semblant interdire toute réponse intégrée à l'exercice (Turan et al. 2011).

Une autre limite du réentraînement repose sur la faible adhésion des patients à ce type de réhabilitation. Dans l'étude de Garrod et al, un tiers des patients ne termine pas le protocole de réentraînement (Garrod et al. 2006). Cette faible adhérence au réentraînement physique serait à relier à des facteurs tels que l'isolement social, la dépression, l'anxiété,

l'éloignement géographique du centre de réhabilitation, une perception faible des bénéfices, la sévérité de la BPCO, la susceptibilité à l'hyperventilation, la dyspnée et la peur de la dyspnée (Young et al. 1999; Sabit et al. 2008; Moore et al. 2012).

Une autre limite du réentraînement est la production accrue d'espèces radicalaires lors d'un exercice qui pourrait augmenter le stress oxydant. Chez le patient BPCO, un entraînement en endurance de 3 semaines provoque effectivement une élévation de la production d'espèces réactives nitrées, comme l'oxyde nitrique par exemple, qui s'accompagne d'une hausse de la nitration de protéines et de la production d'adduits HNE. Les auteurs ne rapportent pas d'augmentation parallèle de l'activité de la SOD contrairement à ce que l'on observe chez le sujet sain (Hollander et al. 1999; Barreiro et al. 2009) montraient quant à eux une réduction de la resynthèse de glutathion réduit (antioxydant) suite à un entraînement en endurance de 8 semaines, avec un effet plus marqué chez les patients de faible IMC (Rabinovich et al. 2006). Suite à cette étude, les bienfaits d'un entraînement en endurance dans le cadre de la prise en charge de la BPCO ont été nuancés. En effet, et comme évoqué précédemment, le stress oxydant est suspecté d'être une cause majeure de la dysfonction musculaire du patient BPCO. Or, l'exercice physique est inducteur d'une élévation de la production d'espèces radicalaires conduisant à un stress oxydant accru (Davies et al. 1982). Dans le cadre d'un entraînement chez le sujet sain, les exercices répétés aboutissent à l'amélioration des capacités anti-oxydantes de l'organisme, le rendant plus à même de faire face à une production augmentée d'espèces réactives (Hollander et al. 1999; Hollander et al. 2001; Ji et al. 2004). Malgré l'augmentation de production radicalaire et l'absence d'amélioration des défenses antioxydantes, Rabinovich et al, ne mettaient toutefois pas en évidence d'effet délétère du stress oxydant comme des peroxydations lipidiques (Rabinovich et al. 2001; Rabinovich et al. 2006).

Rodriguez et al, (Rodriguez et al. 2012) confirment qu'un entraînement d'une durée suffisante (8 semaines comparativement à 3 semaines dans l'étude de Barreiro et al, (Barreiro et al. 2009)) n'élève pas le stress oxydatif et nitrique, indiquant que l'augmentation observée par Barreiro et al, pourrait être seulement transitoire, tant que le système antioxydant ne s'est pas adapté.

La durée d'entraînement ressort donc comme un paramètre important à prendre en compte dans le cadre des réhabilitations pulmonaires. Il doit être suffisamment long pour permettre une amélioration des défenses antioxydantes.

En résumé, le réentraînement apparaît comme une stratégie efficace de limitation de la dysfonction musculaire chez les patients BPCO. Des gains en termes de force, d'endurance et de réduction de la fatigabilité peuvent être obtenus et sont à relier à des modifications du muscle à la fois quantitatives (hypertrophie) et qualitatives (amélioration des capacités oxydantes, changements de typologie, capillarisation augmentée...). Cependant, environ un tiers des patients inclus dans un programme de réhabilitation pulmonaire ne répond pas au réentraînement et n'en retire donc aucun bénéfice. De même, une forte proportion de patients n'adhère pas aux protocoles de réhabilitation et/ou abandonne au cours du programme. Ces limites du réentraînement encouragent donc l'exploration d'autres pistes de prise en charge de la dysfonction musculaire.

3.2 Hormones anaboliques

La croissance normale du muscle requiert la présence de certaines hormones et notamment de l'hormone de croissance (GH) qui stimule la production d'IGF-1 dans le muscle et le foie, et les hormones stéroïdiennes anabolisantes comme la testostérone. Or plusieurs études ont montré une baisse du taux circulant de ces hormones chez le patient BPCO (cf partie origines de la dysfonction). De plus, des études chez le sujet sain mettent en évidence une augmentation de la masse musculaire suite à la prise d'hormone de croissance (Kaiser et al. 1991) ou de stéroïdes anabolisants (Bhasin et al. 1996).

3.2.1 Hormones stéroïdiennes

Plusieurs études ont rapporté une augmentation du poids et plus particulièrement de la masse maigre chez des patients BPCO traités par hormones stéroïdiennes (Schols et al. 1995; Ferreira et al. 1998; Casaburi et al. 2004). Le gain de force est plus controversé. Certaines études le mettent en évidence (Casaburi et al. 2004), notamment lorsqu'une supplémentation nutritionnelle hautement calorique est associé au traitement hormonal (Schols et al. 1995), mais pas toutes (Ferreira et al. 1998).

Les effets d'un traitement aux hormones anabolisantes se révèlent plus marqués lorsqu'il est amené en complément de la réhabilitation physique et nutritionnelle (Creutzberg et al. 2003; Casaburi et al. 2004).

3.2.2 Hormones de croissance et IGF-1

Un traitement à l'hormone de croissance chez des patients BPCO en sous-poids permet un gain de masse musculaire qui se maintient même deux mois après la fin du traitement (Burdet et al. 1997). Néanmoins, il ne semble pas induire d'amélioration de la force (Pichard et al. 1996). Il conduirait même à une diminution de la distance parcourue au TM6M chez les patients traités par rapport aux patients prenant un placebo (Burdet et al. 1997).

La ghréline est une hormone activatrice de la sécrétion de GH. Elle a été donnée à des patients BPCO cachectiques pendant 3 semaines qui ont pu voir leur poids augmenter lors du traitement, et notamment leur masse maigre. Ceci s'est accompagné d'une augmentation de la force développée par les muscles respiratoires et périphériques, ainsi que de la distance parcourue au TM6M (Nagaya et al. 2005). Cependant, les résultats de cette étude sont controversés du fait de l'absence d'un groupe contrôle et/ou d'un groupe placebo. De plus, elle n'était ni randomisée ni réalisée en double-aveugle (Lainscak et al. 2006). Des études plus contrôlées sont donc nécessaires pour étayer ces résultats. Dans 2 études plus récentes, randomisées et en double-aveugle, les effets de la ghréline couplée à un protocole de réhabilitation pulmonaire ont été comparés à la réhabilitation pulmonaire associée à la prise d'un placebo (Miki et al. 2012; Miki et al. 2013). Dans ces études, la distance parcourue au TM6M est augmentée dans les deux groupes de patients à l'issue du traitement de 3 semaines, mais cet effet perdure encore 4 semaines après l'arrêt du traitement uniquement chez les patients prenant le ghréline. Elle permet donc un maintien des effets de l'entraînement plus prolongé dans le temps. La VO_2 est elle aussi augmentée par la prise de ghréline mais le temps d'endurance ne l'est pas alors qu'il est amélioré dans le groupe placebo. En revanche, la force des muscles respiratoires apparaît augmentée dans le groupe ghréline lorsqu'elle est mesurée 4 semaines après la fin du traitement. Ces changements s'accompagnent d'une amélioration du score obtenu au questionnaire de la qualité de vie Saint George et également du score de dyspnée. Aucune amélioration de la force des muscles périphériques n'a pu être mise en évidence. Les effets de la ghréline ou de l'hormone de croissance chez le patient BPCO apparaissent peu marqués et semblent donc peu reliés à la capacité d'exercice des patients.

3.3 Intervention nutritionnelle

Comme évoqué précédemment, près d'un quart des patients BPCO souffre de cachexie (Wagner 2008). Si la dénutrition n'est pas considérée comme la seule responsable dans l'installation de cet état (Schols et al. 1991; Eagan et al. 2010; Remels et al. 2013), la supplémentation nutritionnelle apparaît cependant comme une piste logique pour limiter la cachexie.

De nombreuses études se sont intéressées à la supplémentation nutritionnelle dans le cadre de la prise en charge de la BPCO. En effet, la perte de masse musculaire observée chez les patients découlerait notamment d'un métabolisme basal plus élevé et requerrait donc un apport nutritionnel augmenté. Une supplémentation nutritionnelle pourrait donc participer au rétablissement du poids corporel, de la masse musculaire et par conséquent de la fonction musculaire.

Plusieurs études portant sur la prise d'une supplémentation nutritionnelle visant à augmenter les apports caloriques ont obtenu des résultats dans ce sens, mais ils sont souvent de faible ampleur (Efthimiou et al. 1988; Whittaker et al. 1990; Rogers et al. 1992). Des études ne montrent même aucun effet significatif d'une supplémentation nutritionnelle plus calorique (Sridhar et al. 1994). Si une augmentation du poids corporel est parfois obtenue, elle n'est cependant pas, ou seulement faiblement, accompagnée d'une amélioration de paramètres pulmonaires, de force et de la capacité fonctionnelle (test de marche de 12 minutes) (Lewis et al. 1987; Schols et al. 1995). L'augmentation de la masse lorsqu'elle est présente est en fait essentiellement causée par une masse grasse plus importante alors que la masse maigre reste inchangée (Schols et al. 1995). Une amélioration de paramètres tels que la qualité de vie et un score de dyspnée diminué sont tout de même des effets observés (Weekes et al. 2009).

Des résultats plus convaincants en terme de gain de masse musculaire, de force et de capacité d'exercice sont toutefois obtenus lorsque la supplémentation calorique est apportée en parallèle d'un programme de réentraînement ou de réhabilitation pulmonaire (Schols et al. 1995; Creutzberg et al. 2003; Steiner et al. 2003; Pison et al. 2011; Gurgun et al. 2013), même si une étude ne rapporte pas d'effet (Constantin et al. 2013).

Une méta-analyse concluait en 2000 à l'inefficacité des suppléments caloriques chez le patient BPCO (Ferreira et al. 2000). Mais deux méta-analyses plus récentes montrent quant à elles des effets bénéfiques de l'intervention nutritionnelle sur la prise de masse, principalement chez les patients dénutris, sur la force des muscles respiratoires, la

performance au test de marche de 6 minutes et la qualité de vie (Ferreira et al. 2012; Collins et al. 2013).

Les disparités de résultats observées pourraient s'expliquer par le fait que certains patients restent malgré tout non-répondeurs à ce type d'intervention (Schols et al. 1995). Cette non-réponse à la réhabilitation nutritionnelle serait associée au vieillissement, ainsi qu'à un niveau d'inflammation systémique et d'anorexie plus élevé chez les moins bon répondeurs (Creutzberg et al. 2000; Koehler et al. 2007). Le choix de la population à laquelle est appliquée la réhabilitation nutritionnelle, plus ou moins âgée, dénutrie ou sujette à l'inflammation, pourrait donc influencer sur les résultats et expliquer les écarts observés entre les études.

L'intervention nutritionnelle généralement proposée aux patients BPCO repose principalement sur une rééquilibration des apports caloriques pour faire face à l'augmentation des dépenses énergétiques liées à l'hypermétabolisme de repos et au coût respiratoire accru. Seule, elle apparaît modérément efficace, induisant peu d'effets bénéfiques en termes de force. Cependant, les différences de protocoles, tant pour le contenu des suppléments que pour la quantité et la durée des interventions ne permettent pas de trancher quant à son efficacité. En effet, la forme de l'intervention et son contenu pourrait avoir une importance qu'il conviendrait de caractériser pour aboutir aux meilleures recommandations. Nombre de paramètres sont ainsi à prendre en compte et pourraient expliquer les divergences de résultats observées. Une étude montre notamment que, malgré un apport en énergie inférieur, une supplémentation dont la dose journalière à ingérer est moins volumineuse résulte en des gains de poids supérieurs (Broekhuizen et al. 2005). Cette étude met l'accent sur l'importance de la forme d'administration de la supplémentation. Le contenu de l'intervention nutritionnelle et notamment les propriétés des nutriments qui la constituent sont également des données importantes. Comme évoqué dans les parties précédentes, les patients BPCO souffrent de cachexie et plus particulièrement de fonte musculaire. Ils ont également un statut oxydant et inflammatoire élevé qui participerait à la mise en place de la cachexie et des atteintes musculaires. L'apport de nutriments agissant spécifiquement sur ces paramètres pourrait permettre d'améliorer l'état de santé des patients.

La créatine, par exemple, est une protéine qui, si elle est augmentée dans le muscle pourrait améliorer la performance physique en élevant le contenu en phosphagènes disponibles pour une plus rapide resynthèse d'ATP. Ceci revêt une importance particulière chez le patient BPCO dont le contenu musculaire en phosphagènes est abaissé (Fiaccadori et al. 1987). Une supplémentation en créatine chez les patients induit effectivement des effets

positifs qui sont une augmentation du poids corporel et de la masse maigre, plus marqués qu'avec la réhabilitation physique seule. La capacité d'exercice n'est pas améliorée, mais, au niveau musculaire, la supplémentation en créatine résulte en une augmentation de la force des membres inférieurs et supérieurs (Fuld et al. 2005). Un réentraînement était ensuite ajouté et les gains en force étaient significativement plus élevés dans le groupe créatine par rapport au groupe seulement réentraîné et sous placebo. Ceci s'accompagne d'une meilleure qualité de vie. Une intervention nutritionnelle qualitative avec des nutriments aux propriétés intéressantes semble donc induire des effets positifs pour les patients. Mais là aussi, d'autres études sont nécessaires pour mettre au point les modalités car cet effet n'est pas retrouvé dans d'autres études (Faager et al. 2006; Deacon et al. 2008) où il n'y avait pas de pré-charge en créatine.

Toujours avec l'idée d'apporter des nutriments aux propriétés intéressantes, une étude a évalué les effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés (AGPI), majoritairement oméga-3 (n-3), sur la capacité d'exercice (puissance et endurance) de patients BPCO inclus dans un programme de réentraînement (Broekhuizen et al. 2005). Les AGPI n-3 sont connus pour exercer une action anti-inflammatoire (Calder 2013). Le rôle de l'inflammation dans l'étiologie de la cachexie et de la dysfonction musculaire laisse penser que des nutriments aux propriétés anti-inflammatoires pourraient avoir des effets bénéfiques sur le tissu musculaire. De plus, Creutzberg et al, avait mis en évidence un lien entre le degré d'inflammation et la non-réponse à l'intervention nutritionnelle. Les propriétés anti-inflammatoires des AGPI n-3 pourraient permettre de limiter les cas de non-réponse et d'augmenter l'ampleur des effets (Creutzberg et al. 2000). Une augmentation du temps d'endurance et de la puissance développée ont été retrouvées chez tous les patients mais de manière plus marquée pour ceux qui étaient supplémentés en AGPI en plus du réentraînement. Les AGPI n-3 semblent donc une piste d'intervention nutritionnelle très prometteuse. Dans la prochaine partie de ce travail, nous nous intéresserons aux propriétés des acides gras polyinsaturés et à leur intérêt éventuel dans la prise en charge de la dysfonction musculaire.

En résumé, les interventions nutritionnelles de type qualitatif produisent des résultats positifs concernant la fonction musculaire et la capacité d'exercice. Elles se révèlent cependant plus efficace lorsqu'elles sont associées à un réentraînement. La prise en compte des aspects qualitatifs des nutriments apportés dans le cadre d'une réhabilitation nutritionnelle semble une piste de recherche particulièrement intéressante

au vu des résultats prometteurs concernant la capacité d'exercice obtenus avec une supplémentation riche en acides gras n-3.

4. ACIDES GRAS POLYINSATURES ET DYSFONCTION MUSCULAIRE

Bien que souvent décriés en raison de leur implication dans certaines pathologies, les lipides ont cependant différents rôles physiologiques cruciaux qui les rendent indispensables :

- réserves intracellulaires d'énergie,
- matériaux de structure des membranes biologiques,
- précurseurs de médiateurs lipidiques modulateurs de nombreuses fonctions cellulaires comme les hormones stéroïdes, des messagers intracellulaires, des facteurs de transcription...

Ils apparaissent donc comme des éléments fondamentaux de notre alimentation, d'autant que certains de ces lipides sont essentiels et ne sont donc apportés à l'organisme que *via* l'alimentation. Les recommandations du PNNS conseillent d'ailleurs que la part lipidique dans l'alimentation représente 35 à 40% des apports nutritionnels conseillés (ANSES 2011).

4.1 Structure générale des acides gras et nomenclature

Les acides gras sont les principaux constituants des lipides. Ils ont tous en commun d'être constitués d'une chaîne hydrocarbonée portant à l'une de ses extrémités un groupement carboxyle (-COOH) et à l'autre un groupement méthyle (-CH₃) (figure 23).

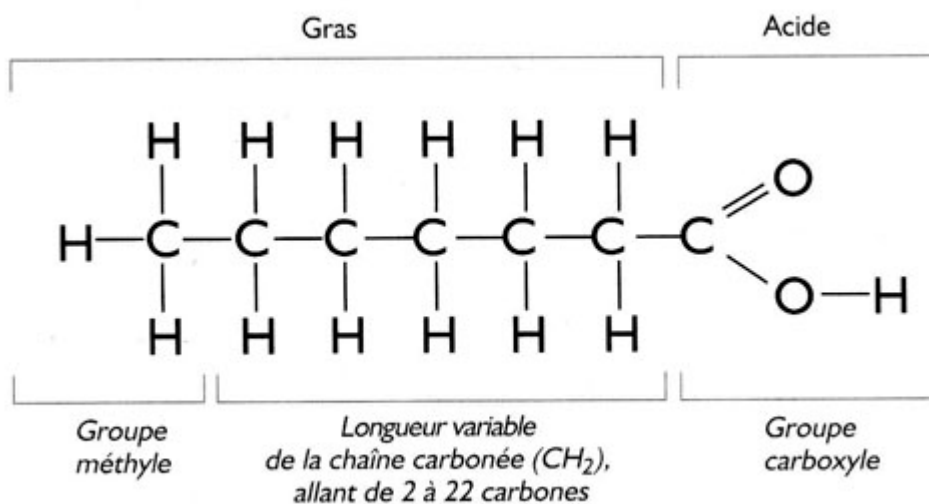


Figure 23:
Représentation schématique d'un acide gras

La nomenclature des acides gras (tableau 3) repose sur plusieurs paramètres:

Tableau 3:
Symboles, noms et noms courants de plusieurs acides gras saturés et insaturés.

	Symbole	Nom	Nom courant
Acides gras saturés	C12 : 0	Acide dodécanoïque	Acide laurique
	C14 : 0	Acide tétradécanoïque	Acide myristique
	C16 : 0	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique
	C18 : 0	Acide octadécanoïque	Acide stéarique
Acides gras monoinsaturés	C16 : 1 (n-9)	Acide hexadécénoïque	Acide palmitoléique
	C18 : 1 (n-9)	Acide octadécénoïque	Acide oléique
	C18 : 1 (n-7)	Acide octadécénoïque	Acide vaccénique
Acides gras polyinsaturés n-6	C18 : 2 (n-6)	Acide octadécadiénoïque	Acide linoléique (LA)
	C18 : 3 (n-6)	Acide octadécatriénoïque	Acide γ -linoléique (GLA)
	C20 : 3 (n-6)	Acide eicosatriénoïque	Acide dihomo- γ -linoléique (DGLA)
	C20 : 4 (n-6)	Acide eicosatétraénoïque	Acide arachidonique (ARA)
	C22 : 5 (n-6)	Acide docosapentaénoïque	DPA
Acides gras polyinsaturés n-3	C18 : 3 (n-3)	Acide ostadécatriénoïque	Acide α -linoléique (ALA)
	C20 : 5 (n-3)	Acide eicosapentaénoïque	EPA
	C22 : 6 (n-3)	Acide docosahexaénoïque	DHA

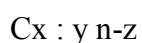
-le nombre d'atomes de carbone de leur chaîne. Il peut varier de 4 à plus de 24 carbones. Si le nombre d'atomes de carbone est inférieur à 10, on parle alors d'acide gras à chaîne courte ou moyenne (AGCM). S'il est égal ou supérieur à 12, ce sont alors des acides gras à longue chaîne (AGLC).

- le nombre d'insaturations (ou double-liaisons) portées par la chaîne carbonée. C'est le deuxième paramètre apparaissant dans la nomenclature. Il peut y en avoir jusqu'à 6 sur un acide gras.

- l'emplacement de la première double-liaison sur le squelette carboné. Il constitue la troisième information mentionnée par la nomenclature. En nutrition, il est défini en partant de l'extrémité méthyle de la molécule. Ainsi, un acide gras dont la première double-liaison se situe sur le troisième carbone en partant de l'extrémité méthyle est un acide gras n-3 (ou ω 3), s'il se trouve sur le 6^{ème} carbone, ce sera un acide gras n-6 (ou ω 6).

- enfin, les mentions « cis » et « trans » peuvent être ajoutées et indiquent la position des atomes d'hydrogène autour de la double liaison. Selon que l'acide gras possède des insaturations cis (les deux atomes d'hydrogènes adjacents sont du même côté) ou trans (les deux atomes d'hydrogènes adjacents sont de part et d'autre de la chaîne carbonée), alors sa conformation spatiale, et donc ses propriétés, seront différentes. En conformation cis, la chaîne carbonée forme des coudes au niveau des insaturations du fait de la position des atomes d'hydrogène, alors qu'en configuration trans la chaîne reste plus droite. Cette dernière conformation rend l'acide gras moins souple et élève sa température de fusion.

En utilisant toutes ces informations, la nomenclature des acides gras est donc la suivante :



où x représente le nombre d'atomes de carbone, y le nombre d'insaturations et n-z l'emplacement de la première double liaison s'il y en a au moins une. Par exemple, l'acide oléique s'écrira : C18:1, n-9 car il possède 18 carbones et une insaturation située sur le 9^{ème} carbone compté depuis l'extrémité méthyle.

Cette nomenclature permet de classer les acides gras en 3 groupes : les acides gras saturés (AGS), qui ne possèdent aucune double-liaison, les acides gras mono-insaturés (AGMI), qui en possèdent une, et les acides gras polyinsaturés (AGPI) qui en possèdent au moins deux (figure 24).

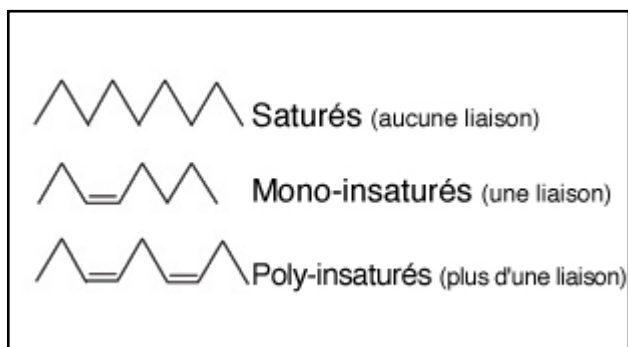


Figure 24:

Représentation schématique de chaînes d'acides gras présentant ou non des doubles-liaisons, un acide gras insaturé à 9 carbones, un acide gras mono-insaturé à 8 carbones et une seule double liaison) et un acide gras polyinsaturé à 9 carbones et deux doubles-liaisons.

Pour ce travail, nous nous intéresserons aux AGPI qui seront plus amplement décrits dans les parties suivantes.

4.2 Les acides gras polyinsaturés (AGPI)

Comme indiqué précédemment, les AGPI ont au moins deux double-liaisons sur leur chaîne carbonée. Ces acides gras particuliers sont eux-mêmes subdivisés en catégories selon l'emplacement de leur première insaturation. Il existe des AGPI n-9 et n-7, mais les deux principales familles, auxquelles nous nous intéresserons, sont les AGPI de la série n-3 et les AGPI de la série n-6. Ces deux familles d'AGPI ne sont pas convertibles entre elles et pourront avoir des effets très différents.

4.2.1 Sources et métabolisme des AGPI

Les AGPI de la série n-6 dérivent de l'acide linoléique (LA, C18:2, n-6) qui est un acide gras essentiel que l'on trouve par exemple dans les huiles végétales (tournesol, soja, maïs) et les noix (tableau 4).

Les AGPI de la série n-3 dérivent pour leur part de l'acide α -linoléique (ALA, C18:3, n-3) qui est lui aussi un acide gras essentiel apporté par certaines huiles végétales (lin, colza), graines et fruits à coques (comme les noix) (tableau 4).

Tableau 4:

Contenus en acide linoléique (LA), acide α -linoléique (ALA), acide arachidonique (ARA) et acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) de différents aliments, exprimés en mg/100g, le contenu en n-6 et n-3 peut varier légèrement selon la source du produit. D'après (Russo 2009).

Produit	LA	ALA	ARA	EPA + DHA
Riche en n-6				
Huile de maïs	50 000	900	-	-
Huile de coton	47 800	1000	-	-
Huile de soja	53 400	7 600	-	-
Huile de tournesol	60 200	500	-	-
Lard	8 600	1 000	1 070	-
Bacon	6 080	250	250	-
Amande	9 860	260	-	-
Noix	34 100	6 800	590	-

Produit	LA	ALA	ARA	EPA + DHA
Riche en n-3				
Huile de colza	19 100	8 600	-	-
Huile de graine de lin	13 400	55 300	-	-
Hareng	150	61.66	36.66	1 700
Saumon	440	550	300	1 200
Truite	74	-	30	500
Thon	260	270	280	400
Morue	4	2	3	300

A partir de ces acides gras essentiels, notre organisme (et celui des animaux en général) est capable de produire des dérivés comportant plus d'atomes de carbones et plus de double-liaisons (figure 25).

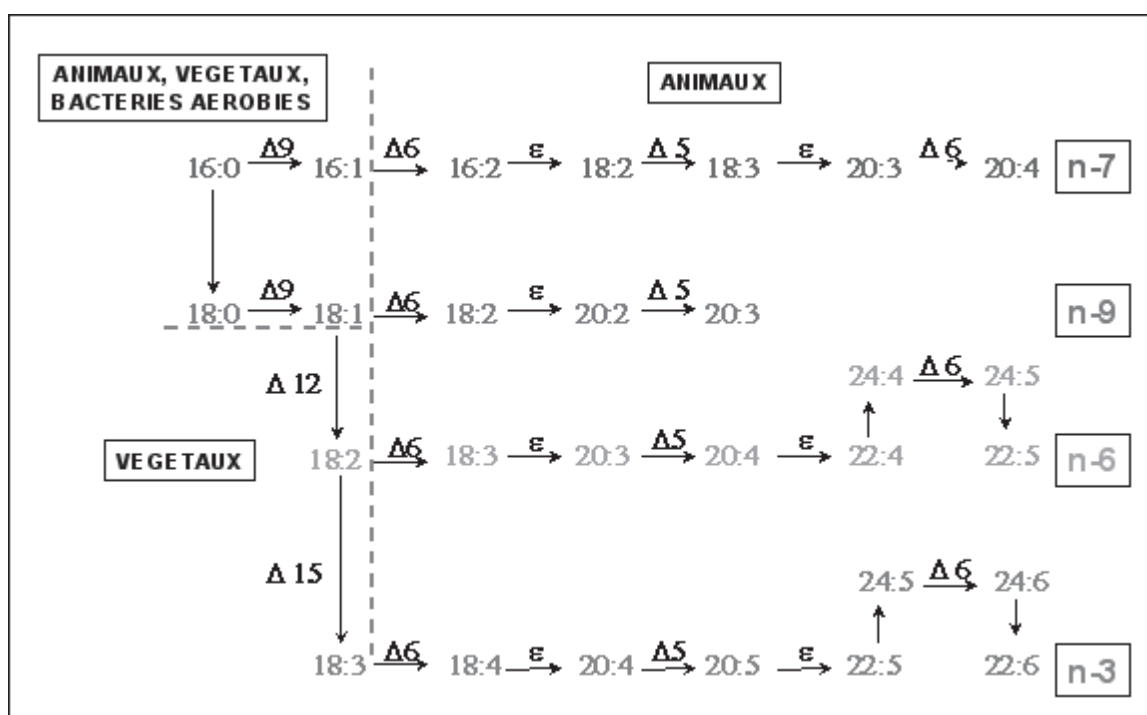


Figure 25:

Conversion des acides gras polyinsaturés essentiels n-3 et n-6 issus des plantes vers leurs dérivés à chaîne plus longue et plus insaturée. Le symbole Δ indique une désaturation avec la place de la double liaison introduite repérée à partir du groupe carboxyle COOH. Le symbole ϵ indique une élongation. (Legrand 2007)

Ainsi, un système enzymatique constitué d'enzymes élongases et désaturases va permettre, *via* plusieurs étapes situées dans le réticulum endoplasmique et dans une moindre

mesure dans la mitochondrie (Mohrhauer et al. 1967), la conversion de l'acide linoléique en acide γ -linoléique (C18:3, n-6) puis en acide arachidonique (ARA, C20:4, n-6) (Marcel et al. 1968) (figure 25).

L'acide α -linoléique va quant à lui être désaturé et élongué pour former de l'acide eicosapenténoïque (EPA, C20:5, n-3). Un nouveau jeu de désaturation et élongation aboutit à la conversion de l'EPA en acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, n-3) qui est l'acide gras polyinsaturé le plus long qui puisse être formé (Klenk et Mohrhauer 1960). Le taux de conversion de l'ALA en DHA est très faible. Il est donc nécessaire de compléter cette voie par l'apport, *via* la nutrition, de quantités suffisantes de DHA (Burdge et al. 2002; Plourde et Cunnane 2007) (figure 25).

Un mécanisme de rétro-conversion permet la synthèse d'EPA à partir de DHA par un cycle d'oxydation dans les mitochondries ou dans les peroxysomes (Gronn et al. 1991). Chez l'Homme, il a été estimé que 0,5 à 4% du DHA exogène sont rétro-convertis en EPA (Brossard et al. 1996; Burdge 2004).

En plus de la synthèse à partir de leurs précurseurs respectifs, l'ARA, l'EPA et le DHA peuvent être amenés directement à l'organisme par l'alimentation (tableau 4). On trouve l'EPA et le DHA en quantité dans les poissons, crustacés et algues. L'ARA sera principalement apporté par des viandes et les œufs (Legrand 2007).

4.2.2 Le ratio n-6/n-3

Les enzymes requises pour la désaturation et l'élongation des acides gras sont les mêmes pour les n-6 et pour les n-3. Ceci a pour conséquence une compétition entre les 2 familles d'AG pour ces enzymes en vue de la synthèse et donc de la disponibilité de leurs acides gras dérivés (Legrand 2003).

A niveau de n-6 constant dans l'alimentation, une augmentation de l'apport en n-3 inhibe la synthèse des produits de LA (Mohrhauer et Holman 1963). Inversement, à niveau constant de n-3, un apport plus important de n-6 inhibe la synthèse des dérivés d'ALA (Rahm et Holman 1964). L'inhibition de la synthèse des dérivés de LA (n-6) est obtenue pour des quantités 10 fois plus faibles de n-3 que la quantité de n-6 requise pour l'inhibition de conversion de ALA en ses dérivés. Les acides gras saturés participent avec les n-3 à l'inhibition de la synthèse des dérivés de LA (Mohrhauer et al. 1967).

En situation d'apport alimentaire équilibré, la voie de biosynthèse des AGPI n-6 s'arrête à l'acide arachidonique. Elle se poursuit au-delà lorsque cet apport est déficient en

AGPI n-3, conduisant à la synthèse d'acide docosapentaénoïque (C22 :5 n-6) en compensation de la diminution de la synthèse du DHA (Zhou et al. 2006). L'équilibre entre les apports en n-3 et n-6 apparaît donc important pour la synthèse des différents dérivés.

Il est souvent considéré que, pour une synthèse équilibrée des différents dérivés d'ALA et LA, le ratio entre les n-6 et n-3 apportés par l'alimentation doit rester faible. Un ratio élevé serait relié à l'apparition de pathologies chroniques (Simopoulos 2006; Simopoulos 2007; Simopoulos 2008). Cependant, la pertinence du ratio seul pour établir des recommandations est débattue (Harris 2006). En effet, les défauts de ce ratio sont qu'il ne tient compte ni de la quantité des AG apportés ni de la proportion des différents AGPI au sein des deux familles n-6 et n-3, alors même que les effets du DHA, de l'EPA et de l'ALA sont différents, tout comme ceux de l'ARA et de l'AL. Sanders montre ainsi en 2006 que des effets bénéfiques observés chez des sujets dont on a baissé le rapport n-6/n-3 ne sont obtenus que si le changement de ratio est dû à un apport plus élevé en DHA et EPA et non en ALA (Sanders et al. 2006). De plus, le ratio ne fournit pas d'informations sur la quantité absolue des AGPI des deux familles. Un ratio n-6/n-3 diminué peut par exemple être le fruit d'une hausse de n-3, comme d'une baisse des n-6 ou le changement des deux à la fois. Wijendran rapportent ainsi que la diminution du ratio n-6/n-3 ne devrait pas s'effectuer par une diminution de l'apport en n-6, qui possèdent eux aussi des propriétés bénéfiques, mais plutôt par un apport en n-3 supérieur (Wijendran et Hayes 2004; Ruf et al. 2006).

Bien qu'il soit souvent utilisé et amène des informations intéressantes, il convient toutefois d'être prudent lorsque l'on utilise le ratio n-6/n-3.

4.2.3 Les AGPI dans l'alimentation occidentale

4.2.3.1 Un peu d'histoire

L'étude des sociétés de chasseurs-cueilleurs du paléolithique, et plus particulièrement de leurs habitudes alimentaires, nous révèle que leur nourriture était pauvre en acides gras saturés et que les quantités d'AGPI n-3 et n-6 consommées étaient relativement similaires (ratio de 1 à 2 : 1) (Eaton et Konner 1985; Simopoulos 2001). Avec le développement de l'agriculture, du fait d'une disponibilité en nourriture différente, les apports en céréales se sont accrus, tout comme en glucides et en gras (Simopoulos 2001). Ces modifications de régime alimentaire se sont accélérées lors de ces 150 dernières années avec une forte augmentation de la part des acides gras saturés et des AGPI n-6 dans l'alimentation,

notamment du fait d'une consommation accrue d'huile de graine de maïs et de graine de coton (Benatti et al. 2004) (figure 26). Une forte consommation de viande est aussi à l'origine d'un plus grand contenu en ARA (Phinney et al. 1990).

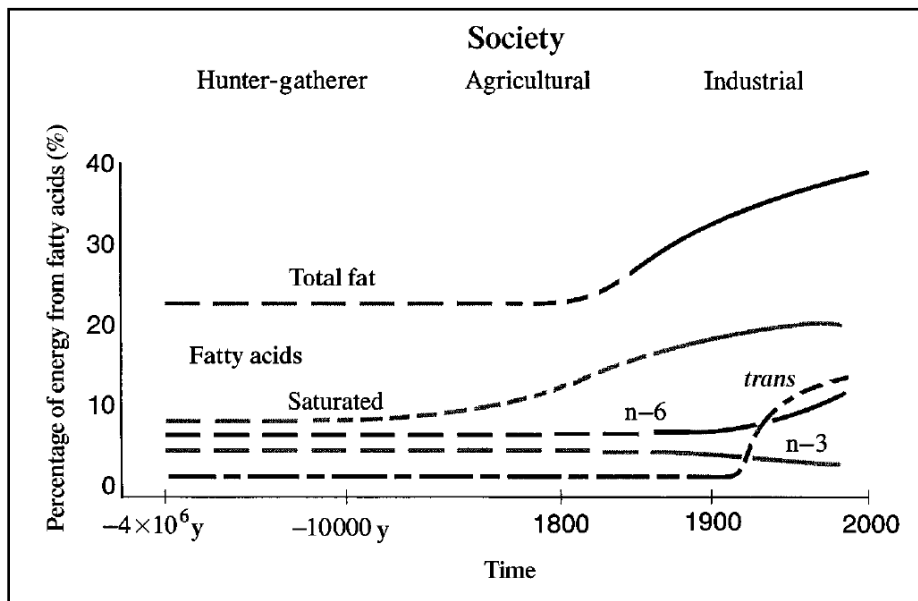


Figure 26:

Pourcentage hypothétique des apports énergétiques à base d'acides gras par grandes familles en nutrition humaine, extrapolés à partir d'études transversales de populations contemporaines des chasseurs-cueilleurs et d'études longitudinales d'observation lors des 100 dernières années. (Simopoulos 1999).

Il semble donc que le régime occidental soit trop riche en gras total. La part des acides gras saturés, n-6 et trans dans la consommation globale d'acides gras est par ailleurs nettement augmentée dans ce régime, tandis que celle des AGPI n-3 se trouve diminuée. Ceci produit une forte hausse du ratio n-6/n-3 dans le régime occidental. Les estimations selon les pays sont variables, mais il est proche de 15-16 aux Etats-Unis et en Europe du nord avec un apport en DHA et EPA journalier d'environ 100 mg (Sanders 2000; Ervin et al. 2004). Les recommandations de l'ANSES conseillent pourtant que le ratio n-6/n-3 soit inférieur à 5 pour obtenir des effets protecteurs au niveau cardiovasculaire (AFSSA 2001). Outre le maintien du ratio, l'ANSES recommande également que la dose journalière d'EPA et DHA confondus soit de 500 mg (ANSES 2011). Au Japon, où la consommation de produits de la mer est importante, le ratio-6/n-3 inférieur à 4 est associé à une consommation de gras total dans les limites des apports nutritionnels recommandés (26%) (Sugano et Hirahara 2000). Les auteurs font l'hypothèse que ce faible ratio serait une explication à l'espérance de vie élevée et à la

faible prévalence des maladies cardiovasculaires dans la population japonaise. Cependant, ils n'évaluent pas la corrélation entre ces paramètres et le ratio n-6/n-3.

4.2.3.2 *Recommandations*

Comme indiqué précédemment, le LA et l'ALA sont des acides gras essentiels. Notre organisme ne possède pas l'équipement enzymatique permettant d'insérer les doubles liaisons nécessaires à leur formation comme le font les plantes. Il est donc nécessaire d'amener par l'alimentation ces deux acides gras qui sont de fait considérés comme essentiels. La conversion de l'ALA en DHA étant faible (Plourde et Cunnane 2007), le DHA est lui aussi proposé comme acide gras indispensable. Cette essentialité des AGPI LA, ALA et DHA se retrouve dans les recommandations établissant les apports nutritionnels conseillés de l'ANSES (ANSES 2011) (tableau 5).

Tableau 5:

Recommandations de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) concernant l'apport en acides gras dans l'alimentation. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'apport énergétique, sauf pour le DHA et l'EPA où elles sont exprimées en mg.

		Besoins physiologiques minimaux	Prévention du risque	
			Syndrome métabolique, diabète et obésité	Maladies cardiovasculaires
Lipides totaux (%)		30	30-40	35-40
AG indispensables	Acide linoléique LA : C18:2 n-6	2	2	5
	Acide α -linoléique ALA : C18:3 n-3	0,8	0,8	1
	Acide docosahexaénoïque DHA : C22:6 n-3	250 mg	500 mg	500 à 750 mg
	Acide eicosapentaénoïque EPA : C20:5 n-3	-		
AG non- indispensables	Acide laurique (C12:0) + acide myristique (C14:0) + acide palmitique (C16:0)	-	-	≤ 8
	Acides gras saturés totaux	-	-	≤ 12
	Acide oléique (C18:1 n-9)	-	-	≤ 20

4.2.4 Rôles des AGPI

4.2.4.1 Rôle structural

Lorsqu'ils sont sous forme de phospholipides, les AGPI sont des constituants des membranes biologiques.

Si le contenu en AGPI des membranes augmente, leur fluidité et leur souplesse sont elles aussi accrues (Stillwell et Wassall 2003; Rajamoorthi et al. 2005). Ceci s'explique par le fait que plus il y a d'insaturations sur la chaîne carbonée, plus celle-ci est souple (Feller et Gawrisch 2005). Les AGPI n-3 possédant une double-liaison de plus que les AGPI n-6 pour un même nombre de carbone, ils sont plus souples que ces derniers et se révèlent donc plus intéressants de ce point de vue (Stillwell et Wassall 2003; Schmitz et Ecker 2008). En effet, une seule insaturation supplémentaire est suffisante pour induire des conséquences significatives sur la fluidité membranaire (Eldho et al. 2003). Une étude sur des modèles de bicouches phospholipidiques semble néanmoins indiquer que les membranes de n-6 pourraient être plus déformables que celles constituées de n-3 (Rajamoorthi et al. 2005). Cet effet d'assouplissement des membranes par l'incorporation des AGPI, et notamment des n-3, est particulièrement important pour les érythrocytes. Des études hémorhéologiques ont ainsi montré que l'incorporation de poissons riches en n-3 dans l'alimentation pendant 10 semaines permettait de diminuer significativement la viscosité sanguine et le temps de filtration des globules rouges (Sofi et al. 2013). Les auteurs de cette étude comparaient également l'effet d'une différence de rapport n-6/n-3 dans l'alimentation. Pour un même niveau d'EPA et DHA apporté, le rapport n-6/n-3 était soit de 0,44 soit de 1,27. Dans le cas où le ratio était élevé, les effets hémorhéologiques n'étaient pas observés. Les n-3 apparaissent donc plus à même d'améliorer la souplesse des membranes que les n-6 (Sofi et al. 2013). Une étude portant sur les effets d'une supplémentation en huile de poisson sur le flux sanguin cérébral évalué par la méthode near infrared spectroscopy (NIRS) a été menée. Deux types d'huile de poisson étaient utilisés, l'un étant majoritairement enrichi en EPA et l'autre en DHA. Il ressort que la supplémentation en huile enrichie en DHA augmente le flux sanguin cérébral et permettrait une meilleure oxygénation par rapport à ce qui est observé dans les groupes placebo et le groupe supplémenté en huile de poisson riche en EPA (Jackson et al. 2012). Des membranes plus souples rendraient donc les globules rouges plus déformables, ce qui se traduit par une

viscosité sanguine plus faible, une meilleure diffusion et *in fine* peut produire une meilleure perfusion des différents tissus de l'organisme (Aguilaniu et al. 1995; Rajamoorthi et al. 2005)

Il existe également des micro-domaines membranaires non-solubles dans des détergents appelés radeaux lipidiques. Ces micro-domaines comportent une plus forte proportion de cholestérol, sphingolipides et phospholipides contenant des acides gras saturés, que les autres portions de membrane ce qui les rend plus rigides. On y trouve des protéines nécessitant un environnement plus stable pour leurs actions que celui fourni par la membrane lipidique ou au contraire des protéines piégées dans ces radeaux et qui restent inactives jusqu'à leur libération (pour revue (Pike 2003; Turk et Chapkin 2013). Il semblerait que les AGPI n-3, et principalement le DHA, modifient la répartition et la taille de ces radeaux membranaires (Shaikh et al. 2009; Turk et Chapkin 2013). Ceci a pour effet de supprimer ou de stimuler l'activité des protéines qu'ils contiennent (Stulnig et al. 2001). Il a notamment été rapporté que l'activation des cellules-T de l'inflammation est dépendante des radeaux lipidiques, tout comme la libération de cytokines. Une diminution de la surface des radeaux permettrait donc de limiter l'inflammation (Turk et Chapkin 2013). Ces micro-domaines sont également retrouvés dans les membranes mitochondriales et pourraient être impliqués dans la mort cellulaire (Sorice et al. 2012). Les AGPI agissent donc sur les protéines et la signalisation cellulaire *via* des modifications de composition des membranes.

L'incorporation des AGPI n-3 dans les membranes module fortement leur fluidité et leur souplesse. Ceci pourra avoir des conséquences sur l'activité des protéines qu'elles contiennent.

4.2.4.2 Rôle de précurseurs de médiateurs lipidiques

Les eicosanoïdes sont des produits de l'ARA (n-6) et de l'EPA (n-3), des AGPI à 20 atomes de carbone. Les membranes contiennent majoritairement de l'ARA par rapport à l'EPA. L'ARA est le principal précurseur d'eicosanoïdes. Il peut être converti par des enzymes cyclo-oxygénases et lipoxygénases en prostaglandines et thromboxanes de série 2 (PGE2 et TXA2), et leucotriène de série 4. L'EPA est quant à lui métabolisé en prostaglandine et thromboxane de série 3 (PGE3 et TXA3), en résolvines et en leucotriènes de série 5 (figure 27).

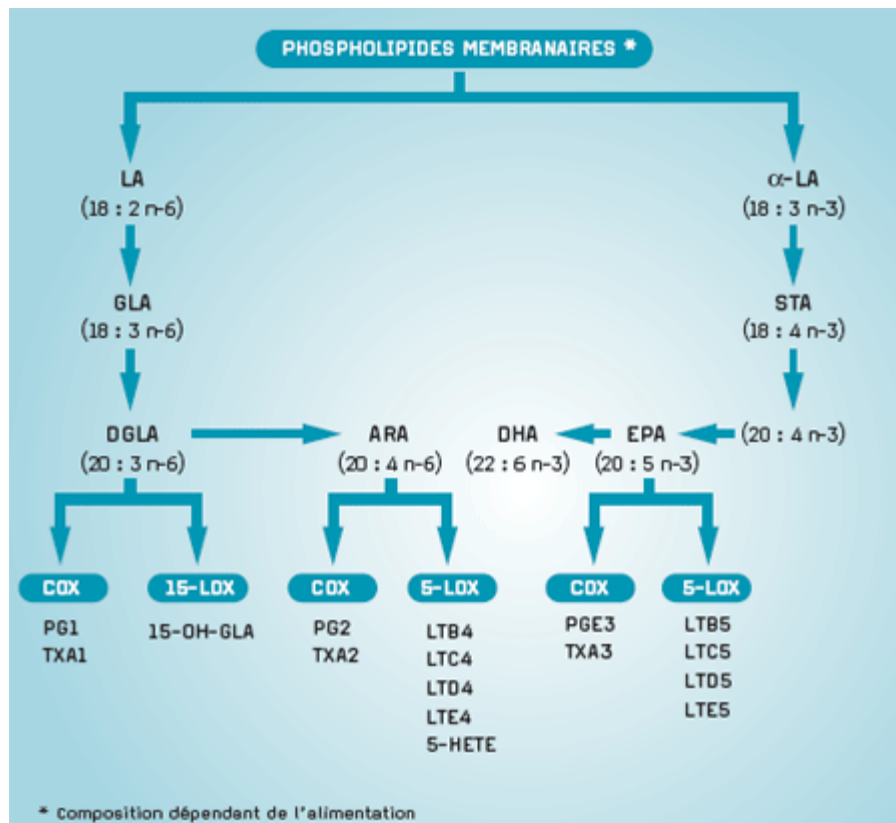


Figure 27:

Représentation schématisée des étapes de production des eicosanoïdes à partir de leurs précurseurs des familles d'AGPI n-6 et n-3. Acide linoléique (LA), acide α -linoléique (α -LA), acide stéaridonique (STA), acide eicosapentaénoïque (EPA), acide docosahexaénoïque (DHA), acide arachidonique (ARA), acide dihomog γ -linoléique (DGLA), acide γ -linoléique (GLA), cyclo-oxygénase (cox), lipo-oxygénase (LOX), prostaglandine (PG), thromboxane (TXA), lymphocytes T (LT). (delarue 2007)

Ces médiateurs lipidiques régulent de nombreuses fonctions cellulaires avec souvent des effets contraires entre les n-6 et les n-3 (pour revue (Schmitz et Ecker 2008)). Les eicosanoïdes dérivés de l'ARA (n-6) sont ainsi majoritairement inflammatoires, athérogènes et pro-thrombotiques, alors que ceux issus de l'EPA (n-3) ont un effet inflammatoire nettement plus réduit (Bagga et al. 2003; Wada et al. 2007) voire même anti-inflammatoire avec les résolvines (Serhan et al. 2000; Prescott et Stenson 2005), ainsi qu'antiathérogènes et anti-thrombotiques. De plus, les n-3 modulent la réaction inflammatoire par un mécanisme de compétition au niveau des cyclo-oxygénases et lipoxygénase qui aboutit à une réduction de libération des métabolites pro-inflammatoires de l'ARA. Une étude montre ainsi qu'une supplémentation en huile de poisson riche en EPA et DHA provoque une diminution du contenu en ARA des phospholipides membranaires de macrophages de souris et réduit la production de prostaglandine et de thromboxane de la série 2 (Yaqoob et Calder 1995). Chez l'humain, une étude comparant les effets d'une supplémentation de trois mois en EPA et

DHA indique que ces AGPI sont bien retrouvés au niveau plasmatique. Il apparaît que le contenu en ARA n'est pas significativement plus faible chez les femmes jeunes alors qu'il l'est nettement chez les femmes âgées. Il y aurait un effet de l'âge sur la diminution du contenu en ARA dans les lipides plasmatiques. Les femmes âgées présentent une diminution de 57% de leur production de PGE2. On observe également une tendance à une diminution de 40% chez les jeunes femmes (Meydani et al. 1991). Ces résultats concernant PGE2 observés chez la femme âgée sont retrouvés chez l'homme jeune (Trebbles et al. 2003). Plus l'EPA et le DHA sont présents dans l'alimentation et donc dans les membranes cellulaires, plus ils limitent la production des eicosanoïdes dérivés de l'ARA.

Les n-3 sont également des précurseurs de protéines anti-inflammatoires appelées résolvines et protectines (Hong et al. 2003; Weylandt et al. 2012). Les résolvines sont formées par la voie de la cyclo-oxygénase 2 (cox-2) qui convertit aussi l'ARA en PGE2. L'EPA est converti en résolvines de la série E et le DHA en résolvines de série D. Ces résolvines interviennent dans le processus inflammatoire au cours de la phase de résolution et ont été mises en évidence pour la première fois sur exsudat de souris (Serhan et al. 2000). Depuis, elles ont été observées dans divers autres tissus comme le foie, le sang, les leucocytes, les cellules gliales... (Hong, Gronert 2003 ; Gonzalez-Pérez 2006). Elles n'agissent pas qu'en empêchant la synthèse des eicosanoïdes dérivées de l'ARA *via* la compétition pour la cox-2, elles seraient également activement impliquées dans le retour à l'état non-inflammatoire (Weylandt et al. 2012). Une supplémentation en DHA apportée à des souris induit ainsi une diminution des dommages causés par une inflammation dans le foie provoquée par des injections répétées d'un solvant toxique. Une augmentation de la formation de protectine D1, dérivée du DHA, est observée et s'accompagne d'une diminution de formation de PGE2 (Gonzalez-Periz et al. 2006). Il a été montré dans le poumon que les résolvines D1 pourraient limiter l'inflammation en supprimant l'activation de NF- κ B (Liao et al. 2012).

Les n-3 permettent donc de limiter l'inflammation en réprimant la formation de dérivés inflammatoires de l'ARA et en permettant la formation de résolvines et protectines aux propriétés anti-inflammatoires.

4.2.4.3 Rôle de régulateurs de facteurs de transcription

Outre leur activité de signalisation par les eicosanoïdes, les AGPI contrôlent également l'expression de nombreux gènes. Les AGPI, qu'ils soient de la série n-6 ou n-3, participent à la régulation de l'expression de protéines de la lipolyse et de la lipogénèse. Ils

interviennent également dans la régulation de l'expression de facteurs de l'inflammation comme les cytokines et les molécules d'adhésion (Simopoulos 1999). Ils régulent ces différents gènes notamment *via* la régulation de facteurs de transcription tels que les PPARs et NF- κ B.

- NF- κ B

Le Nuclear Factor kappa B est un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes de l'inflammation et l'atrophie (revue (Kumar et al. 2004). Il est à l'état inactif dans le cytosol lorsqu'il est lié à une protéine inhibitrice I κ B (inhibitory subunit of NF- κ B). Dès lors qu'il s'en détache, il migre vers le noyau où il pourra jouer son rôle de facteur de transcription et induire l'expression de molécules d'adhésion et de nombreuses cytokines telles que le TNF- α et plusieurs interleukines (Kumar et al. 2004).

Des cellules macrophages cultivées en présence d'EPA ont une action de NF- κ B qui est altérée, d'une manière qui n'est pas complètement élucidée mais qui implique un plus faible contenu en la sous-unité p65 (Lo et al. 1999). Ceci aboutit à une plus faible production de TNF- α par les cellules de souris (Lo et al. 1999). Toujours sur cellules macrophages, plusieurs études montrent que la phosphorylation d'I κ B se trouve également inhibée par les n-3 et empêcherait donc l'activation de NF- κ B (Novak et al. 2003; Zhao et al. 2004). Il ressort d'une autre étude réalisée également sur des macrophages que le DHA est un inhibiteur de l'activation des lymphocytes T (Kew et al. 2004) et de l'activation de NF- κ B plus puissant que l'EPA (Weldon et al. 2007). Il bloquerait NF- κ B en augmentant le contenu cytosolique en I κ B, la sous-unité inhibitrice de NF- κ B, d'une manière plus marquée que l'EPA. Le DHA apparaît donc particulièrement intéressant pour lutter contre l'inflammation.

Chez le cochon, une étude met en avant une diminution de l'activation de NF- κ B dans le muscle lorsque les animaux sont supplémentés en DHA (Wei et al. 2013). Cet effet observé chez l'animal et sur cellules est également retrouvé chez l'Homme. En effet, Fahrman et al, montrent que la prise de n-3 est effectivement associée à une plus faible activation et expression de NF- κ B dans les lymphocytes lors d'un état inflammatoire (Wang et al. 2012; Fahrman et al. 2013).

Les n-3 sont donc capables de moduler l'inflammation en agissant sur l'expression des gènes impliqués, notamment *via* le facteur de transcription NF- κ B.

- PPARs

Les PPARs sont des récepteurs nucléaires ayant les lipides pour ligands. Ils agissent comme activateurs de facteurs de transcription en se liant à des domaines de réponse qui leur sont spécifiques sur l'ADN. Pour pouvoir se lier à ces domaines, ils doivent d'abord former un hétérodimère avec un récepteur nucléaire, le retinoid X receptor (RXR). Ils régulent alors l'expression de gènes du métabolisme lipidique (pour revue (Feige et al. 2006) et l'activation de facteurs de l'inflammation (Chung et al. 2000). Les PPARs interfèreraient ainsi notamment avec l'action de NF- κ B et permettraient de limiter le processus inflammatoire (Chung et al. 2000).

Plusieurs raisons conduisent à penser que les AGPI n-3 ont un lien avec les PPARs. Ainsi, plusieurs types d'AG, aussi bien saturés qu'insaturés, sont capables de se lier aux PPARs (Kliwer et al. 1997; Krey et al. 1997), mais ces derniers ont une affinité supérieure pour les AGPI (Keller et al. 1993; Kliwer et al. 1997).

De plus, la similarité entre les effets sur le métabolisme induits par les AGPI n-3 et ceux induits par une activation des PPARs laisse à penser que les AGPI agiraient en stimulant l'activité des PPARs (Yu et al. 2011). L'utilisation d'un modèle de souris déficiente en PPAR- α a également permis d'explorer plus avant les liens entre les AGPI et les PPAR. Il ressort que les AGPI induisent dans le foie une surexpression génique d'enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras (comme l'acyl-CoA oxydase et la cytochrome P4504A2) qui n'est pas retrouvée lorsque les souris n'expriment pas PPAR- α (Ren et al. 1997). Les AGPI n-3 avaient également pour effet de réprimer l'expression d'enzymes de la lipogénèse, comme la fatty acid synthase (FAS), mais cette fois-ci l'expression génique de ces enzymes de la lipogénèse n'était pas différente chez les souris n'exprimant pas PPAR- α (Ren et al. 1997). L'effet de la prise d'AGPI n-3 sur le métabolisme est donc relié à l'activation des PPARs, mais pas uniquement.

Une étude montre également que l'EPA et le DHA permettent de réduire une inflammation causée par du LPS sur un modèle cellulaire (cellules HK-2). Lorsque ces cellules sont mises en présence d'un antagoniste des PPARs, l'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 est alors aboli (Li, Ruan, Powis 2005). De plus, l'effet inhibiteur des AGPI n-3 sur NF- κ B observé chez des cellules de souris de type sauvage n'est pas retrouvé sur celles de souris n'exprimant pas PPAR (Mishra et al. 2004). Ces résultats confirment bien les interactions entre les n-3 et les PPARs concernant l'inflammation.

Les protéines de la famille SREBP (sterol response element binding proteins) sont des facteurs de transcription. Ils activent l'expression de gènes de la lipogénèse comme la fatty acid synthase (FAS). Les AGPI sont des inhibiteurs de l'expression des protéines SREBP *via* l'action indirecte du facteur de transcription LXR (liver X receptor). Le LXR entrerait en compétition avec les PPAR pour se lier au RXR. En conséquence, si les PPARs sont activés par les AG, ils se lient au RXR empêchant le LXR de s'y accrocher et donc d'activer SREBP. L'action de SREBP est donc contrôlée indirectement par les AGPI (Repa et al. 2000; Yoshikawa et al. 2003). Des études montrent ainsi une diminution de l'expression protéique de SREBP dans les cellules hépatiques des rats souffrant de syndrome métabolique ou alimentés avec un régime calorique et supplémentés en AGPI n-3 (Xu et al. 1999; Lu et al. 2011). Le DHA seul apparaît capable de diminuer le contenu des cellules hépatiques en transcrit de SREBP (Chen et al. 2012).

- Effets sur le métabolisme des acides gras

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet des AGPI n-3 sur le métabolisme et notamment sur celui des lipides.

Il apparaît que les n-3 diminuent la lipogénèse et favorisent la lipolyse et l'oxydation des acides gras (tableau 6) (Tai et Ding 2010).

Tableau 6:
effets des AGPI n-3 sur des gènes du métabolisme lipidique (Tai et Ding 2010)

Catégorie	Gènes	Expression ou activité	Tissu	Référence
Lipogénèse	Stéaroyl-CoA désaturase 1	↓	foie	(Nakatani et al. 2003)
	Fatty acid synthase	↓	Foie	(Nakatani et al. 2003) (Xu et al. 1999) (Kim et al. 1999)
	Acétyl-CoA carboxylase (ACC)	↓	Foie	(Xu et al. 1999) (Kim et al. 1999)
Oxydation des AG	Carnitine-palmitoyl transférase 1	↑	Adipocyte	(Guo et al. 2005)
	Acyl-CoA oxydase	↑	Adipocyte foie	(Guo et al. 2005) (Ide et al. 2000) (Neschen et al. 2002)

	Cétoacyl-coA-thiolase	↑ =	Foie Muscle	(Ide et al. 2000) (Neschen et al. 2002)
	Enoyl-CoA hydratase	↑	foie	(Ide et al. 2000)
Transport des AG	lipoprotéine lipase musculaire	↑	muscle	(Baltzell et al. 1991)
	Lipoprotéines lipase adipocytaire	↓	adipocyte	(Baltzell et al. 1991) (Wang et al. 2010)
lipolyse	Lipase sensible aux hormones	↑	Adipocyte	(Wang et al. 2010) (Luo et al. 1998)

Plusieurs études rapportent une diminution du niveau d'expression génique de SREBP dans le foie (Kim et al. 1999; Xu et al. 1999; Nakatani et al. 2003). Comme évoqué précédemment, ce facteur de transcription est régulé par les n-3. De même, les AGPI n-3 agirait sur ces enzymes *via* l'action des facteurs de transcription PPARs très impliqués dans le métabolisme. Kim et al, proposent alors que les effets majoritairement hypolipidémiant des n-3 passent par une activation et inhibition des facteurs de transcription PPAR et SREBP respectivement (Kim et al. 1999) (figure 28).

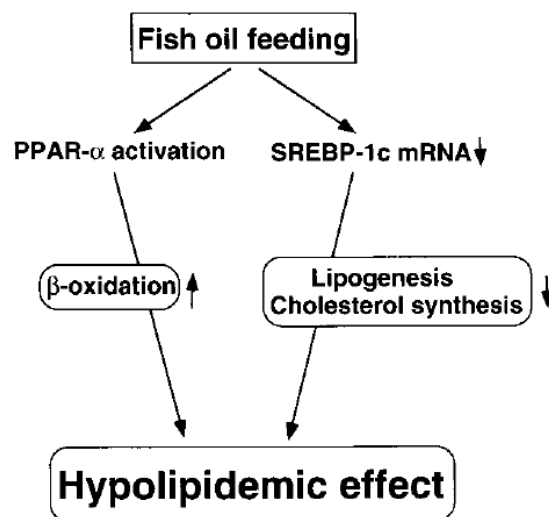


Figure 28:
Proposition de mécanismes pour expliquer l'effet hypolipidémiant de l'huile de poisson.
(Kim et al. 1999)

4.2.4.4 Rôle de réserve énergétique

Enfin, comme tous les acides gras, les AGPI sous forme de triglycérides constituent des réserves énergétiques et pourront être dégradés au cours de la β -oxydation.

Les AGPI jouent plusieurs rôles dans l'organisme.

Ils participent de manière importante à la signalisation cellulaire, à la fois *via* les eicosanoïdes, les résolvines et les protectines, ainsi que par leur rôle d'activateurs de facteurs de transcription.

Ils interviennent dans le métabolisme des acides gras *via* une activation de la lipolyse et une inhibition de la lipogénèse.

Ils jouent également un rôle dans l'inflammation. Les AGPI de la série n-6 sont fortement pro-inflammatoires alors que les n-3 ont des propriétés anti-inflammatoires ou faiblement inflammatoires et limitent l'action pro-inflammatoire des n-6.

L'incorporation des AGPI dans les membranes s'accompagne de modifications de la qualité de ces membranes, les rendant plus souples et fluides. Ceci pourra avoir des répercussions sur l'activité cellulaire.

4.3 n-3, BPCO et dysfonction musculaire

Si l'utilité d'une supplémentation en AGPI n-3 a été explorée et confirmée dans nombre de maladies, au premier plan desquelles les pathologies cardiovasculaires mais aussi certains désordres métaboliques, rénaux, neurologiques, psychiatriques et rhumatologiques (revue (Cicero et al. 2012), peu d'études se sont intéressées à l'effet de ces nutriments sur la BPCO. Au vu des effets bénéfiques des n-3 sur ces différentes pathologies, il serait intéressant de les appliquer aux patients BPCO. En effet, on peut émettre l'hypothèse qu'ils amèneraient des améliorations de plusieurs paramètres impactant l'avancée de la BPCO comme l'inflammation, le stress oxydant, la cachexie, la tolérance à l'effort et la dysfonction musculaire.

4.3.1 n-3 et prévalence de la BPCO

Une étude épidémiologique montre ainsi que les fumeurs dont le régime alimentaire est par ailleurs riche en EPA et DHA seraient moins sujets à souffrir de BPCO (Shahar et al.

1994). Ceci fut confirmé par la suite dans une autre étude épidémiologique. Une part en AGPI plus élevée dans l'alimentation, et notamment en n-6, réduit la prévalence de la BPCO (Hirayama et al. 2010). Ces propos sont nuancés par l'étude de McKeever et al, (McKeever et al. 2008) qui ne rapportent pas d'effet protecteur des n-3 spécifiquement (en accord avec les données de Hirayama et al,) mais plutôt un effet négatif de la prise de n-6 sur un paramètre pulmonaire, le VEMS.

4.3.2 n-3 et inflammation,

L'inflammation systémique présente chez les patients BPCO est fortement reliée à une moins bonne qualité de vie et une plus faible capacité d'exercice, ainsi qu'à un déclin plus rapide des fonctions respiratoires et musculaires (Donaldson et al. 2005; Broekhuizen et al. 2006; Sin et Man 2006).

Or, comme évoqué précédemment, une élévation des apports en AGPI n-3 peut contribuer à réduire l'inflammation. Ainsi, de Battle et al, (de Battle et al. 2012) montrent que le niveau de TNF- α est plus faible chez les patients dont l'alimentation est riche en n-3. De plus, une corrélation négative entre le niveau d'inflammation et la richesse en n-3 de l'alimentation (principalement ALA) est mise en évidence chez des patients BPCO. A l'inverse, un régime alimentaire riche en n-6 est corrélé à un taux de marqueurs circulants de l'inflammation comme IL-6 et CRP, plus élevé, ce qui signale une inflammation plus marquée.

Une étude a comparé un placebo avec la prise d'un supplément nutritionnel, au pouvoir anti-inflammatoire et incluant notamment des n-3, lors d'une réhabilitation physique à faible intensité de 12 semaines chez des patients BPCO (Sugawara et al. 2012). Les auteurs montrent une baisse significative de facteurs de l'inflammation comme IL-6, IL-8, CRP et TNF- α , qui n'est pas retrouvée avec le placebo combiné à la réhabilitation physique. Un régime alimentaire riche en n-3 apparait bénéfique sur l'inflammation observée chez le patient BPCO. Cependant, la supplémentation nutritionnelle utilisée dans cette étude contient en plus des n-3, des vitamines A, C et E aux propriétés antioxydantes et du lactosérum également antioxydant et anti-inflammatoire. Cette étude ne permet donc pas de distinguer les effets propres des n-3.

Broekhuizen, dans son étude de 2005, n'observe pas de changements des médiateurs de l'inflammation après 8 semaines de supplémentation en AGPI n-3 (STA, ALA, EPA, et DHA) et n-6 (GLA) (Broekhuizen et al. 2005). Cependant, les auteurs n'ont regardé que des

marqueurs plasmatiques (CRP, TNF- α et IL-6) et suggèrent d'évaluer le statut inflammatoire au niveau musculaire. Le DHA est suspecté d'avoir un effet plus marqué sur l'inflammation que l'EPA ou l'ALA (Weldon et al. 2007), il serait donc peut-être plus intéressant de le proposer seul.

Les effets anti-inflammatoires des AGPI n-3 sont communément reconnus. Cependant, la seule étude réalisée sur des patients ayant évaluée les effets propres des n-3 sur quelques marqueurs de l'inflammation ne montre aucun effet des n-3. Il apparaît nécessaire de compléter ce premier résultat par de nouvelles études car la prise d'un complément nutritionnel aux propriétés anti-inflammatoires apparaît cependant efficace (Sugawara et al. 2012).

4.3.3 n-3 et stress oxydant

Plusieurs études sur des cellules et des modèles animaux laissent à penser que les n-3 pourraient avoir un effet bénéfique sur le statut antioxydant. En effet, les n-3 EPA et DHA, mais de manière beaucoup plus marquée pour le DHA, inhibent la production d'oxyde nitrique par des macrophages issus de lignées cellulaires et de culture primaire (Komatsu et al. 2003). Les AGPI LA, ALA et ARA n'avaient quant à eux aucun effet sur la production d'espèces réactives nitrées par ces macrophages. Ceci semble indiquer que seuls les AGPI n-3 à chaîne longue permettent de limiter la production d'oxyde nitrique (Komatsu et al. 2003). De plus, l'activité de NF- κ B, un facteur de transcription stimulé par les radicaux libres, est inhibée par le DHA de manière dose-dépendante sur modèle murin de cellules macrophages (figure 29). Komatsu et al montrent d'ailleurs une diminution des peroxydes intracellulaires avec la prise de DHA. Il apparaît que le DHA augmente le contenu cellulaire en glutathion réduit.

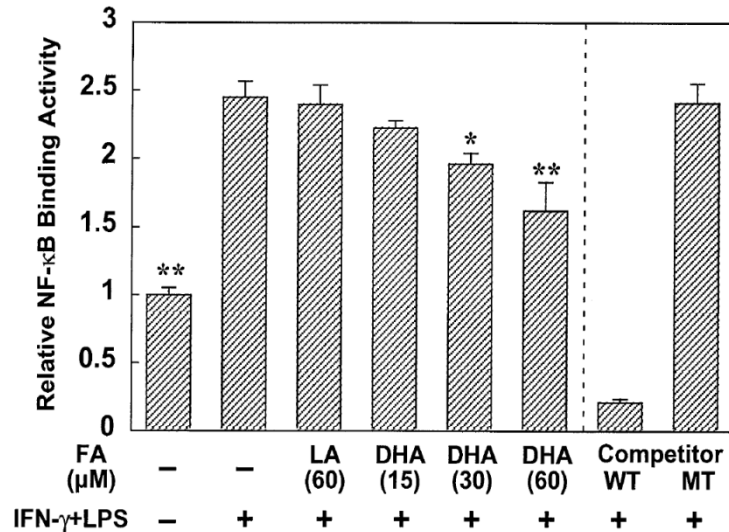


Figure 29:

Activation de l'activité de fixation de NF-κB sur des macrophages RAW264 traités pendant 24h avec du LA (60μM) ou du DHA à différentes concentrations (15, 30, 60 μM). Une inflammation était ensuite induite par incubation en présence de LPS et IFN-γ (interféron gamma). (Komatsu et al. 2003)

De même, cette fois-ci dans le foie de rats supplémentés avec du lait riche en n-3, une augmentation de la concentration en glutathion réduit a pu être mise en évidence, ainsi que du niveau d'activité de l'aconitase, une enzyme mitochondriale inactivée par les ROS (Lionetti et al. 2012). Ceci suggère que le DHA serait capable de stimuler les défenses antioxydantes.

Chez l'humain, la prise d'EPA par des personnes âgées induit également une augmentation du contenu en vitamine E des plaquettes sanguines (Croset et al. 1990). De manière similaire, chez des sujets sains, Mori et al, rapportent une diminution des peroxydations lipidiques consécutivement à un traitement au DHA ou à l'EPA (Mori et al. 2000). Ces résultats ont été depuis confirmés par Calzada et al, (Calzada et al. 2010) qui montrent une augmentation du contenu sanguin en vitamine E et une réduction des peroxydations lipidiques, même pour une dose quotidienne de DHA de 200mg/jour, prise pendant 2 semaines. Il semblerait que des apports trop massifs de DHA, au-delà d'un certain seuil, diminuent toutefois les défenses antioxydantes et augmentent les peroxydations lipidiques. Les auteurs recommandent en conséquence de conserver des apports en DHA inférieurs à 1 g /jour (Calzada et al. 2010).

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude ayant exploré les effets antioxydants des n-3 chez le patient BPCO.

Comme évoqué plus en amont, le stress oxydant systémique inhérent à la BPCO participerait à la dysfonction musculaire. Les AGPI n-3, du fait de leurs actions sur le stress

oxydant et notamment les défenses antioxydantes, pourraient améliorer le statut oxydant des patients BPCO. L'incorporation des AGPI n-3 dans une supplémentation nutritionnelle dans un but antioxydant apparaît donc comme une piste de réhabilitation nutritionnelle intéressante.

4.3.4 n-3 et tolérance à l'effort

Des travaux encourageants chez le patient cancéreux cachectique avaient permis de montrer un effet bénéfique de la prise de n-3 sur le niveau d'activité et de dépense énergétique totale des patients (Moses et al. 2004).

De même, chez le sujet sain âgé, il apparaît que les performances à différents tests de capacités physiques tels que des tests de vitesse de marche, de maintien de position en équilibre et de levés de chaise, de force de préhension et de force des membres inférieurs sont significativement plus élevés chez la population de sujets dont les apports en AGPI n-3 sont les plus élevés (Robinson et al. 2008; Abbatecola et al. 2009; Rousseau et al. 2009). Une alimentation riche en n-3 permettrait donc de préserver le niveau de performance physique au cours du vieillissement.

Sugawara et al, ont étudié les effets d'une supplémentation enrichie en n-3 combinée à un protocole de réhabilitation physique de faible intensité reposant sur de la marche, des étirements et des exercices respiratoires (Sugawara et al. 2012). Ils observent que la distance de marche parcourue pendant 6 min à l'issue de l'intervention nutritionnelle et physique est plus élevée dans le groupe supplémenté et réhabilité physiquement que dans le groupe seulement réhabilité physiquement (Sugawara et al. 2012). Ils mettent également en évidence un effet de la supplémentation sur l'amélioration de la qualité de vie, que l'on sait très liée à la tolérance à l'effort. Cependant, et comme évoqué précédemment, la supplémentation nutritionnelle utilisée dans cette étude contient en plus des n-3, des vitamines A, C et E aux propriétés antioxydantes et du lactosérum également antioxydant et anti-inflammatoire. Elle ne permet donc pas de distinguer les effets propres des n-3.

Broekhuizen et al, montrent que la prise de n-3 (ALA, EPA et DHA) lors d'un programme de réhabilitation par l'activité physique de 8 semaines permettait d'augmenter significativement le temps d'endurance des patients et leur puissance, et ceci de manière significativement plus marquée que s'ils ne suivaient que le réentraînement avec un placebo comme supplément alimentaire (Broekhuizen et al. 2005). Ils ne mettent cependant pas en

évidence d'augmentation de la force du quadriceps, mesurée lors d'une contraction isocinétique.

Ces études chez des sujets âgés, des patients cancéreux cachectiques et des patients BPCO semblent confirmer l'intérêt de la prise de n-3 sur la capacité d'exercice. Il existe peu d'informations sur d'éventuels effets plus marqués d'un type de n-3 par rapport à l'autre. Des études sont également encore requises pour déterminer si la prise de n-3 peut induire des améliorations de la capacité d'exercice lorsqu'elle n'est pas associée à un protocole de réhabilitation physique. De plus, les mécanismes à l'origine de ces effets des AGPI n-3 sur la performance physique restent inconnus. Certains auteurs font l'hypothèse que l'action anti-inflammatoire des AGPI pourrait impacter positivement le tissu musculaire, mais Broekhuizen et al, n'observent pas de modifications de marqueurs plasmatiques de l'inflammation à l'issue de leur protocole (Broekhuizen et al. 2005; Abbatecola et al. 2009). Comme évoqué précédemment, les AGPI n-3 sont des ligands des PPARs, or ces derniers ont été montrés comme inducteurs de la transcription de gènes impliqués dans des adaptations à l'entraînement (Narkar et al. 2008). Il est possible que l'effet des AGPI n-3 sur la tolérance à l'effort passe par une activation des PPARs.

4.3.5 n-3 et cachexie

Certaines études chez des patients cachectiques souffrant de cancers montrent une stabilisation de la masse totale et parfois musculaire lorsqu'ils sont supplémentés avec une préparation riche en n-3 (Barber et al. 1999; Fearon et al. 2003; Taylor et al. 2010; Weed et al. 2011). Bien que certaines études ne montrent aucun effet des n-3 sur la prise de masse (Bruera et al. 2003), une méta-analyse conclut malgré tout à un effet bénéfique des n-3 sur la prise de poids chez des patients cancéreux cachectiques (Colomer et al. 2007; Dewey et al. 2007)). Une supplémentation en DHA seul a permis une augmentation de la masse corporelle chez des patients cachectiques souffrant de la maladie d'Alzheimer (Irving et al. 2009). Cet effet des n-3 n'est donc pas limité au cancer.

Une méta-analyse portant sur les effets de l'EPA sur la cachexie dans le cancer ne conclut pas à un effet de cet AGPI en particulier (Dewey et al. 2007). Ce constat pointe l'importance des modalités de supplémentation et notamment du choix de l'AGPI, qui s'orienterait donc plus vers le DHA.

Suite à une supplémentation nutritionnelle à visée anti-inflammatoire et incluant des n-3, prise lors d'un programme de réhabilitation, des patients BPCO présentent une augmentation de leur masse corporelle totale due à une hausse de leur masse grasse sans changement de la masse musculaire (Sugawara et al. 2012). Cependant, comme indiqué dans la partie précédente, la présence d'autres nutriments aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires dans la supplémentation ne permettent pas de conclure à un effet particulier des n-3. Dans l'étude de Broekhuizen et al, où des patients sont supplémentés en DHA lors d'un programme de réhabilitation, une hausse de la masse corporelle est retrouvée et découlerait là encore d'un gain de masse adipeuse (Broekhuizen et al. 2005). Le protocole de cette étude permet de conclure plus sûrement que les n-3 sont impliqués dans ces modifications de composition corporelle. Malgré tout, reste posée la question de la présence d'un tel effet des n-3 lorsqu'ils ne sont pas associés à un réentraînement.

Malgré des résultats encourageants obtenus sur des patients cachectiques, les suppléments en AGPI n-3 chez le patient BPCO ne semblent donc pas induire de gain de masse musculaire. Elles permettraient en revanche un gain de masse grasse. Mais de nouvelles études portant sur l'effet des n-3 sur la cachexie dans le contexte de la BPCO sont nécessaires, notamment pour discriminer les effets propres des n-3, en dehors du réentraînement et de la prise d'autres nutriments.

4.3.6 n-3 et muscle

Une supplémentation en AGPI n-3 induit des modifications de la composition lipidique des membranes musculaires allant dans le sens d'une augmentation des AGPI n-3 dans les phospholipides aux dépens des AG saturés et des AGPI n-6 (Stark et al. 2007). Il est possible de faire l'hypothèse que ces changements d'environnement lipidique auront des répercussions sur le muscle.

4.3.6.1 n-3 et protéosynthèse/protéolyse

Une étude réalisée sur des bovins montre qu'une supplémentation en huile de poisson prise pendant 5 semaines induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt^{ser473}, de mTOR^{ser2448}, et de la protéine S6K en aval de mTOR (Gingras et al. 2007). Les AGPI à chaîne longue contenus dans l'huile de poisson stimuleraient donc la synthèse protéique, *via* une activation de la voie IGF-1/Akt/mTOR (Gingras et al. 2007). Dans cette étude, les auteurs indiquent que les animaux supplémentés nécessitent un apport en nourriture moins élevé pour

gagner un kg de poids corporel que les animaux non supplémentés. Les modifications d'activité des protéines de la voie Akt/mTOR pourrait participer à cet effet du DHA.

Cette augmentation de phosphorylation d'Akt et mTOR est confirmée dans le muscle de cochons en croissance supplémentés en DHA (Wei et al. 2013), suggérant que le DHA seul semble capable d'activer cette voie de signalisation de l'hypertrophie.

Des sujets âgés atteints de sarcopénie présentent une meilleure réponse à la stimulation anabolique causée par l'insuline lorsqu'ils sont supplémentés en EPA et DHA (Smith et al. 2011). Conformément à ce qui était observé chez l'animal (Gingras et al. 2007; Wei et al. 2013), la phosphorylation de mTOR²⁴⁴⁸ apparaît stimulée par les n-3 chez ces sujets. En revanche, celle d'Akt^{thr308} ne l'est pas, suggérant que l'amélioration de la réponse à la stimulation anabolique causée par l'insuline est indépendante d'Akt. Cette absence d'effet des n-3 sur la phosphorylation d'Akt est retrouvée dans le muscle de rats supplémentés en n-3 à longue chaîne (Le Foll et al. 2007). Dans cette même étude, malgré une baisse de l'activité de PI3K et une absence de modification de la phosphorylation d'Akt, la supplémentation provoque bien une augmentation de la phosphorylation de mTOR (Le Foll et al. 2007). Les résultats de ces études conduisent à penser qu'une voie d'activation de mTOR autre que celle impliquant PI3K et Akt pourrait être en jeu.

Une étude sur culture de myocytes humains en présence de macrophages, condition connue pour activer les voies de signalisation de l'atrophie, montre que le DHA est capable de réduire l'expression de la protéine Fnl4 activatrice de l'expression de MURF-1 (Finlin et al. 2011). Cet effet du DHA pourrait permettre de limiter la dégradation protéique dans le contexte de la BPCO.

Les n-3 pourraient donc avoir pour effet de limiter la perte de masse musculaire en stimulant la protéosynthèse. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas clairement élucidés. Si mTOR apparaît lié à cet effet des n-3 sur la stimulation de la protéosynthèse, l'implication ou non d'Akt et PI3K n'est pas claire. Ces incertitudes suggèrent que d'autres études soient menées pour explorer plus précisément les processus impliqués dans cet effet des n-3 sur la synthèse protéique.

4.3.6.2 n-3 et métabolisme musculaire

Peu d'études se sont penchées sur les effets des n-3 sur le métabolisme musculaire, notamment au niveau mitochondrial.

L'huile de poisson provoque chez le rat une augmentation de la transcription d'UCP3, une protéine découplante mitochondriale (Baillie et al. 1999). Lorsque la mitochondrie est

découplée, un apport accru en électron au niveau de la chaîne respiratoire, et donc une oxydation plus importante de substrat, est nécessaire pour maintenir le gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. Ce phénomène de découplage pourrait expliquer la plus faible accumulation de masse grasse chez ces animaux. Ce résultat de Baillie et al, soutient l'hypothèse que le découplage mitochondrial induit une oxydation des AG plus importante et participe donc à ce que les animaux perdent de la masse grasse ou en gagnent moins. La mitochondrie participerait donc à l'effet des n-3 sur l'oxydation des AG. Cependant, les auteurs mettent également en évidence une augmentation de l'activité d'enzymes impliquées dans l'oxydation des AG par le peroxydosome, indiquant que cette voie d'oxydation est également activée par l'huile de poisson et pourrait agir en parallèle de la mitochondrie (Baillie et al. 1999).

Dans le muscle squelettique de rat, la prise d'huile de hareng riche en n-3 induit une stimulation de l'activité de CPT1 (Power et Newsholme 1997). L'oxydation des AG par la mitochondrie avait été montrée comme étant augmentée dans le foie chez des rats supplémentés en huile de poisson riche en AGPI n-3 par rapport à des rats supplémentés en huile de palme (riche en acides gras saturés et mono-insaturés) ou de carthame (riche en n-6) (Ide et al. 2000).

Une étude sur un modèle aviaire montre que seul le DHA provoque l'augmentation d'activité de CPT dans le muscle (Nagahuedi et al. 2009). Totland et al, confirment cet effet spécifique du DHA par la mesure du niveau d'ARN de CPT1 sur le diaphragme de rats (Totland et al. 2000). En revanche, ce résultat n'est pas retrouvé dans le soléaire de ces animaux, mettant en lumière des effets muscle-dépendants du DHA (Totland et al. 2000). L'EPA et le DHA produisent chacun la même élévation de l'activité de HAD et de la CS (Nagahuedi et al. 2009). L'activité de la COX n'est quant à elle augmentée que lorsque l'EPA et le DHA sont combinés dans la même supplémentation. Le métabolisme musculaire apparaît donc régulé de manière différente selon le type de n-3 apporté, EPA ou DHA. Totland et al, montrent une augmentation de la surface occupée par les mitochondries dans les fibres de type I et non dans celles de type II dans le soléaire et le diaphragme de rats supplémentés en EPA, alors que rien n'est observé lorsqu'ils sont supplémentés en DHA (Totland et al. 2000). Les AGPI n-3 semblent donc d'une part impacter préférentiellement les mitochondries des fibres au métabolisme oxydatif, d'autre part, les effets des n-3 sont variables selon l'AG considéré (EPA ou DHA).

Clavel et al, ne retrouvent pas de hausse de citrate synthase dans le soléaire et le cœur chez le rat ayant pris de l'huile de poisson alors qu'ils mettent bien en évidence une

augmentation de l'oxydation des acides gras similaire à celle mise en place par un entraînement en endurance (Clavel et al. 2002).

Vaughan et al, évaluent par cytométrie en flux le contenu en mitochondrie de cellules cancéreuses issues de muscles après qu'elles aient été incubées en présence de DHA et d'EPA (Vaughan et al. 2012). Il apparaît augmenté par rapport aux cellules non-traitées. Ces auteurs mettent également en évidence une augmentation transitoire d'un facteur 10 du contenu en ARNm de PGC1- α après un traitement de 24h (Vaughan et al. 2012). L'augmentation du niveau d'ARNm de PGC1- α concorde avec l'élévation du contenu en mitochondrie qu'ils observent également.

Hormis la mise en évidence d'un découplage mitochondrial, d'une augmentation de l'activité de certaines enzymes mitochondriales et de la transcription d'un facteur de biogénèse mitochondriale, peu d'effets des n-3 sur les mitochondries de muscle squelettique ont été caractérisés.

Les études portant sur les effets des n-3 sur les mitochondries cardiaques peuvent cependant apporter des pistes de réflexion pour l'étude de la mitochondrie de muscle squelettique. Elles montrent que les membranes de mitochondries de coeur incorporent les AGPI et sont donc sensibles aux changements d'apport (Khairallah et al. 2012). Une supplémentation riche en EPA et DHA permet ainsi une augmentation des proportions de DHA et d'EPA et une réduction de celle de l'ARA dans les membranes de mitochondries cardiaques (O'Shea et al. 2009). Le DHA apparaît avoir un rôle plus marqué que l'EPA dans le remodelage de la composition lipidique des membranes mitochondriales cardiaques (Khairallah et al. 2010). Il s'incorporerait notamment dans les cardiolipines et augmenteraient la teneur membranaire en ce phospholipide spécifique de la membrane interne mitochondriale (Khairallah et al. 2010; Khairallah et al. 2012). Or une diminution du contenu en cardiolipines est associée à de sévères dysfonctions mitochondriales observées dans le cœur mais aussi le muscle squelettique (Schlame et al. 2002). La présence de cardiolipines permet par exemple de stabiliser la conformation et promouvoir l'activité des complexes de la chaîne respiratoire comme le complexe IV (Gomez et Robinson 1999). Malgré cela, Khairallah et al, n'observent pas d'effet d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la respiration de mitochondries isolée cardiaques (Khairallah et al. 2012). En revanche, l'ouverture du PTP mitochondrial est retardée par la prise de DHA, mais pas par la prise d'EPA, démontrant un effet du DHA sur la fonction mitochondriale (Khairallah et al. 2010). Une étude plus récente confirme ce résultat mais ajoute qu'une supplémentation en ARA produit étonnamment le même effet (Khairallah

et al. 2012). Dans le muscle squelettique de souris sous régime hyper-gras, l'incorporation d'huile de poisson à l'alimentation n'induit pas non plus de changement de la respiration mitochondriale bien qu'une hausse de la densité mitochondriale soit toutefois observée (Lanza et al. 2013)..

La prise d'AGPI n-3 semble donc agir sur la fonction mitochondriale cardiaque, avec un effet plus marqué du DHA.

Le peu d'études existantes portant sur les mitochondries de muscle squelettique, ainsi que la présence d'effets des AGPI n-3 observés sur les mitochondries cardiaques, encouragent à approfondir l'étude des effets des n-3 sur la mitochondrie de muscle squelettique.

Les n-3 présentent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ils permettraient également d'augmenter ou au moins de maintenir la protéosynthèse, de limiter la cachexie et d'améliorer la capacité d'exercice. Ils permettraient l'augmentation d'activité de certaines enzymes mitochondriales et certains résultats comme l'augmentation de la densité mitochondriale conduisent à penser qu'ils favoriseraient la mise en place dans le muscle d'un métabolisme plus oxydatif. Certains de ces effets ont été retrouvés dans des études chez le patient BPCO, particulièrement pour la capacité d'exercice, et pourraient recommander l'incorporation des n-3 dans l'alimentation des BPCO. Cependant trop peu d'études de réhabilitation nutritionnelle basée sur la prise de n-3 ont été menées, empêchant de conclure quant à l'efficacité d'une telle approche et les modalités (durée, dose, combinaison avec un réentraînement physique) qui doivent être appliquées.

4.4 Importance du vecteur d'AGPI n-3

Les acides gras n'existent que rarement à l'état libre dans l'organisme et sont en conséquence majoritairement liés à d'autres molécules pour former par exemple des triglycérides (3 acides gras liés à un glycérol) ou des glycérophospholipides (GPL : un glycérol lié à deux acides gras et un phosphate).

En fonction de leur forme, leur impact métabolique pourra varier.

Ainsi, plusieurs études rapportent une meilleure résistance à l'oxydation du DHA lorsqu'il est sous forme de GPL (Song et al. 1997). Il serait donc mieux préservé, conserverait toutes ses propriétés, limitant ainsi les peroxydations lipidiques.

De plus, il a été montré chez l'enfant que l'absorption intestinale du DHA est plus efficace lorsqu'il est amené sous forme de phospholipides en comparaison de triglycérides (Carnielli et al. 1996). Il ressort également mieux incorporé dans les membranes des érythrocytes sous cette forme (Lemaitre-Delaunay et al. 1999). Chez le rongeur, des études ont montré une meilleure incorporation des acides gras de la série n-3 dans les membranes lorsqu'ils sont apportés sous forme phospholipidique par rapport à des triglycérides (Cansell et al. 2003; Tang et al. 2012). De plus, en fonction de la forme sous laquelle ils sont apportés, l'ampleur des effets des AGPI n-3 sera variable. La dose nécessaire pour induire des effets sera plus faible pour la forme GPL comme l'indique une étude comparant les effets de l'huile de krill riche en phospholipides et celle de poisson riche en triglycérides. Les auteurs montrent des résultats identiques sur l'augmentation des niveaux de DHA et d'EPA plasmatiques, sur les teneurs en lipides plasmatiques, en marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation pour des doses en AGPI n-3 pourtant largement plus faibles dans l'huile de krill par rapport à l'huile de poisson chez des sujets sains (Ulven et al. 2011).

La forme GPL ressort donc comme plus pertinente comme vecteur pour l'apport en AGPI n-3 dans des suppléments.

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

L'analyse de la littérature révèle que le maintien de la masse et de la fonction musculaire des patients BPCO est primordial comme dans les autres maladies chroniques. Ces paramètres sont en effet fortement reliés au pronostic vital des patients ainsi qu'à leur qualité de vie et à leur tolérance à l'effort.

Les atteintes du tissu musculaire dans la BPCO sont à la fois quantitatives (diminution de la masse) et qualitatives (transition vers un métabolisme plus glycolytique, baisse de la capillarisation, modifications de la fonction mitochondriale...). Elles impactent les qualités de force et d'endurance dynamique des patients aboutissant à une moindre tolérance à l'effort.

Les causes de cette dysfonction musculaire sont nombreuses. L'inactivité semble en être l'une des principales, mais l'hypoxie tissulaire induite par la limitation ventilatoire, l'inflammation, la sarcopénie qui se surajoute aux autres causes et la dénutrition sont également des facteurs impliqués dans l'étiologie de cette dysfonction.

La réhabilitation par l'effort est actuellement la principale stratégie employée dans le contexte de la BPCO pour maintenir la masse musculaire et limiter la dysfonction, dans le but d'améliorer l'état de santé des patients.

L'efficacité du réentraînement est reconnue mais il présente malgré tout certaines limites. En effet une partie des patients se révèle non-répondeuse au réentraînement et une autre partie ne peut s'engager dans un protocole de réhabilitation physique car elle est trop sévèrement atteinte, ou l'abandonne pour diverses raisons incluant la pénibilité.

De plus, la cachexie observée chez certains patients, et qui peut découler d'apports nutritionnels insuffisants, a également conduit à proposer la réhabilitation nutritionnelle dans la prise en charge de la BPCO. Cependant, les suppléments caloriques pris hors d'un programme de réentraînement mènent à des résultats contradictoires. Outre l'aspect de la rééquilibration calorique, l'apport de nutriments possédant des propriétés particulières est à explorer car susceptible d'amener de meilleurs bénéfices.

Les AGPI n-3, et particulièrement le DHA, sont connus pour leurs effets positifs observés dans de nombreuses pathologies. Leur action anti-inflammatoire, de stimulation des défenses antioxydantes et leurs effets sur le métabolisme pourraient s'avérer profitables aux patients BPCO.

L'objectif de cette thèse était de caractériser les effets d'une supplémentation nutritionnelle en DHA (AGPI n-3) sur la tolérance à l'effort et sur des aspects qualitatifs

et quantitatifs, notamment métaboliques, du muscle squelettique dans un modèle de rat adulte hypoxique. Ce travail représente la première étape d'une recherche translationnelle vers les patients hypoxémiques souffrant de BPCO très sévère.

La réponse à cet objectif s'est articulée en trois temps.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser les effets d'une supplémentation en DHA sur les altérations de la capacité d'effort et de la fonction des mitochondries musculaires chez le rat adulte dont la croissance musculaire est terminée. Afin de déterminer si le type de muscle est déterminant dans la réponse à une telle supplémentation, la fonction mitochondriale sera évaluée sur des muscles possédant des métabolismes à dominante aérobie et à dominante glycolytique.

L'effet des AGPI n-3 au niveau des muscles squelettiques, et notamment du DHA, a été très peu étudié. Il convenait donc de caractériser les effets de cet AG au niveau notamment du métabolisme et du fonctionnement mitochondrial. Outre les éventuels effets du DHA sur le métabolisme mitochondrial, l'évaluation de son efficacité à induire une amélioration de paramètres fonctionnels comme la tolérance à l'exercice apparaissait primordiale pour établir son utilité. La plupart des études qui se sont intéressées aux effets d'une supplémentation en AGPI n-3 chez l'animal ont été conduites sur des animaux jeunes, encore en croissance musculaire. Nous avons décidé dans cette étude de travailler avec des animaux d'âge moyen ayant terminé leur croissance musculaire et présentant potentiellement les premiers signes de sarcopénie. Ce choix était notamment guidé par le fait que la BPCO, comme bon nombre de pathologies chroniques, est une maladie qui se déclare essentiellement en deuxième partie de vie, lorsque le muscle est entré dans le processus de sarcopénie.

Nous avons ensuite voulu caractériser les effets d'une supplémentation en DHA sur le métabolisme du muscle squelettique et la tolérance à l'effort de l'organisme sur un modèle de rat d'âge moyen exposé à l'hypoxie.

Ne disposant pas de modèle animal de BPCO présentant des atteintes musculaires, nous avons choisi le modèle du rat exposé à une hypoxie environnementale afin de nous rapprocher des effets occasionnés sur le muscle par la baisse de disponibilité en oxygène induite par l'atteinte respiratoire inhérente à la BPCO. Le choix d'un tel modèle apparaît cohérent du fait qu'il reproduit l'hypoxie tissulaire qui peut être rencontrée dans la BPCO très sévère (stade GOLD IV) et qui participerait à la dysfonction musculaire.

Enfin, nous avons souhaité déterminer sur ce modèle de rat d'âge moyen exposé à l'hypoxie si la supplémentation en DHA pouvait toujours être efficace lorsqu'elle était appliquée à des organismes soumis par ailleurs à un entraînement en endurance.

L'entraînement ayant des effets bénéfiques reconnus, la question qui reste posée est celle d'un éventuel bénéfice supplémentaire dû à la supplémentation en acides gras polyinsaturés de type n-3. En effet, l'étude précédente s'attachait à caractériser les effets propres des acides gras sur des animaux sédentaires. Nous pouvons raisonnablement penser que le DHA pourrait potentialiser les effets propres de l'entraînement. Dans une telle éventualité, l'introduction de la supplémentation en DHA dans la prise en charge des patients BPCO souffrant d'atteintes musculaires devrait être envisagée de façon plus systématique, en combinaison, lorsque c'est possible, avec un programme de réhabilitation par l'exercice.

MATERIELS ET METHODES

1. CONDITIONNEMENT DES ANIMAUX

L'ensemble des travaux a été réalisé sur des rats mâles de souche Wistar âgés de 9 ± 1 mois au début du conditionnement. Ils étaient élevés dans l'animalerie du laboratoire, avec un cycle lumière/obscurité alterné de 12h/12h, et avec un accès à volonté à un régime standard de type entretien (Safe A04) et à de l'eau de boisson. Au début du conditionnement de 9 semaines, les rats étaient placés en cages individuelles et mis sous régime carencé en AGPI (n-3) (Tableau 7). La prise alimentaire et le poids corporel des rats étaient relevés deux fois par semaine. Au cours du conditionnement, tous les rats étaient manipulés pour les changes des cages, pour les pesées bihebdomadaires et quotidiennement pour les gavages.

Tableau 7:

Composition du régime L5 Tournesol carencé en n-3.

Composé	Quantité (%)
Cellulose	5
Caséine chlorhydrique	18
Mélange minéral	5
Mélange vitaminique	1
Amidon de maïs	40
Maltodextrine	20
Sucre semoule	6
Huile de tournesol	5

1.1 Supplémentation en GPL-DHA®

Durant les 9 semaines de conditionnement, les rats étaient supplémentés quotidiennement par gavage soit avec un placebo, de l'eau, soit avec une préparation enrichie en GPL-DHA®

(90mg/kg/jour, dont près de 12 à 15mg/kg/jour de DHA) fournie par l'entreprise Application Santé des Lipides (ASL) et dont la composition est indiquée en annexe (annexe 2). Bien que les suppléments placebo et GPL-DHA ne soient pas isoénergétiques, l'apport calorique de la supplémentation en DHA reste minime. Un rapide calcul nous apprend que pour un rat de 500g dont la prise alimentaire est de 15g par jour, l'apport calorique par les lipides est d'environ 6,75 kcal/jour. Une estimation haute de l'apport énergétique de la supplémentation en GPL-DHA indique qu'elle représente quant à elle un apport calorique de 0,405 kcal/jour pour ce rat et donc compterait pour moins de 6% des apports en lipides quotidiens.

1.2 Hypoxie

Lors des trois dernières semaines de conditionnement, selon leur groupe expérimental, les rats étaient soit maintenus en normoxie, soit exposés à une hypoxie normobare avec une FiO_2 de 12%. Ils étaient sortis du caisson hypoxique 5 jours par semaine pour le gavage, les pesées, ainsi que l'entraînement pour les groupes de rats entraînés en endurance.

1.3 Entraînement en endurance

Notre protocole d'entraînement en endurance a consisté en de la course en normoxie sur tapis roulant à une vitesse de 20m/min sur une pente à 10%, ce qui correspond approximativement pour des rats jeunes à 85% de VO_2max (Wisloff et al. 2001). Les rats étaient entraînés 1h par jour, 5 jours par semaine pendant les trois dernières semaines de conditionnement.

1.4 Groupes expérimentaux

Les animaux ont été répartis en 7 groupes homogénéisés en fonction de leur poids de départ (figure 30):

- Groupe Normoxie (N) (ou contrôle dans l'étude 1 (C)) : les animaux étaient maintenus en normoxie et un placebo leur était administré quotidiennement pendant les 9 semaines de conditionnement,
- Groupe DHA : les animaux étaient maintenus en normoxie et un mélange enrichi en GPL-DHA® leur était administré quotidiennement pendant les 9 semaines de conditionnement,
- Groupe Hypoxie (H) : les animaux étaient placés en hypoxie normobare ($FiO_2=12\%$) durant les 3 dernières semaines du conditionnement. Un placebo leur était administré quotidiennement pendant les 9 semaines de conditionnement,

- Groupe Hypoxie + DHA (H + DHA) : les animaux étaient placés en hypoxie normobare ($FiO_2=12\%$) durant les 3 dernières semaines du conditionnement. Un mélange enrichi en GPL-DHA® leur était administré quotidiennement pendant les 9 semaines de conditionnement,
- Groupe Normoxie + Entraînement (NE) : les animaux étaient entraînés en endurance durant les trois dernières semaines de conditionnement. Un placebo leur était administré quotidiennement pendant les 9 semaines de conditionnement,
- Groupe Hypoxie + Entraînement (HE) : les animaux étaient entraînés en endurance et placés en hypoxie normobare ($FiO_2=12\%$) durant les trois dernières semaines de conditionnement. Un placebo leur était administré quotidiennement pendant les 9 semaines de conditionnement,
- Groupe Hypoxie + Entraînement + DHA (HE + DHA) : les animaux étaient entraînés en endurance et placés en hypoxie normobare ($FiO_2=12\%$) durant les trois dernières semaines de conditionnement. Un mélange enrichi en GPL-DHA® leur était administré quotidiennement pendant les 9 semaines de conditionnement.

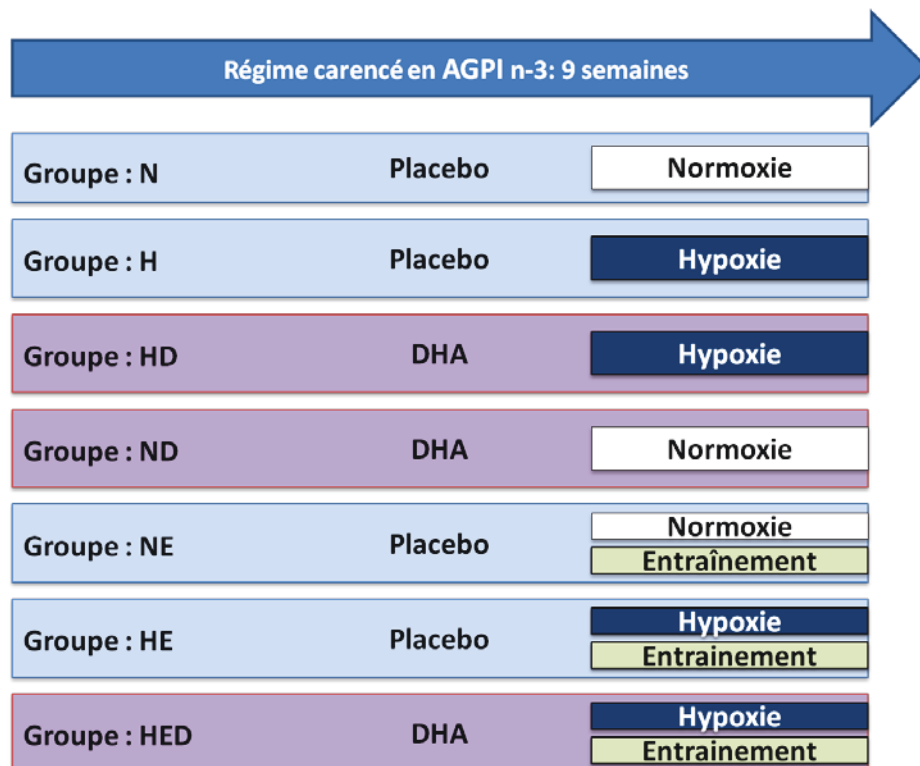


Figure 30:
Groupes expérimentaux et traitements appliqués au cours du conditionnement.

2. EVALUATION DE LA PERFORMANCE AEROBIE

2.1 Habituation à la course sur tapis roulant

La semaine précédant l'épreuve d'endurance, tous les rats étaient soumis à un protocole d'habituation au tapis roulant de 5 jours. Ils couraient chaque jour 5 minutes à une vitesse de 15 m/min progressivement augmentée jusqu'à atteindre 20 m/min. Cette habitude permettait de familiariser les animaux au tapis roulant et donc de limiter le stress lié à son utilisation.

2.2 Epreuve d'endurance maximale

Afin d'évaluer leur performance aérobie, chaque animal était soumis à une épreuve d'endurance maximale 2 à 3 jours avant la fin de son conditionnement. Elle consistait en une course sur tapis roulant à une vitesse de 20 m/min avec une pente de 10% jusqu'à épuisement du rat. Un dispositif de stimulations électriques permettait d'encourager les rats à poursuivre l'exercice. Afin d'être le plus constant possible dans l'évaluation de l'épuisement des rats, il était considéré que lorsque les rats subissaient 15 décharges électriques en moins d'une minute, alors ils avaient atteint leur limite physiologique. Les rats du groupe Normoxie (N) effectuaient cette épreuve dans des conditions normoxiques tandis que les rats des groupes Hypoxie et Hypoxie + DHA couraient en hypoxie (FiO_2 proche de 14%) afin de mimer la baisse de disponibilité en oxygène rencontrée dans la BPCO et donc de réaliser l'épreuve d'effort dans des conditions proches de celles dans lesquelles les patients BPCO réalisent des exercices.

2.3 Calorimétrie indirecte

La dépense énergétique des animaux a été déterminée par calorimétrie indirecte grâce à une chaîne de mesure composée de 4 cages métaboliques reliées à un analyseur d' O_2 et un analyseur de CO_2 (Panlab s.l.). Les animaux étaient placés dans les cages 36 heures avant la fin du protocole et les mesures étaient enregistrées après 12 heures d'acclimatation et pendant les 24 heures suivantes. Les données recueillies ont été traitées à l'aide du logiciel Metabolism V2.0 (Panlab s.l.).

2.4 Anesthésie et euthanasie des animaux

Afin d'explorer la fonction cardiaque *in situ* par sonde Millar, les rats étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (30 à 40 mg/kg du poids corporel). Ils étaient ensuite

euthanasiés par excision du cœur pour pouvoir ensuite procéder aux prélèvements et à la préparation des mitochondries isolées.

3. EXPLORATION DE LA FONCTION CARDIAQUE IN SITU

3.1 La sonde de pression miniature « Millar »

L'utilisation du micro capteur de pression Millar (modèle PR-249) permet une exploration *in situ* des paramètres fonctionnels des ventricules droit et gauche, avec une déformation minimale du signal puisque le capteur est introduit directement à l'intérieur de chacune des deux cavités ventriculaires. Il est relié à un transducteur (modèle TC-100), lui-même connecté à un électromanomètre et différentiateur Gould (modèle Gould 2200 recorder).

Cette technique de cathétérisation des ventricules cardiaques avec le microcapteur Millar est devenue, grâce notamment aux travaux de Zimmer et al. (Zimmer 1983; Zimmer et al. 1988), une méthode de routine pour la caractérisation de la fonction cardiaque de petits animaux intacts ou sous différentes conditions physiopathologiques.

3.2 Protocole d'exploration des fonctions ventriculaires droite et gauche

L'exploration se déroulait au repos, sur animal anesthésié.

Une dissection rapide au niveau du cou permettait d'isoler les vaisseaux dans lesquels la sonde de pression Millar était introduite puis poussée jusqu'aux ventricules. Afin d'éviter toute perte excessive de sang, une ligature céphalique suivie de la pose d'un clamp en position distale étaient réalisées avant l'incision du vaisseau concerné. Une fois la sonde introduite, le clamp était relâché pour permettre le passage de la sonde jusqu'à l'intérieur du ventricule.

L'exploration fonctionnelle débutait par le ventricule droit. La sonde était alors introduite dans la veine jugulaire droite puis poussée jusque dans la veine cave supérieure, l'oreillette droite et enfin le ventricule droit. Après 10 min de stabilisation, les différents paramètres fonctionnels étaient enregistrés. La sonde était ensuite retirée et la veine complètement ligaturée pour éviter l'écoulement sanguin.

L'exploration de la fonction ventriculaire gauche se déroulait ensuite de la même manière. Après introduction dans l'artère carotide droite, la sonde Millar atteignait le ventricule gauche en

passant par la crosse aortique. Comme pour le ventricule droit, l'enregistrement ne débutait qu'après 10 min de stabilisation.

3.3 Les différentes variables enregistrées

Pour chacun des deux ventricules, les variables fonctionnelles enregistrées étaient les suivantes :

- La pression développée par le ventricule (= P systolique – P diastolique), exprimée en mmHg,
- La fréquence cardiaque,
- Les indices caractérisant la contractilité myocardique (exprimés en mmHg/s) :
 - dP/dt max = vitesse de mise en tension des fibres cardiaques
 - dP/dt min = vitesse de relâchement des fibres.

4. PRELEVEMENTS TISSULAIRES

Le sang était prélevé au niveau de la crosse abdominale aortique dans une seringue héparinée. Il était ensuite centrifugé à 4000 g pendant 10 min à 4 °C afin de séparer le plasma et les globules rouges qui étaient récupérés et congelés à -80 °C pour analyses ultérieures.

Les portions profondes des muscles quadriceps des deux pattes postérieures étaient prélevées. Une partie des muscles était découpée et congelée par immersion dans de l'azote liquide puis conservée à -80 °C pour analyses ultérieures. Le reste du muscle prélevé était utilisé pour l'isolement des mitochondries par centrifugations différentielles.

La partie blanche du muscle gastrocnémien, le muscle soléaire et le muscle plantaire étaient prélevés pour la préparation de fibres isolées perméabilisées. Ces mêmes muscles étaient également prélevés sur la patte controlatérale pour être cette fois-ci pesés (plantaire et soléaire), découpés et congelés par immersion dans l'azote liquide, puis conservés à -80 °C pour analyses ultérieures.

Le cœur entier était prélevé. Le ventricule droit était disséqué puis pesé. L'ensemble ventricule gauche et septum, le foie, le tissu adipeux rétropéritonéal, le tissu adipeux viscéral ainsi que les reins et la rate étaient pesés. Une portion de chaque tissu à l'exception des reins et de la rate était congelée par immersion dans l'azote liquide et ensuite conservée à -80 °C.

5. ETUDE DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE

5.1 Isolement des mitochondries

L'isolement des mitochondries a été réalisé selon une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugations différentielles utilisée en routine au laboratoire. Pour limiter les dégradations par les protéases, toutes les procédures d'isolement se déroulaient à 4 °C en moins de 1h15.

Les parties profondes oxydatives des muscles quadriceps prélevées sur les animaux étaient immédiatement plongées dans un tampon d'homogénéisation refroidi à 4°C (saccharose 150 mM, KCl 75 mM, Tris-base 50 mM, KH_2PO_4 1 mM, MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4). Les morceaux de muscle étaient émincés à l'aide de ciseaux puis incubés dans 30 mL de tampon d'homogénéisation additionné de 0,2% de BSA (albumine sérique de bœuf) délipidée. Les morceaux obtenus étaient ensuite soumis à l'action d'une protéase, la subtilisine, ajoutée à raison de 6 mg pour 30 mL de tampon. Après une minute d'incubation, la préparation était homogénéisée à l'aide de plusieurs passages d'un piston en téflon motorisé, tournant à 500 tours/min dans un broyeur de potter en verre. Le volume d'homogénat obtenu était ensuite complété par du tampon d'homogénéisation puis centrifugé à 800 g pendant 10 minutes à 4 °C, afin de sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant contenant les mitochondries était filtré sur une toile à fine trame, et collecté dans un tube à centrifugation propre. Le volume était complété avec du tampon d'homogénéisation. Les tubes étaient ensuite centrifugés à 8000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Après élimination du surnageant, le culot enrichi en mitochondries était délicatement remis en suspension à l'aide d'une micropipette avec 1 mL de tampon d'homogénéisation. La suspension de mitochondries était ensuite diluée avec du tampon d'homogénéisation et lavée par centrifugation à 8000 g pendant 10 min à 4 °C. Les mitochondries contenues dans le culot étaient de nouveau remises en suspension avec 300 à 400 μL de tampon d'homogénéisation puis conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

5.2 Détermination des concentrations protéiques

Les concentrations protéiques étaient mesurées à l'aide de la méthode à l'acide bicinchoninique (kit BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL) basée sur la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines lorsqu'elles sont dans un milieu alcalin. L'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^+ avec une très forte spécificité et forme un complexe soluble coloré en violet dont l'intensité de coloration peut se mesurer par spectrophotométrie à 562 nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique qui est calculée à l'aide

d'une courbe-étalon, établie selon la même procédure, avec une solution de BSA à 2 mg/mL comme standard.

Les préparations de mitochondries à doser étaient diluées au 1/50^{ème} avec de l'eau ultra-pure. Des aliquots de 25 µL d'échantillons dilués étaient déposés en triplicata sur une microplaque de 96 puits et 200 µl de réactif de Pierce[®], préparé selon les recommandations du fabricant, étaient ensuite déposés dans chaque puits. Après une incubation de 30 minutes à 37 °C, la lecture de l'absorbance de chaque puits était effectuée à l'aide d'un lecteur de plaque (ELX800 BioTek Instruments) à 562 nm. Les résultats étaient ensuite traités par le logiciel KC Junior et exprimés en mg/mL, corrigés par le facteur de dilution.

5.3 Préparation de fibres isolées perméabilisées de muscles squelettiques

5.3.1 Principe de la perméabilisation

Le but de la perméabilisation est de permettre l'accès contrôlé des métabolites vers les mitochondries afin d'étudier la fonction mitochondriale *in situ*. La saponine est le détergent choisi comme agent de perméabilisation car elle a une forte affinité pour le cholestérol. Par conséquent, elle dégrade donc préférentiellement les membranes contenant une grande quantité de cholestérol, comme c'est le cas du sarcolemme. En revanche, elle laisse relativement intacte les membranes contenant peu de cholestérol comme les membranes mitochondriales (Kuznetsov et al. 2008). Pour limiter les dégradations, toutes les étapes se déroulaient à 4 °C en moins de 1h30.

5.3.2 Étapes de dilacération et perméabilisation

Après prélèvement, les muscles soléaire, gastrocnémien blanc et plantaire étaient plongés dans une solution de conservation à 4 °C (Solution A de conservation : CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM, MgCl₂ 6,56 mM, Na₂-ATP 5,3 mM, DTT 0,5 mM, Imidazole 20 mM, K-MES 50 mM, Taurine 20 mM, Phosphocréatine 15 mM, BSA 15%, pH 7,3) où ils étaient ensuite dilacérés à l'aide de pinces sous loupe binoculaire (Vision engineering, Angleterre). Les fibres dilacérées étaient ensuite transférées dans une solution A contenant 25 µg/mL de saponine et agitées 30 min à 4 °C.

5.3.3 Etapes de rinçage et pesée

Les fibres étaient ensuite rincées par 3 bains de 5 min dans une solution B à 4 °C (CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM, MgCl₂ 1,38 mM, K₂HPO₄ 3 mM, DTT 0,5 mM, Imidazole 20 mM, K-MES 100 mM, Taurine 20 mM, BSA 0,2%, pH 7,3) avant d'être stockées dans un dernier bain de solution B jusqu'aux mesures d'oxygraphie.

Après les mesures d'oxygraphie, les fibres étaient récupérées et transférées dans des microtubes pour séchage. Après une nuit à l'air libre, elles étaient placées dans un bain sec à une température de 100 °C pour terminer l'évaporation. Les fibres séchées étaient ensuite pesées afin de normaliser les mesures de respiration mitochondriale en fonction du poids sec de fibres.

5.4 Oxygraphie

5.4.1 Principe

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées et des fibres isolées perméabilisées était mesurée à l'aide d'un oxygraphe de type Hansatech Instruments équipé d'une chambre d'incubation de 1 mL (figure 31A) agitée et thermostatée à 30 °C pour les mitochondries et 25 °C pour les fibres isolées perméabilisées. Cette chambre était munie d'une électrode de type Clark composée d'une cathode en platine polarisée à -0,7 volts et d'une anode en argent au contact d'une solution de KCl à demi-saturée. Une membrane en téflon perméable à l'oxygène séparait l'électrode du milieu à mesurer. Lorsque l'oxygène est réduit au niveau de la cathode, une différence de potentiel proportionnelle à la quantité d'oxygène présente dans le milieu est créée (figure 31B). Il est donc possible de mesurer directement la vitesse de respiration mitochondriale dans différentes conditions expérimentales. Les signaux produits par les électrodes étaient recueillis et traités à l'aide du logiciel Oxygraph+ (Hansatech Instruments) puis exprimés en nmol d'O₂/min.

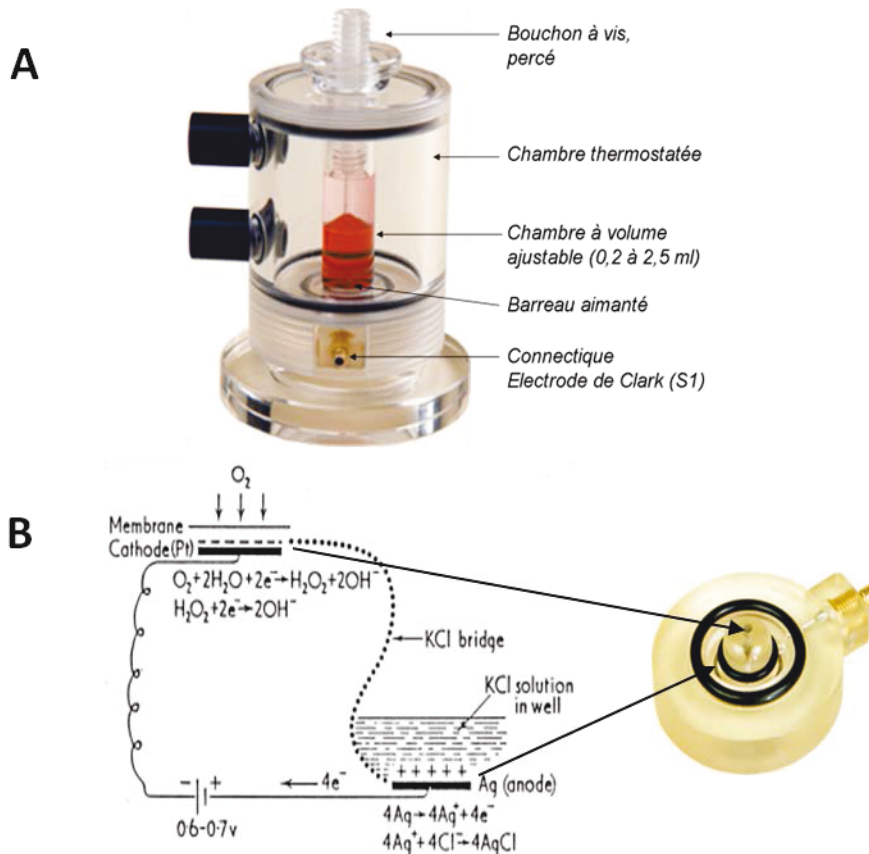


Figure 31:
Chambre d'oxygraphie à volume ajustable (Hansatech Instruments) (A). Schéma de principe de l'électrode de Clark (Hansatech Electrode S1) (B).

5.4.2 Protocole expérimental sur mitochondries isolées

Les mesures de consommation d'oxygène sur mitochondries isolées étaient réalisées par simple adjonction des organites (0,2 mg/mL de mitochondries musculaires) à 0,5 mL de tampon de respiration (KCl 125 mM, Tris-base 20 mM, EGTA 1 mM, BSA délipidée 0,15%, Pi-Tris 5 mM, pH 7,2). Différents substrats respiratoires, permettant d'isoler fonctionnellement les sites de couplage de la chaîne respiratoire, étaient utilisés en concentrations saturantes (figure 32):

- une association de glutamate 5 mM/malate 2,5 mM (G/M) qui permet d'explorer la chaîne respiratoire à partir de la NADH-ubiquinone déshydrogénase (complexe I),
- du succinate à 5 mM (S) qui stimule la chaîne respiratoire à partir de la succinate déshydrogénase (complexe II),
- une association glutamate 5 mM/malate 2,5 mM/succinate 5 mM (G/M/S) qui permet d'activer l'ensemble de la chaîne respiratoire,

- de l'octanoyl-carnitine 100 μM (Oct) qui permet d'explorer l'action d'un acide gras à chaîne courte sur la respiration mitochondriale,
- une association N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine (TMPD)-ascorbate (525 μM -210 μM) constituant un couple donneur-accepteur d'électrons pour le complexe IV. Le TMPD réduit le cytochrome c, substrat de la cytochrome oxydase et l'ascorbate est utilisé pour régénérer la forme réduite du TMPD qui peut à nouveau réduire le cytochrome c. Lorsqu'ils sont associés au découplant protonophore 2,4-dinitrophénol (DNP) (80 μM), ils permettent l'obtention d'une respiration découplée de la synthèse d'ATP.

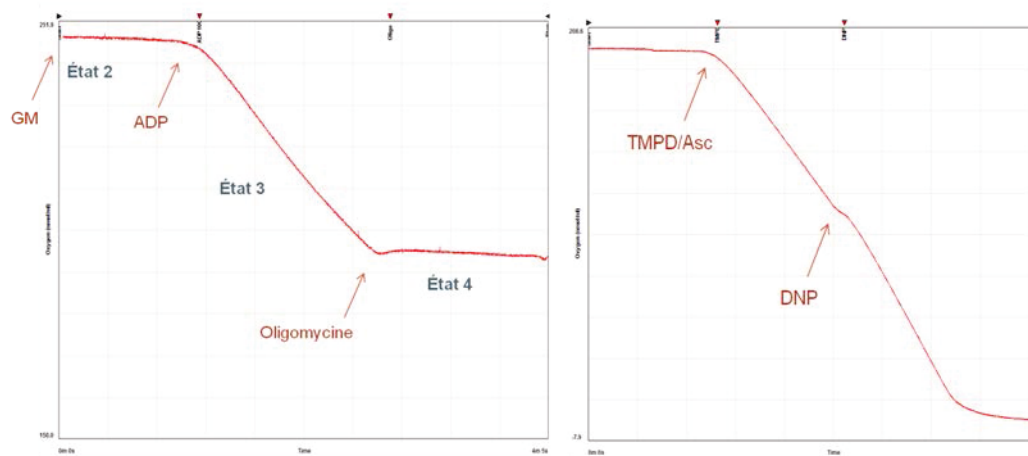


Figure 32:

Exemples de tracés d'oxygraphie sur mitochondries isolées présentant les différents états respiratoires en fonction de l'addition des substrats ou inhibiteurs. TMPD-Asc : N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine-Ascorbate, DNP: 2,4-dinitrophénol.

La mesure de la consommation d'oxygène en présence de substrat seul donne la respiration dite à l'état 2. L'adjonction de 1 mM d'ADP permet d'obtenir la respiration à l'état 3, c'est à dire en conditions phosphorylantes (figure 32). L'ajout d'oligomycine 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibiteur de l'ATP synthase, permet d'obtenir la respiration résiduelle à l'état 4, conséquence d'une réentrée passive de protons au travers de la membrane.

5.4.3 Protocole expérimental sur fibres isolées perméabilisées

La consommation d'oxygène des fibres perméabilisées était mesurée après l'ajout des fibres dans la chambre d'oxygraphie contenant 1 mL de solution B. Deux types de protocoles étaient ensuite appliqués : la mesure de la consommation d'oxygène en fonction de concentrations croissantes d'ADP ("cinétique à l'ADP") avec comme substrats le mélange Glutamate (5 mM)/Malate (2,5 mM)/Succinate (5 mM) pour les trois études et Glutamate (5 mM)/Malate (2,5 mM) pour l'étude 3, et

la mesure de la vitesse de consommation maximale d'oxygène en fonction de différents substrats (V_{max}) en concentrations saturantes :

- le mélange Glutamate (5mM)/Malate (2,5 mM),
- le Succinate (5 mM),
- le mélange Glutamate (5 mM)/Malate (2,5 mM)/Succinate (5 mM).

La mesure de consommation en substrat seul permet de connaître la respiration en état basal (état 2). L'ajout de 1 mM d'ADP induit la vitesse maximale de respiration, correspondant à l'état phosphorylant (état 3) (figure 33).

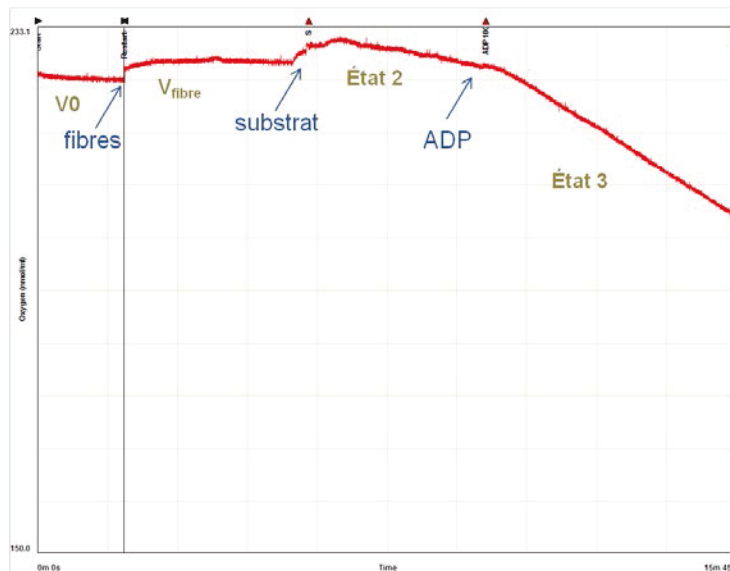


Figure 33:

Exemple de tracé d'oxygraphie obtenu sur fibres perméabilisées. La V_0 représente la dérive de l'électrode, la V_{fibre} la respiration mitochondriale des fibres en absence de substrat et d'ADP, l'état 2 correspond à la respiration mitochondriale basale en présence de substrat et l'état 3 est la respiration mitochondriale en état phosphorylant, induit par l'ajout d'ADP.

Le but de la mesure avec des concentrations croissantes d'ADP est de déterminer l'affinité de l'oxydation phosphorylante pour l'ADP exogène (figure 34). En raison des différences d'affinités rapportées dans la littérature (Kuznetsov et al. 2008) pour les différents muscles étudiés, les gammes de concentrations en ADP utilisées étaient spécifiques de chaque muscle :

- Pour le gastrocnémien : 0,5-1-2-4-24-74-274-1274 μ M d'ADP,
- Pour le plantaire : 0,5-1-4-54-254-754-1754-2754 μ M d'ADP,
- Pour le soléaire : 1-3-53-153-353-853-1853-2853 μ M d'ADP,

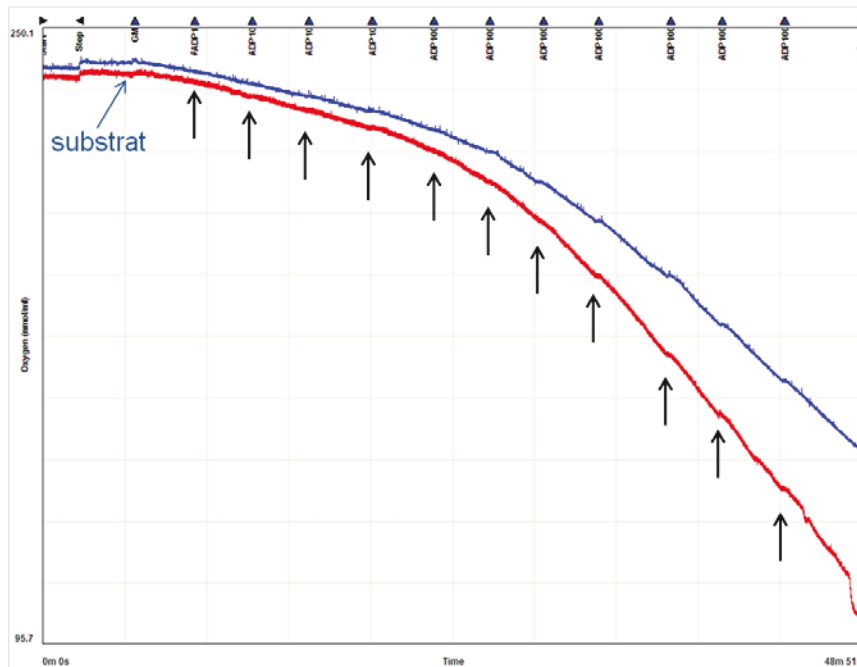


Figure 34:

Exemple de tracés d'oxygraphie lors d'un protocole de cinétique à l'ADP. En présence de substrat, l'ADP est apporté aux fibres à des concentrations croissantes. Chaque flèche verticale correspond à un ajout d'ADP.

Dans ces conditions, la VO_2 exprimée ensuite en fonction de la concentration en ADP, suit l'équation de Michaelis et Menten qui permet de déterminer le K_m apparent caractérisant l'affinité du système pour le substrat. Sa valeur était obtenue à partir des données expérimentales (V) et des concentrations connues d'ADP utilisés dans un modèle de modélisation non linéaire, conduite par itérations successives afin d'obtenir le meilleur ajustement des données expérimentales au modèle cinétique :

$$v = V_{max} \times [ADP] / (K_m + [ADP]) = y_{calc}$$

Une fois obtenue, la courbe modélisée à partir des données expérimentales était utilisée pour le calcul du K_m apparent.

5.5 Mesure de la capacité de rétention calcique sur mitochondries isolées

5.5.1 Principe

La capacité de rétention calcique était mesurée sur un spectrofluorimètre Biotek SFM25 couplé à un ordinateur permettant le recueil et l'analyse des données en mode cinétique. La capacité de rétention calcique est estimée par la quantité de calcium nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) mitochondrial. Cette mesure permet donc

d'analyser dans différentes conditions (avec ou sans inhibiteur par exemple), la réponse du PTP à son inducteur le plus puissant : le calcium. En pratique, le calcium est ajouté à la suspension mitochondriale à concentrations et temps fixes. Le nombre d'ajouts de calcium nécessaire pour déclencher la perméabilité transitionnelle mitochondriale représente la capacité de rétention calcique (CRC). L'ouverture du PTP est repérée grâce à la fluorescence émise par la sonde calcium green lorsque celle-ci se lie au calcium extra-mitochondrial. Le calcium green lié au calcium est excité par un faisceau d'une longueur d'onde de 506 nm. Il revient à son état non-excité en émettant à la longueur d'onde de 530 nm. Ainsi, à chaque ajout de calcium, un pic d'augmentation de la fluorescence est observé (figure 35). La fluorescence diminue ensuite au fur et à mesure de l'entrée du calcium dans les mitochondries, et ceci jusqu'à l'ajout suivant de calcium ou jusqu'à l'ouverture du pore qui survient lorsque la quantité de calcium accumulée dans la mitochondrie est supérieure à sa capacité de rétention calcique. Dans ce cas, la mitochondrie relargue du calcium, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence (figure 35).

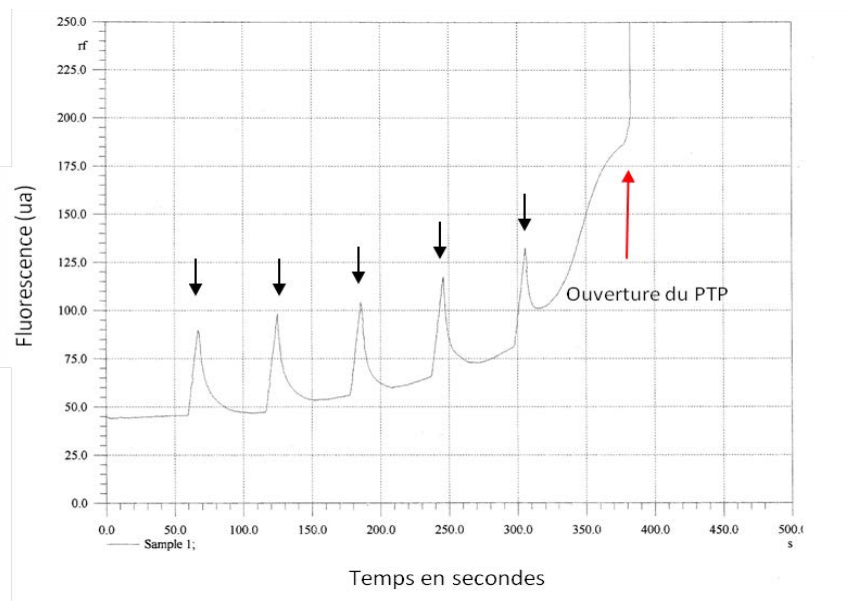


Figure 35:

Exemple de tracé de la mesure de la capacité de rétention calcique de mitochondries musculaires par l'enregistrement de la fluorescence du calcium green réagissant avec le calcium extra mitochondrial. Toutes les minutes, une charge de calcium est ajoutée (flèches orientées vers le bas) jusqu'à l'ouverture du pore (flèche orientée vers le haut) qui se manifeste par une libération massive de calcium hors de la mitochondrie.

5.5.2 Protocole expérimental

En pratique, dans une cuve thermostatée à 30 °C et maintenue sous agitation, 0,05 mg de protéines mitochondriales étaient ajoutées à un milieu réactionnel composé de 1 mL de tampon de

CRC (saccharose 250 mM, Tris-MOPS 10 mM, Pi-Tris 1 mM, pH 7,4) additionné de substrat (soit succinate 5 mM, soit glutamate/malate 5 mM/2,5 mM) et de 0,125 μ M de calcium green. Après 2 minutes de stabilisation, l'enregistrement de la fluorescence débutait. Toutes les minutes, une charge de calcium (10 μ M) était ajoutée dans la cuve jusqu'à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (figure 35). En plus de cette condition de référence, la mesure était également effectuée en présence de cyclosporine A (CsA), inhibiteur de référence de l'ouverture du PTP. Pour cela, 1 μ M de CsA était additionné au milieu réactionnel avant le début de la mesure. Dans ces conditions, l'inhibition de l'ouverture du PTP par la CsA se traduit par une quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore supérieure à la condition de référence.

5.6 Mesure de la production de ROS sur mitochondries isolées

5.6.1 Principe

La mesure de production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale est estimée par la mesure de libération de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence de peroxydase du raifort (horseradish peroxidase, HRP) l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) est oxydé par l' H_2O_2 en un composé dimérique fluorescent : la Resorufin ($\lambda_{excitation} = 560$ nm et $\lambda_{émission} = 584$ nm) dans un rapport stœchiométrique de 1:1 (figure 36).

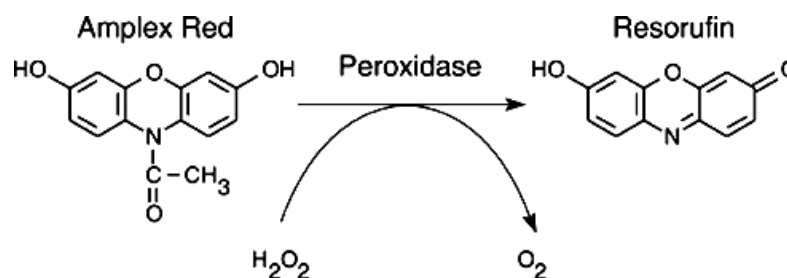


Figure 36:
Equation d'oxydation de l'Amplex Red par l' H_2O_2 .

La Resorufin est excitée par un faisceau monochromatique d'une longueur d'onde de 560 nm. Son retour à l'état non excité génère un photon détectable dans la longueur d'onde d'émission spécifique du composé : 584nm. La fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la production d' H_2O_2 . Il est donc possible de mesurer directement la vitesse de production mitochondriale d' H_2O_2 en fonction de différentes conditions de substrats et d'inhibiteurs.

5.6.2 Protocole expérimental

En pratique, les mesures étaient effectuées avec un spectrofluorimètre thermostaté à 30 °C (Hitachi F4100) couplé à un ordinateur permettant le recueil et l'analyse des données en cinétique. Elles étaient réalisées dans une cuve en quartz contenant 1 mL de milieu réactionnel (KCl 125 mM, Tris Base 20 mM, EGTA 1 mM, BSA délipidée 0,15%, pH 7,2) auquel était ajouté extemporanément 1 μ M d'Amplex Red et 5 U/mL de HRP. Les mitochondries étaient ensuite ajoutées (0,2 mg/mL) dans la cuve.

La mesure comprenait une succession d'états stables de 2 min (figure 37). Après une période de stabilisation correspondant à la production basale de ROS, un des 4 substrats respiratoires d'intérêt était ajouté dans la cuve : le mélange glutamate/malate (5 mM / 2,5 mM), le succinate (5 mM), le mélange glutamate/malate/succinate (5 mM / 2,5 mM / 5 mM) ou l'octanoyl-carnitine (100 μ M) permettant de mesurer la production de ROS à l'état 2. Puis, 3 μ M de roténone étaient ajoutés pour mesurer la production de ROS lorsque le complexe I était inhibé. Enfin l'enregistrement se terminait par la mesure de la production de ROS au niveau du complexe III grâce à l'ajout de 3 μ M d'un inhibiteur du complexe III, l'Antimycine A. La production de H₂O₂ était ensuite exprimée en pmol d'H₂O₂/mg de protéines grâce à la mesure de la variation de fluorescence engendrée par l'ajout au milieu réactionnel, contenant les mitochondries, d'une quantité connue d'H₂O₂ (équivalente à 450 pmol et évaluée par spectrométrie : $\lambda_{\text{absorption H}_2\text{O}_2} = 240 \text{ nm}$).

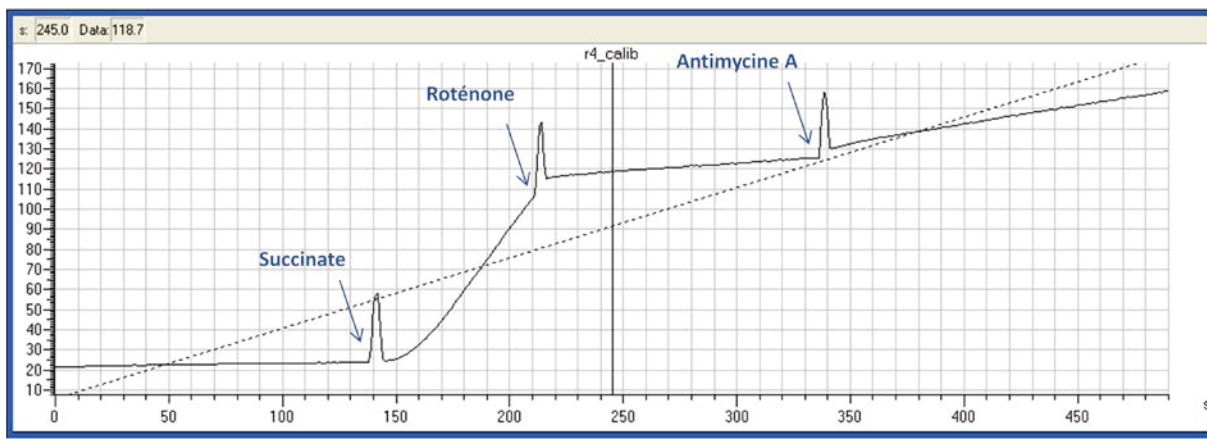


Figure 37:

Exemple de tracé obtenu lors de la mesure de production de ROS par fluorimétrie en fonction du temps et de l'addition des substrats ou inhibiteurs. Ici du succinate est ajouté à 140s, de la roténone à 210s et de l'antimycine A à 340s.

6. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

6.1 Préparation de homogénats musculaires

Des homogénats au 1/10^{ème} de muscle soléaire et de gastrocnémien blanc étaient réalisés à 4 °C, dans un tampon phosphate 100 mM, pH=7,4. Les tissus étaient broyés à l'aide d'un broyeur à billes (Rescht MM300) pendant 4 min à 30 Hz, puis centrifugés à une vitesse de 100 g pendant 10 min à 4 °C. Les concentrations protéiques étaient mesurées à l'aide de la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL) décrite précédemment.

6.2 Mesures de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire

6.2.1 Principe

Le principe des dosages repose sur le transfert d'électrons d'un donneur à un accepteur. Les dosages permettent la mesure par spectrophotométrie du taux d'apparition de l'accepteur réduit ou du taux de disparition du donneur oxydé, selon les cas.

Les activités s'expriment en μmoles de substrats transformés ou de produits apparus par minute et par mg de protéines mitochondriales à partir de la variation de densité optique (ΔDO) du substrat ou produit suivi, conformément à la loi de Beer-Lambert :

$$\Delta DO = \epsilon.l.C$$

ϵ : coefficient d'extinction molaire exprimé en $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, l : longueur du trajet optique en cm et C : concentration des espèces absorbantes en mM.

Toutes les mesures d'activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire ont été réalisées dans des cuves agitées et thermostatées à 37 °C.

6.2.2 Mesure de l'activité du complexe I

Cette technique détermine l'activité NADH-ubiquinone oxidoreductase roténone-sensible, par mesure de la décroissance de la fluorescence du NADH (figure 38).

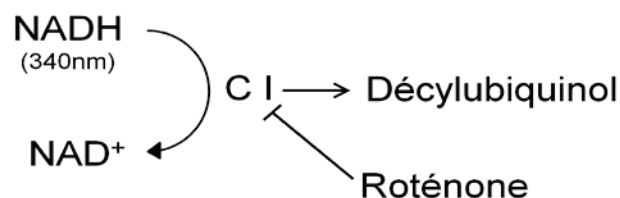


Figure 38:
Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe I.

Un aliquot de 10 μL d'homogénat de soléaire dilué au 1/100^{ème} était ajouté à 945 μL d'un milieu réactionnel composé de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,4, BSA délipidée 3,75 mg/mL, NADH 100 μM , décylubiquinol 100 μM , réalisé extemporanément. L'oxydation du NADH était suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 340 nm pendant 2 minutes, correspondant à l'activité totale. L'addition de 10 μM de rotenone pendant 2 minutes permettait de déterminer la dérive liée à une oxydation du NADH non spécifique au complexe I pour la soustraire à l'activité totale de façon à obtenir l'activité spécifique. Les résultats étaient exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines à partir du coefficient d'extinction molaire (ϵ) d'une mole de NADH égal à $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

6.2.3 Mesure de l'activité du complexe II

Cette mesure déterminant l'activité dépendante de la succinate déshydrogénase a été faite en suivant la réduction du 2,6-dichloroindophénol (DCIP) par les électrons transférés du succinate vers la décylubiquinone (Figure 39).

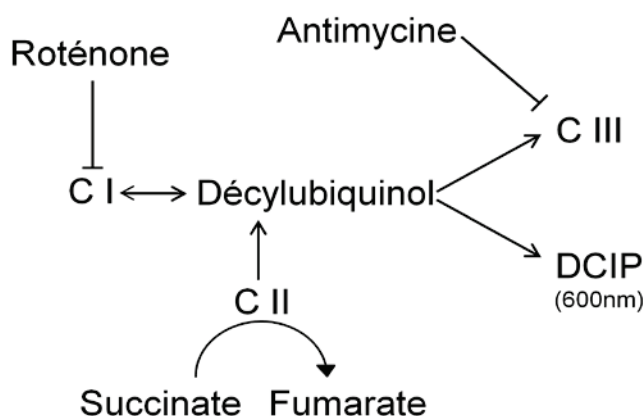


Figure 39:
Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe II.

Un aliquot de 10 μL d'homogénat de soléaire dilué au 1/100^{ème} était ajouté à un milieu réactionnel composé de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,4, BSA délipidée 3,75 mg/mL, Succinate 30

mM, décylubiquinol 50 μM , Antimycine A 9,3 μM , roténone 5 μM , dichloro-indophénol (DCIP) 100 μM , préparé extemporanément. La réduction du DCIP était suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 600 nm pendant 3 minutes à 37 °C. Les résultats étaient exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines à partir du coefficient d'extinction molaire (ϵ) d'une mole de DCIP égal à 19,1 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

6.2.4 Mesure de l'activité du complexe III

Cette mesure est basée sur la mesure de la décroissance de la fluorescence du cytochrome c oxydé (figure 40).

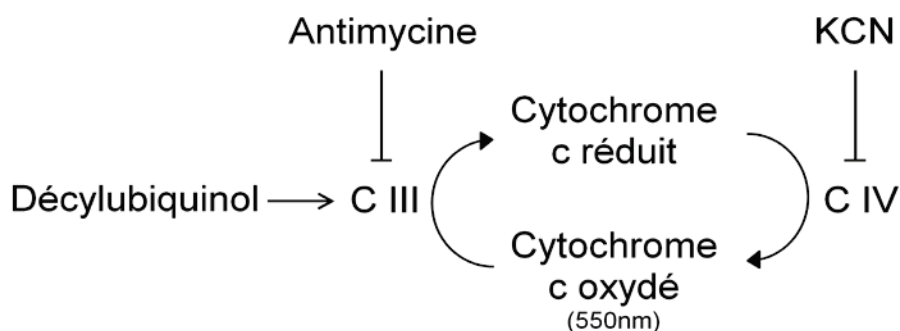


Figure 40:
Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe III.

L'activité du complexe III était mesurée en présence de décylubiquinol en tant que substrat du complexe III et de roténone et KCN pour inhiber respectivement les complexes I et IV. Une première mesure d'absorbance, correspondant à l'activité totale, s'effectuait à 550 nm (cytochrome c oxydé) pendant 1 min à 30 °C sur l'homogénat de soléaire dilué au 1/100^{ème} dans du tampon (KPi 90,7 mM pH 7,5, EDTA 50 μM , KCN 1 mM, cytochrome c oxydé 100 μM , décylubiquinol 0,11 mM, roténone 5 mM). Ensuite 9,3 μM d'antimycine A étaient ajoutés pour mesurer pendant 2 min l'activité non spécifique et la soustraire à l'activité mesurée précédemment.

6.2.5 Mesure de l'activité du complexe IV

Cette mesure est basée sur la détermination de la vitesse d'oxydation du cytochrome c réduit à 95% par la cytochrome oxydase (figure 41).

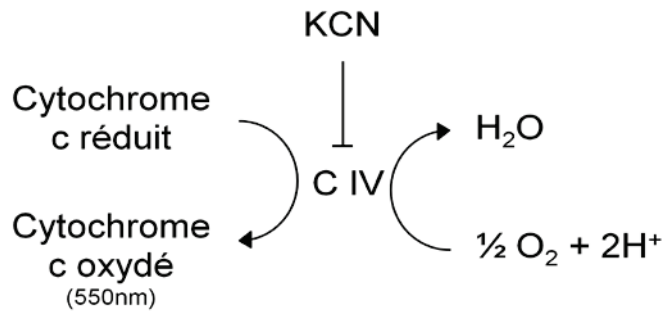


Figure 41:
Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe IV.

Pour les mesures, un aliquot de 10 μL d'homogénat de soléaire dilué au 1/100^{ème} ont été placés dans 990 μL de mélange réactionnel composé de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,4 contenant 50 μM de cytochrome c réduit au préalable à 90 % avec du dithionite de sodium. L'oxydation du cytochrome c a été suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 550 nm à 37 °C pendant 2 min 30. L'activité non spécifique était mesurée après l'ajout de KCN 1 mM pendant 2 min 30 et soustraite à l'activité initialement mesurée pour donner l'activité spécifique. Les résultats ont été exprimés en nmol/min/mg protéines en utilisant le coefficient d'extinction molaire (ϵ) du cytochrome c égal à 29,5 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

6.3 Mesure de l'activité de la citrate synthase

6.3.1 Principe

La citrate synthase est une enzyme du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, spécifique de la matrice mitochondriale. Son activité exprimée par quantité de tissu est considérée comme un index de la densité mitochondriale ou plus précisément de la quantité de cycle de Krebs. L'activité de la citrate synthase était mesurée selon la technique colorimétrique de Srere (Faloona et Srere 1969) basée sur la mesure de l'apparition du coenzyme A qui porte un groupement sulfhydrile SH. Ce groupement réagit avec l'acide dinitrothiobenzoïque (DTNB) apporté dans le milieu réactionnel (figure 42). La réaction était suivie par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 412 nm.

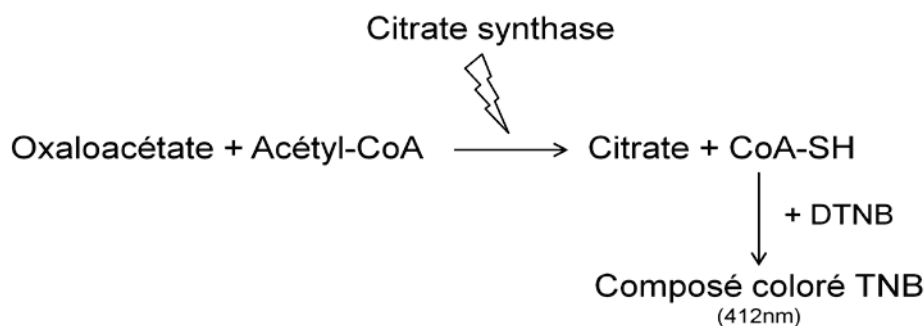


Figure 42:
Principe réactionnel du dosage d'activité de la citrate synthase.

6.3.2 Protocole expérimental

Un aliquot de 5 μL d'homogénat de soléaire dilué au 1/100^{ème} ou un aliquot de 5 μL d'homogénat de gastrocnémien blanc dilué au 1/50^{ème} étaient incubés dans 1 mL de milieu réactionnel composé de DTNB 150 μM , acétylcoenzyme A 250 μM , Tris Base 125 mM, Triton 0,1%, pH 7,4. L'activité non spécifique était déterminée par la mesure de densité optique à 412 nm pendant 2 min. La réaction débutait avec l'addition de 0,5 mM d'oxaloacétate et était suivie pendant encore 4 min. L'activité spécifique de la citrate synthase était calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire (ϵ) égal à 13,6 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ après soustraction de l'activité non spécifique (Faloona et Srere 1969). Les résultats étaient exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu.

7. MARQUEURS PLASMATIQUES

7.1 Peroxydation des lipides par mesure des TBARs

7.1.1 Principe

En cas de stress oxydant, les ROS attaquent les membranes cellulaires provoquant ainsi des dégradations oxydatives des phospholipides membranaires et entraînant la formations entre autres, d'aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) qui peut à son tour dégrader les protéines et l'ADN. Le dosage des TBARs permet d'estimer le niveau de cette peroxydation lipidique.

Le principe de ce dosage repose sur la liaison en milieu acide (pH 2 à 3) et chaud du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un pigment rosé, le complexe MDA-(TBA)₂ qui absorbe à une longueur d'onde $\lambda = 532 \text{ nm}$ (Richard et al. 1992).

7.1.2 Protocole expérimental

Un aliquot de 100 μL de plasma est ajouté à 750 μL d'une solution contenant du TBA 0,55 mM (pH compris entre 7,4 et 7,8) et de l'acide perchlorique 7%. Le mélange est ensuite placé pendant une heure au bain marie à 95 °C afin de libérer les fonctions aldéhydes du MDA par hydrolyse acide. Celles-ci vont pouvoir réagir avec le TBA et former le complexe coloré MDA-(TBA)₂ qui est extrait par incubation avec 2 mL de butanol pendant 2 minutes sous agitation. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3500 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Enfin, la phase supérieure (organique) est récupérée et transférée dans une cuvette pour quantifier le complexe par fluorimétrie (λ excitation = 532 nm, λ émission = 553 nm). Une courbe d'étalonnage a été obtenue à partir d'une solution de 1,1,3,3-tétraéthoxypropane (TEP) avec des concentrations allant de 0 à 8 μM (dilutions extemporanées).

7.2 Oxydation des protéines par mesure des thiols

7.2.1 Principe

L'oxydation des protéines plasmatiques était évaluée par la disparition des groupements thiols des protéines. Le principe de ce dosage repose sur la mesure des groupements thiols réagissant avec le DTNB pour former du 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB) coloré et absorbant à 412 nm (figure 43) (Faure P 1995).

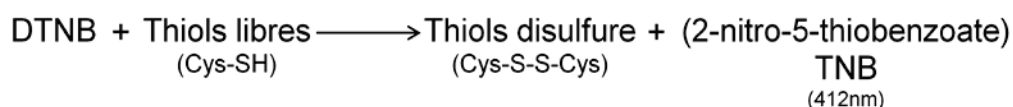


Figure 43:
Principe réactionnel du dosage des Thiols

7.2.2 Protocole expérimental

Pour cela, 20 μL de plasma étaient dilués dans du tampon phosphate et mis en présence de DTNB 2,5 mM. Après agitation, les échantillons étaient conservés à l'obscurité pendant 15 minutes avant la mesure par spectrométrie pendant 3 minutes. Une courbe de calibration était préparée à partir d'une solution de N-Acétylecystéine (NAC) avec des concentrations allant de 0,125 à 0,6 mM. Les résultats étaient exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

7.3 La capacité totale de réduction du fer dans le plasma

7.3.1 Principe

La mesure de la capacité totale de réduction du fer dans le plasma (Ferric Reducing Ability of Plasma ou FRAPs) renseigne sur la capacité totale en antioxydants non-enzymatiques d'un échantillon. La réduction du Fe^{2+} en Fe^{3+} à faible pH cause la formation d'un complexe Fe^{2+} -tripyridyltriazine coloré mesurable à 593 nm. La variation d'absorbance est directement proportionnelle au pouvoir de réduction des antioxydants donneurs d'électrons de l'échantillon (Benzie et Strain 1996).

7.3.2 Protocole expérimental

Un aliquot de 100 μL de plasma dilué au $1/10^{\text{ème}}$ était mélangé à 900 μL d'un mélange réactionnel composé de tampon acétate, pH 3,6, 2,4,6 Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) 10 mM, FeCl_3 20 mM. La solution est réduite par les molécules présentes dans le plasma et un complexe TPTZ- Fe^{2+} coloré dont la longueur d'onde d'absorbance est de 593 nm se forme. Les valeurs de FRAPs sont obtenues en comparant le changement d'absorbance à 593 nm des échantillons à des solutions standards contenant des concentrations de Fe^{3+} connues.

7.4 Cholestérol et triglycérides

Les concentrations des triglycérides ont été mesurées par méthode enzymatique sur automate HITACHI 912 à l'aide de Kit Roche diagnostics (France).

7.5 Détermination des compositions lipidiques des membranes

Cette analyse a été réalisée par l'équipe CHLEO du Laboratoire de Nutrition Humaine du Centre Régional de Nutrition Humaine (INRA UMR 1019) de Clermont-Ferrand (collaboration avec Béatrice Morio et Brigitte Laillet).

La composition phospholipidique a été déterminée dans les globules rouges et sur homogénat de muscle plantaire. Les lipides étaient extraits selon la méthode de Folch et al, (Folch et al. 1957). Les phospholipides étaient séparés des lipides non-phosphoriques par l'utilisation d'une colonne sep-pack (Juaneda et al. 1990). Après une transméthylation, les esters de méthyl d'acide gras étaient séparés et analysés par chromatographie gazeuse.

8. ANALYSE DE L'EXPRESSION RELATIVE DES

ARNm

La technique de RT-qPCR apparaît à ce jour comme la technique la plus fiable et précise pour déterminer le niveau d'ARNm dans un échantillon. Elle repose sur la conversion par transcription inverse d'ARNm, extraits d'homogénats musculaires, en ADNc, suivie de l'amplification sélective d'un des ADNc de façon à pouvoir le détecter. La difficulté est d'amplifier l'ADNc choisi de manière proportionnelle à la quantité initiale présente dans l'échantillon.

8.1 Purification des ARNm

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 50 à 100 mg de muscle soléaire prélevé et congelé immédiatement après le sacrifice des animaux.

Les morceaux de muscle ont été homogénéisés dans 1 mL de TRIzol Reagent à l'aide d'un broyeur à billes (Rescht MM300) pendant 2 x 2 min à 30 Hz. La préparation obtenue était ensuite incubée 5 min à température ambiante pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant était ensuite récupéré et 0,2 mL de chloroforme y étaient ajoutés. Les tubes étaient ensuite agités vigoureusement à la main pendant 15 secondes, puis incubés 10 min à température ambiante. Ils étaient ensuite centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Après la centrifugation, la phase aqueuse incolore contenant les ARN totaux était prélevée et transférée dans un tube propre. Un volume équivalent d'isopropanol était ajouté et les tubes étaient ensuite agités puis incubés 10 min à température ambiante. Une nouvelle centrifugation était effectuée à 12000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant était alors éliminé et le culot lavé par addition de 1 mL d'éthanol 75% puis agité. Ensuite, les échantillons étaient centrifugés à 7500 g pendant 5 min à 4 °C et le surnageant était éliminé. Les culots étaient laissés à sécher à l'air libre et étaient ensuite remis en suspension dans 100 à 200 µL d'H₂O-DEPC, selon le poids du morceau de tissu utilisé au début de l'extraction.

8.2 Mesure des concentrations des ARNm

La concentration en ARN totaux des échantillons était déterminée par spectrophotométrie (Nanophotometer, IMPLÉN). Pour cela, 1 µL d'ARN totaux obtenus lors de l'extraction était déposé sur la cellule de lecture de l'appareil et la densité optique de chaque échantillon (rapportée à une référence composée d'H₂O-DEPC) était mesurée à 260 nm et à 280 nm.

La concentration en ARN totaux était ensuite calculée à l'aide de la relation : $DO_{260nm} = 1$ pour une concentration en ARN égale à 40 µg/mL.

8.3 Digestion de l'ADN génomique

Afin de limiter la contamination des échantillons par de l'ADN génomique, 1 µg d'ARN totaux de chaque échantillon était dilué dans 8 µL d'H₂O-DEPC et 1 µL de tampon DNase 10X (kit DNase Invitrogen) était ajouté. Après addition de 1 µL de DNase, les échantillons étaient incubés pendant 15 min à température ambiante (phase de digestion). Puis 3 µL de mix 1 (EDTA 25 mM, pH 8, oligo(dt)₂₀ 0,5 µg/µL, dNTP mix) étaient ajoutés dans chaque tube avant une incubation de 10 min à 65 °C pour inactiver la DNase et permettre l'hybridation des oligo(dt)₂₀ avec les ARNm polyadénylés. Les échantillons étaient ensuite immédiatement mis dans la glace pendant au moins deux minutes.

8.4 Synthèse de l'ADNc

Les ADN complémentaires (ADNc) des ARNm extraits ont été synthétisés par transcription inverse à l'aide d'un kit (SuperScript III, Invitrogen). A chaque échantillon étaient ajoutés 7 µL de mix 2 (tampon RT 10X, DTT 0,1 M, RNase Out 40 U/µL, Superscript III 200 U/µL), préparé selon les instructions du fabricant. La préparation était alors mélangée puis incubée 45 minutes à 50 °C (phase de transcription inverse). L'enzyme était désactivée par une dernière incubation de 15 minutes à 70 °C. Les ADNc ainsi formés étaient finalement stockés à -20 °C.

8.5 RT-PCR

Les ARNm d'intérêt étaient quantifiés par réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR pour reverse transcriptase polymerase chain reaction) en temps réel. Cette technique se base sur l'amplification de séquences spécifiques d'ADNc, créées par transcription inverse à partir d'ARNm, en les soumettant à une série de cycles de réplication. Un cycle se compose de trois étapes nécessitant des températures différentes. La première étape dite de dénaturation permet la séparation des brins d'ADNc ; la suivante est l'hybridation : des amorces spécifiques de la séquence d'intérêt (tableau 8) s'apparient par complémentarité de bases aux brins d'ADNc séparés. La troisième étape correspond à l'élongation : une polymérase (Taq DNA polymerase) synthétise un nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce et selon la séquence du brin servant de matrice. Lors de ces séries de réplication, un marqueur fluorescent, le SYBR green, est inséré entre les bases. Au fur et à mesure des cycles de réplication, la fluorescence augmente de façon concomitante avec l'amplification, c'est-à-dire avec la multiplication de l'ADNc correspondant à la séquence d'intérêt, jusqu'à un certain seuil où elle devient repérable. Le cycle au cours duquel apparaît la fluorescence est appelé "cycle threshold" (CT), ou cycle seuil. Le nombre de cycles effectués jusqu'au CT renvoie à la quantité initiale d'ADNc, donc d'ARNm. Plus la quantité en ARNm est élevée au départ, plus la fluorescence apparaîtra tôt car

l'amplicon requerra moins de cycles de réplication pour atteindre le niveau où sa quantité est suffisante pour que la fluorescence soit détectable. C'est la valeur du CT qui est utilisée et comparée entre les groupes. Afin de s'affranchir d'une éventuelle variation de la quantité d'ADNc entre les différents tubes, les résultats sont normalisés par la mesure du niveau d'expression de gènes dits "de ménage" (housekeeping genes). Ce sont des gènes codant pour des protéines indispensables à la vie des cellules et présentant un niveau d'expression supposé très stable, quelque soient les conditions. En raison de la nature des expérimentations menées et du tissu étudié, nous avons choisi comme gène de ménage celui de l'acidic ribosomal phosphoprotein P0 (Arbp).

Cette étape d'amplification a été réalisée sur un système Roche LightCycler 1.5 en suivant les instructions du kit Fast Start DNA Master et optimisées ensuite pour obtenir des efficacités de réaction satisfaisantes.

Un master mix était préparé selon les indications du fabricant en additionnant 14 µL de tube 1a (Taq DNA Polymerase) à un tube 1b contenant le tampon de réaction, les oligonucléotides, les ions nécessaires à la réaction et le marqueur fluorescent SYBR green I.

Un mélange réactionnel était ensuite préparé comme suit (équivalent pour un tube) : 2 µL de master mix étaient ajoutés à 1 µL d'amorce sens (0,5 µM) et 1 µL d'amorce antisens (0,5 µM). La concentration de MgCl₂ était ajustée à 3 ou 4 mM selon les cas. De l'eau venait ensuite compléter le mélange pour atteindre un volume final de 18 µL. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 8.

Tableau 8:
Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR

	Séquence sens	Séquence antisens	Longueur de l'amplicon
ARBP	5'-CCTGCACACTCGCTTCCTA-3'	5'-TGATGGAGTGAGGCACTGAG-3'	95
SODc	5'-GGTCCAGCGGATGAAGAG-3'	5'-GGACACATTGGCCACACC-3'	78
SODm	5'-CATTGAGGGAAGCCATTCA-3'	5'-CCCGTTTGCCTCTACTGAAA-3'	93
NF-kB	5'-ATGCTGAGCAGTGGCTGA-3'	5'-TGCCCTGCTATTAAGGCACT-3'	120
PGC-1α	5'-GGAATGCACCGTAAATCTGC-3'	5'-TTTCATTGACCTGCGTAAA-3'	119
MuRF1	5'-AGCATTGTAGAAGCTTCCAAGG-3'	5'-GTAAACTCCTCCTCATCTGTC-3'	146
HAD	5'-TGGACTGGATACTACAAAGTTCATCT-3'	5'-GGTCTTTTGGCCAGCTTCT-3'	124
Adipoq	5'-CACCTACGACCAGTATCAGGAAA-3'	5'-GAGTCCATTGTTGTCCCCTTC-3'	120
VEGF	5'-GAGAGCAACGCCACTATGC-3'	5'-CGCCTTGGCTTGTACAT-3'	146
PPARδ	5'-GCAAGCCCTTCAGTGACATC-3'	5'-TGTGGCACGTTTCATGAGG-3'	145

18 µL de ce mix étaient déposés dans des capillaires ainsi que 2 µL de matrice (ADNc dilué au 1/50^{ème}). Les capillaires étaient ensuite centrifugés pendant 5 secondes à 700 g (LC Carousel Centrifuge), puis placés dans le thermocycleur LightCycler. Les programmations des cycles pour les différentes amorces étaient : dénaturation à 95°C pendant 10 s, hybridation de température et durée

variables selon l'amorce, élongation à 72 °C pendant une durée de 5 ou 6 s. Les conditions pour chaque amorce sont reportées dans le tableau 9. Elles ont été définies dans des expérimentations préalables où l'échantillon était constitué d'un pool de tous les ADNc obtenus, utilisé à diverses dilutions de façon à vérifier l'efficacité de la PCR.

Tableau 9:
Conditions de RT-PCR pour les différentes amorces

Amorce	T°C hybridation	Durée hybridation (s)	Durée élongation (s)	[MgCl ₂] (mM)
ARBP	55	5	6	3
SODc	58	5	5	3
SODm	58	5	5	3
NF-kB	59	5	5	3
PGC-1 α	55	5	6	3
MuRF1	56	6	6	3
HAD	55	5	5	3
Adipoq	56	6	6	4
VEGF	56	6	6	3
PPAR δ	56	6	6	3

Les programmes se terminaient par la réalisation de la courbe de fusion des échantillons, obtenue en augmentant la température de 65 °C à 95 °C en 60 s.

Les valeurs de CT ont été recueillies selon la méthode des "fit points", à l'aide du logiciel LightCycler® Software 3.5.3. Ces valeurs ont ensuite été traitées par la méthode des 2 Δ CT pour obtenir des valeurs en terme de multiples d'expression par rapport au groupe contrôle (Livak et Schmittgen 2001) après correction de l'efficacité de PCR.

9. ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN-BLOT

Le niveau d'expression de protéines d'intérêt a été déterminé par Western-Blot. Cette méthode utilise l'association de technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et de transfert sur une membrane d'hybridation.

9.1 Préparation des échantillons

Des homogénats au 1/50^{ème} ont été réalisés à 4 °C à partir de 15 à 30 mg de muscles soléaires qui avaient été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C. Ils ont préparés dans un tampon d'extraction composé de HEPES 20 mM, EGTA 2 mM, β -glycérophosphate 50 mM, benzamidine 3 mM, glycérol 10%, Triton X-100 1%, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, anti-protéase (protease inhibitor cocktail, Roche) à l'aide d'un broyeur à billes (Rescht MM300) pendant 4 min à 30 Hz. Les homogénats ont été centrifugés à 200 g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants étaient ensuite aliquotés et conservés à -80 °C. Les concentrations protéiques étaient déterminées à l'aide de la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL) décrite précédemment.

Le jour ou la veille de l'expérimentation, les échantillons ont été décongelés et dilués selon la quantité de protéines voulue dans une solution de dénaturation (tampon de Laemmli : Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, bleu de bromophénol 0,05%, SDS 0,8%, glycérol 40%, et complété extemporanément de beta-mercaptoéthanol 20% (v/v)). Le volume total à déposer était ajusté à 30 μ L par échantillon. Les protéines étaient dénaturées pendant 5 min par incubation dans un bain-marie à 95°C.

9.2 Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

9.2.1 Principe

Le gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) en condition dénaturante utilise un polymère (mélange Acrylamide/Bis-acrylamide) qui permet la séparation des protéines dénaturées en fonction de leur poids moléculaire. Le SDS leur procure un environnement riche en charges négatives, ce qui rend négligeable la charge propre de la protéine. Ainsi sous l'action d'un champ électrique, les protéines migrent au travers du gel. Les petites protéines vont vite car elles passent facilement dans les pores du gel, mais les grosses protéines sont retardées par friction avec le polymère. Ainsi la séparation des protéines sur le gel d'acrylamide est déterminée par leur seul poids moléculaire. Le bleu de bromophénol, contenu dans les échantillons préparés n'est absolument pas retardé dans le gel et permet de suivre le front de migration des protéines.

9.2.2 Protocole expérimental

Le gel de concentration (ou de dépôt) et le gel de séparation (ou de migration) sont préparés manuellement (1,5 mm d'épaisseur) en additionnant au dernier moment du NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et du persulfate d'ammonium (APS) qui catalysent la

polymérisation. La concentration en acrylamide du gel de séparation a été adaptée à la masse molaire des protéines étudiées (tableau 10).

Tableau 10:
Compositions des gels d'électrophorèse

Pourcentage du gel	séparation			concentration
	7,5 %	12 %	15 %	4%
Acrylamide/Bis-Acrylamide 40 % (mL)	1,875	3	3,75	0,5
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (mL)	2,5	2,5	2,5	0
Tris-HCl 1 M pH 6,8 (mL)	0	0	0	0,625
H ₂ O (mL)	5,42	4,3	3,54	3,77
SDS 10 % (mL)	0,05	0,05	0,05	0,05
APS 10 % (mL)	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED (µL)	5	5	5	5

Les électrophorèses ont été réalisées avec le système BioRad Mini Protean II. Après polymérisation du gel de migration d'abord puis du gel de dépôt, les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaires (Biorad ou Euromedex) ont été déposés dans les puits. Le gel a été placé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration (Tris-Glycine-SDS 1X Euromedex) et le générateur relié à la cuve a été réglé à un voltage fixe et pour une durée d'électrophorèse variable selon le pourcentage du gel d'acrylamide (tableau 11).

Tableau 11:
Synthèse des conditions de migration appliquées

Protéine	Poids moléculaire	Référence	Dilution Anticorps primaire	Pourcentage gel de migration	Quantité de protéines/puits	Migration V/durée
Akt	60 kDa	Cell signaling 4691	1/1000	7,5	50 µg	150 V/1h30
pAkt ^{ser473}	60 kDa	Cell signaling 4060	1/1000	7,5	50 µg	150 V/1h30
mTOR	289 kDa	Cell signaling 2983	1/1000	7,5	50 µg	150 V/1h30
pmTOR ^{ser2448}	289 kDa	Cell signaling 5536	1/1000	7,5	50 µg	150 V/1h30
ACC	280 kDa	Cell signaling 3662	1/1000	7,5	50 µg	150 V/1h30
pACC ^{ser79}	280 kDa	Cell signaling 3661	1/1000	7,5	50 µg	150 V/1h30
AMPK	62 kDa	Cell signaling	1/1000	7,5	50 µg	150 V/1h30

		2532				
pAMPK ^{thr172}	62 kDa	Cell signaling 2531	1/500	7,5	50 µg	150 V/1h30
REDD1	27 kDa	Proteintech 10638-1-AP	1/500	12	50 µg	90 V/3h
OXPHOS	CI 20 kDa CII 30 kDa CIII 48 kDa CIV 40 kDa CV 55 kDa	Mitoscience MS604	1/750	15	20 µg	150 V/1h30

9.3 Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose

9.3.1 Principe

Le principe de l'électrotransfert est le même que celui de l'électrophorèse. Les protéines, après la migration, sont toujours entourées de SDS et maintenues sous l'influence d'un champ électrique à la différence qu'ici, les électrodes sont de part et d'autre du gel et de la membrane qui lui est accolée, et non plus dans le plan du gel. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Les membranes de nitrocellulose lient les protéines de manière non spécifique. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines.

On peut, juste après le transfert, colorer la membrane avec un colorant spécifique des protéines, comme par exemple le rouge de Ponceau. Cette opération permet de visualiser les protéines sur la membrane et donc de vérifier que l'électrophorèse et le transfert se sont bien déroulés.

9.3.2 Protocole expérimental

Selon la protéine étudiée, nous avons appliqué soit la technique de transfert humide (REDD1 et OXPHOS) soit celle de transfert semi-sec (Akt, mTOR, AMPK, ACC et leurs formes phosphorylées).

9.3.2.1 Transfert humide

L'étape de transfert est réalisée dans des cuves Biorad Mini Protean II. Chaque sandwich est constitué de quatre feuilles de papier Whatman, de deux éponges, d'un gel et d'une membrane en nitrocellulose. Au moment du montage du sandwich, une attention particulière est portée sur l'élimination des bulles d'air comprises entre le gel et la membrane. Les plaques contenant le

sandwich sont ensuite insérées dans une cuve contenant un bloc réfrigéré et du tampon de transfert composé de Tris-Glycine 1X (Euromedex), éthanol 20%, SDS 0,01%. Le générateur relié à la cuve a été réglé à un voltage fixe de 90 V pendant 3h pour REDD1 et de 150 V pendant 1h30 pour OXPPOS.

9.3.2.2 Transfert semi-sec

En pratique, à la suite de l'électrophorèse, un sandwich abondamment humidifié avec du tampon de transfert Tris-Glycine 1X (Euromedex), éthanol 20%, SDS 0,01% et composé de deux feuilles épaisses de papier Wathman de part et d'autre de la membrane et du gel est placé dans le système de transfert semi-sec Biorad. Le générateur est réglé sur un ampérage de 120 mA par gel et un voltage limitant de 25 V pour une durée de transfert de 1h.

9.4 Immunorévélation des protéines d'intérêt

9.4.1 Principe

Après une étape de saturation qui consiste à bloquer les sites de liaisons non-spécifiques en incubant la membrane avec une solution riche en protéines inertes, les membranes sont incubées avec un premier anticorps (anticorps primaire), spécifique de la protéine d'intérêt. La protéine d'intérêt joue alors le rôle d'antigène reconnu par l'anticorps. Une fois le complexe antigène-anticorps formé, sa détection se fait grâce à un deuxième anticorps (anticorps secondaire) spécifique des anticorps primaires. L'anticorps secondaire n'a pas besoin d'être aussi spécifique que l'anticorps primaire, mais on le choisit généralement en fonction de sa capacité à reconnaître une classe spécifique d'immunoglobulines (souvent IgG) de l'espèce animale d'où provient l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est généralement lié à une enzyme comme la peroxydase de raifort (HRP) qui permettra l'identification visuelle de la protéine étudiée par chemiluminescence. En effet, en présence de son substrat et d'eau oxygénée, l'HRP va oxyder le luminol et libérer de l'énergie sous la forme de lumière. Ces photons peuvent être détectés pendant plusieurs heures par exposition sur films autoradiographiques ou à l'aide de caméras ultrasensibles de systèmes d'imagerie informatisés.

9.4.2 Protocole expérimental

Suite à l'électrotransfert, les membranes sont lavées dans une solution de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (TTBS) afin de rincer toute trace de tampon de transfert.

Elles sont ensuite incubées pendant 2h à température ambiante dans une solution de blocage composée de lait écrémé dilué à 5% dans du TTBS.

A l'issue de l'étape de saturation, les membranes sont incubées toute la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire dilué dans du TTBS (tableau 11).

La membrane est ensuite rincée trois fois 10 min dans du TTBS puis incubée avec l'anticorps secondaire, anti-lapin pour toutes les protéines sauf OXPHOS qui requerrait un anticorps secondaire anti-souris, pendant 2h à température ambiante.

Trois rinçages de 10 min sont ensuite effectués avec du TTBS avant l'étape de révélation par chemiluminescence (kit ECL GE Healthcare). La réaction de chemiluminescence est initiée par l'application de 1 mL d'un mélange des deux réactifs du kit sur la membrane pendant 1 min. Les membranes sont ensuite exposées dans un Imager QuantLAS4000 (GE Healthcare) et le signal lumineux généré est suivi en temps réel et enregistré avant saturation.

9.4.3 Quantification

Les images obtenues avec l'Imager sont analysées par densitométrie avec le logiciel libre Image J. Les bandes obtenues sont quantifiées par intégration tenant compte à la fois de leur surface et de leur intensité. Le signal correspondant au bruit de fond est soustrait de la valeur brute de chaque échantillon. L'expression de REDD1 a été normalisée par la quantité totale de protéine au niveau du poids moléculaire 25 kDa révélée par le colorant rouge ponceau.

10. ANALYSES STATISTIQUES

La plupart des variables testées ont été comparées par analyse de variance. Lorsque des différences existaient, un test post-hoc (test LSD de Fischer) était réalisé de façon à isoler les différences. Lorsque les valeurs n'étaient pas distribuées selon la loi normale, un test non paramétrique était alors réalisé (test Dunn's). Lorsque les comparaisons concernaient seulement deux groupes (étude 1), les variables testées ont été comparées par test de Student. Lorsque les valeurs n'étaient pas distribuées selon la loi normale, un test non paramétrique était alors réalisé (test Mann et Whitney). Pour l'ensemble des analyses, le seuil de significativité a été fixé à 5%.

1. ETUDE 1 : 9 SEMAINES DE SUPPLEMENTATION EN DHA AMELIORENT LA CAPACITE D'ENDURANCE ET LE METABOLISME MITOCHONDRIAL DU MUSCLE SQUELETTIQUE DE RATS ADULTES

1.1 Introduction

Le vieillissement est associé à un déclin progressif de la masse musculaire et à l'apparition d'altérations de sa fonction. Ces modifications sont regroupées sous le terme de sarcopénie et entraînent une diminution des capacités physiques, de la performance physique, de la qualité de vie et finalement aboutissent à des incapacités (Guralnik et al. 1995; Frontera et al. 2000; Kyle et al. 2001).

Plusieurs causes seraient à l'origine de cette sarcopénie. Parmi celles-ci, un déséquilibre entre la synthèse protéique et la dégradation protéique ressort comme un facteur de première importance (Balagopal et al. 1997; Cuthbertson et al. 2005). Des modifications du métabolisme pourraient également être impliquées et comprendre des altérations de la fonction mitochondriale. Une réduction de l'activité des enzymes oxydatives a en effet été rapportée (Rooyackers et al. 1996). De plus, chez le rongeur, la chaîne de transport des électrons apparaît également affectée car le nombre de fibres musculaires COX^-/SDH^{++} augmente, indiquant des modifications de la chaîne respiratoire (Bua et al. 2002). Différentes études montrent que des fibres musculaires de rats âgés présentent plusieurs anomalies de fonctionnement mitochondrial parmi lesquelles une augmentation de la production mitochondriale de ROS, un plus faible niveau de respiration en état 3 mesuré en présence de pyruvate et une sensibilité à l'ouverture du PTP accrue (Petersen et al. 2003; Short et al. 2005; Martin et al. 2007; Joseph et al. 2012).

Ces modifications de la fonction mitochondriale pourraient altérer l'énergétique cellulaire et donc également l'équilibre de la balance protéique qui englobe des processus requérant de l'énergie. De plus, la mitochondrie est connue pour être impliquée dans l'induction de la mort cellulaire. Des altérations de sa fonction pourraient donc jouer un rôle dans la fonte musculaire en participant à l'augmentation de vulnérabilité à l'apoptose observée dans les muscles sarcopéniques.

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour prévenir le déclin progressif de la masse et de la fonction musculaire avec l'âge. Des études suggèrent que fournir une supplémentation en AGPI n-3 pourrait être bénéfique dans la perspective de limiter la fonte musculaire liée à l'âge (Smith et al. 2011). De plus, une étude rapporte que les effets du vieillissement sur la mitochondrie semblent reliés des modifications du profil en acides gras des lipides mitochondriaux (Martin et al. 2007). Parmi les AGPI n-3, le DHA et l'EPA ressortent comme les plus intéressants d'un point de vue thérapeutique (Fetterman et Zdanowicz 2009). Ces nutriments pourraient agir par une activation des voies de signalisation de l'anabolisme ou *via* leurs propriétés anti-inflammatoires qui limiteraient l'atrophie associée à l'inflammation (Ferrucci et al. 2006; Roth et al. 2006; Gingras et al. 2007). Il est aussi possible qu'ils aient un impact positif sur la masse musculaire par des changements du métabolisme. Leurs effets sur la fonction mitochondriale ont été particulièrement étudiés dans le cœur. Les auteurs rapportent que les AGPI n-3 augmentent la CRC des mitochondries cardiaques sans changement de leur consommation d'oxygène (O'Shea et al. 2009; Khairallah et al. 2010). Il apparaît que la combinaison EPA + DHA, que l'on retrouve notamment dans les huiles de poisson, a un effet moins marqué que le DHA seul sur la mitochondrie cardiaque (Khairallah et al. 2010). Malgré le fait que les AGPI n-3 améliorent la capacité d'exercice de patients BPCO (Broekhuizen et al. 2005) et qu'ils aient des propriétés pouvant se révéler bénéfiques dans le contexte de la sarcopénie, il n'existe que peu d'informations concernant les effets de ces acides gras sur le muscle squelettique et ses mitochondries.

Nous faisons l'hypothèse que la forte capacité du DHA à modifier la composition lipidique des membranes, jointe à son effet montré sur les mitochondries cardiaques, améliore la fonction des muscles squelettiques, conduisant à une meilleure capacité d'exercice. Nous supposons qu'il pourrait agir par une amélioration du métabolisme oxydatif et notamment de la fonction des mitochondries.

L'objectif de cette étude était donc de caractériser chez le rat les effets d'une supplémentation en DHA sur les altérations liées à l'âge de la capacité d'endurance et de la fonction des mitochondries musculaires. La fonction mitochondriale était évaluée par deux

approches : les fibres perméabilisées de muscle squelettique qui permettent d'étudier la mitochondrie intacte et dans un environnement structural relativement conservé, et sur mitochondries isolées afin de préciser la localisation des changements éventuels de fonctionnement de la chaîne respiratoire. Contrairement à la plupart des études qui cherchent à préciser les effets du DHA sur le muscle squelettique et portent sur des animaux jeunes, nous avons utilisé des rats d'âge moyen dans le but d'explorer les effets de la supplémentation en DHA sur les premières étapes du vieillissement musculaire.

1.2 Résultats

1.2.1 Données morphologiques et métaboliques

La supplémentation en DHA n'a aucun effet sur le poids corporel final des animaux, identique à celui des animaux du groupe contrôle. Ceci concorde avec le fait que la prise alimentaire, le quotient respiratoire et la dépense énergétique calculée sur 24h sont similaires dans les deux groupes. Une perte significative de masse corporelle est visible dans les deux groupes entre le début et la fin du conditionnement (tableau 12).

Tableau 12:

Effet de la supplémentation en DHA sur des paramètres morphologiques, métaboliques et sur la prise alimentaire des rats d'âge moyen. DE: dépense énergétique sur 24h. Les données sont des moyennes \pm SEM, $n \geq 8$. #: différent d'initial, $p < 0,05$.

	Contrôle	DHA
Poids corporel initial (g)	482 \pm 17	507 \pm 8
Poids corporel final (g)	452 \pm 18 #	481 \pm 13 #
Prise alimentaire (g/jour)	15,8 \pm 0,2	15,7 \pm 0,2
DE (kcal/jour/poids corporel^{0.75})	133,76 \pm 7,99	133,59 \pm 7,54
Quotient respiratoire	0,89 \pm 0,01	0,85 \pm 0,04

1.2.2 Composition corporelle

Si le poids corporel total n'est pas impacté par la supplémentation, celle-ci induit en cependant des modifications de la composition corporelle.

Ainsi, le poids du cœur des animaux du groupe supplémenté en DHA est significativement plus faible que dans le groupe contrôle (tableau 14). Cette différence peut être attribuée à la réduction de la masse du ventricule droit (VD). Les masses du foie, de la rate et des reins ne sont pas impactées par la supplémentation en DHA. Il en va de même pour les muscles soléaire, gastrocnémien et EDL. Le poids des tissus adipeux viscéral et rétropéritonéal sont quant à eux significativement plus faibles dans le groupe DHA par rapport au groupe contrôle (respectivement -38% et -35% $p < 0,05$) (tableau 13).

Tableau 13:

Effet de la supplémentation en DHA sur les poids de différents organes et tissus d'intérêt à l'issue des 9 semaines de conditionnement. Les valeurs sont exprimées en mg, excepté pour le foie, les reins, le tissu adipeux rétropéritonéal (TARP) et le tissu adipeux viscéral (TAV) pour lesquels elles sont exprimées en g. EDL : extenseur des doigts long. Les résultats sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 9$. * différent de Contrôle $p < 0,05$.

	Contrôle	DHA	
cœur	1070,8 \pm 30,0	955,9 \pm 15,5	*
VG	733,5 \pm 14,2	731,1 \pm 13,8	
VD	284,0 \pm 22,6	222,6 \pm 7,6	*
foie (g)	12,1 \pm 0,6	12,5 \pm 0,5	
rein x2 (g)	2,4 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	
rate	735,5 \pm 34,4	851,9 \pm 37,3	
TARP (g)	10,3 \pm 1,5	6,7 \pm 0,8	*
TAV (g)	9,9 \pm 1,3	6,2 \pm 0,8	*
soléaire	149,3 \pm 4,8	151,3 \pm 5,0	
plantaire	341,3 \pm 9,1	365,4 \pm 15,7	
EDL	171,7 \pm 7,8	180,9 \pm 3,6	

1.2.3

1.2.4 Composition en acides gras des phospholipides membranaires

La supplémentation en DHA provoque une modification importante de la composition lipidique des membranes des érythrocytes et des cellules du muscle plantaire (tableau 14). Le rapport n-6/n-3 chez les animaux supplémentés est significativement abaissé dans les deux tissus.

Dans les globules rouges, la proportion des AGPI n-3 totaux est augmentée chez les animaux supplémentés, notamment du fait d'une augmentation des proportions d'EPA (C20:5

n-3), de DHA (C22:6 n-3) et de DPA (C22:5 n-3). La proportion des AGPI n-6 LA (C18:3 n-6), DPA (C22:5 n-6) et DTA (C22:4 n-6) est à l'inverse plus faible (tableau 15).

La diminution du ratio n-6/n-3 dans le muscle plantaire des animaux supplémentés provient principalement d'une plus faible proportion d'AGPI n-6 parmi lesquels LA (C18:3 n-6), ARA (C20:4 n-6), DPA (C22:5 n-6) et DTA (C22:4 n-6). Les animaux supplémentés en DHA ne présentent qu'une tendance à l'augmentation de la proportion des AGPI n-3 dans les phospholipides membranaires du muscle plantaire, *via* notamment une augmentation de la proportion d'EPA (C20:5 n-3). La proportion de DHA n'est en revanche pas augmentée dans le groupe DHA (tableau 14).

Tableau 14:

Effet de la supplémentation en DHA sur la composition en acides gras des phospholipides membranaires de globules rouges et de cellules du muscle plantaire. AGPI : acides gras polyinsaturés; AGMI : acides gras mono-insaturés; AGS : acides gras saturés. Les données sont des moyennes \pm SEM, n = 8; *: différent de Contrôle, $p < 0,05$; nd : non détecté.

AG %	Globules rouges		Muscle plantaire	
	Contrôle	DHA	Contrôle	DHA
C12:0	0,17 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01 *	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02
C14:0	0,25 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02 *	0,65 \pm 0,09	0,88 \pm 0,14
C15:0	nd	nd	0,15 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02
C16:0	31,0 \pm 0,87	29,19 \pm 0,36	24,15 \pm 0,41	25,75 \pm 0,48 *
C17:0	nd	nd	0,23 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02
C18:0	11,02 \pm 0,33	11,33 \pm 0,36	9,32 \pm 0,64	9,15 \pm 0,55
C16:1 n-9	0,09 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02 *	0,36 \pm 0,03	0,34 \pm 0,04
C18:1 n-9	7,32 \pm 0,41	7,26 \pm 0,21	12,90 \pm 1,74	14,21 \pm 1,32
C16:1 n-7	0,80 \pm 0,016	0,68 \pm 0,10	2,24 \pm 0,36	4,12 \pm 0,70 *
C18:1 n-7	3,54 \pm 0,13	3,41 \pm 0,09	4,16 \pm 0,20	4,10 \pm 0,24
C18:2 n-6	12,99 \pm 0,48	14,45 \pm 0,54	20,78 \pm 1,02	19,97 \pm 0,59
C18:3 n-6	0,12 \pm 0,02	0,07 \pm 0,005 *	0,09 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00 *
C20:2 n-6	0,16 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
C20:3 n-6	0,24 \pm 0,01	0,47 \pm 0,02 *	0,32 \pm 0,03	0,31 \pm 0,02
C20:4 n-6	20,63 \pm 0,92	19,44 \pm 0,39	12,26 \pm 1,31	7,91 \pm 0,94 *
C22:4 n-6	1,80 \pm 0,22	1,16 \pm 0,11 *	0,43 \pm 0,04	0,21 \pm 0,02 *
C22:5 n-6	0,62 \pm 0,11	0,20 \pm 0,02 *	0,52 \pm 0,09	0,11 \pm 0,03 *
C18:3 n-3	0,19 \pm 0,03	0,09 \pm 0,01 *	0,30 \pm 0,05	0,26 \pm 0,06
C20:3 n-3	nd	nd	0,11 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02
C20:5 n-3	0,07 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03 *	0,05 \pm 0,00	0,15 \pm 0,02 *
C22:5 n-3	0,31 \pm 0,03	0,77 \pm 0,07 *	0,40 \pm 0,03	0,42 \pm 0,04
C22:6 n-3	1,48 \pm 0,16	2,78 \pm 0,18 *	6,83 \pm 0,59	7,77 \pm 0,63
total (n-3) %	2,00 \pm 0,21	3,89 \pm 0,25 *	7,65 \pm 0,55	8,73 \pm 0,65

total (n-6) %	36,56 ± 0,90	35,96 ± 0,40	34,54 ± 0,66	28,70 ± 0,79 *
total (n-9) %	8,72 ± 0,39	8,71 ± 0,18	13,51 ± 1,70	14,75 ± 1,29
(n-6)/(n-3)	19,52 ± 1,76	9,64 ± 0,90 *	4,68 ± 0,34	3,38 ± 0,18 *
total AGPI %	38,56 ± 0,84	39,85 ± 0,41	42,19 ± 1,14	37,43 ± 1,36 *
total AGMI %	13,81 ± 0,60	13,57 ± 0,30	20,20 ± 1,95	23,25 ± 1,98
total AGS %	47,63 ± 0,83	46,58 ± 0,47	37,60 ± 0,94	39,34 ± 0,82

1.2.5

1.2.6 Fonction cardiaque

La fonction cardiaque évaluée par l'étude des pressions intra-ventriculaires à l'aide d'une sonde de pression millar est similaire dans les deux groupes d'animaux d'âge moyen ayant ou non reçu une supplémentation en DHA (tableau 15).

Tableau 15:

Comparaison de la fonction cardiaque avec ou sans supplémentation avec du DHA. La fonction cardiaque est évaluée par la mesure avec une sonde millar de la pression développée (PD) par les ventricules droit (VD) et gauche (VG), de la vitesse de mise en tension du myocarde (dP/dt max), de la vitesse de relaxation du myocarde (dP/dt min) et par la mesure de la fréquence cardiaque (FC). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. n ≥ 7.

		N	N+DHA
	FC	321 ± 15	309 ± 4
	PD	32 ± 3	35 ± 4
VD	dP/dt max	939 ± 115	800 ± 83
	dP/dt min	817 ± 137	700 ± 96
	PD	101 ± 7	98 ± 8
VG	dP/dt max	2829 ± 522	2594 ± 250
	dP/dt min	2750 ± 313	2250 ± 236

1.2.7

1.2.8 Dosages plasmatiques

La supplémentation en DHA n'induit pas de modification du taux plasmatique de cholestérol et des triglycérides (tableau 17).

Nous n'observons pas non plus d'effet de la supplémentation sur des marqueurs plasmatiques du stress oxydant comme les TBARS, les groupements thiols et le FRAP (tableau 16).

Tableau 16:

Effet de la supplémentation en DHA sur des paramètres métaboliques et des marqueurs du stress oxydant. TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; FRAP: Ferric ion Reducing

Antioxydant Parameter. Les données sont des moyennes \pm SEM, $n \geq 8$; excepté pour les groupements Thiols et la mesure de FRAP: $n \geq 5$.

	Contrôle	DHA
Cholestérol (g/L)	0,90 \pm 0,11	0,68 \pm 0,05
Triglycérides (g/L)	1,10 \pm 0,19	1,38 \pm 0,14
Protéines plasmatiques totales (g/L)	59,9 \pm 2,7	57,1 \pm 0,8
Groupements thiols (μ M/g prot)	2,6 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2
TBARS (μ M)	1,17 \pm 0,05	1,14 \pm 0,08
FRAP (μ M/g prot)	4,8 \pm 0,8	4,2 \pm 0,5

1.2.9

1.2.10 Capacité d'endurance

La supplémentation en DHA permet une augmentation de près de 56% du temps d'endurance, évalué lors d'une épreuve de course sur tapis roulant jusqu'à épuisement, par rapport au groupe contrôle (figure 44).

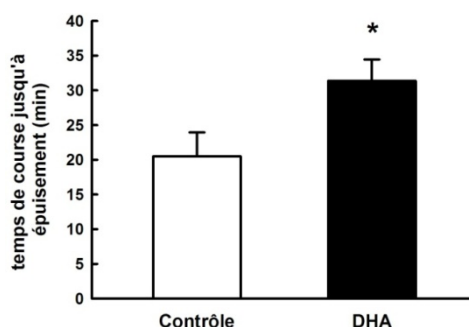


Figure 44:

Effet de la supplémentation en DHA sur le temps de course évalué sur tapis roulant jusqu'à épuisement, à une vitesse de 20 m/min et avec une pente positive de 10%. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 7$. * différent de Contrôle $p < 0,05$.

1.2.11 Fonction mitochondriale

1.4.1.1 Activité d'enzymes mitochondriales

L'activité de la citrate synthase est considérée comme un marqueur de densité mitochondriale. Mesurée sur homogénat de muscle soléaire, elle est identique entre les groupes contrôle et DHA (figure 45A). Il en est de même lorsqu'elle est mesurée sur homogénat de la portion blanche du muscle gastrocnémien (figure 45B). La supplémentation en DHA semble n'avoir aucun effet sur la densité mitochondriale.

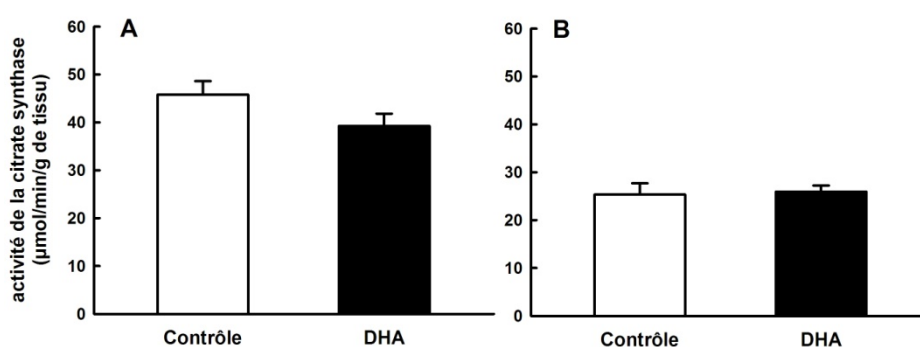


Figure 45:

Effet de la supplémentation en DHA sur l'activité enzymatique de la citrate synthase mesurée sur homogénat de muscle soléaire (A) et de la portion blanche du muscle gastrocnémien (B). Les données sont des moyennes \pm SEM, $n \geq 8$.

Bien que nous n'observons aucune modification de l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire, celles des complexes III et IV sont significativement plus élevées dans le soléaire des animaux du groupe DHA (tableau 17). Elles augmentent ainsi de 166% pour le complexe III et de 57% pour le complexe IV ($p < 0,05$) dans le groupe DHA par rapport au groupe Contrôle.

Tableau 17:

Effet de la supplémentation en DHA sur les activités enzymatiques des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale mesurées sur homogénat de muscle soléaire total. Les données sont des moyennes \pm SEM, $n \geq 8$, excepté pour le CIII: $n \geq 6$; *: différent de Contrôle, $p < 0,05$.

	Contrôle	DHA
Complexe I (µmol/min/mg prot)	0,40 \pm 0,03	0,33 \pm 0,02
Complexe II (µmol/min/mg prot)	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01

Complexe III ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$)	0,03 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01 *
Complexe IV ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$)	0,47 \pm 0,02	0,74 \pm 0,05 *

1.4.1.2 *Respiration des mitochondries isolées*

Tableau 18:

Effet de la supplémentation en DHA sur la consommation d'oxygène de mitochondries isolées issues des portions rouges du muscle quadriceps. Les données sont des moyennes \pm SEM, n = 8; la consommation d'oxygène est exprimée en nmol O/min/mg prot.

		Contrôle	DHA
GM	état 2	30,5 \pm 3,4	34,3 \pm 0,9
	état 3	477,9 \pm 44,9	424,9 \pm 15,7
GMS	état 2	95,9 \pm 5,7	83,7 \pm 5,2
	état 3	678,3 \pm 29,2	709,8 \pm 28,6
S	état 2	89,4 \pm 9,1	85,1 \pm 6,4
	état 3	465,2 \pm 18,4	442,4 \pm 13,9
Octanoyl-C	état 2	30,9 \pm 3,2	26,5 \pm 1,9
	état 3	198,6 \pm 15,7	181,3 \pm 11,6

La respiration mitochondriale a été évaluée sur mitochondries isolées des portions rouges du muscle quadriceps. La supplémentation en DHA n'induit pas de modification de la respiration mitochondriale mesurée sur l'organite isolé, et ceci quelle que soit la condition de substrat et l'état, phosphorylant ou non (tableau 18).

1.4.1.3 *Respiration mitochondriale de fibres perméabilisées*

Nous avons également mesuré la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées de muscle soléaire (métabolisme majoritairement oxydatif) et de la partie blanche du muscle gastrocnémien (métabolisme majoritairement glycolytique).

La consommation d'oxygène mesurée sur fibres de soléaire est plus élevée dans le groupe DHA que dans le groupe Contrôle lorsqu'elle est mesurée en état 2 en présence des substrats GM ou S (figure 46A et 46B). Cet effet disparaît lorsque la chaîne respiratoire est alimentée en équivalents réduits *via* les complexes I et II simultanément (substrat GMS) (figure 46C). En état 3, lorsque la chaîne respiratoire est activée par l'ADP, la consommation

d'oxygène est augmentée dans le groupe DHA par rapport au groupe Contrôle, mais uniquement en présence de GM (figure 46A).

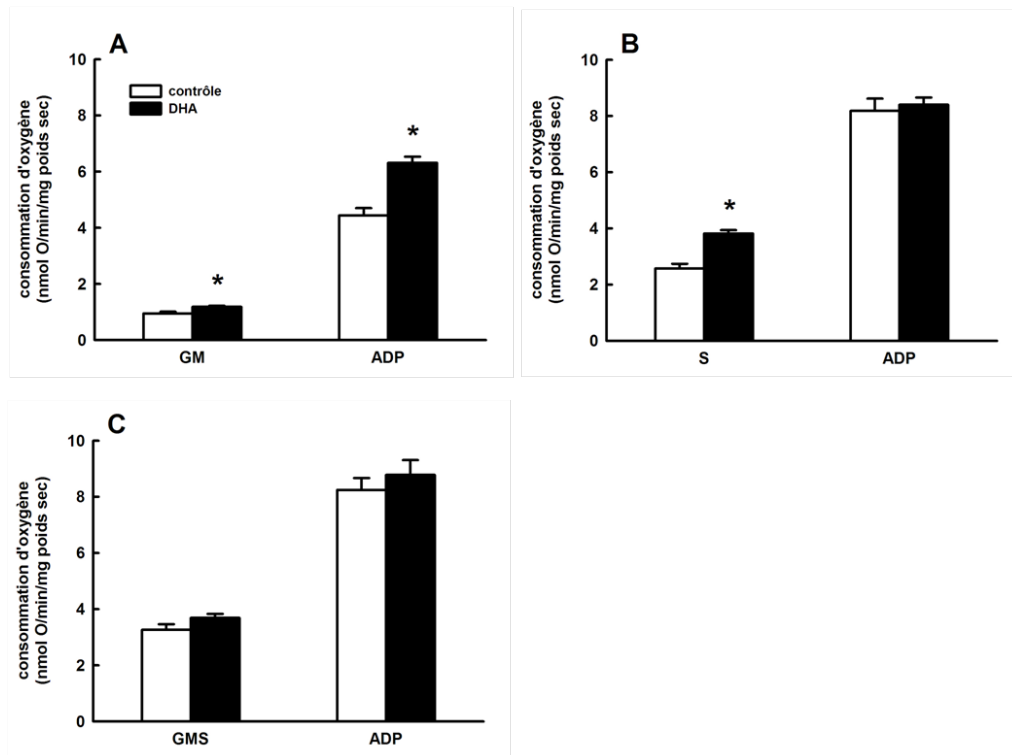


Figure 46:

Effet de la supplémentation en DHA sur la respiration mitochondriale mesurée sur fibres perméabilisées de muscle soléaire en états 2 et 3 dans différentes conditions de substrat : glutamate/malate (GM) (A), succinate (S) (B) et glutamate/malate/succinate (GMS) (C). Les données sont des moyennes \pm SEM, $n \geq 9$. * différent de Contrôle $p < 0,05$.

Dans le muscle gastrocnémien blanc, la consommation d'oxygène par les fibres est également affectée par la supplémentation en DHA. Nous observons en effet une élévation de la consommation d'oxygène en état 2 et 3 lorsque les fibres sont en présence de GM et de GMS (figure 47A et 47C). En revanche, aucun effet de la supplémentation n'est observé sur la consommation d'oxygène des fibres lorsqu'elles ont comme substrat le S (figure 47B).

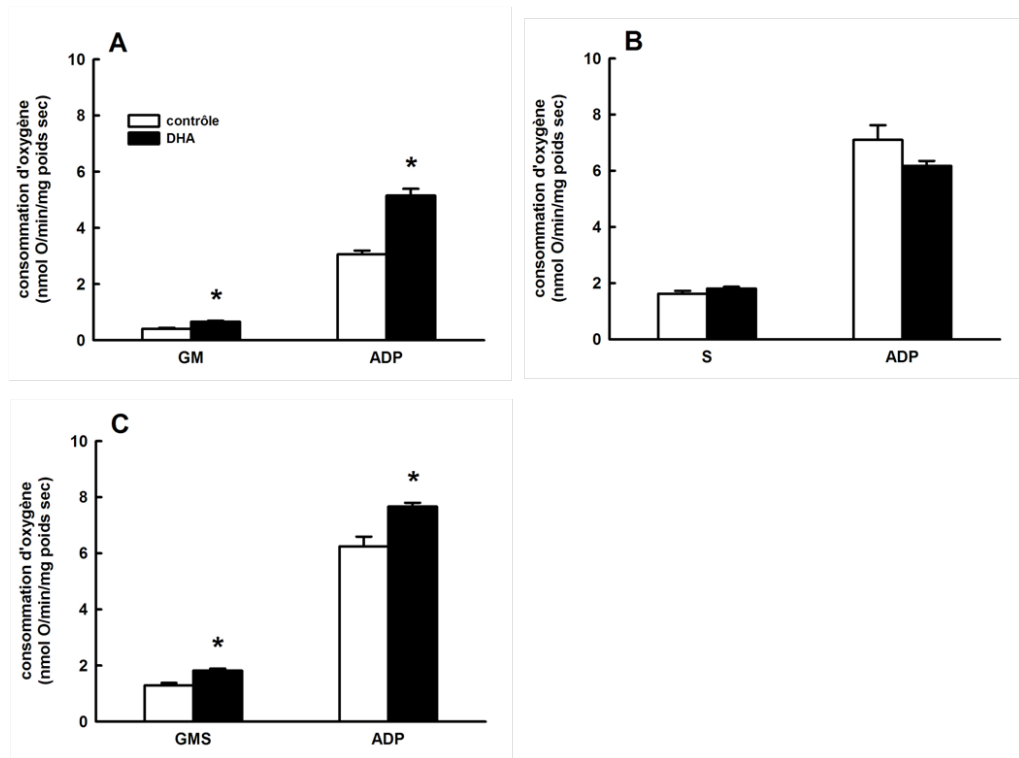


Figure 47:

Effet de la supplémentation en DHA sur la respiration mitochondriale mesurée sur fibres perméabilisées de la portion blanche de muscle gastrocnémien en états 2 et 3 dans différentes conditions de substrat : glutamate/malate (GM) (A), succinate (S) (B) et glutamate/malate/succinate (GMS) (C). Les données sont des moyennes \pm SEM, $n \geq 9$. * différent de Contrôle $p < 0,05$.

La respiration mitochondriale mesurée en présence de concentrations croissantes d'ADP permet la détermination du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP. L'inverse du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP reflète l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP.

Dans le soléaire, l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP apparaît significativement abaissée par la supplémentation en DHA comme l'indique le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP plus élevé (figure 48A).

Dans le gastrocnémien blanc, le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP est identique entre le groupe Contrôle et le groupe DHA (figure 48B). L'affinité des mitochondries pour l'ADP n'est donc pas modifiée par la supplémentation.

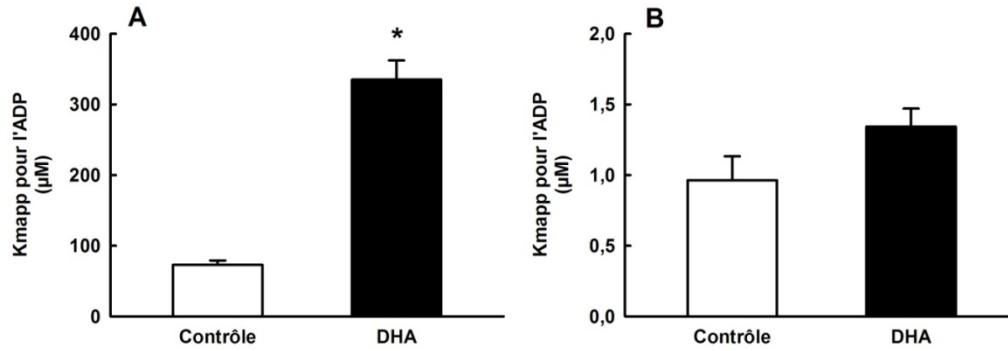


Figure 48:

Effet de la supplémentation en DHA sur l'affinité des mitochondries de fibres perméabilisées de soléaire (A) et de gastrocnémien blanc (B) pour l'ADP, évaluée par détermination du km apparent à l'ADP en présence de la combinaison de substrats glutamate/malate/succinate. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de Contrôle $p < 0,05$.

1.4.1.4 Production mitochondriale d' H_2O_2

Nous avons mesuré la production de peroxyde d'hydrogène par les mitochondries isolées de muscle quadriceps en présence de substrat seul, puis après addition d'un inhibiteur du complexe I (roténone) et du complexe III (antimycine A).

Quelle que soit la condition de substrat et d'inhibiteur, la supplémentation n'a aucun effet sur la production mitochondriale d' H_2O_2 (tableau 19). Dans tous les groupes, la production d' H_2O_2 est supérieure avec les substrats GMS et S par rapport à GM et à l'octanoyl-carnitine. La roténone a exercé un effet inhibiteur de la production d' H_2O_2 lorsque la chaîne respiratoire était alimentée par les substrats du complexe II (S et GMS) et l'antimycine activait au contraire la production dans toutes les conditions de substrat. Nous retrouvons donc bien les effets classiques des inhibiteurs et des substrats.

Tableau 19:

Effet de la supplémentation en DHA sur la production d' H_2O_2 par des mitochondries isolées des portions rouges du muscle quadriceps. Les données sont des moyennes \pm SEM, $n = 8$. La production d' H_2O_2 est exprimée en pmol/min/mg prot.

		Contrôle	DHA
GM	basal	64,5 \pm 5,7	65,5 \pm 3,15
	roténone	128,5 \pm 13,3	150,3 \pm 11,9
	antimycine A	270,7 \pm 26,7	260,2 \pm 15,5
GMS	basal	1965,9 \pm 276,3	1495,2 \pm 174,1
	roténone	313,2 \pm 31,0	356,2 \pm 23,2
	antimycine A	394,1 \pm 35,4	397,4 \pm 35,9

S	basal	2075,5 ± 313,9	2013,9 ± 150,5
	roténone	136,1 ± 8,7	137,5 ± 7,3
	antimycine A	293,3 ± 37,9	289,3 ± 25,0
Palmitoyl-C	basal	113,4 ± 12,9	121,4 ± 8,1
	roténone	158,2 ± 15,2	148,3 ± 9,9
	antimycine A	508,6 ± 75,1	524,2 ± 33,0

1.4.1.5 CRC de mitochondries isolées de quadriceps

La CRC est diminuée en présence de GM, avec ou sans la CsA, qui est l'inhibiteur de référence de l'ouverture du PTP (tableau 20). Ceci est retrouvé lorsque les mitochondries sont en présence de succinate sans CsA (tableau 20). En revanche, si la CSA est ajoutée au milieu d'incubation, la CRC en présence de S n'est pas différente d'un groupe à l'autre. La fraction de CRC inhibée par la CsA en présence de S est ainsi plus élevée dans le groupe DHA par rapport au groupe Contrôle. Ceci indique que l'effet inhibiteur de la CSA sur l'ouverture du PTP en présence de S est renforcé par la supplémentation en DHA.

Tableau 20:

Effet de la supplémentation en DHA sur la capacité de rétention calcique des mitochondries isolées issues du quadriceps et sur l'action de la ciclosporine A sur la CRC. Les résultats sont exprimés en nmol de Ca²⁺/mg de protéines. Les valeurs présentées sont des moyennes ± SEM. n ≥ 7. * différent de Contrôle p<0,05.

	Contrôle	DHA	
GM	893,1 ± 143,4	597,0 ± 24,9	*
GM CSA	1228,0 ± 134,6	829,2 ± 32,8	*
S	1088,1 ± 106,5	802,2 ± 39,8	*
S CSA	1324,6 ± 100,8	1138,1 ± 85,5	

1.2.12 Voies de signalisation :

1.4.1.6 Expression protéique

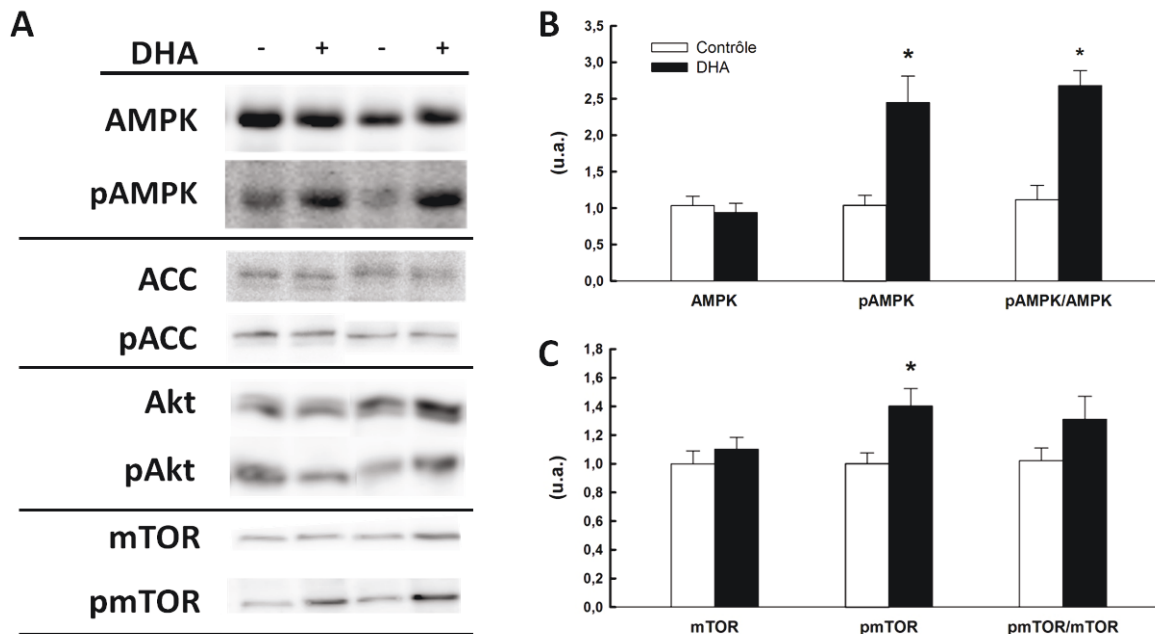


Figure 49:

Effet de la supplémentation en DHA sur le contenu protéique et la phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation énergétique et la synthèse protéique. Western blots des protéines AMPK α , AMPK α^{Thr172} (pAMPK), ACC, pACC $^{\text{Ser79}}$ (pACC), Akt, pAkt $^{\text{Ser473}}$ (pAkt), mTOR et mTOR $^{\text{Ser2448}}$ (pmTOR) (A). Quantification du contenu en AMPK total, pAMPK α^{Thr172} et calcul du ratio de la forme phosphorylée sur la protéine totale (B). Quantification du contenu en mTOR total, pmTOR $^{\text{Ser2448}}$ et calcul du ratio de la forme phosphorylée sur la protéine totale (C). Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 6$. * différent de Contrôle $p < 0,05$.

L'AMPK est une protéine clé du métabolisme énergétique. La supplémentation en DHA induit une forte augmentation de sa phosphorylation (figure 49A et 49B). La quantité de protéines totale restant identique entre les deux groupes, le rapport de la forme phosphorylée sur la forme totale est donc significativement plus élevé dans la condition DHA par rapport à la condition Contrôle. ACC est une protéine en aval d'AMPK dans les voies de signalisation. Ni sa forme totale, ni sa forme phosphorylée sur le résidu Sérine⁷⁹ ne sont affectées par la supplémentation en DHA (figure 49A).

Le contenu en Akt et pAkt^{Ser473} n'est pas affecté par la supplémentation (figure 49A). Le contenu de la forme phosphorylée de mTOR est quant à lui significativement augmenté par la prise de DHA pendant 9 semaines (figure 49A et 49E). Cependant, bien que le contenu en mTOR total reste identique entre les groupes, l'augmentation du rapport pmTOR/mTOR n'atteint pas le seuil de significativité (figure 49E).

1.4.1.7 Expression génique

Le contenu en ARNm de différents gènes d'intérêt a été mesuré sur homogénat de soléaire. L'adiponectine, HAD, MuRF1, NF- κ B, PGC-1 α et VEGF ne semblent pas affectés au bout de 9 semaines de supplémentation en DHA chez ces animaux d'âge moyen (figure 50). En revanche, le contenu en ARNm de PPAR- δ est significativement augmenté suite à la prise de DHA pendant 9 semaines.

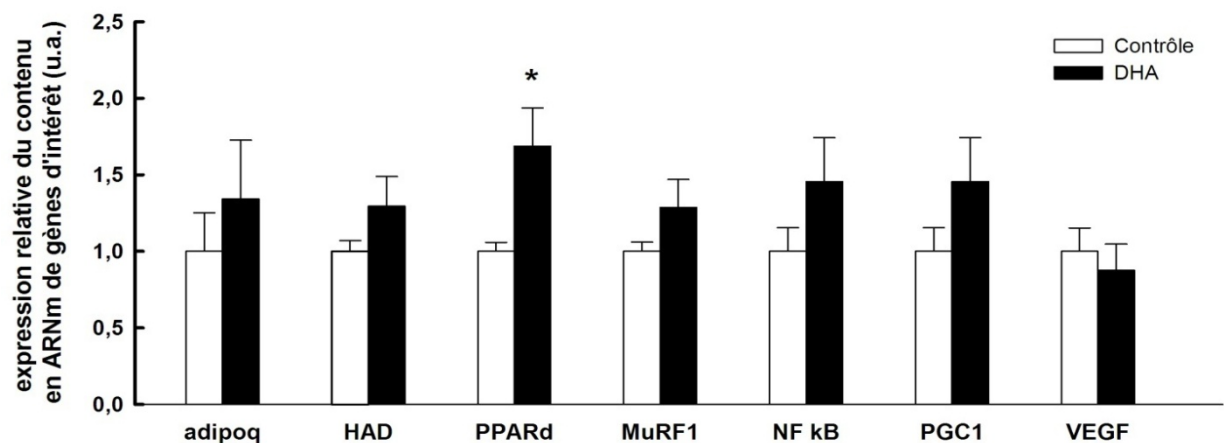


Figure 50:

Expression relative du contenu en ARNm de l'adiponectine (adipoq), de l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD), de PPAR- δ (PPARd), de MuRF1, de NF- κ B, de PGC1- α et de VEGF, mesurés sur homogénat de soléaire. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM rapportées à la moyenne du groupe Contrôle. $n \geq 7$. * différent de Contrôle $p < 0,05$.

1.3 Discussion

L'objectif de ce travail était d'étudier les effets du DHA sur les altérations précoces de la fonction musculaire et du métabolisme causées par le vieillissement. Pour cela, nous avons utilisé des rats adultes (12 mois), ayant terminé leur croissance, contrairement à la majorité des études qui travaillent avec des animaux encore en croissance (Hoyer et Lippert 1982).

Le résultat principal de cette étude est qu'une supplémentation en DHA de 9 semaines provoque une augmentation des capacités d'endurance de rats d'âge moyen en dehors de tout entraînement. Cette amélioration de l'endurance s'accompagne d'importants changements fonctionnels des mitochondries de muscle squelettique indépendamment de toute hypertrophie musculaire.

Un régime alimentaire riche en AGPI n-3 a pu être associé à un meilleur niveau de performance physique chez des sujets âgés (Rousseau et al. 2009). Or, les études portant sur l'évolution de régime alimentaire occidental au cours du dernier siècle montrent que l'ingestion de LA (n-6) a augmenté menant à une diminution du contenu en DHA dans les tissus (Blasbalg et al. 2011). Afin de reproduire cet effet du régime occidental chez nos animaux, nous les avons nourris au cours du protocole avec un régime pauvre en acides gras insaturés au lieu des régimes habituellement proposés dans le commerce et qui contiennent une part d'AG insaturés.

Effet du DHA sur la composition corporelle

La supplémentation en DHA a produit un effet important sur la composition corporelle des animaux. En effet, nous observons une diminution du poids du tissu adipeux viscéral et rétropéritonéal chez les animaux supplémentés. Une telle diminution ne peut être attribuée à une réduction de la prise alimentaire ou à une augmentation de la dépense énergétique, qui sont restées identiques entre les deux groupes tout au long du conditionnement. Des études ont rapporté que la consommation d'huile de poisson avait pour effet d'activer l'oxydation des acides gras chez l'humain (Couet et al. 1997). Nous pouvons faire l'hypothèse qu'un effet similaire s'est produit chez nos animaux supplémentés en DHA. Bien que nous n'ayons qu'une tendance à la diminution du QR avec le DHA, il est possible que la faible augmentation d'oxydation des acides gras qu'il reflète soit suffisante pour produire des changements significatifs de la masse grasse. La mesure du QR au cours de l'effort qui induit une hausse de la demande énergétique, aurait pu permettre d'observer des résultats plus parlants. Nous ne mettons toutefois pas en évidence d'augmentation de la transcription de certains gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras comme l'HAD et l'adiponectine. De même, au niveau protéique, la phosphorylation de l'acétyl CoA Carboxylase (ACC) ne se trouve pas augmentée. Cette enzyme, quand elle n'est pas phosphorylée, est pourtant inhibitrice de l'activité de la carnitine-palmitoyl-transférase 1 (CPT1) qui permet l'entrée des AG à chaîne longue dans la mitochondrie pour qu'ils y soient oxydés (Rufier et al. 2009). Cependant, la lipolyse et l'oxydation des AG ne sont pas exclusivement régulées par l'ACC et la CPT1. L'entrée des acides gras à chaîne courte dans la mitochondrie ne nécessite en effet pas de transporteur particulier. De plus, le peroxyosome est également un siège de l'oxydation des AG dans lequel les AG à chaîne longue peuvent diffuser librement. Il serait intéressant d'évaluer le niveau d'oxydation des acides gras dans cet organite chez les animaux

supplémentés. La diminution du poids du tissu adipeux causée par le DHA pourrait donc être due à une augmentation de l'oxydation des AG malgré l'absence de phosphorylation d'ACC.

Nous ne rapportons dans cette étude aucun effet de la supplémentation en DHA sur la masse des muscles soléaire, plantaire et EDL. Des études avaient pourtant montré chez des patients cachectiques que les AGPI n-3 pouvaient permettre un gain de masse maigre (Barber et al. 1999) et qu'ils augmentaient la réponse de sujets âgés atteints de sarcopénie à la stimulation anabolique causée par l'insuline (Smith et al. 2011). Il est cependant possible que les AGPI n'induisent ce type d'effet que si les sujets sont en situation de fonte musculaire. En effet, en dehors des études sur des patients ou des modèles de pathologie, une augmentation de la masse musculaire n'est généralement jamais rapportée suite à la prise d'AGPI n-3. Les protéines Akt et mTOR sont des acteurs de la voie de signalisation de l'hypertrophie PI3K/Akt/mTOR. Les rapports pAkt/Akt et pmTOR/mTOR ne sont pas affectés par la supplémentation en DHA indiquant que ces protéines ne sont pas activées par le DHA. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR ne serait donc pas influencée, indiquant que la synthèse protéique ne serait pas stimulée. Le gain de temps d'endurance observé chez nos animaux supplémentés en DHA ne proviendrait donc pas de modifications de la masse musculaire.

Effet du DHA sur la composition lipidique des membranes

Dans cette étude, nous avons administré le DHA sous forme de phospholipides au lieu des triglycérides plus classiquement employés. La forme phospholipidique conférerait au DHA une meilleure résistance à l'oxydation et une meilleure biodisponibilité permettant une incorporation supérieure dans les membranes cellulaires (Song et al. 1997). Nous confirmons dans cette étude que, comme le rapportaient certains auteurs (Ayre et Hulbert 1996; Andersson et al. 2002), une supplémentation en DHA a pour effet de modifier la composition lipidique des membranes des globules rouges ainsi que de celles des cellules de muscle squelettique. Parmi les changements observés, il ressort que le DHA induit une diminution du rapport en AGPI n-6/n-3 dans les érythrocytes et les cellules musculaires. La modification de ce rapport provient d'une diminution de la proportion des AGPI n-6 dans les deux compartiments et d'une augmentation concomitante de la proportion d'AGPI n-3 dans les globules rouges. Un changement de composition lipidique de ce type dans le plasma est associé à une meilleure santé au travers de la réduction des facteurs de risque de pathologies cardiovasculaires et d'une meilleure protection contre les maladies dégénératives (Hooijmans et al. 2009; Dornstauder et al. 2012).

Un faible apport en AGPI dans l'alimentation pourrait également être impliqué dans l'altération des performances musculaires (Ayre et Hulbert 1996; Ayre et Hulbert 1996; Ruf et al. 2006). Des données suggèrent qu'un ratio n-6/n-3 élevé augmente le risque de présenter des performances physiques amoindries (Abbatecola et al. 2009). Ces auteurs proposent que les AGPI n-3 puissent avoir un effet préventif contre le déclin musculaire. Il a été montré que la consommation de lipides saturés peut limiter la tolérance à l'exercice chez des souris d'âge moyen, contrairement à la consommation d'acides gras polyinsaturés mais les mécanismes à l'origine de cet effet ne sont toutefois pas élucidés (Zhang et al. 2011). Chez l'humain, la consommation d'extraits de poisson ne permet pas d'améliorer la capacité d'endurance (Jeukendrup et Aldred 2004). Il a été rapporté chez l'Homme qu'à la suite d'un entraînement de 4 semaines, les membranes des cellules musculaires sont enrichies en AG insaturés, et notamment DHA (Helge et al. 2001). Dans notre étude, l'induction par la supplémentation en DHA d'un profil lipidique membranaire se rapprochant de celui découlant d'un entraînement, avec notamment une diminution du ratio n-6/n-3, pourrait expliquer que le DHA produise des effets similaires à ceux provoqués par un entraînement.

Effet du DHA sur la respiration mitochondriale

Après 9 semaines de supplémentation en DHA, la consommation d'oxygène des mitochondries de fibres musculaires isolées perméabilisées est plus élevée. Ovide-Bordeaux et al, ont mis en évidence dans le cœur qu'une supplémentation en DHA résultait en des modifications de la composition lipidique des membranes des cellules musculaires mais aussi des membranes mitochondriales avec notamment une diminution du ratio n-6/n-3. Bien que nous ne l'ayons pas mesuré dans notre étude, ceci suggère que des modifications de la composition lipidique des membranes mitochondriales due à la supplémentation en DHA pourraient être à l'origine de cette augmentation d'activité mitochondriale (Ovide-Bordeaux et Grynberg 2004).

L'augmentation de la respiration mitochondriale causée par l'administration de DHA est observée en état 3 (phosphorylant) sur fibres perméabilisées à la fois de muscle oxydatif (soléaire) et de muscle glycolytique (portion majoritairement blanche du muscle gastrocnémien). Cependant, des différences intermusculaires existent. Dans le soléaire, l'augmentation de consommation d'oxygène n'est observée qu'en présence de GM, un substrat du complexe I de la chaîne respiratoire. Lorsqu'elle est mesurée en présence de S, un substrat du complexe II, ou de la combinaison GMS permettant d'alimenter la chaîne respiratoire dans son ensemble, aucun effet de la supplémentation en DHA n'apparaît. Dans le

muscle gastrocnémien, la respiration mitochondriale est également augmentée en état 3 en présence de GM. Ce résultat similaire dans le soléaire suggère que le DHA aurait un effet marqué sur la respiration lorsque le complexe I est impliqué. Contrairement à ce que nous observons avec le soléaire, la consommation d'oxygène par les mitochondries de gastrocnémien blanc est également augmentée chez les animaux supplémentés lorsque les substrats GM et S sont combinés. Ceci laisse à penser que dans les fibres glycolytiques, le DHA a un effet plus marqué sur la respiration et que l'activité du complexe II (dont le substrat est le S) ne peut masquer cet effet, à l'inverse de ce qu'il semble se passer dans le muscle oxydatif.

En condition non-phosphorylante (état 2), la consommation d'oxygène des fibres musculaires, aussi bien glycolytiques qu'oxydatives, est augmentée par le DHA en présence des substrats GM ou S. Une tendance est également visible lorsque les substrats sont combinés. Cette augmentation de respiration en état 2 pourrait refléter un effet découplant du DHA sur la mitochondrie (Lionetti et al. 2012). Cependant, ceci s'avère peu probable dans notre étude car nous ne retrouvons pas d'augmentation de la respiration en état 2 sur les mitochondries isolées de ces animaux. Bien que les mesures de respiration de mitochondries isolées et celles de fibres perméabilisées aient été réalisées sur des muscles différents (vaste latéral et gastrocnémien/soléaire respectivement), le fait que les suppléments en AGPI affectent généralement tous les muscles permet de supposer que les différences observées ne proviendraient probablement pas du fait que les muscles étudiés sont différents (Stark et al. 2007).

La citrate synthase mesurée sur homogénat de soléaire et de gastrocnémien blanc n'est pas affectée par la supplémentation en DHA. Ceci indique que les modifications de respiration mitochondriale ne seraient pas dues à une augmentation de la densité mitochondriale. Ceci apparaît coïncider avec l'absence d'augmentation du niveau de transcrite de PGC1- α , l'un des principaux facteurs de transcription de la biogénèse mitochondriale. Le DHA semble en revanche affecter les complexes III et IV de la chaîne respiratoire. Leurs activités maximales mesurées sur homogénat de soléaire sont en effet augmentées, suggérant une élévation de leur contenu dans la mitochondrie. Il est connu que la composition membranaire peut exercer une régulation sur les éléments de la chaîne de transport des électrons (McKenzie et al. 2006; Schwall et al. 2012). Au vu des modifications de composition membranaire induites par la supplémentation en DHA, et que nous supposons répercutées dans la membrane mitochondriale, nous faisons l'hypothèse que l'environnement lipidique a impacté les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire.

Effet du DHA sur l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP

Puisque l'augmentation de respiration mesurée sur fibres perméabilisées n'est pas liée à une augmentation de la densité mitochondriale, le DHA aurait donc un effet spécifique sur la régulation de la chaîne de transport des électrons qui se traduit notamment par des variations de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP. En effet, chez les rats supplémentés en DHA, l'affinité pour l'ADP est ainsi largement diminuée dans le soléaire comme l'indique l'augmentation marquée du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP. La diminution de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP est également l'un des effets connus de l'entraînement (Zoll et al. 2002; Zoll et al. 2003), alors que la restriction calorique a par ailleurs été montré comme induisant un effet inverse avec une affinité qui se trouve alors augmentée (Daneshrad et al. 2001).

Comme pour la respiration mitochondriale, le DHA semble donc reproduire les conséquences d'un entraînement physique. Cependant, l'augmentation du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP n'est pas retrouvée sur le muscle gastrocnémien blanc. Dans cette étude, nous avons évalué l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP en présence de la combinaison de substrats GMS, permettant d'alimenter la chaîne respiratoire dans son ensemble. Ceci constitue une des originalités de cette étude puisque, classiquement pour ce type de mesure, le substrat utilisé n'alimente la chaîne respiratoire que par le complexe I (pyruvate ou GM) ou en de rares occasions par le complexe II (Saks et al. 1998; Daneshrad et al. 2001). Nous avons fait le choix de cette combinaison de substrats afin de nous rapprocher des conditions physiologiques dans lesquelles la chaîne respiratoire est supposée alimentée en électrons simultanément au niveau des complexes I et II. Cependant, et du très probablement du fait de ce substrat différent, le $K_{m_{app}}$ à l'ADP dans nos travaux est inférieur à ce qui est couramment observé avec le substrat GM (Saks et al. 1998). Mesuré sur le soléaire de nos animaux contrôle, il est d'environ 70 μM alors qu'il s'élève en moyenne à plus de 300 μM dans la littérature pour ce muscle en présence de GM. Concernant le gastrocnémien, nous obtenons un $K_{m_{app}}$ à l'ADP proche de 1 μM alors qu'il est habituellement donné dans la littérature entre 10 et 15 μM (Saks et al. 1998). L'affinité de la mitochondrie pour l'ADP apparaît donc plus élevée lorsque la chaîne respiratoire est alimentée au niveau des complexes I et II simultanément. La différence de réponse à la supplémentation en DHA concernant l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP entre ces muscles pourrait provenir du fait que les valeurs de $K_{m_{app}}$ en présence de GMS dans le muscle gastrocnémien sont très basses. Des changements de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP pourraient alors être sous le seuil de sensibilité de notre technique de mesure.

Dans notre étude, nous avons mesuré la consommation d'oxygène à la fois sur fibres perméabilisées et sur mitochondries isolées de muscle squelettique. Ces deux modèles se révèlent complémentaires. En effet, les mitochondries isolées sont étudiées hors de tout système de régulation cellulaire, alors que dans les fibres perméabilisées, les membranes mitochondriales sont mieux conservées tout comme l'environnement cellulaire (Picard et al. 2011). La comparaison des résultats obtenus dans les deux approches pourrait donc permettre d'apporter des informations quant au rôle de l'environnement cellulaire sur la régulation de la fonction mitochondriale. N'ayant pas observé d'effet du DHA sur la respiration mitochondriale de mitochondries isolées, alors même qu'elle est augmentée dans les fibres perméabilisées, nous pouvons supposer que l'environnement mitochondrial joue un rôle prépondérant dans la régulation de la respiration mitochondriale et que le DHA agirait sur ce type de régulation. Des travaux suggèrent que la régulation du métabolisme mitochondrial par l'environnement cellulaire impliquerait notamment des interactions entre des protéines de la membrane mitochondriale, comme VDAC et l'ANT, et des composants du cytosquelette tels que les différentes isoformes de tubulines (Guzun et al. 2012).

Effet du DHA sur la capacité de rétention calcique et la production d' H_2O_2

Chez nos rats supplémentés, la fonction mitochondriale n'est pas affectée uniquement en termes de consommation d'oxygène. Nous rapportons également une diminution de la capacité de rétention calcique des mitochondries isolées qui reflèterait une plus grande sensibilité à l'ouverture du PTP dans le groupe supplémenté. L'ouverture du PTP est également retardée chez les rats supplémentés en DHA lorsqu'elle est mesurée en présence de cyclosporine A (CsA), qui est l'inhibiteur de référence du PTP et agirait en réprimant l'activité de la cyclophiline D (cypD). Cet effet du DHA sur la CRC en présence de CsA n'est cependant observé que lorsque la chaîne respiratoire est alimentée par un substrat du complexe I. Bien que la structure moléculaire du PTP ne soit pas élucidée, l'implication de ce pore dans la mort cellulaire par apoptose est très documentée (Hunter et al. 1976; Bernardi 2013). Ces résultats suggèrent que le DHA, au lieu de préserver la fonction mitochondriale, serait associé à une sensibilité à l'apoptose plus élevée. Ce résultat va à l'encontre de ce qui avait été observé sur des mitochondries cardiaques (O'Shea et al. 2009). Les effets du DHA sur l'apoptose ont été étudiés sur de nombreux modèles cellulaires. Mais les résultats sont très variables d'une étude à l'autre, le DHA ayant un effet sur l'apoptose parfois négatif ou parfois

positif, selon le type cellulaire étudié (Diep et al. 2000; Qadhi et al. 2013). De nouveaux travaux apparaissent donc nécessaires pour préciser les mécanismes reliant le DHA à la régulation de l'apoptose dans le muscle squelettique.

Des auteurs rapportent l'existence d'une association entre la production de ROS et la régulation de l'ouverture du PTP. Dans notre étude, nous ne mettons en évidence aucun effet du DHA sur la génération d' H_2O_2 par la mitochondrie isolée, utilisée comme indicateur de la production de ROS. La détermination de marqueurs plasmatiques du stress oxydant, comme les groupements thiols, les TBARS et le FRAP, abonde également dans le sens d'un stress oxydant identique entre nos deux groupes de rats. Le DHA n'aurait donc pas d'effet sur le stress oxydant dans notre modèle.

Le PTP, outre son implication dans l'apoptose, est également considéré comme un outil de régulation de la fonction mitochondriale (Gunter et Pfeiffer 1990; Rasola et Bernardi 2007; Brenner et Moulin 2012). Dans la mitochondrie musculaire, l'ouverture transitoire du PTP permet une diminution du potentiel de membrane. Dans la littérature, cette diminution est associée à une diminution de la production mitochondriale de ROS (Batandier et al. 2006). Si l'augmentation de la sensibilité des mitochondries musculaires à l'ouverture du PTP induite par la supplémentation en DHA provoque des ouvertures transitoires de ce dernier, cela pourrait participer à limiter la production de ROS. Un tel effet pourrait avoir des conséquences bénéfiques à plusieurs niveaux, comme notamment une baisse des peroxydations lipidiques et de l'oxydation des protéines dans des situations inductrices de stress oxydant comme l'exercice. Une étude mesurant la CRC sur le muscle gastrocnémien indique par ailleurs que, comme le DHA, l'entraînement provoque également une sensibilisation à l'ouverture du PTP (Lumini-Oliveira et al. 2009). Bien que le caractère positif ou négatif de cet effet du DHA ne soit pas établi, il convient de noter qu'une fois de plus le DHA produit un effet similaire à celui de l'entraînement physique.

Effet du DHA sur les voies de signalisation métabolique

Les AGPI n-3 sont connus pour être activateurs de facteurs de transcription et notamment de la famille des PPARs dont ils sont des ligands (Kliwer et al. 1997). Il a été montré sur culture de myotubes que le DHA permettait également d'activer l'expression de PPAR- γ (Wang et al. 2013). L'isoforme PPAR- δ est la plus exprimée dans le muscle et favorise notamment l'oxydation des AG (Ehrenborg et Krook 2009). Dans notre étude, nous mettons en évidence une augmentation du niveau de transcrite de PPAR- δ dans le muscle soléaire des rats supplémentés en DHA. Des travaux ont montré que la prise d'agonistes de

PPAR- δ combinée à un entraînement permet une augmentation plus marquée du temps d'endurance de souris sédentaires que lorsqu'elles sont seulement entraînées (Narkar et al. 2008). Cet effet de PPAR- δ serait lié à son activité de facteur de transcription de plusieurs gènes impliqués dans les adaptations à l'entraînement, et notamment des gènes du métabolisme oxydatif (Narkar et al. 2008). Dans notre étude, la supplémentation en DHA pourrait donc avoir augmenté l'expression et l'activité de PPAR- δ conduisant à des adaptations similaires à celle de l'entraînement chez les animaux supplémentés. Cependant, dans l'étude de Narkar et al, l'activation de PPAR- δ n'est pas suffisante à induire une amélioration de la capacité d'endurance si elle n'est pas couplée à un entraînement (Narkar et al. 2008). Un autre mécanisme apparaît donc impliqué.

L'AMPK est une protéine clé du métabolisme énergétique impliquée dans de nombreuses voies de signalisation liées à l'atrophie/hypertrophie, au vieillissement et au métabolisme des lipides et des glucides. Comme PPAR- δ , l'AMPK permet la transcription de nombreux gènes responsables d'adaptations à l'entraînement et du glissement vers un métabolisme plus oxydatif (Winder et al. 2006). Une étude rapporte ainsi que la stimulation de l'activité de l'AMPK permet un gain de temps d'endurance sans que les animaux ne se soient entraînés (Narkar et al. 2008). Dans notre étude, le DHA provoque une forte augmentation de la phosphorylation de l'AMPK et donc de son activation, ce qui pourrait participer à l'augmentation du temps d'endurance observée chez les rats supplémentés en DHA. Cependant, le niveau de transcrite de PGC1- α , un gène activé par l'AMPK, ne s'avère pas augmenté chez les animaux supplémentés. Il serait intéressant d'étudier d'autres cibles de l'AMPK impliquées dans les adaptations à l'entraînement. Narkar et al, montrent que les actions de PPAR- δ et de l'AMPK sur la transcription de gènes liés aux adaptations à l'entraînement se potentialisent, aboutissant à des effets encore plus marqués (Narkar et al. 2008). Cet effet de potentialisation a également pu avoir lieu chez les rats supplémentés en DHA, permettant d'expliquer le spectaculaire gain de temps d'endurance.

Conclusion

Cette étude nous indique que le DHA permet la mise en place d'adaptations similaires à celle normalement induite par un entraînement en endurance. Il permet ainsi une amélioration de la capacité d'exercice et de la fonction mitochondriale, ainsi que l'activation de facteurs de transcription impliqués dans les réponses adaptatives à l'entraînement.

Il représente donc une approche nutritionnelle prometteuse pour l'amélioration des capacités d'exercice des personnes d'âge moyen en bonne santé et pourrait également être envisagé dans le contexte pathologique.

2. ETUDE 2 : EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN DHA SUR LA TOLERANCE A L'EFFORT ET SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE CHEZ DES RATS ADULTES EN HYPOXIE

2.1 Introduction

La BPCO est une maladie pulmonaire dont la prévalence ne cesse d'augmenter et qui se positionne aujourd'hui comme la 4^{ème} cause de décès en Europe (OMS 2004). Outre l'atteinte pulmonaire, elle est souvent associée à une dysfonction musculaire marquée par des atteintes qualitatives et quantitatives du tissu musculaire. Or la quantité de masse musculaire est reconnue comme étant un puissant facteur prédictif de la survie des patients (Marquis et al. 2002). Une faible masse musculaire a également été reliée à une diminution de tolérance à l'effort (Bernard et al. 1998), de mobilité (Roig et al. 2011) et de qualité de vie des patients (Shoup et al. 1997; Mostert et al. 2000; Vogiatzis et al. 2010). Les causes de cette dysfonction musculaire sont multiples. Outre l'inactivité, l'inflammation, la dénutrition et la sarcopénie, l'hypoxie serait également impliquée. En effet, elle est connue pour affecter la masse et le métabolisme musculaire (Itoh et al. 1990; Favier et al. 2010).

Différentes stratégies, comme l'oxygénothérapie chez les patients avec une hypoxémie chronique, et le réentraînement ont donc été envisagées pour limiter la dysfonction musculaire dans le but d'améliorer l'état de santé des patients BPCO (SPLF 2009). Parmi celles-ci, la réhabilitation par l'activité physique a fait ses preuves et fait actuellement partie intégrante de la prise en charge thérapeutique des patients (Maltais et al. 1996; Nici et al. 2006; Vogiatzis et al. 2011). Elle présente cependant certaines limites, une partie des patients ne répondant pas au réentraînement ou n'y adhérant pas (Garrod et al. 2006). D'autres pistes sont donc explorées.

La cachexie dont souffrent certains patients, notamment du fait d'apports alimentaires qui seraient insuffisants au vu de leur dépense énergétique (Schols et al. 1991; Koehler et al. 2007), a conduit à proposer des réhabilitations nutritionnelles aux patients.

Les AGPI n-3, et particulièrement le DHA sont des nutriments possédant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires qui pourraient se révéler bénéfiques dans le contexte de la BPCO (Calzada et al. 2010; Calder 2013). Broekhuizen et al, montrent d'ailleurs un gain de tolérance à l'effort plus marqué chez un groupe de patients BPCO supplémentés en AGPI n-3 et inclus dans un programme de réentraînement, comparativement à un groupe de patients simplement réentraînés (Broekhuizen et al. 2005). Cependant, les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la tolérance à l'effort chez ces patients sont mal connus. Broekhuizen et al, faisaient l'hypothèse que l'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 serait à l'origine de l'amélioration des capacités physiques des patients. Toutefois, l'étude de marqueurs plasmatiques de l'inflammation ne montrait pas d'effet des AGPI n-3 sur ce paramètre (Broekhuizen et al. 2005). D'autres mécanismes seraient impliqués. L'étude précédente et des travaux portant sur des mitochondries cardiaques indiquent que la fonction mitochondriale est influencée par la prise de DHA (Khairallah et al. 2010). Ces modifications de la fonction mitochondriale dans l'étude 1 s'accompagnaient d'une augmentation du temps d'endurance chez nos animaux d'âge moyen.

Au vu des éléments disponibles dans la littérature et de nos résultats obtenus dans l'étude précédente, nous faisons l'hypothèse qu'une supplémentation en DHA pourrait avoir des effets positifs sur le muscle de patients BPCO et plus particulièrement sur sa fonction mitochondriale, qui pourraient se traduire par une amélioration de la capacité d'effort.

La présente étude a donc pour objectif de caractériser les effets d'une supplémentation en DHA sur le muscle squelettique et la tolérance à l'effort de rats placés en hypoxie. Ne disposant pas de modèle animal de BPCO présentant des atteintes musculaires, nous avons choisi le modèle du rat exposé à une hypoxie environnementale afin de nous rapprocher des effets occasionnés par la baisse de disponibilité en oxygène causée par l'atteinte respiratoire dans la BPCO sur le muscle.

Afin de nous rapprocher encore de la condition musculaire des patients BPCO qui déclarent cette pathologie dans la deuxième partie de vie, nous avons utilisé dans cette étude des animaux d'âge moyen ayant terminé le processus de croissance musculaire. Ceci est une approche originale au regard des études portant sur les effets d'une supplémentation en AGPI sur le muscle qui sont principalement réalisées chez le rat jeune.

2.2 Résultats

2.2.1 Prise alimentaire et données anthropométriques

2.2.1.1 Prise alimentaire

La prise alimentaire était mesurée deux fois par semaine tout au long du conditionnement (figure 51).

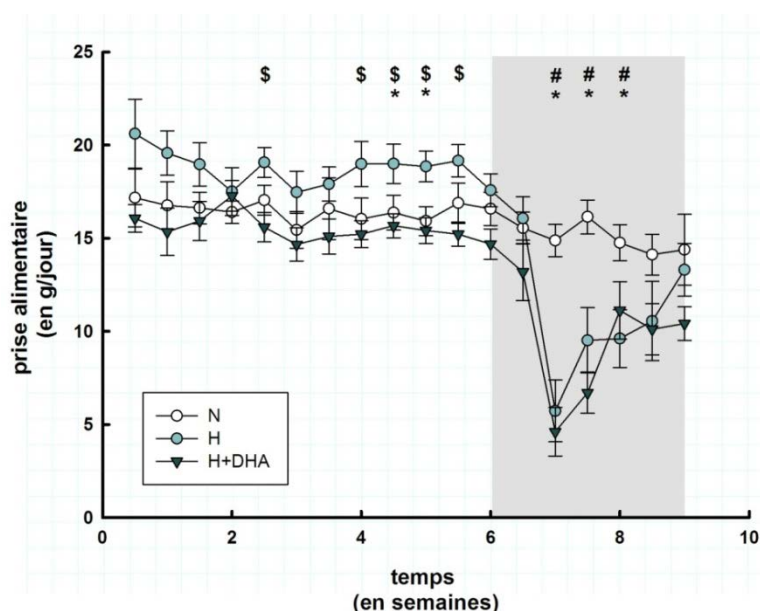


Figure 51:

Evolution de la prise alimentaire mesurée deux fois par semaine pendant les 9 semaines de conditionnement. La partie grisée correspond à la période d'hypoxie pour les groupes H et H + DHA. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 12$. * H différent de N $p < 0,05$. # H + DHA différent de N $p < 0,05$. \$ H + DHA différent de H $p < 0,05$.

Elle est plus importante lors de la 5^{ème} semaine et de la 6^{ème} semaine dans le groupe H par rapport au groupe H + DHA. Avant la 7^{ème} semaine, qui correspond à la mise en hypoxie des animaux des groupes H et H + DHA, la prise alimentaire dans le groupe N n'est pas différente de celle du groupe H + DHA.

A partir de la mise en hypoxie, la prise alimentaire chute dans les groupes H et H + DHA alors qu'elle reste stable dans le groupe N. A la fin de la 7^{ème} semaine, les animaux des groupes H et H + DHA ont une prise alimentaire trois fois plus faible que celle des animaux du groupe N (H + DHA : $4,6 \text{ g} \pm 1,3$; H : $5,7 \text{ g} \pm 1,7$ contre N : $14,9 \text{ g} \pm 0,9$; $p < 0,05$). Cette baisse de prise alimentaire se résorbe ensuite peu à peu et nous n'observons plus de différence entre les groupes lors de la dernière semaine de conditionnement.

Nous souhaitons vérifier que la supplémentation en DHA ne réduisait pas la prise alimentaire et que l'hypoxie normobare avec une FiO_2 de 12% était suffisante pour produire des effets sur l'organisme, comme notamment l'anorexie habituellement observée.

La supplémentation en DHA n'apparaît pas limiter la prise alimentaire puisque cette dernière est similaire à celle du groupe N avant la mise en hypoxie. Les animaux du groupe hypoxie présente une prise alimentaire plus élevée que ceux des groupes N et H + DHA avant la mise en hypoxie. Cependant, lorsque la prise alimentaire est rapportée au poids corporel des animaux, cette différence n'est plus observée. Les animaux du groupe H dont la prise alimentaire était mesurée avaient effectivement une masse corporelle légèrement plus élevée que celles des rats des autres groupes.

L'hypoxie induit bien une anorexie, que les animaux reçoivent ou non la supplémentation en DHA.

2.2.1.2 Poids corporel

Les moyennes des poids corporels d'un groupe à l'autre sont les mêmes en début de conditionnement. Au cours des 9 semaines de conditionnement, tous les animaux ont perdu du poids (figure 52).

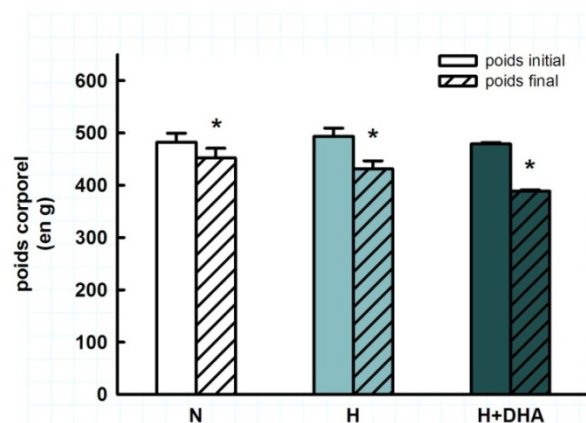


Figure 52:

Evolution du poids corporel entre le début (poids initial) et la fin du conditionnement (poids final) dans les différents groupes expérimentaux. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 18$. * différent du poids initial pour le même groupe $p < 0,05$.

Cependant la perte n'a pas été la même selon le groupe auquel ils appartenaient. Les rats du groupe H ont perdu deux fois plus de poids que ceux du groupe N ($61,7 \text{ g} \pm 5,2$ contre $29,8 \text{ g} \pm 9,7$ respectivement $p < 0,05$) (figure 53). Les rats du groupe H+DHA ont eu une perte

de poids supérieure de 46% par rapport à celle des rats du groupe H. L'hypoxie induit donc une perte de poids, qui se trouve majorée par la supplémentation en AGPI n-3 DHA.

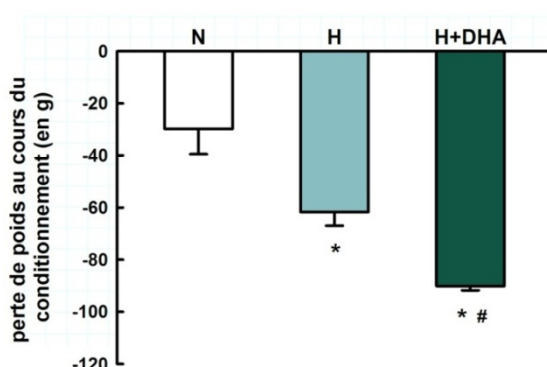


Figure 53:

Perte de poids survenue entre la mise en conditionnement et à l'issue des 9 semaines de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 18$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

2.2.1.3 Composition corporelle

A l'issue des 9 semaines de conditionnement, les animaux étaient euthanasiés et certains tissus prélevés et pesés afin de déterminer d'éventuelles modifications de la composition corporelle.

Tableau 21:

Poids de différents organes et tissus, exprimés en mg/g de poids corporel total. EDL = extenseur des doigts longs, VG = ventricule gauche, VD = ventricule droit. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 14$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

	N	H	H+DHA
cœur	24,37 \pm 1,15	25,06 \pm 1,12	29,62 \pm 0,31 * #
VG	16,85 \pm 0,86	15,39 \pm 0,52	17,87 \pm 0,28
VD	7,08 \pm 1,13	6,71 \pm 0,52	8,43 \pm 0,17
EDL	3,71 \pm 0,18	4,17 \pm 0,11	4,09 \pm 0,03
rein	53,36 \pm 1,88	50,12 \pm 1,25	54,99 \pm 0,27
rate	17,23 \pm 0,76	17,84 \pm 0,83	22,08 \pm 0,33 *
foie	267,17 \pm 5,90	256,38 \pm 6,09	262,51 \pm 1,09

Le poids du cœur rapporté au poids total est significativement augmenté par la supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie par rapport aux conditions normoxie et hypoxie seule (tableau 21). Bien que les poids relatifs des ventricules gauche et droit ne varient pas entre les groupes, l'indice de Fulton nous indique que c'est principalement une hypertrophie ventriculaire droite qui est responsable de l'augmentation de poids du cœur dans le groupe H + DHA (figure 54). L'indice de Fulton est ainsi supérieur dans le groupe H + DHA par rapport au groupe N mais n'est pas différent de celui du groupe H.

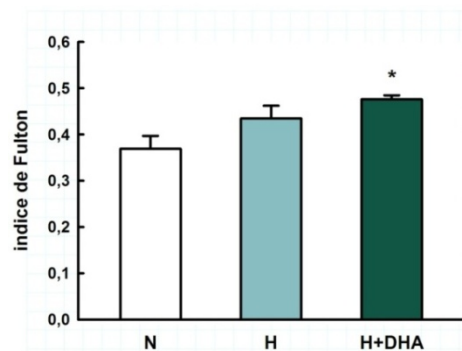


Figure 54:

Indice de Fulton (VD/VG+septum) calculé pour les cœurs des animaux des groupes N, H et H+DHA. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. n ≥ 10. * différent de N p<0,05.

Outre le muscle cardiaque, la masse musculaire squelettique est également modifiée par les traitements expérimentaux. Alors que les poids du soléaire et du plantaire rapportés au poids corporel total sont identiques dans les conditions normoxie seule et hypoxie, ils sont supérieurs dans le groupe H + DHA (figure 55). Ceci signifierait que les animaux en hypoxie seule qui perdent de la masse de manière marquée, mais pour qui le rapport masse musculaire/masse totale ne change pas, perdraient indifféremment de la masse de façon homogène au niveau musculaire et d'autres tissus, En revanche, les animaux du groupe H + DHA pour qui le rapport masse musculaire/masse totale augmente, auraient une augmentation de la masse de ces deux muscles rapportée au poids total, alors que ce dernier diminue. Ceci suggère que ces animaux qui avaient perdu beaucoup de poids ont préférentiellement préservé leur masse musculaire au détriment d'autres tissus. Toutefois, ce type de résultat ne se retrouve pas pour tous les muscles puisque nous n'observons rien de tel concernant le muscle EDL (tableau 21) La supplémentation en DHA semble donc maintenir préférentiellement les muscles oxydatifs.

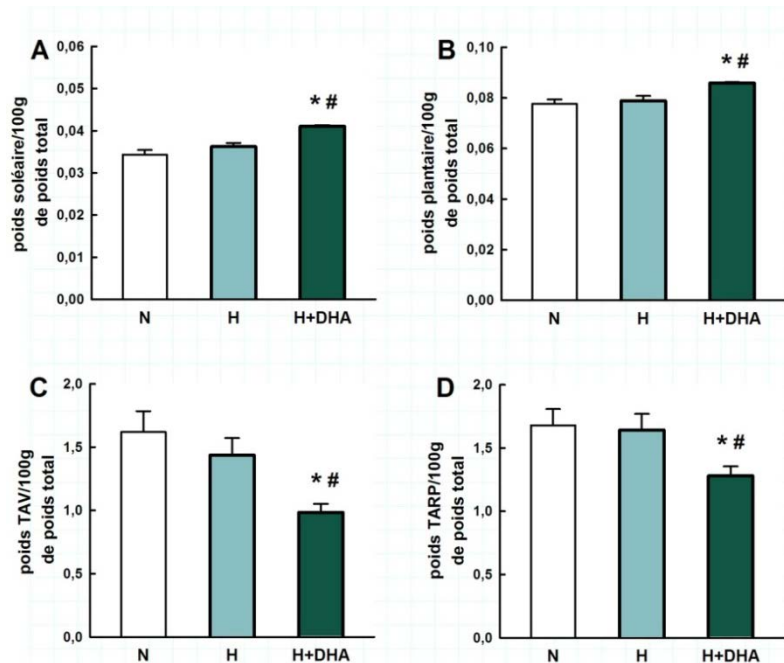


Figure 55:

Poids de différents tissus de l'organisme rapportés au poids corporel total. TAV= tissu adipeux viscéral, TARP = tissu adipeux rétropéritonéal. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 14$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

Une diminution de la masse relative des tissus adipeux viscéral et rétropéritonéal est observée dans le groupe H + DHA par rapport aux groupes H et N (figure 55). Il apparaît donc que le tissu dont la masse diminue dans la condition H + DHA, expliquant au moins partiellement la perte de poids corporel, est le tissu adipeux.

La supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie provoque donc des modifications de la composition corporelle allant dans le sens d'une diminution de la masse adipeuse avec un maintien relatif de la masse musculaire.

2.2.2 Calorimétrie indirecte

La dépense énergétique et le quotient respiratoire ont été mesurés sur 24h au cours de la dernière semaine de conditionnement (figure 56).

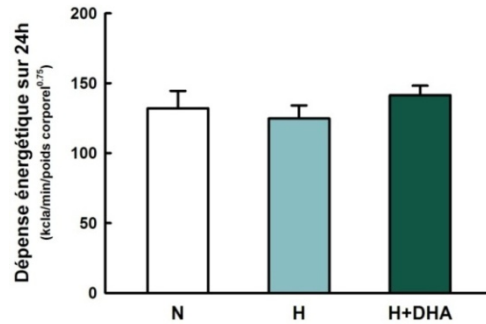


Figure 56:

Dépense énergétique mesurée sur 24h, lors de la dernière semaine de conditionnement, chez des animaux en normoxie (N), en hypoxie (H) et en hypoxie et supplémentés en DHA (H+DHA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$.

Ni la supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie, ni l'hypoxie seule n'induisent de modification de la dépense énergétique calculée sur 24h. Toutefois, la mesure de la dépense énergétique évaluée heure par heure indique qu'en fin de période nocturne, de 4h et 7h, les animaux du groupe H+DHA ont une dépense énergétique supérieure à celle des animaux du groupe H ($p < 0,05$).

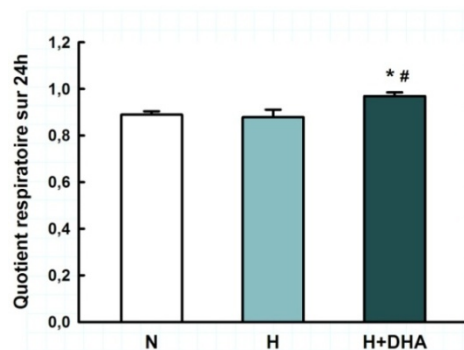


Figure 57:

Quotient respiratoire évalué sur 24h lors de la dernière semaine de conditionnement chez des animaux en normoxie (N), en hypoxie (H) et en hypoxie et supplémentés en DHA (H+DHA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

Le quotient respiratoire calculé sur 24h est significativement plus élevé dans le groupe H + DHA ($0,97 \pm 0,02$) comparé aux groupes N ($0,89 \pm 0,01$) et H ($0,88 \pm 0,03$) ($p < 0,05$), ce qui indique que la prise de DHA combinée à l'hypoxie induirait une oxydation préférentielle des substrats glucidiques (figure 57).

2.2.3 Fonction cardiaque

Nous avons évalué la fonction cardiaque au travers de mesure des pressions intraventriculaires avec une sonde Millar.

La fréquence cardiaque n'apparaît pas impactée par les traitements expérimentaux (figure 58).

La pression développée par le ventricule droit est supérieure en hypoxie, avec ou sans supplémentation en DHA, par rapport à la condition normoxie (figure 58). La vitesse de relaxation myocardique (dP/dt min) est également supérieure dans les deux groupes d'animaux en hypoxie par rapport au groupe N, alors que celle de mise en tension (dP/dt max) ne l'est que dans le groupe H.

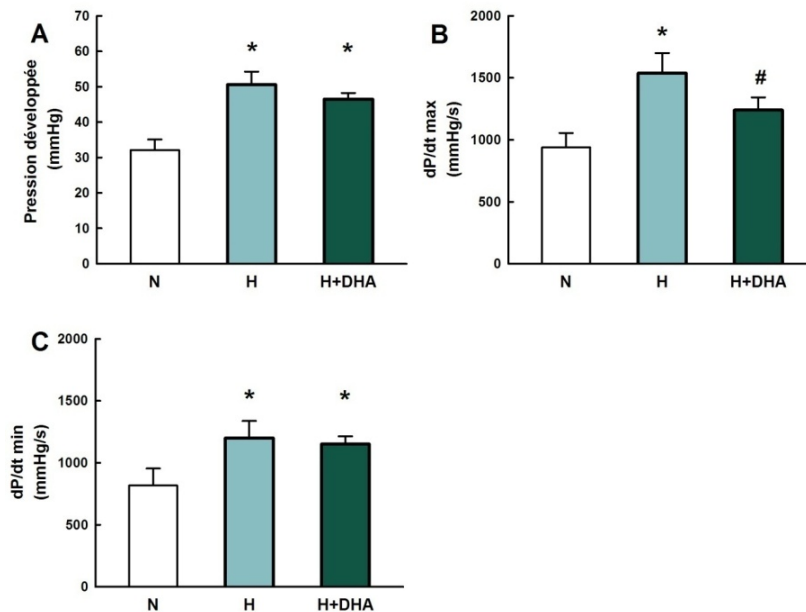


Figure 58:

Fonction cardiaque évaluée par mesure de la pression ventriculaire droite avec une sonde millar : (A) pression développée par le ventricule droit, (B) vitesse de mise en tension du myocarde et (C) vitesse de relaxation du myocarde. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 9$. * différent de N $p < 0,05$.

Ces différentes variables, lorsqu'elles sont mesurées sur le ventricule gauche, n'apparaissent affectées ni par l'hypoxie ni par la prise de DHA combinée à l'hypoxie (figure 59).

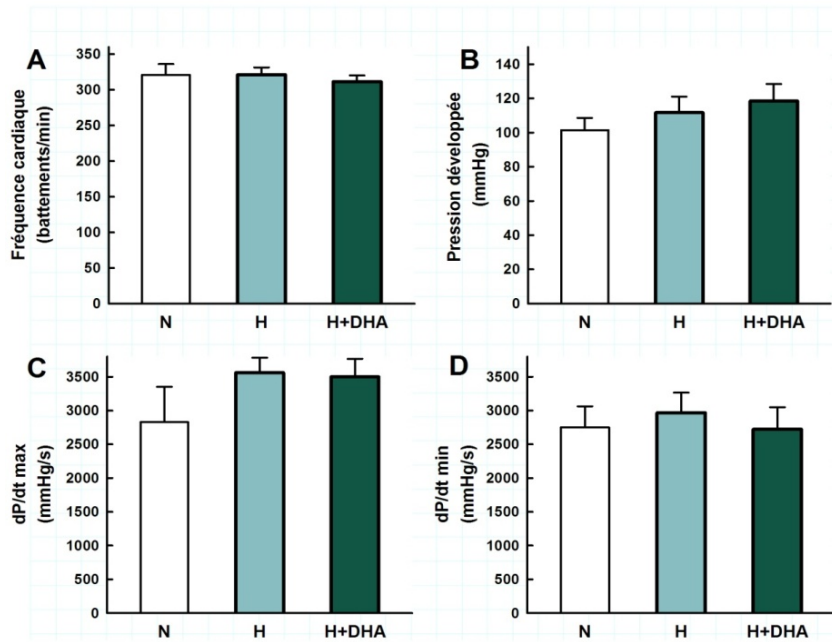


Figure 59:

Fonction cardiaque évaluée par la mesure de la fréquence cardiaque (A) et par la mesure de la pression ventriculaire gauche avec une sonde millar : (B) pression développée par le ventricule gauche, (C) vitesse de mise en tension du myocarde et (D) vitesse de relaxation du myocarde. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 7$.

2.2.4 Dosages biologiques

Aucun effet de l'hypoxie ou de l'hypoxie combinée à la supplémentation en DHA n'est observé sur le contenu plasmatique en triglycérides (figure 60).

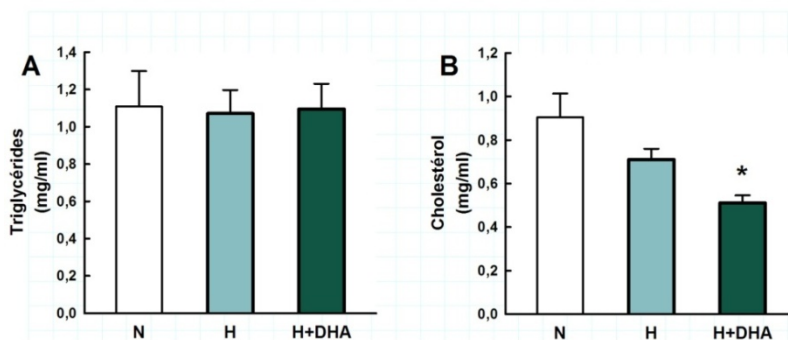


Figure 60:

Contenu plasmatique en triglycérides (A) et cholestérol (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de N $p < 0,05$.

Le taux de cholestérol plasmatique total a également été évalué (figure 60). Il ressort qu'il est abaissé de 44% dans le groupe H+DHA par rapport au groupe N ($p < 0,05$). Des

tendances à la diminution sont également observées entre les groupes N et H ($p=0,069$) ainsi qu'entre les groupes H et H+DHA ($p=0,061$). Si les groupes sont comparés deux à deux par un test t de student, la tendance entre les groupes H et H+DHA devient significative ($p=0,005$), au contraire de celle des groupes N et H ($p=0,125$). Le DHA combiné à l'hypoxie semble donc bien provoquer une baisse du taux de cholestérol circulant qui n'est pas retrouvée pour l'hypoxie seule à cause des différences d'écart-type entre le groupe N et les deux autres groupes.

2.2.5 Stress oxydant

La mesure de FRAP renseigne sur les capacités antioxydantes non-enzymatiques plasmatiques globales. Elle est augmentée dans la condition H+DHA respectivement de 54,5% et de 67% comparée à H et N ($p<0,05$) (figure 61). La supplémentation en DHA est donc associée à une amélioration des capacités antioxydantes non-enzymatiques plasmatiques globales chez des animaux en hypoxie, alors que l'hypoxie seule n'induit aucun effet de ce type.

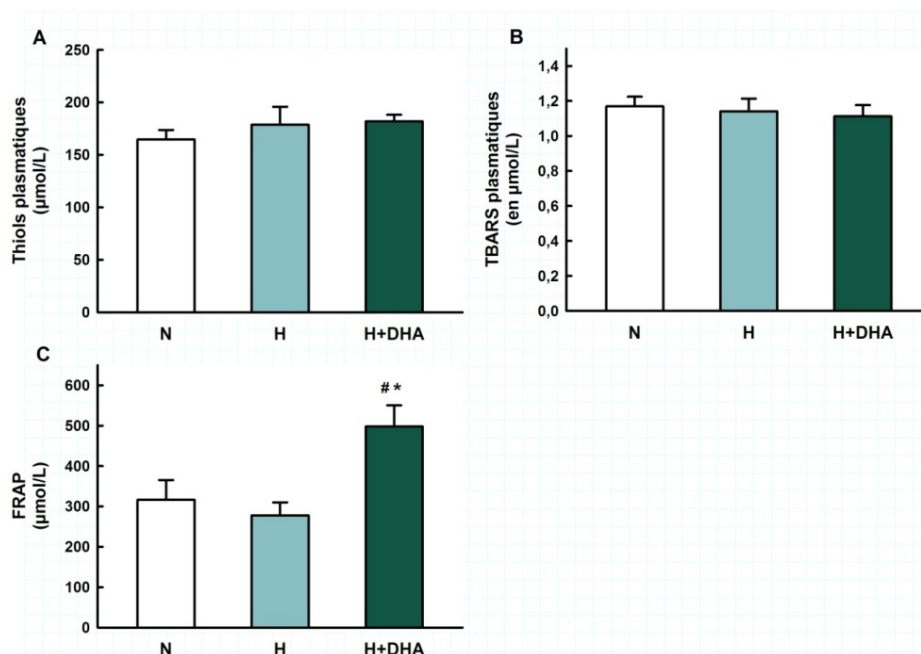


Figure 61:

Marqueurs du stress oxydant mesurés dans le plasma. Un marqueur d'oxydations protéiques, les thiols (A) ; un marqueur de peroxydations lipidiques, les TBARS (B) ; un marqueur des capacités antioxydantes non-enzymatiques, FRAP (C). Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 6$. * différent de N $p<0,05$. # différent de H $p<0,05$.

Toutefois, aucune modification de l'oxydation des protéines, évaluée par la mesure des groupements thiols plasmatiques, n'est visible. La mesure des TBARS, indicateurs de la peroxydation lipidique, nous indique que celles-ci ne sont pas non plus affectées par les différents traitements expérimentaux (figure 61).

2.2.6 Capacité d'endurance

La capacité d'exercice des animaux a été mesurée lors d'une épreuve de course sur tapis roulant. Les animaux des groupes H et H + DHA réalisaient l'épreuve d'effort en hypoxie alors que ceux du groupe N restaient en normoxie. Ce choix de protocole est guidé par le fait que nous voulions rester proches des conditions dans lesquelles les patients BPCO réalisent un exercice, c'est-à-dire en situation de baisse de disponibilité en oxygène caractérisant la BPCO, pour les deux groupes H et H + DHA. Les rats du groupe N courraient en normoxie comme des sujets sains.

Le temps de course jusqu'à épuisement des rats du groupe H, mesuré en hypoxie, est significativement inférieur au temps de course du groupe N, mesuré en normoxie ($p < 0,05$). Cependant, lorsque les animaux en hypoxie sont supplémentés en DHA, leur temps de course mesuré en hypoxie est doublé par rapport à celui des animaux du groupe H (H : $8 \text{ min} \pm 2,11$; H + DHA : $16,2 \text{ min} \pm 2,01$; $p < 0,05$). Il n'est alors pas significativement différent de celui des rats courant en normoxie ($20,5 \pm 3,43$) (figure 62). La supplémentation en DHA ramène donc le niveau de performance des animaux en hypoxie à celui des animaux en normoxie.

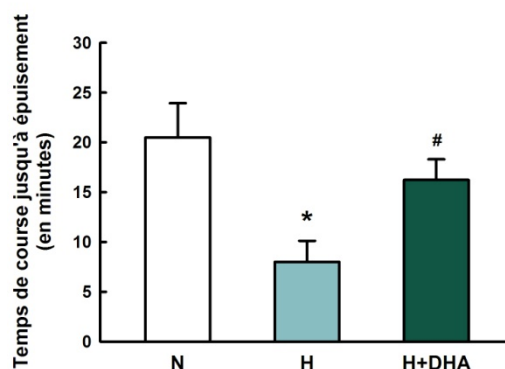


Figure 62:

Temps de course évalué sur tapis roulant jusqu'à épuisement, à une vitesse de 20 m/min et avec une pente positive de 10%. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 7$. # différent de H $p < 0,05$.

2.2.7 Fonction mitochondriale

La fonction mitochondriale a été évaluée par des mesures d'activités enzymatiques mitochondriales, de respiration mitochondriale sur mitochondries isolées et sur fibres perméabilisées, de production de ROS mitochondriaux et de la CRC de mitochondries isolées.

2.2.7.1 Activités d'enzymes mitochondriales

- Citrate synthase

La citrate synthase est un indicateur de référence de la densité mitochondriale. Dans le soléaire, un muscle oxydatif, la citrate synthase n'est pas significativement affectée par l'hypoxie ou l'hypoxie combinée à la supplémentation en DHA (figure 63A).

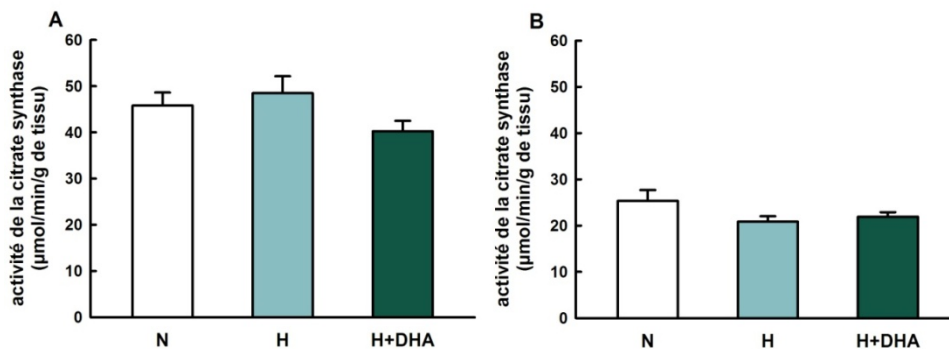


Figure 63:

Activité de la citrate synthase mesurée sur homogénat de soléaire (A) et de la portion blanche du gastrocnémien (B). Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 7$.

Dans le muscle gastrocnémien blanc, majoritairement glycolytique, aucune différence de l'activité de la CS n'est observée non plus, quel que soit le traitement expérimental appliqué (figure 63 B). Ceci suggère que la densité mitochondriale n'est pas modifiée dans ces deux muscles par nos conditions expérimentales.

- Complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Nous avons mesuré l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 64).

L'activité du complexe I apparait diminuée dans le groupe H + DHA par rapport aux deux autres groupes ($p=0,05$) (figure 64A). La supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie semble donc diminuer l'activité de ce complexe.

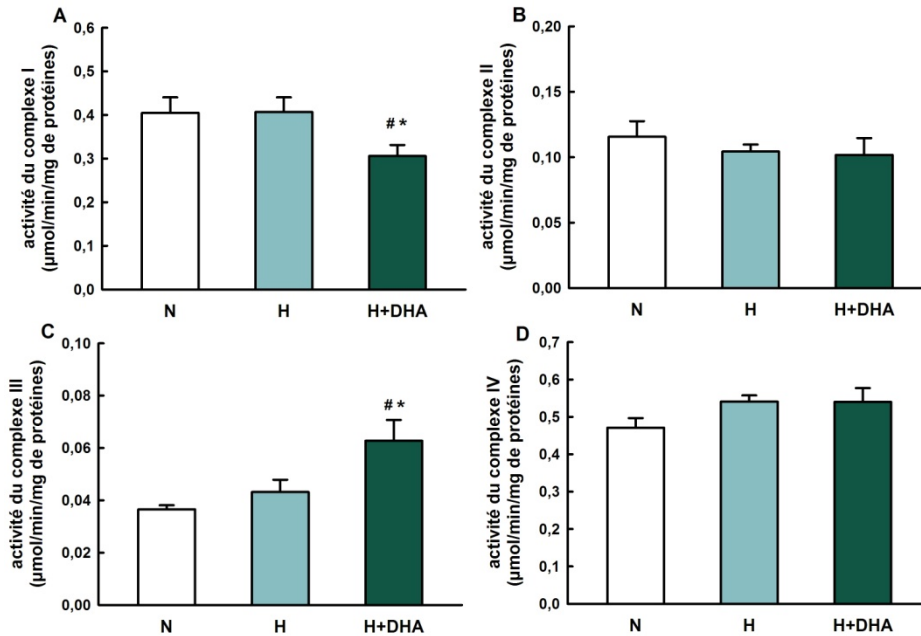


Figure 64:

Activités des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines : (A) complexe I, (B) complexe II, (C) complexe III et (D) complexe IV. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 7$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

L'activité du complexe III est significativement plus élevée dans la condition H+DHA par rapport aux deux autres conditions, N et H (figure 64C). La supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie provoque donc une diminution de l'activité du complexe I en parallèle d'une augmentation de celle du complexe III.

L'activité des complexes II et IV ne subit aucune modification suite aux différents traitements expérimentaux (figure 64B et 64D).

2.2.7.2 *Respiration sur mitochondries isolées*

La fonction mitochondriale a été explorée en mesurant la consommation d'oxygène de mitochondries isolées issues de portions rouges du quadriceps (tableau 22). Excepté dans la condition de substrat GMS, nous n'observons aucun effet des différentes conditions expérimentales sur les paramètres de respiration et ce quel que soit le substrat utilisé (acide gras, glutamate/malate ou succinate). Lorsque la chaîne respiratoire est alimentée par la combinaison de substrat GMS permettant d'apporter des électrons *via* les complexes I et II, la vitesse de consommation de l'oxygène par la mitochondrie est diminuée en état phosphorylant dans les conditions hypoxie seule ($529,38 \pm 54,31$) et hypoxie avec DHA ($539,63 \pm 21,23$) par

rapport à la condition normoxie ($678,63 \pm 29,23$) ($p < 0,05$). La respiration en état 2 et 4 ainsi que le RCI ne varient pas. Il semble donc que l'hypoxie limite la respiration mitochondriale dans cette condition sans que la supplémentation en DHA n'y change rien.

Tableau 22:

Consommation d'oxygène par des mitochondries isolées de quadriceps avec différents substrats (GM, GMS, S, octanoyl-carnitine et TMPD/Asc + DNP). Elle est exprimée en nmol d'O/min/mg de protéines. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de N $p < 0,05$.

		N		H		H+DHA	
GM	état 2	30,50	\pm 3,44	26,00	\pm 2,66	28,88	\pm 4,02
	état 3	477,88	\pm 44,96	361,63	\pm 31,01	396,00	\pm 20,92
	état 4	27,63	\pm 4,41	26,25	\pm 3,98	23,13	\pm 3,04
	RCI	20,66	\pm 4,00	16,18	\pm 2,62	19,00	\pm 2,42
GMS	état 2	95,88	\pm 5,69	88,25	\pm 5,52	86,26	\pm 5,84
	état 3	678,63	\pm 29,23	529,38	\pm 54,31 *	539,63	\pm 21,23 *
	état 4	73,25	\pm 6,42	76,50	\pm 9,07	83,63	\pm 9,31
	RCI	9,69	\pm 0,83	7,56	\pm 0,98	6,98	\pm 0,72
S	état 2	89,38	\pm 9,06	80,63	\pm 5,37	86,25	\pm 6,24
	état 3	465,25	\pm 18,40	368,38	\pm 36,87	444,63	\pm 31,96
	état 4	89,75	\pm 13,10	80,25	\pm 7,48	85,00	\pm 6,80
	RCI	5,91	\pm 0,78	4,69	\pm 0,42	5,37	\pm 0,36
Octanoyl-carnitine	état 2	30,88	\pm 3,22	27,88	\pm 2,61	29,25	\pm 1,87
	état 3	198,63	\pm 15,71	178,25	\pm 22,15	167,88	\pm 10,83
	état 4	29,13	\pm 2,69	24,13	\pm 2,17	27,63	\pm 2,67
	RCI	7,10	\pm 0,73	7,44	\pm 0,57	6,34	\pm 0,51
TMPD/ASC/DNP		1216,75	\pm 61,46	1238,00	\pm 96,29	1200,63	\pm 105,23

La respiration mitochondriale lorsqu'elle est stimulée directement au niveau du complexe IV (condition TMPD/Asc/DNP) n'est pas modifiée par l'un ou l'autre des traitements. Ce résultat concorde avec l'activité enzymatique du complexe IV mesurée sur homogénat de soléaire qui restait inchangée (figure 64D)

La respiration mesurée sur mitochondries isolées demeure dans l'ensemble peu affectée par les traitements.

2.2.7.3 Respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées

- Vitesse maximale de consommation d'O₂

La mesure de la respiration sur fibres perméabilisées permet de rendre compte du fonctionnement de la chaîne respiratoire dans son environnement maintenu relativement intact. Nous l'avons évalué sur trois muscles différents, un muscle oxydatif, un muscle glycolytique et un muscle au métabolisme intermédiaire, respectivement le soléaire, le gastrocnémien blanc et le plantaire.

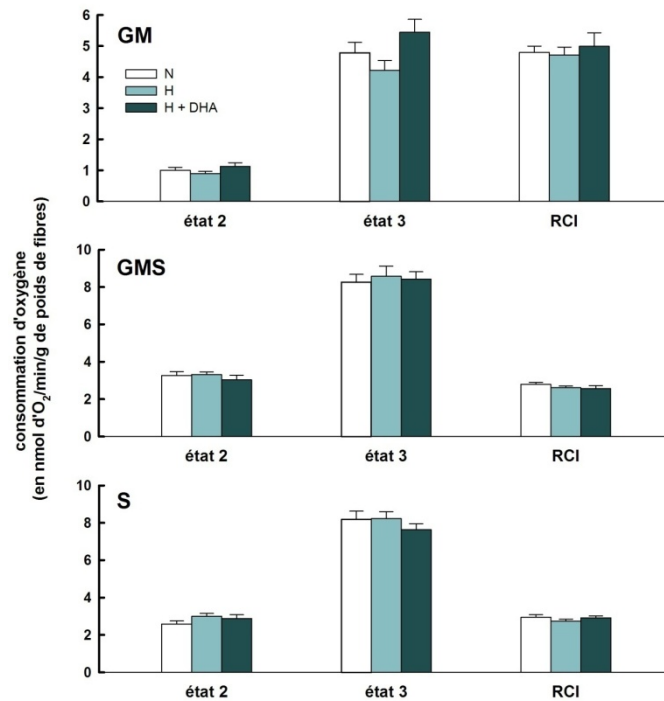


Figure 65:

Consommation d'oxygène mesurée sur fibres perméabilisées de muscle soléaire en états 2 et 3 dans différentes conditions de substrat : glutamate/malate (GM), glutamate/malate/succinate (GMS) et succinate (S). L'indice de contrôle respiratoire (RCI) était calculé par division de la consommation d'oxygène en état 3 par celle de l'état 2. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

La respiration mitochondriale mesurée sur le muscle soléaire n'est pas affectée en états 2 et 3 dans les différentes conditions de substrat. Cependant il existe une tendance à sa variation en état 3 lorsque le substrat est le GM ($p=0,062$). Elle serait augmentée dans le groupe H + DHA par rapport au groupe H. L'index de contrôle respiratoire reste inchangé (figure 65).

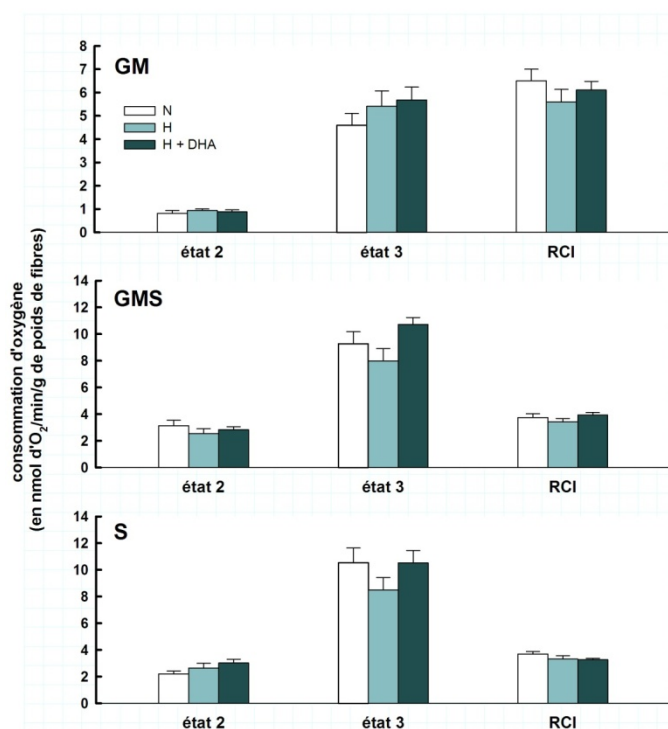


Figure 66:

Consommation d'oxygène mesurée sur fibres perméabilisées de muscle plantaire en états 2 et 3 dans différentes conditions de substrat : glutamate/malate (GM), glutamate/malate/succinate (GMS) et succinate (S). L'indice de contrôle respiratoire (RCI) était calculé par division de la consommation d'oxygène en état 3 par celle de l'état 2. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$.

Le muscle plantaire ne présente aucune modification de la respiration mitochondriale suite aux traitements expérimentaux et ceci, quel que soit le substrat (figure 66). Il en va de même pour le muscle gastrocnémien blanc, excepté lorsque la chaîne de transport des électrons est alimentée par le complexe II avec comme substrat le succinate (figure 67). Nous observons alors une baisse de la respiration en état phosphorylant dans le groupe H par rapport au groupe N ($5,2 \text{ nmol d'O}_2/\text{min/poids sec de fibres} \pm 0,33$ contre $7,1 \pm 0,52$ respectivement; $p < 0,05$). Le RCI dans cette condition de substrat est lui aussi affecté, il est augmenté dans le groupe H + DHA par rapport au groupe H ($4,3 \pm 0,29$ contre $3,2 \pm 0,1$; $p < 0,05$) et se rapproche de celui du groupe N dont il n'est pas significativement différent.

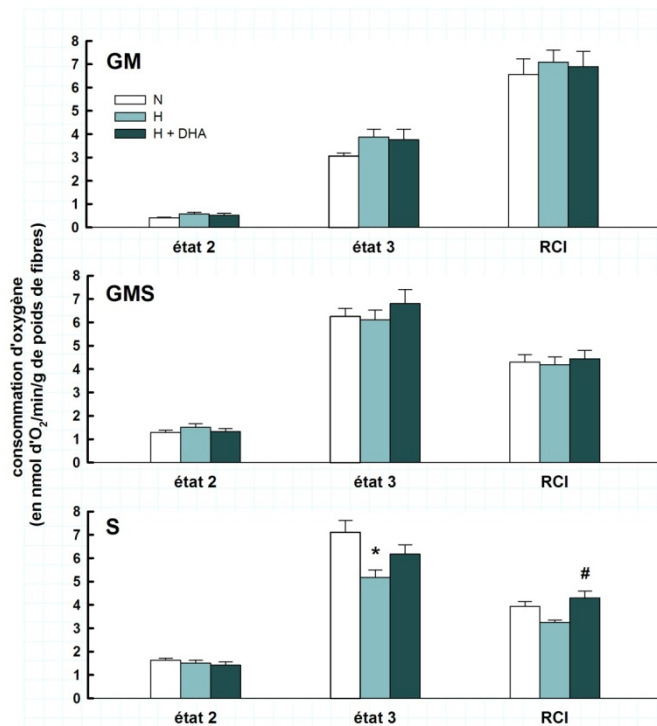


Figure 67:

Consommation d'oxygène mesurée sur fibres perméabilisées de muscle gastrocnémien en états 2 et 3 dans différentes conditions de substrat : glutamate/malate (GM), glutamate/malate/succinate (GMS) et succinate (S). L'indice de contrôle respiratoire (RCI) était calculé par division de la consommation d'oxygène en état 3 par celle de l'état 2. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

- Détermination de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP

L'affinité de la mitochondrie pour différents substrats est reflétée par l'inverse du k_m apparent de la mitochondrie pour le substrat. Il peut être calculé à partir des données obtenues lors de cinétiques d'ajouts croissants du substrat voulu. Nous avons évalué l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP sur les fibres perméabilisées des muscles soléaire et gastrocnémien en présence de la combinaison de substrats GMS. Ce choix de substrat, original par rapport à ce qui est habituellement réalisé dans la littérature, permet d'alimenter la chaîne respiratoire dans son ensemble, ce qui peut être supposé comme plus physiologique.

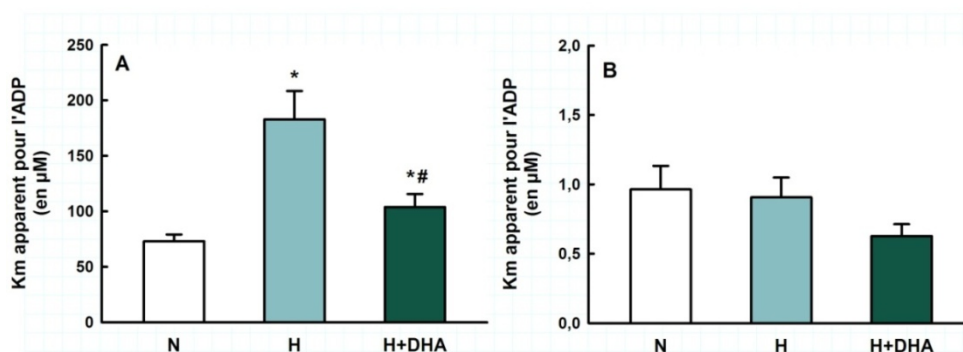


Figure 68:

Evaluation de l'affinité de fibres perméabilisées de soléaire (A) et de gastrocnémien blanc (B) pour l'ADP par détermination du km apparent à l'ADP en présence de la combinaison de substrats glutamate/malate/succinate. Les valeurs présentées sont des moyennes ± SEM. n ≥ 8. * différent de N p<0,05.

Le km_{app} des mitochondries de soléaire est significativement augmenté dans les conditions hypoxie et hypoxie combinée à la prise de DHA comparées à la condition normoxie ($182,83 \mu M \pm 25,55$ et $103,83 \mu M \pm 11,84$ respectivement contre $73,07 \mu M \pm 6,05$; p<0,05) (figure 68A). Il est également supérieur dans le groupe H par rapport au groupe H + DHA (p<0,05). Il n'est en revanche pas modifié dans le muscle gastrocnémien (figure 68B).

2.2.7.4 Production mitochondriale d' H_2O_2

Tableau 23:

Production d' H_2O_2 par des mitochondries isolées de quadriceps exprimée en pmol d' H_2O_2 /min/mg de protéines. Les valeurs présentées sont des moyennes ± SEM. n ≥ 8.

	N	H	H+DHA
GM			
substrat	64,54 ± 5,75	72,65 ± 6,88	64,01 ± 3,96
roténone	128,48 ± 13,36	186,53 ± 18,84 *	152,69 ± 10,76
AA	270,67 ± 26,74	278,27 ± 27,66	278,13 ± 16,72
GMS			
substrat	1965,92 ± 276,28	2009,64 ± 222,06	1718,86 ± 253,16
roténone	313,20 ± 31,02	318,59 ± 59,29	291,59 ± 30,64
AA	394,06 ± 35,37	473,17 ± 88,41	449,59 ± 47,10
S			
substrat	2075,50 ± 313,90	1907,91 ± 392,64	2014,69 ± 266,38
roténone	136,12 ± 8,74	177,76 ± 19,92 *	134,13 ± 12,79
AA	293,34 ± 37,94	389,33 ± 51,41	328,51 ± 38,72
Octanoyl			
substrat	113,46 ± 12,95	114,56 ± 15,60	117,41 ± 13,50

carnitine	roténone	158,19 ± 15,19	176,18 ± 17,40	162,00 ± 12,81
	AA	508,65 ± 75,15	468,80 ± 89,56	467,10 ± 62,65

La production de ROS a été évaluée sur mitochondries isolées de quadriceps à travers la mesure de la génération d'H₂O₂ par les mitochondries.

Elle apparaît significativement augmentée en situation d'hypoxie par rapport au groupe N dans les conditions de substrat S et GM en présence de roténone (tableau 23). Cette augmentation de génération d'H₂O₂ n'est pas retrouvée dans le groupe H + DHA indiquant que la supplémentation en DHA a pu contrecarrer les effets de l'hypoxie. Le fait que cette production accrue de ROS en hypoxie n'ait lieu qu'en présence de roténone conduit à penser que le complexe I est spécifiquement touché par l'hypoxie. Cet effet n'est pas retrouvé pour la condition de substrats combinés GMS.

2.2.7.5 Capacité de rétention calcique mitochondriale

La CRC des mitochondries isolées de quadriceps, qui rend compte de la sensibilité à l'ouverture du PTP mitochondrial, n'est pas modifiée par les différents traitements appliqués aux animaux (tableau 24).

Tableau 24:

Capacité de rétention calcique des mitochondries isolées issues du quadriceps, exprimée en nmol de Ca²⁺/mg de protéines. Les valeurs présentées sont des moyennes ± SEM. n ≥ 8.

	N	H	H+DHA
GM	893,10 ± 143,44	709,45 ± 62,37	696,46 ± 55,62
GM + CSA	1227,99 ± 134,62	1056,05 ± 139,10	1054,66 ± 76,50
S	1088,06 ± 106,46	1008,62 ± 95,06	977,99 ± 59,39
S + CSA	1324,63 ± 100,76	1284,08 ± 91,34	1304,26 ± 46,20

2.2.8 Expression protéique

2.2.8.1 Complexes de la chaîne respiratoire

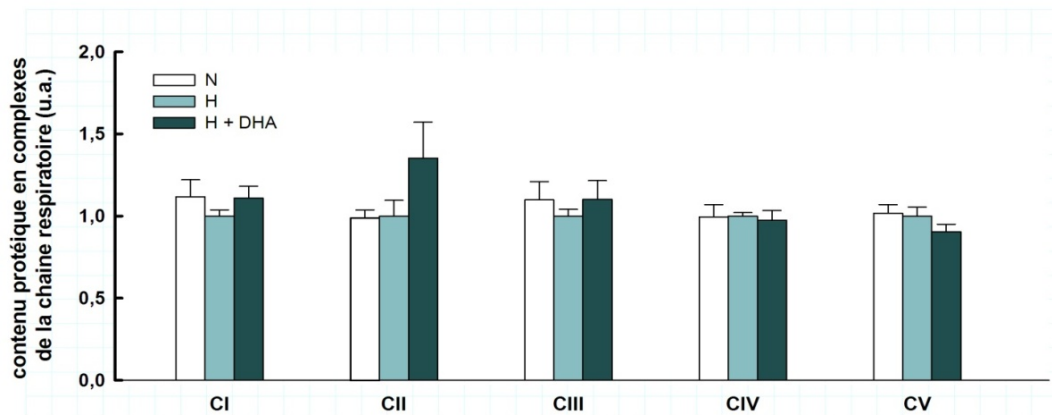


Figure 69:

Contenu protéique relatif, mesuré par western blot sur homogénat de muscle soléaire, en complexes de la chaîne respiratoire : complexe I (CI), complexe II (CII), complexe III (CIII), complexe IV (CIV) et ATP-synthase (CV). Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. n = 6.

Les différents traitements expérimentaux n'induisent pas de modification de l'expression protéique des complexes de la chaîne respiratoire (figure 69).

2.2.8.2 REDD1

Afin de nous assurer de la présence d'un stress hypoxique au niveau musculaire dans la condition normoxie, nous avons également mesuré sur homogénats de soléaire le contenu protéique en REDD1, une protéine activée par l'hypoxie (figure 70). Les expressions protéiques ont été normalisées par rapport à la bande des protéines d'environ 25 kDa totales colorée au rouge ponceau. Il ressort que le contenu de cette protéine est effectivement augmenté dans les muscles soléaires d'animaux d'âge moyen exposés à l'hypoxie seule par rapport à la condition normoxie ($1,32 \pm 0,63$ contre $1,00 \pm 0,58$ respectivement, $p < 0,05$). En revanche, cette hausse n'est pas retrouvée pour le groupe H + DHA dont le contenu en REDD1 ($0,98 \pm 0,44$) dans le soléaire est identique au groupe N et significativement plus faible que dans le groupe H ($p < 0,05$).

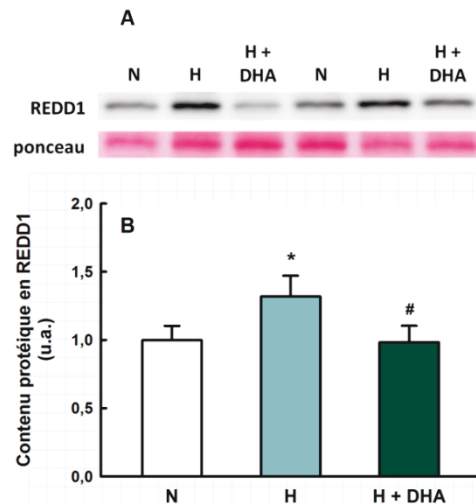


Figure 70:

Contenu en protéine REDD1 mesuré par western blot sur homogénat de muscle soléaire (A) et quantifié après normalisation par rapport aux protéines totales d'environ 25 kDa colorées au rouge ponceau (B). Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 5$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

2.2.8.3 Voies de signalisation Akt/mTOR et AMPK/ACC

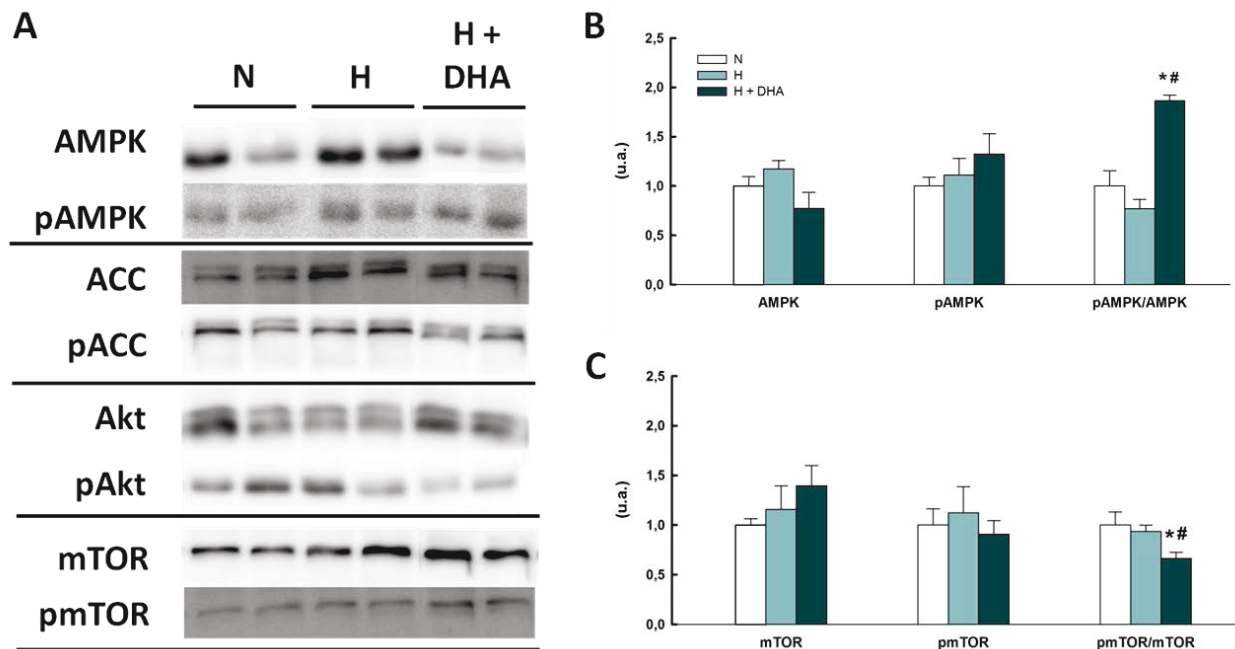


Figure 71:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à la supplémentation en DHA sur le contenu protéique et la phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation énergétique et la synthèse protéique. Western blots des protéines AMPK α , AMPK α^{Thr172} (pAMPK), ACC, pACC $^{\text{Ser79}}$ (pACC), Akt, pAkt $^{\text{Ser473}}$ (pAkt), mTOR et pmTOR $^{\text{Ser2448}}$ (A). Quantification du contenu en AMPK total, pAMPK α^{Thr172} et calcul du ratio de la forme phosphorylée sur la protéine totale (B). Quantification du contenu en mTOR total, pmTOR $^{\text{Ser2448}}$ et calcul du ratio de

la forme phosphorylée sur la protéine totale (C). Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 6$. * différent de N $p < 0,05$. # différent de H $p < 0,05$.

Les contenus en la forme totale d'AMPK et en sa forme phosphorylée sur le résidu thréonine 172 ne varient pas significativement avec les traitements expérimentaux. Cependant, le rapport pAMPK/AMPK est presque doublé dans le groupe H + DHA, certainement du fait d'une diminution du contenu en la forme totale concomitante à une augmentation de la forme phosphorylée par rapport aux deux autres groupes mais qui ne passeraient pas le seuil de significativité (figure 71A et 71B). ACC est une protéine régulatrice de la lipolyse, sa phosphorylation par l'AMPK induit une augmentation de la lipolyse. Le contenu protéique en ACC et en sa forme phosphorylée ne varie pas entre les conditions expérimentales (figure 71A).

Nous observons une tendance à la diminution de sa forme totale d'Akt chez les rats du groupe H ($p=0,067$), mais ni la forme phosphorylée, ni le ratio pAkt/Akt ne sont affectés par l'hypoxie avec ou sans la supplémentation en DHA (figure 71A).

Le rapport pmTOR/mTOR est significativement diminué dans le groupe H + DHA par rapport aux deux autres groupes (figure 71A et 71C). Cette baisse du rapport proviendrait essentiellement d'une élévation du contenu protéique de la forme totale plutôt que d'une diminution de la phosphorylation.

2.2.9 Expression génique

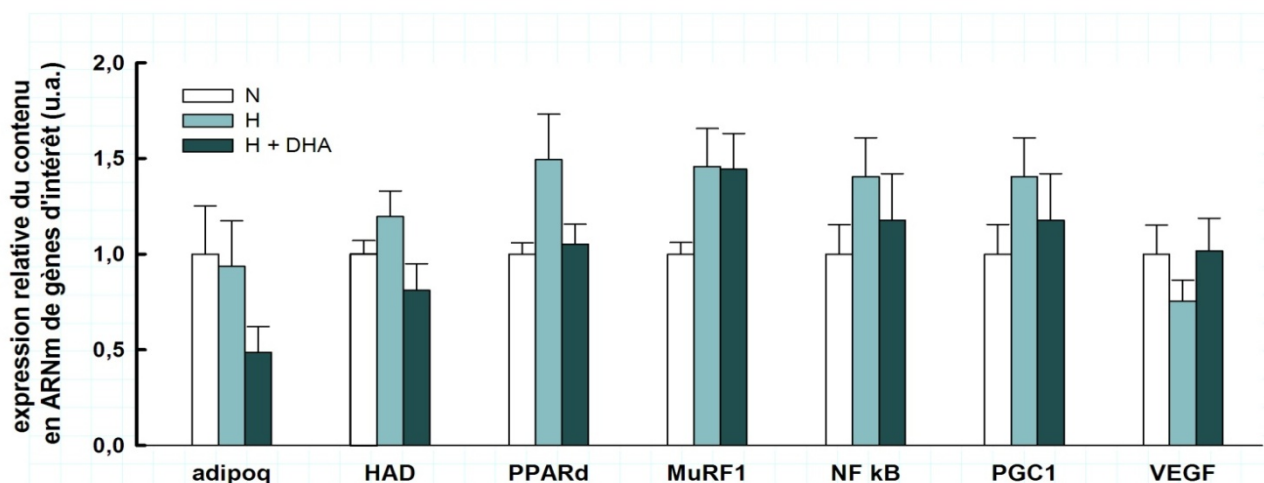


Figure 72:

Expression relative du contenu en ARNm de l'adiponectine (adiopoq), de l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD), de PPAR- δ (PPARd), de MuRF1, de NF- κ B, de PGC1- α et de

VEGF. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM rapportées à la moyenne du groupe N. $n \geq 7$.

Aucune expression relative des gènes étudiés n'est affectée par les différents traitements expérimentaux (figure 72).

2.3 Discussion

L'objectif de cette étude était de caractériser les effets d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI n-3 DHA sur le muscle squelettique et la tolérance à l'exercice en situation de faible disponibilité en oxygène. Le principal résultat de cette étude est le doublement du temps d'endurance des animaux en hypoxie et supplémentés en DHA par rapport aux animaux en hypoxie seule.

Validation du modèle

Avant toute analyse, nous avons souhaité nous assurer de la validité de certains points de notre protocole et de notre modèle.

Effet du DHA sur la prise alimentaire

La première interrogation portait sur la supplémentation en DHA et le fait qu'elle puisse interférer avec le comportement alimentaire normal des animaux. La prise alimentaire, évaluée tout au long du conditionnement, demeure identique entre tous les groupes jusqu'à la mise en hypoxie. A ce moment, elle est réduite dans les groupes H et H + DHA, sans majoration ou minoration de cet effet par le DHA. La supplémentation en DHA n'interfère donc pas avec la prise alimentaire des animaux.

Efficacité du protocole d'hypoxie

Un autre point de validation avait trait à l'exposition à l'hypoxie ($FiO_2=12\%$) et à son efficacité à induire sur notre modèle de rats âgés de 10 à 12 mois des conséquences connues de l'hypoxie. Nous avons donc comparé les groupes N et H afin d'étudier les effets de l'hypoxie sur différents marqueurs de l'hypoxie comme l'effet anorexigène, l'hypertrophie ventriculaire droite, l'augmentation de la pression intraventriculaire, l'expression de la protéine REDD1 activée par l'hypoxie et la transcription de VEGF.

Comme indiqué précédemment, notre protocole induit une anorexie dans les groupes H et H + DHA qui est une caractéristique bien documentée de l'hypoxie (Westerterp-Plantenga et al. 1999; Daneshrad et al. 2001; Wasse et al. 2012). Dans notre étude, elle

s'accompagne d'une perte de poids qui semble concerner les tissus de l'organisme de manière indifférenciée puisque la composition corporelle, approchée par la mesure des poids relatifs de différents organes et tissus adipeux rapportés au poids corporel, ne semble pas varier entre la condition normoxie et la condition hypoxie seule. Il y aurait donc bien une fonte musculaire associée à la perte de poids des animaux exposés à l'hypoxie. Cette perte de poids liée à l'hypoxie est rapportée dans de nombreuses études et survient quelque soit l'âge de l'animal. Benderro et al, montrent en effet que la perte de poids induite par l'hypoxie est proportionnellement identique chez des souris de 4 et 24 mois (Benderro et Lamanna 2011). Cependant, ils constatent que la perte de poids cesse plus rapidement chez les souris jeunes, dès la fin de la première semaine d'hypoxie, alors que les souris âgées continuent à perdre du poids pendant encore une semaine supplémentaire. De plus, alors que les souris jeunes regagnent du poids dans les semaines suivantes, ce n'est pas le cas des souris âgées qui ne font que stabiliser leur poids sans le réaugmenter (Benderro et Lamanna 2011). Des travaux menés au laboratoire ont montré le même profil de perte puis regain de poids chez des rats jeunes exposés à l'hypoxie. Chez nos animaux d'âge moyen, la perte de poids n'est pas complètement stabilisée à l'issue des trois semaines de conditionnement hypoxique. Le vieillissement limite donc bien la reprise de poids pourtant observée chez les animaux jeunes.

Dans toute étude portant sur l'hypoxie se pose la question des effets de la restriction calorique qu'elle induit et qui a des conséquences sur la masse corporelle et le tissu musculaire (Daneshrad et al. 2000; Daneshrad et al. 2001). Afin de discriminer les effets de la restriction calorique, les protocoles expérimentaux incluent fréquemment un groupe « pair-fed », c'est-à-dire un groupe d'animaux dont la prise alimentaire est appariée à celles d'animaux exposés en hypoxie (Daneshrad et al. 2000; Daneshrad et al. 2001). Mais ce type d'approche comporte une limite majeure. En effet, il convient de noter que les animaux pair-fed sont restreints nutritionnellement contrairement aux animaux exposés en hypoxie qui sont alimentés *ad libitum*. Ces animaux sont donc soumis à un stress métabolique intense, potentiellement différent de celui des animaux exposés en hypoxie. Dans notre étude, nous visons à caractériser les effets d'une supplémentation en DHA sur les conséquences de l'hypoxie, notamment sur le muscle. L'hypoxie peut en effet être considérée comme un moyen de nous approcher de la condition de baisse de disponibilité en oxygène au niveau tissulaire qui touche les patients BPCO. Or l'hypophagie fait partie intégrante des effets de l'hypoxie que nous souhaitons explorer d'une manière globale. De plus, des études rapportent qu'une part importante des patients BPCO présente un état de dénutrition et de cachexie (Wagner 2008; Ferreira et al. 2012). La baisse de prise alimentaire dans notre modèle

d'hypoxie permet donc de nous rapprocher de cet état de dénutrition présenté par une partie des patients. Nous avons donc fait le choix de ne pas utiliser de groupe pair-fed car il ne nous semblait pas nécessaire au vu de nos objectifs.

Comme marqueur de l'hypoxie, nous avons également évalué le niveau d'hypertrophie du ventricule droit des rats. Notre protocole d'hypoxie appliqué à ces animaux d'âge moyen, n'induit pas d'hypertrophie ventriculaire droite significative dans le groupe hypoxie seule, comme nous l'indique l'indice de Fulton resté inchangé. L'hypertrophie ventriculaire droite est pourtant l'une des conséquences connues de l'hypoxie, classiquement observée, et qui provient d'une augmentation des résistances périphériques à l'écoulement du sang dans l'artère pulmonaire (Pierson 2000; Penalosa et Arias-Stella 2007; de La Roque et al. 2011). Il est toutefois possible que des phénomènes d'adaptation à l'hypoxie soient contrariés ou plutôt ralentis par l'âge des animaux. Ainsi, Chouabe et al, montrent en 2004 sur des rats de 2, 6 et 18 mois que l'hypertrophie ventriculaire droite induite par l'hypoxie s'amenuise au fur et à mesure de l'avancée en âge (Chouabe et al. 2004). L'absence d'hypertrophie ventriculaire droite sur notre modèle de rats d'âge moyen pourrait ainsi s'expliquer par un effet de l'âge. Cela ne remet donc pas en cause notre modèle, et ce d'autant que la fonction cardiaque évaluée par la mesure des pressions intraventriculaires apparaît tout de même affectée par l'hypoxie au niveau du ventricule droit. La pression développée par ce dernier est en effet augmentée dans le groupe H par rapport au groupe N, tout comme la vitesse de mise en tension et de relaxation de ses fibres musculaires, ce qui est en accord avec des études chez des animaux plus jeunes (Kolar et Ostadal 1991). Notre protocole d'hypoxie suffit donc à impacter la fonction cardiaque.

Nous nous sommes également posé la question de savoir si notre protocole d'hypoxie avait un impact jusqu'au niveau tissulaire. L'un des principaux facteurs activés par l'hypoxie est le facteur HIF-1. Cependant, la mesure de son expression s'est révélée difficile ou inexploitable dans de précédents travaux du laboratoire. Pour contourner ce problème technique, nous avons donc choisi d'évaluer le niveau de transcription d'une protéine en aval de HIF-1, le facteur angiogénique VEGF (Semenza 1999). Nous n'observons pas dans notre modèle de rat d'âge moyen en hypoxie d'augmentation du niveau de transcrit de VEGF. Dans l'étude de Benderro et al, portant sur des souris de 24 mois, les auteurs montrent une absence d'expression de HIF-1 α dans le cerveau lors de l'hypoxie (Benderro et Lamanna 2011). Ceci a pour effet de limiter l'expression protéique de VEGF et aboutit à une diminution de la densité de micro-vaisseaux dans le cerveau. La diminution d'expression d'HIF-1 α avec l'âge est retrouvée au niveau musculaire chez des souris âgées de 20 mois par rapport à des souris

de 2 mois, suite à une ischémie provoquée par ligature de l'artère fémorale (Bosch-Marce et al. 2007). L'absence d'augmentation du niveau de transcrite de VEGF dans le muscle soléaire de rats d'âge moyen en hypoxie pourrait donc être due à un effet de l'âge. Cependant, et bien que le gène de ce facteur angiogénique possède un élément de réponse à l'hypoxie (HRE), l'augmentation de sa transcription n'a pu être mise en évidence dans le muscle squelettique en réponse à l'hypoxie chronique (Lundby et al. 2004). VEGF ne représente donc peut-être pas le marqueur le plus adéquat. De plus, il est à noter que malgré la baisse de disponibilité en oxygène rencontrée au niveau tissulaire chez les patients BPCO, ceux-ci ne présentent pas d'augmentation du taux de VEGF dans le quadriceps (Barreiro et al. 2008). Nous avons donc utilisé un indicateur supplémentaire en évaluant le niveau d'expression de la protéine REDD1 qui se trouve surexprimée en situation de stress énergétique et notamment d'hypoxie (Favier et al. 2010; Chaillou et al. 2012). Son expression mesurée sur homogénat de soléaire est effectivement augmentée dans le groupe H par rapport au groupe N, validant la présence d'une hypoxie au niveau tissulaire. De plus, cette protéine marqueur de l'hypoxie est également surexprimée chez le patient BPCO, ce qui contribue à valider notre modèle d'hypoxie pour l'étude de la BPCO (Favier et al. 2010). Ces résultats valident donc notre protocole d'hypoxie bien que certains effets de l'hypoxie n'aient pu être mis en évidence, certainement du fait de l'âge des animaux. Plusieurs études montrent ainsi que le vieillissement pourrait limiter et/ou retarder la mise en place de plusieurs adaptations de l'organisme à l'hypoxie comme l'hypertrophie ventriculaire droite et la transcription de VEGF (Chouabe et al. 2004; Benderro et Lamanna 2011).

Limites du modèle

Ne disposant pas de modèle animal de BPCO présentant des atteintes musculaires, nous avons choisi le modèle du rat exposé à une hypoxie environnementale afin de nous rapprocher des effets occasionnés sur le muscle par la baisse de disponibilité en oxygène induite par l'atteinte respiratoire inhérente à la BPCO. Ce modèle a pour avantage de reproduire l'hypoxie tissulaire qui peut être rencontrée chez les patients hypoxémiques. Cependant, il présente des limites, dont la principale est que, comme indiqué en introduction de ce travail, les causes de l'atteinte musculaire dans la BPCO sont multiples, l'hypoxie n'étant qu'un stimulus parmi d'autres. Notamment, il pourrait être intéressant d'ajouter une inflammation dans notre modèle, car elle ressort comme un facteur majeur de l'induction des atteintes musculaires dans la BPCO (Sin et Man 2006).

Caractérisation des effets du DHA dans notre modèle de rats d'âge moyen en hypoxie

DHA et tolérance à l'effort en hypoxie

Cette étude-ci est la première à notre connaissance à montrer un effet bénéfique du DHA sur la capacité d'endurance en situation d'hypoxie en dehors de toute réhabilitation par l'activité physique. L'augmentation du temps d'endurance chez des animaux supplémentés en DHA en condition normoxique et hors entraînement avait déjà été montrée sur l'animal dans l'étude 1. Un régime alimentaire riche en AGPI n-3 a pu être associé à un meilleur niveau de performance physique chez des sujets âgés (Abbatecola et al. 2009). De même, une étude chez la femme âgée rapporte qu'une supplémentation en huile de poisson riche en AGPI n-3 permet d'améliorer les effets d'un entraînement en force sur des paramètres de force des muscles inférieurs et de tolérance à l'effort (test du "levé de chaise") (Rodacki et al. 2012). Chez le patient BPCO, des études avaient également mis en évidence une amélioration de la capacité d'exercice par la prise d'AGPI n-3, mais toujours de manière combinée à une réhabilitation par l'activité physique (Broekhuizen et al. 2005; Sugawara et al. 2012). Notre résultat indique que la prise de DHA dans le but d'améliorer la capacité d'exercice pourrait être envisagée en dehors de tout entraînement.

L'augmentation du temps d'endurance avec la prise de supplémentation en DHA s'accompagne de modifications de la composition corporelle, du métabolisme et de la fonction mitochondriale.

Effet du DHA sur la composition corporelle en hypoxie

Nous l'avons vu avec le groupe H, l'hypoxie induit une perte de poids sans modification significative de la composition corporelle, indiquant que les animaux perdent du poids au niveau des différents tissus de l'organisme, tant adipeux que musculaire. Avec la supplémentation en DHA en situation d'hypoxie, les rats perdent significativement plus de poids qu'en hypoxie seule. Cette perte de poids n'est cependant pas reliée à une dépense énergétique plus élevée. Ceci va à l'encontre de ce qui est classiquement observé dans la littérature chez les patients cachectiques et BPCO. La consommation d'AGPI n-3 favorise habituellement la prise de masse, principalement adipeuse, chez ces patients cachectiques (Barber et al. 1999; Fearon et al. 2003; Broekhuizen et al. 2005; Taylor et al. 2010; Weed et al. 2011; Sugawara et al. 2012). Toutefois, plusieurs études chez l'animal indiquent que la prise de n-3 peut limiter la prise de poids lorsque les animaux sont soumis à un régime

obésogène (pour revue (Buckley et Howe 2009), et une étude montre même que les AGPI n-3 sont capables de réduire la masse de souris déjà obèses (Huang et al. 2004). Chez l'humain, quelques études confirment l'effet des n-3 sur la perte de masse grasse et le maintien de masse musculaire, et ceci même chez des sujets sains non-obèses (Couet et al. 1997; Kabir et al. 2007). Cependant, il convient de rester prudent puisqu'un nombre restreint d'études, des populations étudiées très variables et avec différentes modalités de supplémentation, combinées ou non avec de l'exercice et d'autres régimes, font qu'il est difficile de tirer des conclusions (Buckley et Howe 2010). Il est également possible que la quantité de masse grasse initiale des sujets joue un rôle dans l'induction ou non d'effets des n-3 sur la quantité de masse adipeuse. Les animaux ou humains sains, et *a fortiori* obèses, possèdent une marge de perte de poids plus importante que les patients/animaux cachectiques, les n-3 peuvent alors stimuler la lipolyse et donc la perte de masse adipeuse préférentiellement (Couet et al. 1997; Kabir et al. 2007). Chez des sujets cachectiques, la faible masse adipeuse réduit cette marge et un mécanisme pourrait limiter la lipolyse causée par les n-3. Dans notre modèle, les rats ne sont pas cachectiques en début de conditionnement et ont donc une certaine marge de perte de poids.

Dans le groupe H + DHA, la perte de poids plus marquée qu'en hypoxie seule s'accompagne de modifications de la composition corporelle. Celles-ci vont dans le sens d'une perte de masse adipeuse plus marquée, ce qui est en accord avec les études précédemment citées chez les sujets sains ou obèses en normoxie (Couet et al. 1997; Kabir et al. 2007). De plus, les résultats de l'étude 1 obtenus sur des rats en normoxie, confortent l'idée que la prise de DHA permet une diminution de la masse adipeuse, qui serait donc plus visibles en situation d'hypoxie comme l'indiquent les résultats de la présente étude. Il serait intéressant d'évaluer les effets de la supplémentation chez des animaux déjà placés en hypoxie, et donc ayant déjà perdu du poids, afin de voir si dans cette condition le DHA provoque une baisse supplémentaire de masse adipeuse.

Les études de l'effet des AGPI n-3 sur la composition corporelle portent le plus souvent sur l'huile de poisson. Elles ne permettent donc pas de discriminer le rôle et l'importance des différents AGPI. Un AGPI en particulier serait-il plus efficace que les autres ? Ruzickova montre chez l'humain que, combinée à un régime obésogène, la prise de DHA, plutôt que d'EPA, limite la quantité de tissu adipeux viscéral (Ruzickova et al. 2004). Dans notre étude, nous retrouvons cet effet sur le tissu adipeux viscéral, mais aussi sur le tissu adipeux rétro-péritonéal. Le DHA semble donc capable de réduire la masse adipeuse.

Effet du DHA sur des facteurs de transcription et protéines du métabolisme

L'action des AGPI n-3 sur le métabolisme lipidique pourrait s'effectuer *via* l'activation des PPARs qui sont des facteurs de transcription régulateurs du métabolisme lipidique (Keller et al. 1993; Kliewer et al. 1997; Feige et al. 2006). Il a été montré sur culture de myotubes que le DHA permettait également d'activer l'expression de PPAR- γ (Wang et al. 2013). Toutefois, l'étude du contenu en ARNm de PPAR- δ sur le muscle soléaire de ces animaux ne montre aucun effet de la supplémentation prise en situation d'hypoxie. Le DHA ne permettrait donc pas d'activer la transcription de ces facteurs sur notre modèle. Afin d'évaluer l'effet du DHA sur l'activité transcriptionnelle des PPARs, nous avons mesuré le niveau de transcrits de l'adiponectine, dont la transcription est notamment régulée par les PPARs et les AGPI n-3 (Feige et al. 2006; Flachs et al. 2006). Il apparaît que sa transcription n'est pas affectée par la supplémentation en DHA, tout comme celle d'HAD, une enzyme de la β -oxydation. De même, le contenu en ARNm de PGC1- α , un régulateur de la biogénèse mitochondriale activé par les PPARs n'est pas augmenté. L'ensemble de ces résultats, obtenus sur homogénat de muscle soléaire, semble indiquer que l'action du DHA sur le métabolisme lipidique n'implique pas le facteur de transcription PPAR- δ dans le muscle squelettique à dominante oxydative. Il conviendrait maintenant de mesurer ces éléments dans un muscle à dominante glycolytique. Notre étude et notre hypothèse sont principalement centrées sur le tissu musculaire, mais il serait également intéressant d'évaluer le niveau de transcription de ces protéines dans le tissu adipeux qui est au centre du métabolisme des lipides.

De même, évaluer le contenu en transcrits de ces gènes à différentes durées de supplémentation pourrait apporter des compléments d'information car l'augmentation du niveau d'ARNm de ces gènes pourrait n'être que transitoire. En effet, plusieurs études rapportent de faible durée d'activité de transcription suite à différents stimuli. Ainsi, l'hypoxie induit une augmentation de la transcription de l'ubiquitine-ligase MAFbx en début de conditionnement hypoxique qui n'est plus visible au bout de 12 jours d'hypoxie (Chaillou et al. 2012). De même l'augmentation du niveau de transcrit de la SOD mitochondriale suite à un exercice physique ne perdure que quelques heures (Hollander et al. 2001; Jiang et al. 2009). Nous pouvons supposer que de telles cinétiques de l'activité de transcription pourraient s'appliquer à d'autres protéines. Les AGPI étant reconnus pour leur action d'activateurs de facteurs de transcription, nous nous sommes donc essentiellement intéressés au niveau de transcrit de ces différentes protéines, avec cependant des résultats peu

concluants. Une étude du contenu protéique de ces facteurs permettrait de compléter ces résultats en apportant notamment des informations sur l'effet des n-3 sur des aspects post-transcriptionnels, et également permettrait de nous affranchir des éventuelles augmentations transitoires de transcrits que notre protocole expérimental ne permet pas de mettre en évidence.

Outre les niveaux d'ARNm de ces facteurs, nous avons également mesuré le niveau d'expression protéique d'ACC qui est une protéine régulatrice de l'oxydation lipidique. Sous sa forme non-phosphorylée, elle est inhibitrice de l'oxydation des acides gras. En revanche, lorsqu'elle est phosphorylée, son action inhibitrice est réprimée et l'oxydation des acides gras est favorisée (Saha et Ruderman 2003). Nous n'avons observé aucun changement de son contenu protéique total ou de son niveau de phosphorylation dans cette étude. La diminution de tissu adipeux ne serait donc pas liée à un changement d'activité d'ACC. Cette absence d'effet du DHA sur ACC est quelque peu surprenante car ACC est connu pour être phosphorylé par l'AMPK qui apparait quant à elle stimulée par le DHA. En effet, le rapport pAMPK/AMPK est augmenté dans le groupe H + DHA par rapport aux deux autres groupes. Ceci concorde avec les résultats obtenus dans l'étude 1 qui mettaient en évidence une augmentation de ce rapport chez les animaux en normoxie supplémentés en DHA. Des études avaient déjà montré sur différents modèles (cellules macrophages, cancéreuses) que l'apport de n-3 pouvait s'associer à une augmentation de la phosphorylation de cette protéine (Jing et al. 2011; Xue et al. 2012). Cependant, la relation entre les AGPI n-3 et l'AMPK n'est pas éclaircie. L'adiponectine est suspectée d'être un lien possible entre les n-3 et l'AMPK, des études montrant en effet que l'adiponectine stimulerait la phosphorylation de l'AMPK (Yamauchi et al. 2002) et que l'AMPK possède des récepteurs à l'adiponectine (Fasshauer et al. 2004). Mais comme indiqué plus haut, nous ne mettons pas en évidence d'effet du DHA sur le contenu en ARNm de l'adiponectine chez nos animaux, qu'ils soient en normoxie (étude 1) ou en hypoxie. L'activation de l'AMPK par le DHA se ferait donc indépendamment de l'adiponectine. Outre son effet inhibiteur d'ACC, l'AMPK est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation liées à l'atrophie/hypertrophie, au vieillissement et au métabolisme des lipides et des glucides (pour revue (Hardie 2011)). Elle est activée dans les situations de stress énergétique, comme l'exercice, où le niveau d'AMP augmente, et elle participerait à la mise en place des adaptations induites par l'entraînement, possiblement *via* l'activation de PGC1- α , un facteur de régulation de la biogénèse mitochondriale (Lee et al. 2006; Rockl et al. 2008; O'Neill 2013). Comme indiqué précédemment, nous n'observons cependant pas d'augmentation du niveau de transcrit de PGC1- α chez nos rats après 9

semaines de supplémentation en DHA dont trois semaines d'hypoxie. L'étude de l'expression de protéines en aval de l'AMPK dans ces voies de signalisation pourrait apporter des éléments d'explication concernant les résultats que nous observons dans cette étude, et notamment l'augmentation du temps d'endurance. Déjà en normoxie, la supplémentation en DHA n'induisait pas d'augmentation du contenu en ARNm de PGC1- α . En revanche, une augmentation du niveau de transcrite de PGC1- α avait été observée à 12 jours d'hypoxie dans l'étude de Chaillou et al, et qui n'est pas retrouvée dans notre étude (Chaillou et al. 2013). Mais comme mentionné précédemment, il est possible que la hausse du niveau de transcrite n'ait été que transitoire et soit donc invisible au bout de 9 semaines. De même, l'absence d'effet sur la transcription de ces facteurs pourrait être causée par l'âge des animaux qui peut retarder ou limiter ces processus comme cela a été mis en évidence pour HIF-1 (Bosch-Marce et al. 2007). Il serait intéressant de mesurer le contenu protéique de PGC1- α et d'autres cibles de l'AMPK pour compléter ces résultats et également de réaliser des prélèvements de tissus à différents temps du conditionnement pour définir la cinétique d'évolution des contenus en ARNm de ces gènes.

Nous montrons dans cette étude que la supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie induit une diminution du niveau de cholestérol plasmatique par rapport au groupe N. L'AMPK est connue pour limiter la synthèse de cholestérol (Henin et al. 1995) et pourrait jouer un rôle dans cet effet du DHA. Le taux de triglycérides plasmatiques n'est en revanche pas impacté par l'hypoxie ou la supplémentation combinée à l'hypoxie.

Nous avons obtenu de manière inattendue une augmentation du quotient respiratoire dans le groupe H + DHA par rapport aux deux autres groupes. La hausse de cet indice reflète une utilisation préférentielle des substrats glucidiques plutôt que lipidiques. A la vue des effets lipolytiques des AGPI, ce résultat apparait discordant avec l'ensemble des autres résultats concernant le métabolisme lipidique. Une explication à ceci pourrait reposer sur l'AMPK. En effet, cette protéine induit une augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT-4 et de sa translocation vers la membrane des cellules musculaires, facilitant donc l'entrée de glucose dans le muscle (Merrill et al. 1997; Kurth-Kraczek et al. 1999; Ojuka et al. 2002). De plus, des études portant sur les effets des AGPI n-3 dans des situations d'insulino-résistance indiquent qu'ils permettent la restauration de l'oxydation des glucides (Luo et al. 1996; D'Alessandro et al. 2000). Nous avons tenté de mesurer le niveau d'expression des transporteurs du glucose sur le muscle soléaire, mais nos résultats se sont révélés peu concluants d'un point de vue qualitatif et mériteraient d'être retentés afin de confirmer cette hypothèse. L'augmentation du QR observé dans le groupe H + DHA n'est pas

retrouvée dans le groupe N + DHA de l'étude 1. Elle apparaît donc spécifique à l'hypoxie, condition dans laquelle le manque d'oxygène peut conduire à une utilisation préférentielle des substrats glucidiques dont la dégradation requiert moins d'oxygène et peut même s'effectuer sans oxygène. Il serait intéressant d'évaluer le QR également au cours d'un exercice, afin de déterminer si cet effet du DHA sur l'utilisation préférentielle des lipides est maintenu.

Effet du DHA sur le tissu musculaire et les voies de signalisation de la protéosynthèse/protéolyse

La diminution du tissu adipeux observée chez nos animaux en hypoxie et supplémentés en DHA s'accompagne d'un maintien de la masse musculaire, dont la part dans le poids total est augmentée. Nos animaux perdent donc du poids mais semblent préserver leur masse musculaire. Des études chez l'homme et chez l'animal montrent un effet positif des AGPI n-3 sur la synthèse protéique dans le muscle (Gingras et al. 2007; Wei et al. 2013). Cette augmentation passerait par l'activation de mTOR mais indépendamment d'Akt (Smith et al. 2011). Dans notre étude, nous ne mettons pas en évidence de modification de l'expression protéique d'Akt ou de sa forme phosphorylée au niveau du résidu sérine⁴⁷³ dans les conditions H et H + DHA. Les formes de mTOR total et pmTOR^{ser2448} ne sont pas non plus affectées significativement mais suffisamment pour aboutir à une réduction du rapport pmTOR/mTOR dans le groupe H + DHA. Cette diminution pourrait être liée à l'action inhibitrice de l'AMPK sur la phosphorylation de mTOR *via* l'activation du facteur TSC2 (Bolster et al. 2002). Le maintien de la masse musculaire dans le groupe H + DHA ne viendrait donc pas d'une stimulation de la protéosynthèse dépendante de la voie PI3K/Akt/mTOR, ou d'une autre voie impliquant mTOR. L'absence d'effet de l'hypoxie sur l'expression et la phosphorylation de mTOR et Akt dans le muscle avait déjà été observée auparavant (Chaillou et al. 2012).

Afin d'explorer la balance protéique sur le versant de la protéolyse, nous avons également mesuré le niveau de transcrite de MuRF1, une ubiquitine-ligase spécifique du tissu musculaire. Il ne ressort aucun changement de la transcription de cette enzyme dans le muscle soléaire de nos animaux quelque soit le groupe. Une augmentation du niveau de transcrite de cette enzyme a pourtant été observée en hypoxie avec une FiO₂ de 11% sur le cœur (Razeghi et al. 2006). En revanche, sur le muscle plantaire et en accord avec nos résultats, il n'apparaît pas augmenté pour une hypoxie avec une FiO₂ de près de 10%, excepté en situation d'augmentation des contraintes mécaniques appliquées au muscle (Chaillou et al. 2012). Cette différence entre le cœur et le muscle squelettique pointe le fait que l'hypoxie semble avoir un

effet différent selon le muscle considéré. Les résultats quant à la spécificité de réponse à l'hypoxie selon le muscle considéré sont assez contradictoires (Itoh et al. 1990; Shiota et al. 2004; Faucher et al. 2005; El-Khoury et al. 2012). L'augmentation du niveau de transcrite de MuRF1 observée dans le muscle plantaire en état de surcharge fonctionnelle n'était visible qu'au 5^{ème} jour d'hypoxie et n'était déjà plus détectée au 12^{ème} jour (Chaillou et al. 2012). La transcription de ce facteur apparait donc transitoire dans le modèle de surcharge fonctionnelle en hypoxie. Il semble en être de même pour MAFbx. En effet, Chaillou et al, observent en hypoxie seule une augmentation de la transcription de MAFbx, une autre ubiquitine ligase présente dans le tissu musculaire. Mais cette hausse n'est également visible qu'au 5^{ème} jour d'hypoxie et déjà plus au 12^{ème} (Chaillou et al. 2012). Ceci confirme donc qu'il serait intéressant de réaliser sur notre modèle des prélèvements de tissus à différents temps du conditionnement pour définir la cinétique d'évolution des contenus en ARNm de ces gènes dans notre modèle, afin d'éventuellement mettre en évidence des effets précoces du DHA sur leur transcription.

Bien que nous n'ayons pas d'explication sur les mécanismes moléculaires mis en jeu pour maintenir la masse musculaire aux dépens de la masse adipeuse chez nos animaux supplémentés en DHA, cet effet de la supplémentation sur la perte de masse corporelle avec maintien de la masse musculaire pourrait contribuer en partie à l'amélioration des capacités d'exercice. Des études portant sur des patients obèses suivant un programme de perte de poids indiquent ainsi que la réduction du poids corporel participe à l'amélioration de la performance lors d'un TM6M et limite la sensation de pénibilité au cours de l'exercice (Ekman et al. 2013). Mais plus que sur la masse musculaire et la composition corporelle, la capacité d'endurance repose principalement sur des paramètres métaboliques et plus spécifiquement oxydatifs.

Effet du DHA sur la respiration et l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP dans le muscle squelettique en hypoxie

Nous avons donc exploré le métabolisme oxydatif à travers l'étude de la fonction mitochondriale sur fibres perméabilisées et sur mitochondries isolées de muscles squelettiques, ainsi qu'au travers de l'activité d'enzymes du métabolisme oxydatif.

Mesurée sur les mitochondries isolées des portions rouges du quadriceps, la respiration mitochondriale n'est que très peu affectée par l'hypoxie, combinée ou non à la supplémentation en DHA. Il n'y a que lorsque la chaîne respiratoire est alimentée par des substrats des complexes I et II à la fois que nous observons un effet de l'hypoxie. La

respiration est alors réduite en état 3 dans les deux groupes hypoxiques sans effet supplémentaire du DHA. Cette absence d'effet du DHA concorde avec les résultats obtenus dans l'étude 1 sur mitochondries isolées où aucun effet de la supplémentation sur ces paramètres chez les animaux en normoxie n'était observé. En revanche, des études rapportent que l'hypoxie induit une baisse de la respiration mitochondriale pour les substrats GM, S et lipidiques. Gamboa et al, montrent ainsi une diminution de la respiration en état 2, 3 et 4 en hypoxie dans le triceps sural pour le substrat GM, avec cependant une FiO₂ à 10% plus sévère que celle de notre protocole (12%) (Gamboa et Andrade 2012). Une autre étude rapporte que dans une préparation de mitochondries issues du gastrocnémien, du soléaire, du tibial antérieur et du quadriceps, la respiration est plus faible en hypoxie aigüe avec les substrats pyruvate/malate et S en états 3 et 4 (la respiration en état 2 n'est pas rapportée) (Magalhaes et al. 2005). Concernant la respiration avec un substrat lipidique tel que le palmitoyl-carnitine, des auteurs indiquent qu'elle est abaissée en hypoxie dans le muscle quadriceps mais seulement en état 2 et pour une durée d'hypoxie (FiO₂~ 12%) de 5 semaines (Galbes et al. 2008). Sur notre modèle, nous ne retrouvons une baisse de respiration en hypoxie que pour la condition de substrat GMS. Peut-être là encore est-ce dû à une moindre adaptation à l'hypoxie de nos rats d'âge moyen ou à la durée d'exposition plus faible que dans les autres études. Il existe toutefois une tendance à la baisse de la respiration en état 3 dans la condition de substrat GM (p=0,062), ce qui laisse penser que la réduction de respiration avec la combinaison de substrat GMS serait plutôt liée à une baisse d'activité du complexe I.

Gambao et al suggèrent que l'explication de ces baisses de respiration soit liée à une diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire ou de leur niveau d'expression. Nos mesures du contenu protéique des complexes I, II, III et IV ne révèlent aucun effet de l'hypoxie ou de la supplémentation en DHA sur leur expression. Gamboa montrait pourtant une augmentation du contenu protéique du complexe IV dans son étude, avec cependant une hypoxie plus sévère et plus longue d'une semaine que la nôtre (Gamboa et Andrade 2012). Dans notre étude, les activités maximales des complexes mesurées sur homogénat de soléaire ne sont pas non plus affectées par la condition hypoxique. L'hypothèse de Gamboa et al, ne semble donc pas valide dans notre modèle. Ceci suggère que des régulations de l'activité sous-maximale de ces complexes interviennent en hypoxie afin de diminuer la consommation d'oxygène des mitochondries en présence de GMS. Bien que n'induisant pas de modifications de la respiration mitochondriale, le DHA a en revanche un effet sur le complexe III dont il augmente l'activité par rapport aux deux autres groupes. Cet effet du DHA était déjà observé dans l'étude 1 lorsque les animaux n'étaient pas en hypoxie

et apparait donc conservé malgré l'hypoxie. L'activité du complexe I est à l'inverse inférieure chez les animaux supplémentés. Cet effet n'était pas observé dans l'étude 1 et apparait donc spécifique de la situation combinant hypoxie + DHA. Ces modifications de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire induites par le DHA ne semblent pas reposer sur des modifications de leur contenu protéique, ce qui peut s'expliquer par le fait que l'anti-corps utilisé pour les étudier ne cible qu'une sous-unité de chaque complexe. D'autres sous-unités pourraient donc être surexprimées sans être mises en évidence par notre technique. Ces modifications d'activité n'apparaissent pas se traduire par des modifications de la respiration mitochondriale. Des facteurs régulateurs de l'activité sous-maximale de ces enzymes pourraient masquer cet effet du DHA.

Nous avons également évalué la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées de muscles squelettiques, technique qui permet d'étudier la fonction de la mitochondrie dans son environnement relativement préservé. Elle a été mesurée sur trois muscles aux métabolismes différents : le soléaire (oxydatif), la portion blanche du gastrocnémien (glycolytique) et le plantaire (métabolisme intermédiaire). L'utilisation de ces différents muscles s'est faite dans le but de discriminer des différences d'effets du DHA selon le type de métabolisme du muscle.

Le muscle plantaire ne montre aucun changement de respiration mitochondriale dans nos différentes conditions de substrat, que ce soit en hypoxie ou en hypoxie combinée à la supplémentation en DHA. Le DHA et l'hypoxie ne semblent donc pas impacter la fonction mitochondriale d'un muscle au métabolisme intermédiaire.

Le gastrocnémien est quant à lui impacté par l'hypoxie. En effet, la respiration mitochondriale en état 3 est diminuée dans le groupe H par rapport au groupe N. Cet effet est toutefois substrat-dépendant car nous ne l'observons qu'en présence de S, c'est-à-dire lorsque la chaîne respiratoire est alimentée par le complexe II. L'absence d'effet de l'hypoxie en présence de GM et GMS indique que l'hypoxie n'influence pas le fonctionnement du complexe I dans ce muscle et que son effet sur le complexe II n'est pas suffisant pour modifier la respiration mitochondriale lorsque la chaîne respiratoire est stimulée dans son ensemble. Cet effet de l'hypoxie sur la respiration en état 3 en présence de S n'est pas retrouvé lorsque les animaux hypoxiques sont supplémentés en DHA. Ce nutriment permettrait donc de limiter la baisse de respiration mitochondriale induite par l'effet de l'hypoxie sur le complexe II. Ceci concorde avec les résultats de l'étude 1 qui montraient une activation de la respiration en présence de S chez les animaux supplémentés en DHA en condition de normoxie. Le maintien de la respiration en état 3 avec S dans le groupe H +

DHA sans augmentation concomitante de la respiration en état 2 reflète donc un meilleur fonctionnement de la chaîne de transport des électrons. Alors que la respiration était augmentée en présence de GM dans le groupe N + DHA par rapport au groupe N de l'étude 1, nous ne retrouvons pas un tel effet lorsque les animaux sont en hypoxie, indiquant que l'action possible du DHA sur le complexe I est annulée en hypoxie.

Le modèle de fibres perméabilisées permet également de déterminer les valeurs de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP renseignant sur l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP. Plus le $K_{m_{app}}$ est élevé, plus l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP exogène est faible.

Dans cette étude, nous avons évalué l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP dans le soléaire et dans le gastrocnémien blanc. Les mesures étaient réalisées en présence de la combinaison de substrats GMS, qui, comme évoqué dans la discussion de l'étude 1 est une approche originale par rapport à la littérature. Ce choix de substrat était motivé par le fait qu'il apparaît plus physiologique puisqu'il permet d'alimenter la chaîne respiratoire dans son ensemble. Cependant, et du fait de ce substrat différent, le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP dans nos travaux est inférieur à ce qui est couramment observé avec le substrat GM (Saks et al. 1998).

Il apparaît dans le muscle gastrocnémien que ni l'hypoxie, ni le DHA n'induisent de modifications de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP. Toutefois, comme pour l'étude 1, le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP est très faible pour ce muscle et il est possible que des changements de K_m soient sous le seuil de sensibilité de notre technique.

Les techniques d'étude de la mitochondrie sur fibres perméabilisées ont également été appliquées au muscle soléaire qui présente un métabolisme oxydatif. Nous n'observons qu'une tendance à ce que le DHA stimule en hypoxie la respiration en état 3 en présence de GM par rapport à la condition hypoxie seule. Ceci coïnciderait avec les résultats de l'étude 1 qui indiquait que le DHA induit une hausse de la respiration en état 3 en présence de GM, suggérant un effet du DHA sur le complexe I de la chaîne de transport des électrons, cependant atténué par l'hypoxie. Les autres effets du DHA observés en normoxie dans l'étude 1 (hausse de la respiration en état 2 en présence de GM ou S) semblent empêchés par l'hypoxie. Dans le soléaire, l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP apparaît influencée par nos traitements expérimentaux. Ainsi, lorsque l'ensemble de la chaîne respiratoire est activée, le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP est 2,5 fois supérieur chez les animaux du groupe H par rapport à ceux du groupe N. Le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP dans le groupe H + DHA est lui aussi significativement supérieur à celui du groupe N, mais dans une moindre mesure puisqu'il reste significativement inférieur à celui du groupe H. De manière inattendue, l'hypoxie induit donc une baisse d'affinité de la mitochondrie pour l'ADP exogène, alors qu'elle avait été montré

comme diminuée dans le cœur et inchangée dans le soléaire et le diaphragme (Daneshrad et al. 2001). Toutefois, cette différence entre nos résultats et ceux de la littérature pourrait s'expliquer par la combinaison de substrats que nous avons utilisée qui est différente de celle employée habituellement. A notre connaissance, aucune étude n'a caractérisé l'effet de l'hypoxie sur le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP en présence de GMS, rendant toute comparaison difficile. L'autre fait étonnant est qu'au lieu de renforcer la hausse de $K_{m_{app}}$ à l'ADP, la supplémentation en DHA la limite. Cet effet semble aller à l'encontre de ce que nous avons observé en normoxie dans l'étude 1, où la prise de DHA provoquait une spectaculaire augmentation du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP. La diminution de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP est pourtant une adaptation du muscle habituellement retrouvée suite à un entraînement physique et considérée comme positive (Zoll et al. 2002; Zoll et al. 2003). En hypoxie, le DHA tend donc à augmenter l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP, ce qui est quelque peu inattendu. L'affinité de la mitochondrie pour l'ADP serait régulée par de protéines membranaires impliquées dans les entrées et sorties d'ADP et d'ATP de la mitochondrie comme VDAC, MtCK et l'ANT (Guzun et al. 2012). Bien que nous ne l'ayons pas mesuré dans cette étude, les résultats de l'étude 1 indiquent que la supplémentation en DHA permet une incorporation des AGPI n-3 et donc une augmentation du rapport n-3/n-6 dans les membranes des érythrocytes et des cellules du muscle plantaire. Nous faisons l'hypothèse qu'il en a été de même dans cette étude car les animaux sont du même âge et soumis à un protocole d'administration similaire en termes de dose, fréquence et durée. Il est possible que ce changement de composition lipidique, qui modifie par exemple la taille des radeaux lipidiques (Sorice et al. 2012), affecte l'activité des protéines membranaires et modifie donc la régulation de ces facteurs régulateurs de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP.

Il ressort de l'étude des vitesses maximales de respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées que le muscle glycolytique est plus sensible au stimulus hypoxique. La supplémentation en DHA permet cependant de limiter l'effet inhibiteur de l'hypoxie sur la respiration mitochondriale dans ce muscle. En revanche, la stimulation de la respiration mitochondriale par le DHA observée en normoxie apparaît amoindrie par l'hypoxie dans le soléaire et masquée dans le gastrocnémien blanc. Le DHA pris en situation d'hypoxie n'aurait donc que peu d'effet sur les mitochondries de muscle oxydatifs peu impactées par l'hypoxie. En revanche, il aurait pour effet de limiter les altérations de la respiration mitochondriale induites par l'hypoxie dans le muscle glycolytique. Il a été montré chez les patients BPCO que l'atteinte musculaire dont ils souffrent provoque préférentiellement une perte des fibres de type I avec un maintien des fibres de type II (Satta et al. 1997; Whittom et al. 1998; Gosker

et al. 2002; Richardson et al. 2004; Gosker et al. 2007). Le muscle du patient BPCO riche en fibres de type II glycolytiques pourrait donc particulièrement bénéficier des effets du DHA apparemment plus efficaces sur les fibres glycolytiques.

Comme pour l'étude 1, les effets du DHA obtenus sur fibres perméabilisées sont différents de ceux observés sur mitochondries isolées. Cependant, dans cette deuxième étude, l'effet de l'hypoxie est variable d'un muscle à l'autre, impliquant que des comparaisons inter-muscles ne seraient pas pertinentes. Ceci empêche donc la confrontation de nos deux approches (fibres perméabilisées et mitochondries isolées) réalisées sur des muscles distincts. Cependant, sur fibres perméabilisées de quadriceps de jeunes hommes sains, Jacobs et al, obtiennent des résultats similaires à ceux que nous obtenons sur mitochondries isolées de quadriceps, avec cependant un protocole quelque peu différent du nôtre (Jacobs et al. 2013). Ils évaluent eux aussi la respiration mitochondriale lorsque la chaîne respiratoire dans son ensemble est activée par l'utilisation des substrats GMS combinés additionnés d'octanoyl-carnitine, ce qui, outre la différence inter-espèces, s'éloigne de notre protocole. Ils observent dans ces conditions une tendance à une respiration mitochondriale plus faible en état 3 chez des sujets maintenus en hypoxie pendant 9 à 11 jours par rapport à des mesures effectuées sur ces mêmes sujets sur une biopsie réalisées avant la montée en altitude. Ceci indiquerait que l'effet de l'hypoxie observé en GMS sur mitochondries isolées chez nos animaux est retrouvé sur fibres perméabilisées. L'hypoxie impacterait donc directement le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale sans que des facteurs potentiellement régulateurs du fonctionnement mitochondrial présents dans l'environnement de l'organe, comme les tubulines, l'ANT et VDAC, n'interviennent (Guzun et al. 2012).

La mesure de l'activité de la citrate synthase, indice de la densité mitochondriale, suggère que les modifications de respiration mitochondriale sur fibres isolées observées dans cette étude ne sont pas dues à des changements de la densité mitochondriale. Elles sont en effet identiques entre les groupes dans le gastrocnémien blanc et le soléaire. Les données de la littérature indiquent que l'activité de la citrate synthase n'est habituellement pas augmentée par l'hypoxie dans les muscles squelettiques comme le tibial antérieur et le soléaire (Daneshrad et al. 2000; Galbes et al. 2008; Esteva et al. 2009). L'absence de modification de l'activité de la citrate synthase est concordante avec un contenu en transcrits de PGC1- α inchangé dans le soléaire. La supplémentation en DHA ne semble donc pas influencer les processus de biogénèse mitochondriale sur notre modèle.

Effet du DHA sur la CRC et la production d'H₂O₂ des mitochondries de muscle squelettique en hypoxie

Un autre moyen d'étude de la mitochondrie est l'évaluation de sa capacité de rétention calcique. Elle n'apparaît affectée ni par l'hypoxie ni par le DHA pris en situation d'hypoxie dans notre étude, alors que dans l'étude 1, nous avons mis en évidence une diminution de la capacité de rétention calcique liée à la prise de DHA. Cet effet du DHA observé en condition normoxique et dont les conséquences physiologiques ne sont pas connues, serait donc empêché par l'hypoxie.

Sur notre modèle, nous avons également mesuré la production de ROS des mitochondries isolées de quadriceps. Lorsque nous l'évaluons en présence de roténone, un inhibiteur du complexe I, avec le substrat GM ou de S, nous notons une augmentation de production chez les rats en hypoxie seule par rapport aux rats en normoxie. Cette augmentation n'est pas retrouvée dans le groupe combinant hypoxie et supplémentation en DHA. Cette augmentation de production de ROS en présence de roténone suggère que le complexe I est impacté par l'hypoxie mais que le DHA permet de limiter cet effet puisqu'il n'est pas retrouvé dans le groupe H + DHA. Cependant, dans la condition de mesure la plus physiologique, c'est-à-dire en présence des substrats GMS activant l'ensemble de la chaîne respiratoire et sans inhibiteurs des complexes, nous n'observons pas d'augmentation de la production d'H₂O₂ mesurée sur mitochondries isolées de quadriceps. Ceci suggère que malgré l'effet probable de l'hypoxie sur le complexe I, la production mitochondriale de ROS en condition physiologique n'est pas influencée par l'hypoxie combinée ou non au DHA en condition physiologique. Le niveau de transcrit de NF-κB, un facteur de transcription dont l'expression est stimulée par les ROS, reste également inchangé dans le soléaire des animaux des différents groupes expérimentaux. La production de ROS au niveau de ce muscle ne semble donc pas augmentée par l'hypoxie ou impactée par le DHA.

Effet du DHA sur le statut antioxydant en hypoxie

Nous nous sommes également intéressés au statut antioxydant des animaux. Pour cela, nous avons mesuré différents marqueurs plasmatiques du stress oxydant. Ni le niveau de peroxydations lipidiques évalué par les TBARS, ni celui d'oxydation de protéines mesuré par la présence de groupements thiols, n'est modifié par l'hypoxie ou la supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie. Ceci semble indiquer dans notre modèle une absence d'effet de l'hypoxie et du DHA sur le stress oxydant. L'étude 1 nous avait déjà appris que le DHA ne

modifiait pas le statut oxydant des animaux en normoxie. Nous observons cependant une augmentation des défenses antioxydantes non-enzymatiques, évaluée par la mesure de FRAP, chez nos animaux du groupe H + DHA par rapport aux deux autres groupes. Le DHA permettrait donc malgré tout la mise en place de moyens de protections contre les espèces radicalaires. Cet effet stimulant des défenses antioxydantes induit par le DHA apparaît concordant avec différentes études, dont une qui montrait notamment une augmentation du taux plasmatique de vitamine E chez l'humain (Calzada et al. 2010). Il est possible qu'au cours d'une situation génératrice de stress oxydant, comme un exercice physique, les animaux supplémentés en DHA présentant des défenses antioxydantes améliorées soient alors mieux protégés des attaques radicalaires.

Le DHA et l'hypoxie

Comme évoqué précédemment, l'augmentation de l'affinité des mitochondries de soléaire pour l'ADP induite par la supplémentation en DHA en hypoxie apparaît surprenante. Cependant, cet effet du DHA permet en réalité de maintenir l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP à un degré proche de celui de la condition normoxie. Il est donc possible que l'effet de l'hypoxie sur la mitochondrie ne se manifeste pas lorsque les animaux sont supplémentés en DHA. Le DHA pourrait avoir pour effet de limiter les conséquences de l'hypoxie au niveau tissulaire. Cette hypothèse d'un impact de l'hypoxie limité par le DHA est confortée par différents résultats que nous avons obtenus.

Au premier rang de ceux-ci, nous pouvons citer l'absence de baisse de la respiration induite par l'hypoxie sur les fibres du muscle gastrocnémien blanc en présence de S, que nous avons déjà discutée précédemment.

De plus, nous avons montré une augmentation de l'expression de REDD1, utilisée comme un marqueur de l'hypoxie tissulaire, dans le muscle soléaire des rats conditionnés en hypoxie. Or, la hausse d'expression de REDD1 n'est pas retrouvée dans le muscle des animaux du groupe H + DHA. Ceci indique que soit l'hypoxie au niveau tissulaire est moins importante, soit elle n'exerce pas ces effets sur l'expression de REDD1 lorsque les animaux sont supplémentés en DHA.

De même, concernant cette fois-ci la fonction cardiaque, la vitesse de mise en tension des fibres cardiaques dans le ventricule droit n'est pas augmentée dans le groupe H + DHA alors qu'elle l'est en hypoxie seule par rapport au groupe N. Là aussi, l'adaptation à l'hypoxie habituellement observée n'est pas retrouvée. Les autres paramètres de la fonction cardiaque

sont toutefois similaires dans les groupes H et H + DHA, suggérant que le DHA ne ferait que limiter les adaptations sans les empêcher complètement.

Comme indiqué plus haut, nous faisons l'hypothèse au vu des résultats de l'étude 1 que la supplémentation en DHA a provoqué un changement de la composition lipidique des membranes des érythrocytes chez nos rats. Des auteurs s'accordent à dire qu'un contenu en AGPI augmenté dans les membranes accroît la fluidité et la souplesse de celles-ci (Kamada et al. 1993; Rajamoorthi et al. 2005). Les érythrocytes dont les membranes sont enrichies en AGPI n-3 seraient donc plus déformables (Guezennec et al. 1989) et circuleraient alors plus facilement et rapidement dans le réseau vasculaire permettant une meilleure perfusion et oxygénation des tissus. Il est possible que l'augmentation probable du rapport n-3/n-6 dans les membranes des érythrocytes, causée par la supplémentation, permette une meilleure perfusion et oxygénation des tissus, limitant l'impact au niveau tissulaire de l'hypoxie environnementale. Un paramètre semble cependant aller à l'encontre de cette hypothèse. L'indice de Fulton est en effet plus élevé dans le groupe supplémenté en DHA et conditionné en hypoxie alors qu'il n'augmentait pas dans le groupe en hypoxie seule. Comme discuté précédemment, nous avançons l'hypothèse que l'absence d'hypertrophie ventriculaire droite dans le groupe de rats en hypoxie seule vient d'un effet de l'âge. Le DHA semble donc limiter cet effet de l'âge, supposé empêcher l'hypertrophie, possiblement en activant la protéosynthèse ou en limitant la protéolyse dans le tissu musculaire cardiaque. Une étude rapporte que des sujets âgés atteints de sarcopénie présentent une meilleure réponse à la stimulation anabolique causée par l'insuline lorsqu'ils sont supplémentés en EPA et DHA (Smith et al. 2011). Il est donc possible que les rats supplémentés en DHA aient eux aussi une meilleure réponse anabolique dans le ventricule droit au stimulus hypoxique. L'hypertrophie ventriculaire est causée par une augmentation des résistances périphériques à l'écoulement du sang dans l'artère pulmonaire (Coudert 1976; Zierhut et Zimmer 1989). Plus qu'à une augmentation de la viscosité sanguine du fait d'un taux d'hématocrite élevé par l'hypoxie, l'élévation des résistances périphériques en hypoxie est causée par un rétrécissement de la lumière de l'artère pulmonaire causé par un remodelage des parois vasculaires (Coudert 1976). L'augmentation de fluidité du sang par le DHA pourrait donc n'avoir eu qu'un impact mineur sur les résistances périphériques au niveau de l'artère pulmonaire n'empêchant donc pas la survenue de l'hypertrophie ventriculaire droite. Une étude portant sur les effets de l'huile de poisson chez des rats présentant une hypertrophie cardiaque indique que cet apport nutritionnel permet d'améliorer le débit et l'efficacité cardiaque des animaux sans réduire l'hypertrophie (McLennan et al. 2012). Les paramètres fonctionnels du cœur pourraient donc

être modifiés indépendamment de l'hypertrophie par les AGPI. Ceci pourrait expliquer dans notre modèle l'hypertrophie ventriculaire droite observée malgré une fluidité sanguine probablement améliorée.

Conclusion

En conclusion, le DHA pris en situation d'hypoxie permet une forte augmentation du temps d'endurance. Ce résultat ouvre des pistes prometteuses pour la prise en charge de patients BPCO sévèrement atteints et ne pouvant participer à des programmes de réhabilitation ou non-répondeurs au réentraînement.

Contrairement à ce qui avait été vu dans l'étude 1, il apparaît que la prise de DHA en situation d'hypoxie ne permet pas une amélioration franche de la respiration mitochondriale. Cependant, le DHA semble limiter certains effets de l'hypoxie comme la baisse de respiration mitochondriale et la baisse d'affinité de la mitochondrie pour l'ADP. La limitation des conséquences de l'hypoxie par le DHA pourrait s'expliquer par une meilleure perfusion des tissus dans le groupe supplémenté. En effet, l'incorporation des AGPI dans les membranes des érythrocytes les rendrait plus déformables, ils circuleraient alors plus aisément dans le réseau vasculaire jusqu'aux organes. L'amélioration de la perfusion des tissus, et particulièrement du tissu musculaire, pourrait participer à l'amélioration du temps d'endurance des animaux. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait particulièrement intéressant d'évaluer chez nos animaux la déformabilité des GR et la viscosité sanguine.

3. ETUDE 3 : EFFET COMBINE D'UNE SUPPLEMENTATION EN DHA ET DE L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE SUR LA FONCTION MUSCULAIRE DE RATS ADULTES EN HYPOXIE

3.1 Introduction

Comme évoqué dans la revue de littérature et en introduction de l'étude 2, la BPCO est une maladie pulmonaire dont la prévalence ne cesse d'augmenter et qui se positionne aujourd'hui comme la 4^{ème} cause de décès en Europe (OMS 2004). Elle est associée à une dysfonction musculaire caractérisée par des atteintes qualitatives et quantitatives du tissu musculaire. Cette dysfonction musculaire aboutit à ce que les patients BPCO soient moins tolérants à l'exercice (Vogiatzis et al. 2012). Dans l'étude 1 de ce travail de thèse, nous mettions en évidence une amélioration du temps d'endurance d'animaux supplémentés en DHA et non entraînés. Dans l'étude 2, cet effet de la supplémentation en DHA était retrouvé lorsque les animaux étaient conditionnés en hypoxie dans le but de mimer les effets sur le muscle de la baisse de disponibilité en oxygène causée par l'atteinte respiratoire dans la BPCO sévère. Ces résultats soutiennent donc l'incorporation du DHA dans la réhabilitation nutritionnelle des patients BPCO.

La réhabilitation pulmonaire est une approche multimodale dont l'objectif est d'optimiser l'autonomie des patients BPCO et leur performances physiques et sociales (ATS 1999). Elle comprend le plus souvent un volet de réhabilitation physique dont l'efficacité dans le maintien de la fonction musculaire est communément reconnue. L'entraînement en endurance chez le patient BPCO induit une augmentation de la surface de section des fibres musculaires et de leur capillarisation (Maltais et al. 1996; Whittom et al. 1998; Vogiatzis et al. 2005; Vogiatzis et al. 2010; Vogiatzis et al. 2011) et une élévation de la proportion de fibres de type I (Vogiatzis et al. 2011). La mitochondrie est également touchée par l'entraînement chez ces patients. Ainsi, l'activité des enzymes mitochondriales HAD et CS est augmentée par l'entraînement et l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP est diminuée (Maltais et al. 1996; Puente-Maestu et al. 2003; Vogiatzis et al. 2005; Guzun et al. 2012). Ces modifications vont

dans le sens d'une restauration du métabolisme oxydatif dans le muscle. Ces modifications au niveau musculaire s'accompagnent d'un gain de capacités d'endurance et de force, ainsi que d'une amélioration de la tolérance à l'effort et de la qualité de vie des patients (Serres et al. 1997; Bernard et al. 1999; Creutzberg et al. 2003).

De nombreuses études rapportent qu'un réentraînement combiné à une supplémentation nutritionnelle visant à augmenter l'apport calorique au permet un gain plus marqué encore en terme de masse musculaire, force et capacité d'exercice que le réentraînement seul (Schols et al. 1995; Creutzberg et al. 2003; Steiner et al. 2003; Pison et al. 2011; Gurgun et al. 2013). L'apport d'une supplémentation nutritionnelle, qui ne serait pas seulement quantitative mais inclurait également des nutriments aux effets positifs comme les AGPI n-3, pourrait permettre d'améliorer encore les effets de l'entraînement.

Broekhuizen et al, montrent qu'une supplémentation en AGPI n-3 apportée en parallèle d'un réentraînement permet d'améliorer le gain de capacité d'exercice induit par l'entraînement (Broekhuizen et al. 2005). En revanche, les mécanismes à l'origine de cet effet ne sont pas élucidés.

Dans l'étude 1, l'amélioration du temps d'endurance induite par le DHA s'accompagnait de modifications de la fonction mitochondriale s'apparentant aux changements habituellement causés par un entraînement en endurance. Dans l'étude 2, lorsque les animaux étaient placés en hypoxie, le DHA semblait limiter les effets de l'hypoxie plutôt que mimer ceux de l'entraînement.

Nous faisons l'hypothèse que l'entraînement en endurance pourrait potentialiser les effets mimétiques de l'entraînement induits par le DHA sur la fonction mitochondriale et sur la capacité d'effort, tout en réduisant les effets de l'hypoxie sur le tissu musculaire. Ceci aboutirait à une augmentation plus marquée du temps d'endurance des animaux supplémentés et entraînés.

L'objectif de cette étude est de déterminer sur notre modèle de rat d'âge moyen exposé à l'hypoxie si les effets d'une supplémentation en DHA montrés précédemment, sont améliorés lorsque cette supplémentation est combinée à un entraînement en endurance. Pour cela, nous avons exploré la fonction mitochondriale sur fibres perméabilisées et sur mitochondries isolées, complétée par des mesures d'expression de facteurs impliqués dans des voies de signalisation potentiellement activées par les AGPI et en particulier le DHA.

Afin de répondre à cet objectif, les rats d'âge moyen de cette étude étaient soumis à un protocole d'entraînement en endurance de trois semaines. Comme pour l'étude 2, une partie

des animaux était exposée à l'hypoxie pour tenter de reproduire les effets de l'insuffisance respiratoire sévère.

3.2 Résultats

3.2.1 Prise alimentaire et données anthropométriques

3.2.1.1 Prise alimentaire

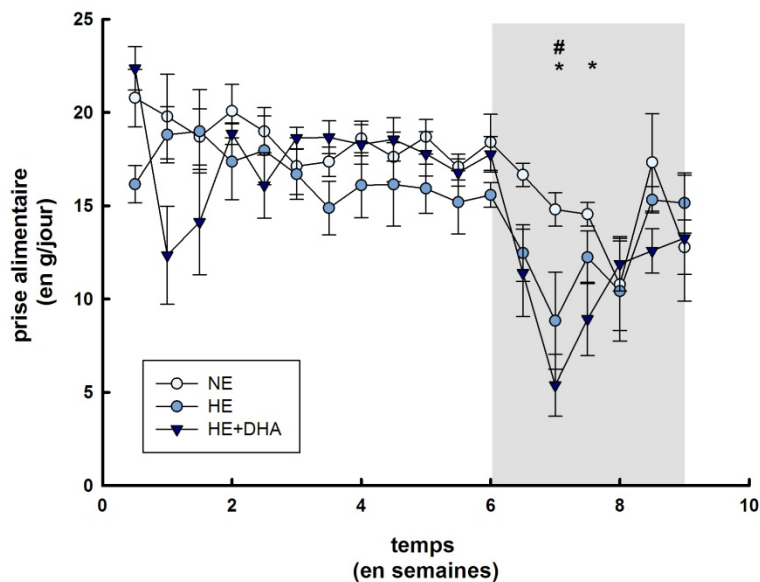


Figure 73:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur l'évolution de la prise alimentaire mesurée deux fois par semaine pendant les 9 semaines de conditionnement. La partie grisée correspond à la période d'hypoxie pour les groupes HE et HE + DHA et d'entraînement pour tous les groupes. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 6$. * HE + DHA différent de NE $p < 0,05$. # HE différent de NE $p < 0,05$.

La prise alimentaire est identique entre les groupes depuis le début du conditionnement jusqu'au moment de la mise en hypoxie et du début de l'entraînement en endurance (figure 73). La prise alimentaire est nettement réduite dans les deux groupes d'animaux en hypoxie par rapport à ceux du groupe NE à la fin de la 7^{ème} semaine de conditionnement qui correspond à la première semaine d'hypoxie. Cette différence se résorbe dès le début de la 8^{ème} semaine pour le groupe HE et à la fin de la 8^{ème} semaine pour le groupe HE + DHA. Si la baisse de prise alimentaire semble vite résorbée lorsque l'on compare les groupes en hypoxie avec celui resté en normoxie, c'est notamment parce que la prise alimentaire est également réduite dans le groupe en normoxie lorsque l'entraînement débute

(figure 74). La prise alimentaire diminue donc dans tous les groupes après la 6^{ème} semaine de conditionnement, cependant cette baisse est plus marquée dans le groupe HE + DHA ($p < 0,05$) et dans le groupe HE ($p = 0,061$) par rapport au groupe NE.

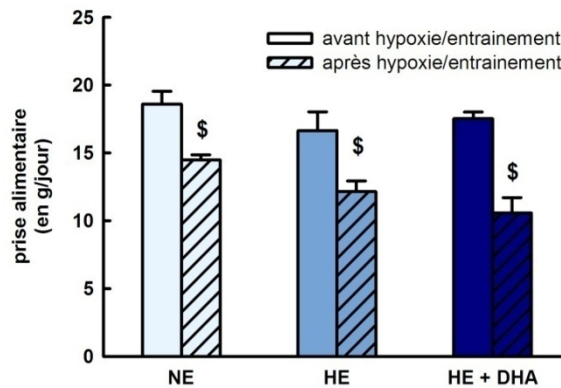


Figure 74:

Effet de la mise en hypoxie et/ou de l'entraînement en endurance sur la prise alimentaire dans les différents groupes (A). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n = 6$. * HE + DHA différent de N $p < 0,05$. \$ différent de la prise alimentaire avant la mise en hypoxie et/ou le début de l'entraînement pour le même groupe $p < 0,05$.

3.2.1.2 Poids corporel

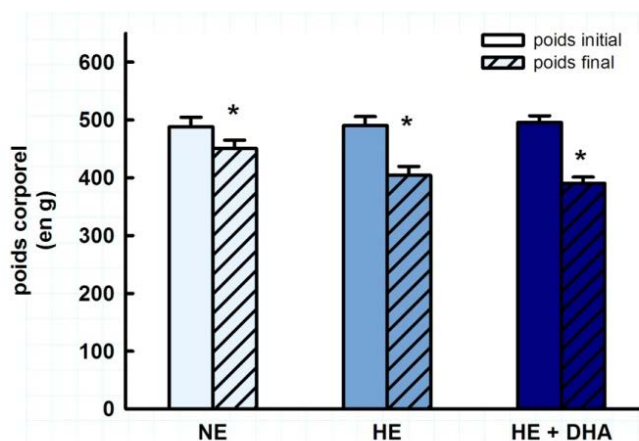


Figure 75:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur l'évolution du poids corporel entre le début (poids initial) et la fin du conditionnement (poids final) dans les différents groupes expérimentaux. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 16$. * différent du poids initial pour le même groupe.

Le poids corporel est significativement réduit dans tous les groupes entre le début et la fin du conditionnement des animaux (figure 75). Les pertes de poids sont toutefois plus marquées dans les groupes HE et HE + DHA par rapport au groupe N (figure 76).

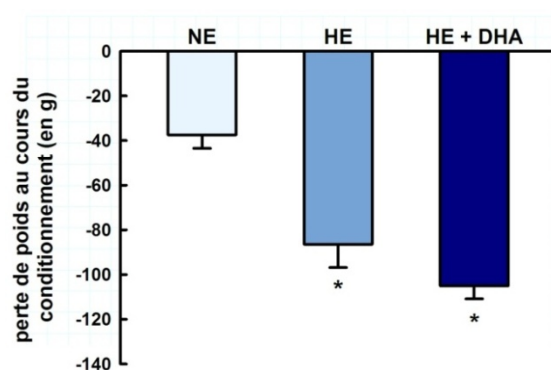


Figure 76:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la perte de poids survenue entre la mise en conditionnement et à l'issue des 9 semaines de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 16$. * différent de NE $p < 0,05$.

3.2.1.3 Composition corporelle

Différents organes et tissus ont été pesés à l'issue du conditionnement.

Tableau 25:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur le poids de différents tissus de l'organisme (en mg) rapportés au poids corporel total (en g). EDL = extenseur des doigts longs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 13$. * différent de N $p < 0,05$.

	NE		HE		HE + DHA	
cœur	22,60	\pm 0,62	24,85	\pm 0,62	26,55	\pm 0,76 *
Foie	276,37	\pm 4,25	262,83	\pm 5,66	270,98	\pm 6,22
rein	51,20	\pm 0,90	56,73	\pm 0,86	54,60	\pm 1,24 *
rate	18,79	\pm 0,60	17,85	\pm 0,67	17,22	\pm 0,69
EDL	7,86	\pm 0,19	8,08	\pm 0,29	8,06	\pm 0,21

Les mesures de composition corporelle ne montrent aucune différence liée au traitement concernant le foie et la rate (tableau 25). Le poids des reins relativement au reste du corps est augmenté dans les groupes HE et HE + DHA par rapport au groupe NE, certainement du fait de la perte de poids observées sur les animaux de ces groupes.

Le poids du cœur est également augmenté dans ces deux groupes par rapport au groupe NE (tableau 25). Lorsque l'on s'intéresse aux poids des ventricules, nous observons que le ventricule gauche pesé avec le septum ne varie pas d'un groupe à l'autre, alors que celui du ventricule droit augmente significativement dans les groupes en hypoxie par rapport

au groupe NE (figure 77A). Ceci est confirmé par la comparaison de l'indice de Fulton entre les trois groupes (figure 77B).

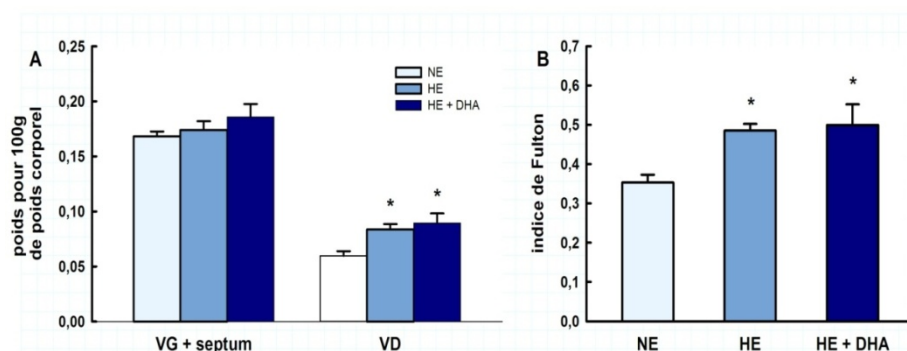


Figure 77:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur le poids du ventricule gauche + septum (VG) et du ventricule droit (VD) (A). Indice de Fulton calculé pour les cœurs des animaux des groupes NE, HE et HE+DHA (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 10$. * différent de NE $p < 0,05$.

Les poids relatifs de différents muscles, soléaire, plantaire (figure 78) et EDL (tableau 25) ne varient pas d'un groupe à l'autre, indiquant que la perte de poids de corps observée chez les animaux entraînés et placés en hypoxie ou en hypoxie combinée à la prise de DHA s'accompagne d'une perte de masse musculaire qui n'est pas limitée par la prise de DHA. La masse du tissu adipeux viscéral est en revanche diminuée dans les groupes en hypoxie HE et HE + DHA par rapport au groupe NE (figure 78A). Un effet spécifique du DHA conduit à une diminution significative du TARP dans le groupe HE + DHA par rapport aux deux autres groupes. Le TAV est donc impacté par l'hypoxie indépendamment de la prise de DHA, alors que le DHA provoque quant à lui une diminution de la masse du TARP.

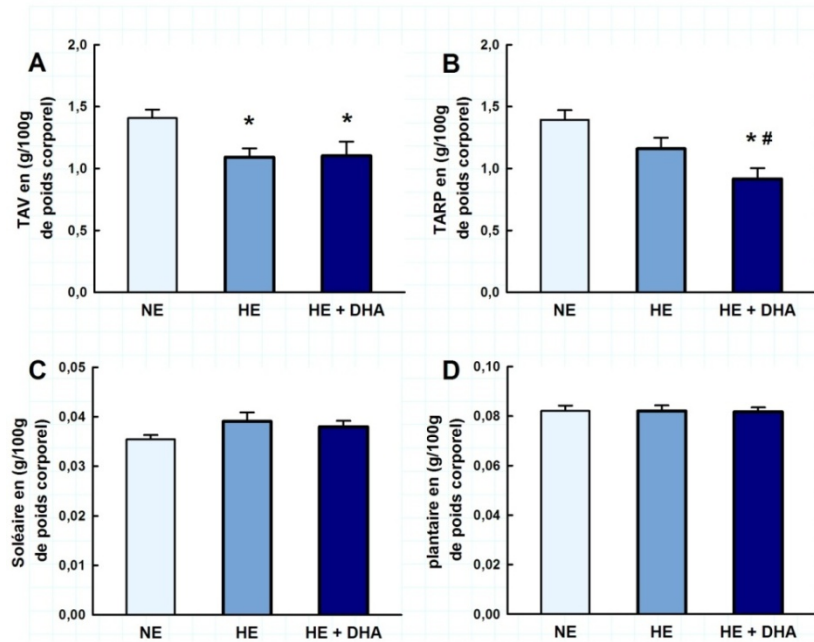


Figure 78:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur le poids de différents tissus de l'organisme rapportés au poids corporel total. TAV= tissu adipeux viscéral, TARP = tissu adipeux rétro-péritonéal. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 14$. * différent de NE $p < 0,05$. # différent de HE $p < 0,05$.

3.2.2 Calorimétrie indirecte

La dépense énergétique et le quotient respiratoire ont été déterminés à partir de la mesure sur 24h des gaz respiratoires des animaux. Ces mesures étaient effectuées lors de la dernière semaine de conditionnement.

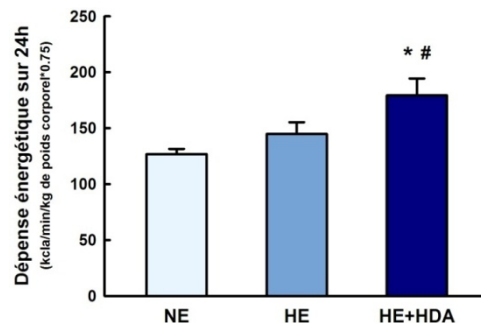


Figure 79:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la dépense énergétique mesurée sur 24h, lors de la dernière semaine de conditionnement chez des animaux entraînés. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de NE $p < 0,05$. # différent de HE $p < 0,05$.

La supplémentation en DHA combinée à l'hypoxie provoque une élévation de la dépense énergétique mesurée sur 24h par rapport à la condition normoxie et hypoxie seule (figure 79). Lorsqu'elle est évaluée heure par heure (figure 80), elle est augmentée pour le groupe HE+DHA par rapport au groupe HE à presque chaque heure, il ne se dégage pas de plage horaire spécifique où la dépense énergétique serait plus particulièrement augmentée.

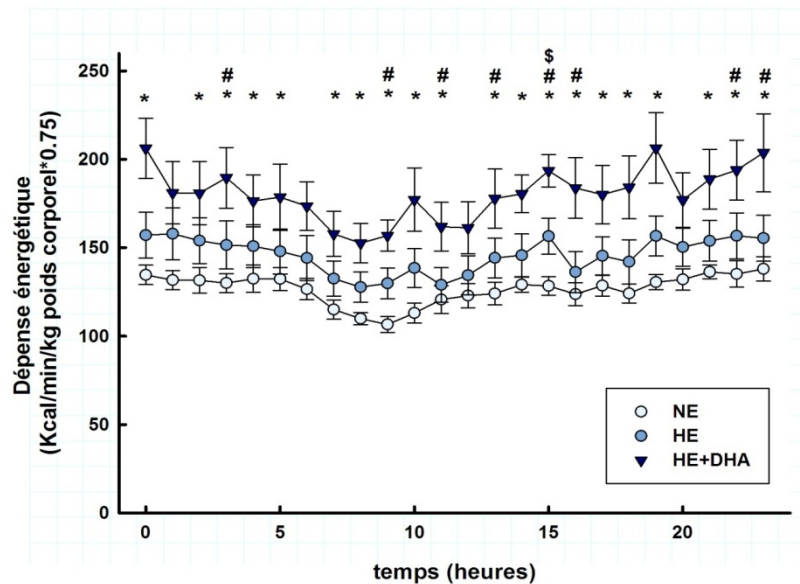


Figure 80:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la dépense énergétique mesurée heure par heure sur 24h lors de la dernière semaine de conditionnement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$. * HE+DHA différent de NE $p < 0,05$. # HE+DHA différent de HE $p < 0,05$. \$ HE différent de NE $p < 0,05$.

Le quotient respiratoire n'est pas impacté par l'hypoxie ou la supplémentation en DHA combinée avec l'hypoxie chez ces rats d'âge moyen entraînés (figure 81).

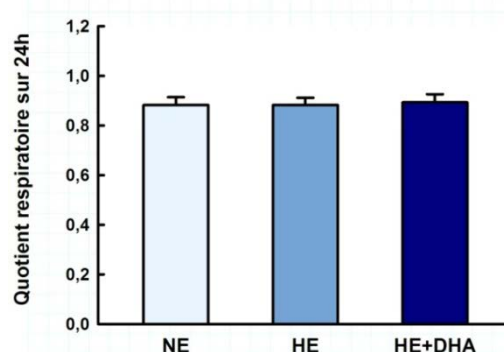


Figure 81:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur le quotient respiratoire évalué sur 24h lors de la dernière semaine de conditionnement chez des animaux en

normoxie (NE), en hypoxie (HE) et en hypoxie et supplémentés en DHA (HE+DHA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 7$.

3.2.3 Fonction cardiaque

La fréquence cardiaque est similaire dans les différents groupes (figure 82D). Il en est de même pour la pression développée par le ventricule gauche (figure 83A), ainsi que pour les vitesses respectives de relaxation et de mise en tension des fibres cardiaques des ventricules droits et gauches (figure 82B et C et 83B et C). En revanche, la pression développée par le ventricule droit est significativement augmentée dans les groupes HE et HE + DHA par rapport à NE (figure 82A).

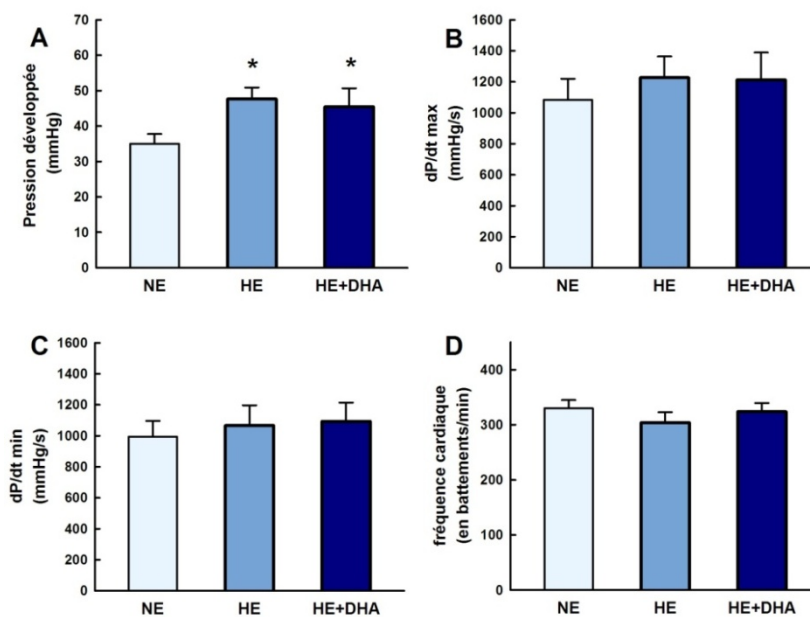


Figure 82:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la fonction cardiaque évaluée par la mesure avec une sonde millar de la pression développée par le ventricule droit (A), de la vitesse de mise en tension du myocarde (B), de la vitesse de relaxation du myocarde (C) et par la mesure de la fréquence cardiaque (D). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de NE $p < 0,05$.

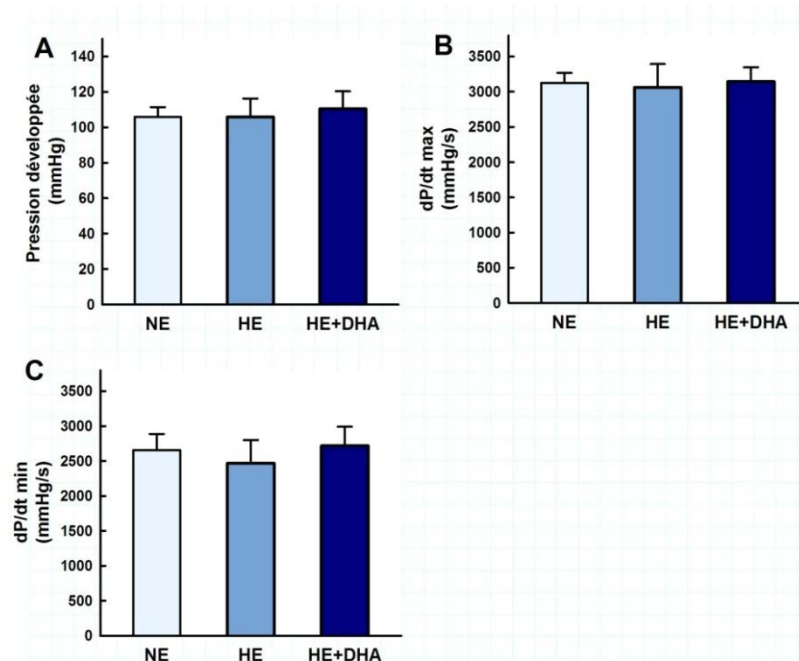


Figure 83:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la fonction cardiaque évaluée par la mesure de la pression ventriculaire gauche avec une sonde millar : (A) pression développée par le ventricule gauche, (B) vitesse de mise en tension du myocarde et (C) vitesse de relaxation du myocarde. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$.

3.2.4 Dosages biologiques

Le cholestérol est abaissé dans les conditions hypoxie et hypoxie combinée à la supplémentation en DHA par rapport à la condition normoxie (figure 84B). Mais cette diminution se révèle plus marquée dans le groupe HE + DHA pour lequel le taux de cholestérol mesuré est significativement plus faible que dans la condition hypoxie seule.

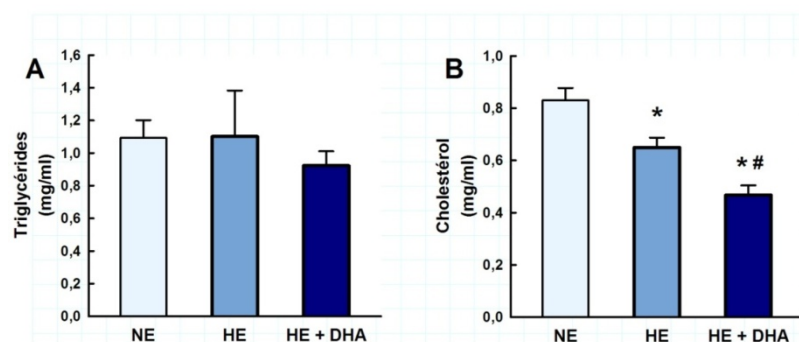


Figure 84:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur le contenu plasmatique en triglycérides (A) et cholestérol (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de NE $p < 0.05$. # différent de HE $p < 0.05$.

Aucun effet des traitements expérimentaux sur le taux de triglycérides plasmatiques n'est rapporté (figure 84A).

3.2.5 Stress oxydant

Des marqueurs du stress oxydant ont été recherchés dans le plasma des animaux à l'issue du conditionnement.

Les thiols plasmatiques sont réduits dans le groupe HE par rapport au groupe NE et au groupe HE + DHA (figure 85A). La concentration de thiols dans le plasma est la même dans les groupes NE et HE + DHA. Il y aurait donc une oxydation plus importante des protéines en hypoxie mais qui n'est pas retrouvée avec la supplémentation en DHA. En revanche, les peroxydations lipidiques sont plus faibles dans les deux groupes hypoxiques par rapport au groupe d'animaux en normoxie (figure 85B).

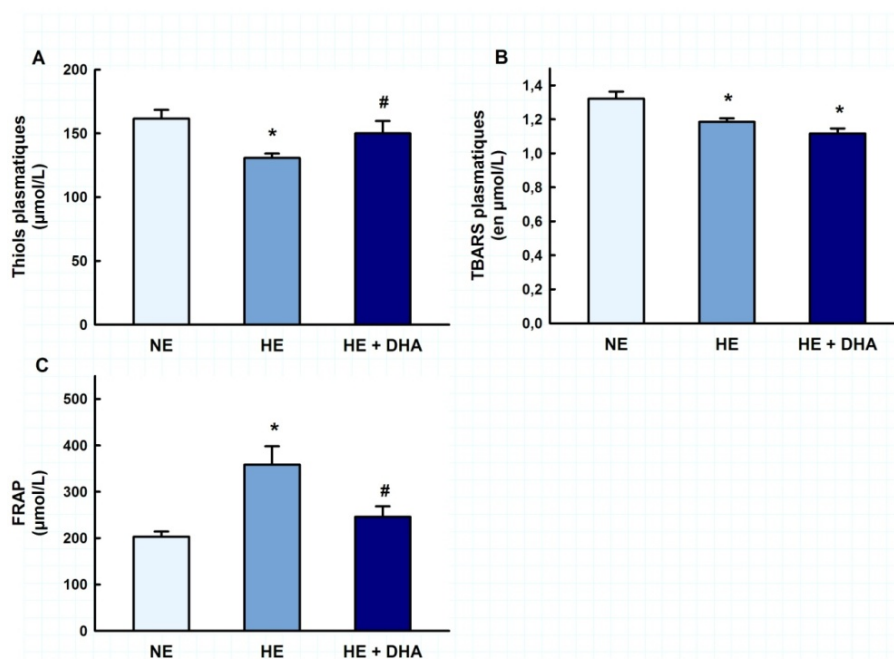


Figure 85:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur des marqueurs du stress oxydant mesurés dans le plasma. Mesure des concentrations en thiols comme marqueur de l'oxydation protéique (A); mesure des concentrations en TBARS comme marqueurs de peroxydations lipidiques(B) ; mesure de FRAP comme marqueur des capacités antioxydantes non-enzymatiques (C). Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 6$. * différent de NE $p < 0,05$. # différent de HE $p < 0,05$.

Le système antioxydant non-enzymatique, évalué par la mesure de FRAP, apparait stimulé par la mise en hypoxie mais pas lorsqu'elle est couplée à la supplémentation en DHA (figure 85C).

3.2.6 Epreuve d'endurance

La capacité d'exercice des animaux était évaluée par la mesure du temps maximal de course jusqu'à épuisement lors d'une épreuve d'effort sur tapis roulant (figure 86).

Le temps de course jusqu'à épuisement est largement supérieur pour les rats du groupe NE, comparés aux rats des groupes HE et HE + DHA (153 ± 14 min contre 21 ± 2 min et 39 ± 7 min respectivement). Cette différence s'explique par les conditions différentes dans lesquelles se déroulait l'épreuve (normoxie vs hypoxie). Il nous est apparu plus pertinent de comparer ensuite spécifiquement les groupes HE et HE + DHA entre eux puisque l'épreuve était alors réalisée dans des conditions identiques. Il ressort que le temps d'endurance des animaux du groupe HE + DHA est significativement supérieur à celui des animaux du groupe HE (figure 86).

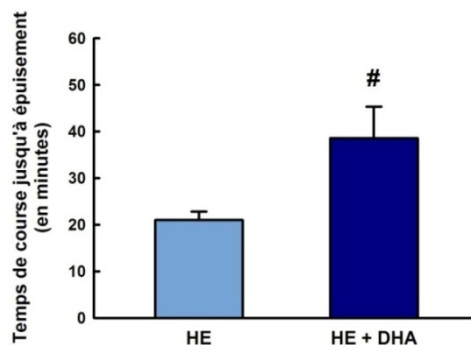


Figure 86:

Effet de l'hypoxie de la supplémentation en DHA sur le temps de course évalué sur tapis roulant jusqu'à épuisement, à une vitesse de 20m/min et une pente de 10%, chez des animaux en hypoxie (HE) et en hypoxie associée à la supplémentation en DHA (HE+DHA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 11$. * différent de NE $p < 0,05$.

3.2.7 Fonction mitochondriale

La fonction mitochondriale a été évaluée par des mesures d'activités enzymatiques mitochondriales, de respiration mitochondriale sur mitochondries isolées et sur fibres perméabilisées, de production de ROS et de CRC de mitochondries isolées.

3.2.7.1 Activités d'enzymes mitochondriales

- Activité de la citrate synthase

L'activité de la citrate synthase ne varie pas entre les différentes conditions, que ce soit dans un muscle oxydatif, le soléaire, ou dans un muscle glycolytique, le gastrocnémien blanc (figure 87).

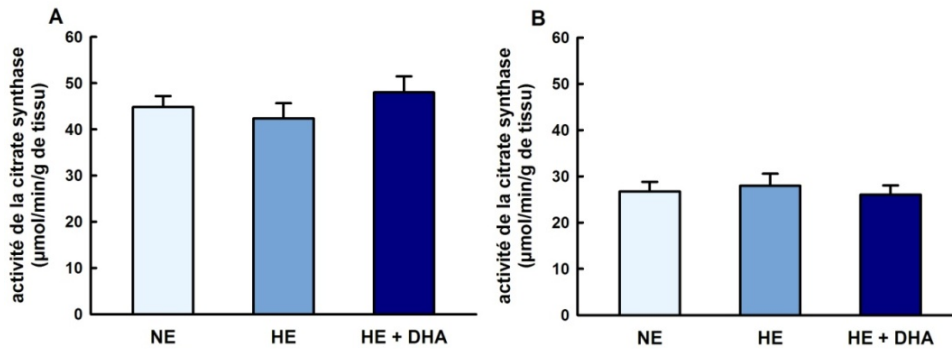


Figure 87:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur l'activité de la citrate synthase mesurée sur homogénat de soléaire (A) et de la portion blanche du gastrocnémien (B). Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 7$.

- Activité des complexes de la chaîne respiratoire

L'activité des complexes de la chaîne respiratoire n'est pas modifiée dans le soléaire entre les différents groupes (figure 88).

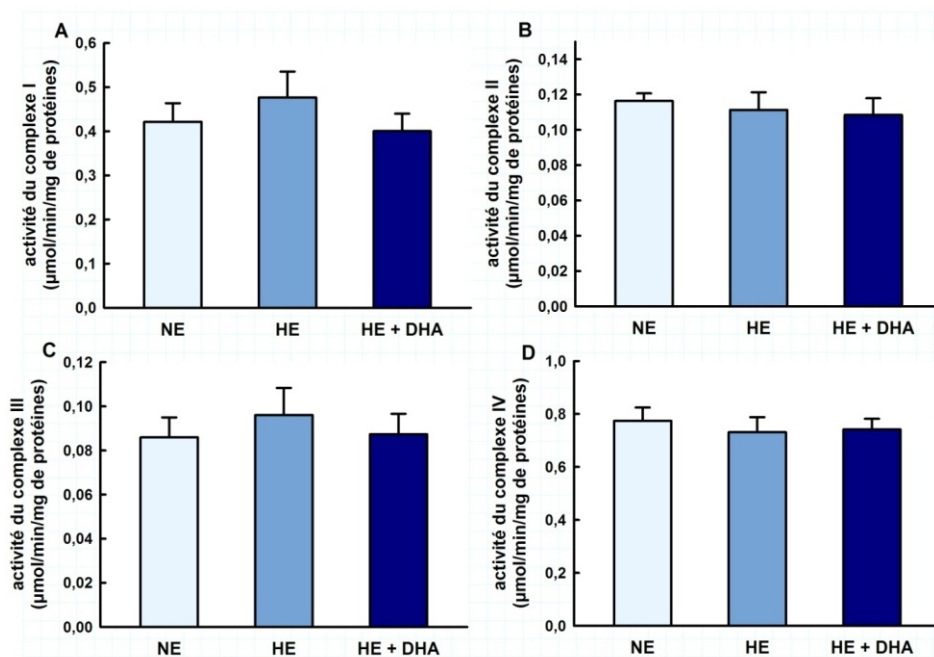


Figure 88:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur l'activité des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. (A) complexe I, (B) complexe II, (C) complexe III et (D) complexe IV. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 7$.

3.2.7.2 Respiration de mitochondries isolées

Tableau 26:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la consommation d'oxygène des mitochondries isolées de quadriceps avec différents substrats (GM, GMS, S, octanoyl-carnitine et TMPD/Asc + DNP). Elle est exprimée en $\text{nmol d'O}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n \geq 8$.

		NE	HE	HE+DHA
GM	état 2	30,00 \pm 2,51	28,75 \pm 2,38	27,11 \pm 2,47
	état 3	398,78 \pm 39,50	398,75 \pm 21,69	345,11 \pm 21,61
	état 4	21,56 \pm 2,33	21,75 \pm 3,52	17,44 \pm 3,93
	RCI	20,04 \pm 3,00	22,76 \pm 4,37	34,73 \pm 9,73
GMS	état 2	86,22 \pm 5,04	88,30 \pm 4,04	83,89 \pm 7,63
	état 3	616,56 \pm 40,35	592,88 \pm 37,36	543,44 \pm 53,06
	état 4	70,22 \pm 4,36	65,75 \pm 8,72	62,33 \pm 8,40
	RCI	8,92 \pm 0,57	10,58 \pm 1,95	9,85 \pm 1,38
S	état 2	81,40 \pm 5,06	81,25 \pm 5,80	75,56 \pm 5,34
	état 3	420,78 \pm 25,09	423,38 \pm 23,05	398,22 \pm 30,83
	état 4	70,22 \pm 5,82	76,13 \pm 5,42	66,89 \pm 6,99
	RCI	6,21 \pm 0,48	5,69 \pm 0,39	6,57 \pm 0,97
Octanoyl-carnitine	état 2	27,89 \pm 1,65	24,13 \pm 1,42	26,56 \pm 1,80
	état 3	216,00 \pm 23,16	186,88 \pm 7,68	179,67 \pm 15,41
	état 4	24,67 \pm 1,00	25,63 \pm 1,72	22,00 \pm 2,74
	RCI	8,80 \pm 0,90	7,53 \pm 0,58	8,83 \pm 1,08
TMPD/Asc/DNP		1027,22 \pm 81,19	1007,50 \pm 53,43	986,00 \pm 64,77

La respiration mitochondriale mesurée sur mitochondries isolées de quadriceps n'est en rien affectée par les traitements expérimentaux (tableau 26). La respiration mesurée en état découplé ne varie pas non plus.

3.2.7.3 Respiration mitochondriale par les fibres perméabilisées

- Vitesses maximales de consommation d'O₂

Dans le soléaire, quel que soit le substrat, l'hypoxie provoque une diminution de la vitesse de consommation d'O₂ en état 3. La supplémentation en DHA ne limite pas cet effet de l'hypoxie. La respiration en état 2 et le RCI ne sont pas affectés avec ce substrat. Avec les substrats S et GMS, la respiration en état 2 est elle aussi diminuée par l'hypoxie, combinée ou non à la prise de DHA (figure 89).

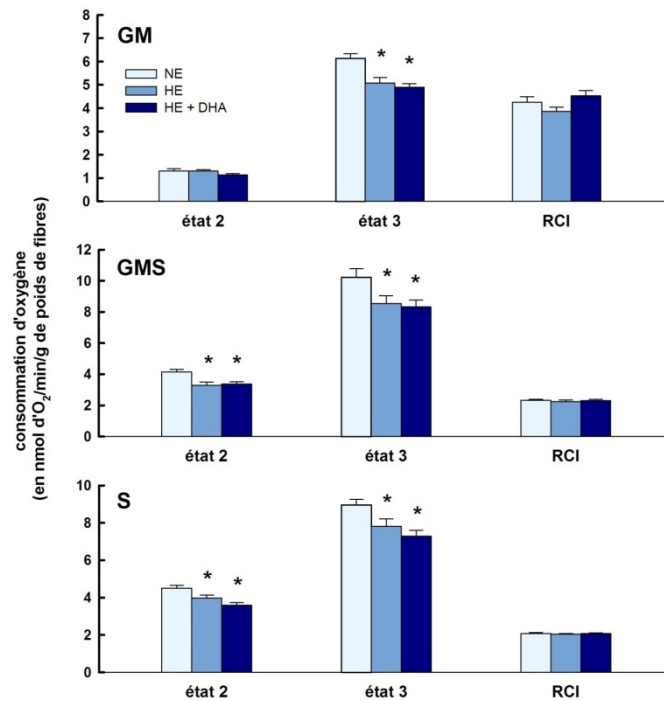


Figure 89:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la consommation d'oxygène mesurée sur fibres perméabilisées de muscle soléaire en états 2 et 3 dans différentes conditions de substrat : glutamate/malate (GM), glutamate/malate/succinate (GMS) et succinate (S). L'indice de contrôle respiratoire (RCI) était calculé par division de la consommation d'oxygène en état 3 par celle de l'état 2. Les valeurs présentées sont des moyennes ± SEM. n ≥ 8. * différent de NE p<0,05.

La vitesse maximale de consommation d'oxygène par les mitochondries de fibres perméabilisées de muscle glycolytique (gastrocnémien) est diminuée en état 2 lorsque le substrat est le glutamate/malate dans le groupe HE + DHA par rapport aux deux autres groupes (figure 90). La respiration en état 3 n'étant pas modifiée, cela aboutit à une augmentation du RCI dans ce groupe par rapport aux deux autres. Ce résultat ne se retrouve pas lorsque les substrats utilisés pour alimenter la chaîne respiratoire sont le S ou la combinaison GMS. Aucun effet des traitements n'est visible avec ces substrats.

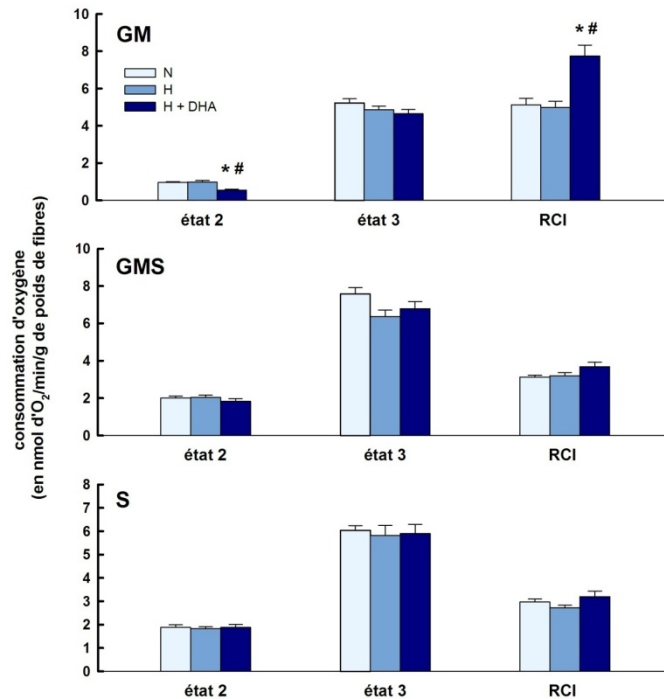


Figure 90:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la consommation d'oxygène mesurée sur fibres perméabilisées de muscle gastrocnémien en états 2 et 3 dans différentes conditions de substrat : glutamate/malate (GM), glutamate/malate/succinate (GMS) et succinate (S). L'indice de contrôle respiratoire (RCI) était calculé par division de la consommation d'oxygène en état 3 par celle de l'état 2. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de NE $p < 0,05$. # différent de HE $p < 0,05$.

- Détermination de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP

Le $k_{m_{app}}$ à l'ADP de la mitochondrie correspond à l'inverse de l'affinité de l'organite pour ce substrat. Nous l'avons évalué à partir de données d'oxygraphie de fibres perméabilisées de soléaire et de gastrocnémien en présence de GMS, une combinaison de substrats permettant d'activer la chaîne respiratoire dans son entier (figure 91), et de GM, classiquement utilisé dans la littérature et alimentant la chaîne respiratoire par le complexe I (figure 92).

Chez ces rats entraînés, en présence de GMS, le $k_{m_{app}}$ est augmenté dans la condition HE + DHA par rapport à la condition NE dans le muscle gastrocnémien (figure 91B). Il reste inchangé dans le soléaire quelque soit le traitement expérimental (figure 91A).

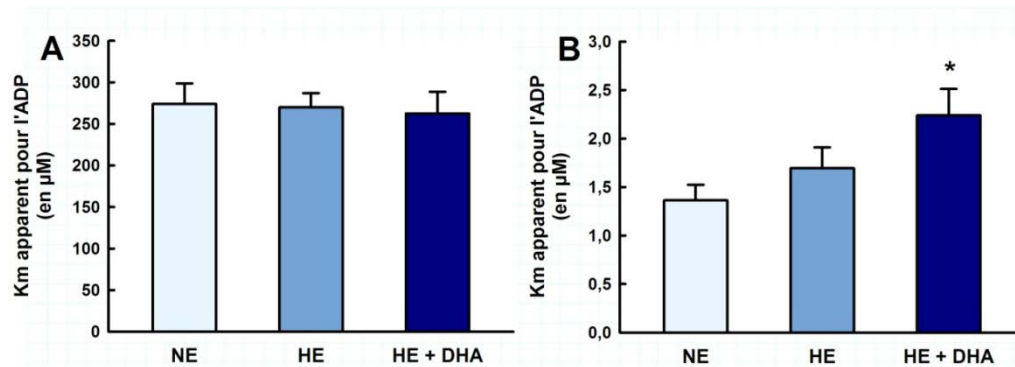


Figure 91:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur l'affinité de fibres perméabilisées de soléaire (A) et de gastrocnémien blanc (B) pour l'ADP déterminée par le calcul du km apparent à l'ADP en présence de la combinaison de substrats glutamate/malate/succinate. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de NE $p < 0,05$.

Lorsque le substrat est le GM, l'affinité des mitochondries de soléaire pour l'ADP est significativement abaissée par l'hypoxie sans effet particulier de la supplémentation en DHA (figure 92A). L'affinité des mitochondries de gastrocnémien n'apparaît pas impactée par l'hypoxie et la combinaison hypoxie/DHA en présence de GM (figure 92B).

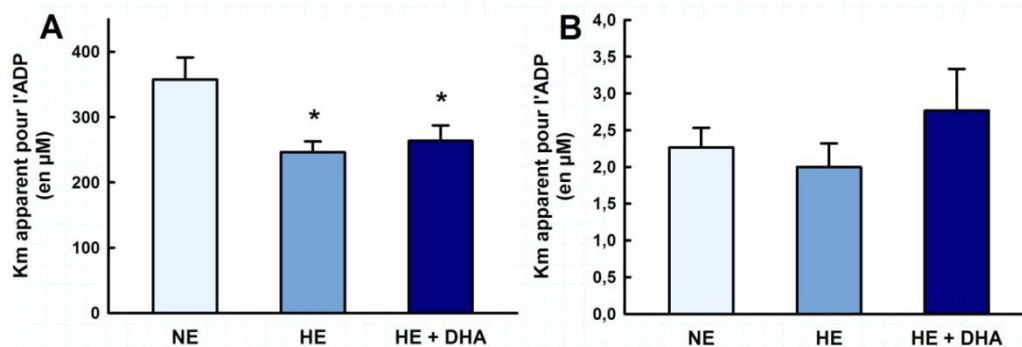


Figure 92:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur l'affinité de fibres perméabilisées de soléaire (A) et de gastrocnémien blanc (B) pour l'ADP par évaluée par calcul du km apparent à l'ADP en présence du substrat glutamate/malate. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$. * différent de NE $p < 0,05$.

3.2.7.4 Production d' H_2O_2

Tableau 27:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la production d' H_2O_2 par des mitochondries isolées de quadriceps dans différentes conditions de substrat (GM, GMS, S et octanoyl-carnitine), exprimée en pmol d' H_2O_2 /min/mg de protéines. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 8$.

		NE	HE	HE + DHA
GM	substrat	69,32 ± 5,24	52,92 ± 4,35	62,53 ± 5,03
	roténone	160,84 ± 12,60	143,16 ± 12,39	159,39 ± 11,11
	AA	300,43 ± 18,50	240,88 ± 18,34	267,26 ± 15,89
GMS	substrat	1588,30 ± 288,98	1563,33 ± 149,99	1565,70 ± 225,99
	roténone	311,47 ± 27,86	321,85 ± 15,68	300,13 ± 24,97
	AA	468,92 ± 38,73	402,10 ± 34,59	376,04 ± 25,50
S	substrat	1762,39 ± 322,25	1720,43 ± 214,45	1816,45 ± 265,03
	roténone	133,52 ± 10,08	105,36 ± 14,74	117,04 ± 10,40
	AA	340,77 ± 22,33	228,40 ± 46,12	284,76 ± 35,21
Octanoyl-carnitine	substrat	115,32 ± 10,80	107,23 ± 6,68	102,38 ± 9,03
	roténone	156,90 ± 8,61	144,57 ± 10,48	152,20 ± 8,53
	AA	454,87 ± 45,66	419,16 ± 23,45	452,13 ± 53,19

Tout comme pour la respiration mitochondriale évaluée sur mitochondries isolées, la production d'H₂O₂ par les mitochondries isolées n'est affectée ni par l'hypoxie, ni par la supplémentation en DHA associée à l'hypoxie chez nos rats entraînés. (tableau 27).

3.2.7.5 Capacité de rétention calcique mitochondriale

Tableau 28:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à une supplémentation en DHA sur la capacité de rétention calcique des mitochondries isolées issues du quadriceps, exprimée en nmol de Ca²⁺/mg de protéines. Les valeurs présentées sont des moyennes ± SEM. n ≥ 7. * différent de NE p<0,05. # différent de HE p<0,05.

	NE	HE	HE + DHA
GM	511,6 ± 35,9	769,3 ± 42,1	* 575,0 ± 79,6 #
GM + CSA	885,5 ± 31,5	1127,3 ± 35,8	* 1000,0 ± 65,5
S	779,9 ± 9,8	959,7 ± 98,9	955,6 ± 72,9
S + CSA	1097,5 ± 62,5	1244,6 ± 113,2	1133,3 ± 100,0

Chez ces rats entraînés, la CRC est significativement augmentée dans la condition HE par rapport aux conditions NE et HE + DHA lorsque le substrat est le GM. Toujours avec ce substrat mais en présence de CsA, la CRC est plus élevée dans le groupe HE par rapport au groupe NE mais n'est pas significativement différente de la CRC dans le groupe HE + DHA malgré une tendance ($p=0,08$) (tableau 28).

3.2.8 Expression protéique

Le contenu et la phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation énergétique et la synthèse protéique ont été évalués sur homogénat de soléaire.

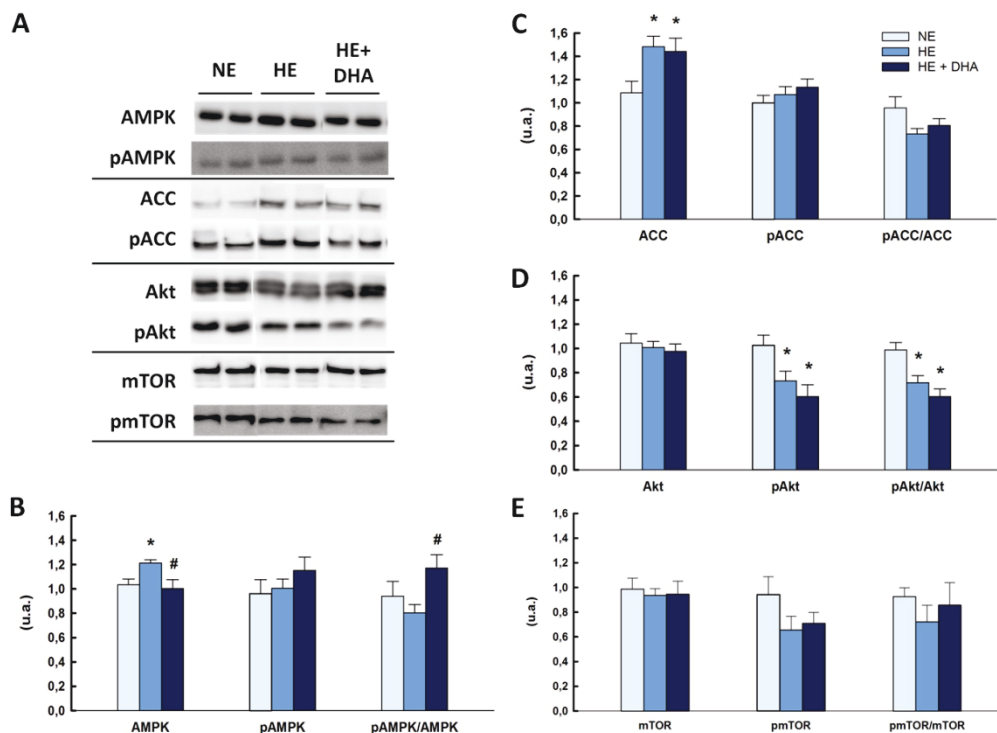


Figure 93:

Effet de l'hypoxie combinée ou non à la supplémentation en DHA sur le contenu protéique et la phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation énergétique et la synthèse protéique. Western blots des protéines AMPK α , AMPK α^{Thr172} (pAMPK), ACC, pACC $^{\text{Ser79}}$ (pACC), Akt, pAkt $^{\text{Ser473}}$ (pAkt), mTOR et pmTOR $^{\text{Ser2448}}$ (A). Quantification du contenu en AMPK total, pAMPK α^{Thr172} et calcul du ratio de la forme phosphorylée sur la protéine totale (B). Quantification du contenu en ACC total, pACC $^{\text{Ser79}}$ et calcul du ratio de la forme phosphorylée sur la protéine totale (C). Quantification du contenu en Akt total, pAkt $^{\text{Ser473}}$ et calcul du ratio de la forme phosphorylée sur la protéine totale (D). Quantification du contenu en mTOR total, pmTOR $^{\text{Ser2448}}$ et calcul du ratio de la forme phosphorylée sur la protéine totale (E). Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM. $n \geq 6$. * différent de NE $p < 0,05$. # différent de HE $p < 0,05$.

Le contenu protéique en AMPK totale est plus élevé dans le groupe HE par rapport aux deux autres groupes qui ne sont pas différents entre eux. Le rapport pAMPK/AMPK est quant à lui supérieur dans le groupe HE + DHA par rapport au groupe HE (figure 93A et 93B). Cette augmentation du rapport pAMPK/AMPK dans le groupe HE+DHA n'est pas significative par rapport au groupe NE.

Le contenu total d'ACC est significativement plus élevé dans les deux conditions d'hypoxie (HE et HE + DHA) par rapport à la condition de normoxie NE, mais aucune différence entre les groupes ne ressort concernant la forme phosphorylée (figure 93A et 93C). Les changements observés sont insuffisants pour modifier significativement le ratio pACC/ACC.

Le contenu de sa forme phosphorylée diminue dans les conditions hypoxie seule et hypoxie combinée à la supplémentation en DHA par rapport à la condition normoxie (figure 93A et 93D). Le contenu total d'Akt total est similaire entre les différents groupes d'animaux entraînés. La chute de pAkt dans les groupes hypoxiques conduit à une baisse du ratio pAkt/Akt dans ces deux groupes par rapport au groupe NE.

Dans nos groupes expérimentaux, l'expression de mTOR n'est pas significativement affectée par les différentes conditions expérimentales (figure 93A et 93E), alors même que la quantité d'Akt phosphorylée (Akt^{ser473}) est moins importante en situation d'hypoxie.

3.2.9 Expression génique

Des modifications de l'expression en ARNm de certains gènes impliqués dans métabolisme des acides gras, l'atrophie, la biogénèse mitochondriale, l'angiogénèse et le stress oxydant ont été recherchées sur homogénat de muscle soléaire.

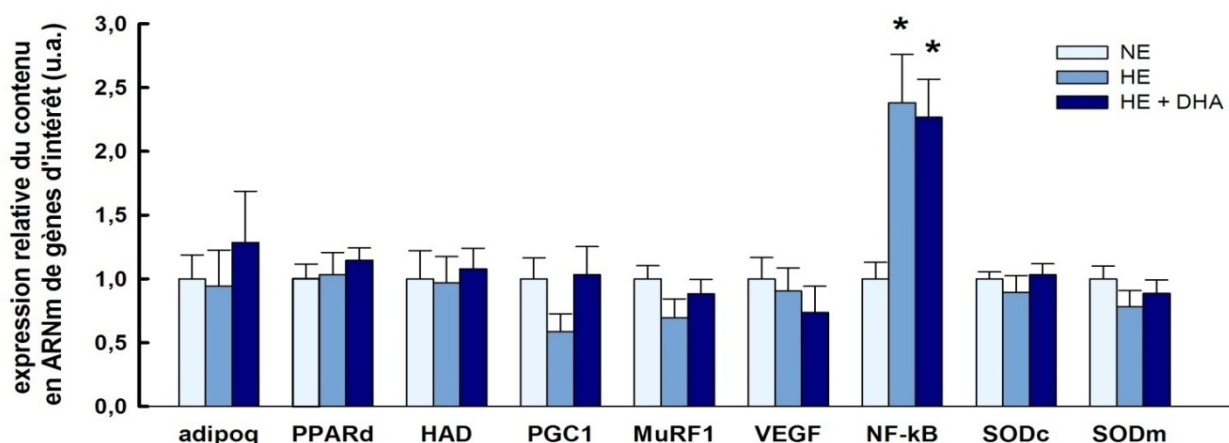


Figure 94:

Expression relative du contenu en ARNm de l'adiponectine (adipoq), de l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD), de PPAR- δ (PPARd), PGC1- α , MuRF1, VEGF, NF- κ B et des superoxyde dismutases cytosolique (SODc) et mitochondriale (SODm) dans le soléaire. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM rapportées à la moyenne du groupe NE. $n \geq 6$. * différent de NE $p < 0,05$.

Il ne ressort aucun effet des traitements expérimentaux sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras comme l'adiponectine, PPAR- δ et HAD (figure 94).

Le contenu en ARNm de PGC1- α , un régulateur clé de la biogénèse mitochondriale, reste également inchangé (figure 94), tout comme celui de MuRF-1, impliqué dans l'atrophie, et de VEGF, un facteur angiogénique induit par l'hypoxie (figure 94).

La transcription de NF- κ B apparaît augmentée dans la situation d'hypoxie seule et la condition combinant hypoxie et supplémentation en DHA chez ces animaux entraînés (figure 94). Bien qu'il soit connu pour être activateur notamment de la transcription des gènes des SOD cytosolique et mitochondriale, nous ne retrouvons pas d'augmentation du contenu en ARNm de ces gènes chez nos animaux dans les groupes HE et HE+DHA (figure 94).

3.3 Discussion

Le résultat principal de cette étude est que la supplémentation en DHA permet une augmentation du temps d'endurance de 18 min chez les animaux en hypoxie et entraînés en endurance. Le gain observé dans l'étude 2 entre les groupes H et H + DHA n'était que de 8 min. L'entraînement apparaît donc renforcer l'effet du DHA sur l'amélioration du temps d'endurance. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur les deux études précédentes ainsi qu'avec notre hypothèse selon laquelle les effets du DHA sur la tolérance à l'effort pourraient se cumuler à ceux de l'entraînement.

Efficacité de l'entraînement en endurance

Dans un premier temps, nous pouvons nous assurer de l'efficacité de notre protocole d'entraînement en comparant entre les études 2 et 3 certains paramètres connus pour être impactés par l'entraînement.

Notre protocole d'entraînement apparaît efficace puisqu'il permet une augmentation des temps d'endurance dans les groupes de rats entraînés par rapport à ceux de l'étude 2 restés sédentaires. Le temps d'endurance des animaux du groupe NE est ainsi augmenté de près de

650% par rapport à celui des animaux du groupe N. En hypoxie, l'entraînement en endurance permet de plus que doubler le temps d'endurance, indiquant que l'hypoxie n'empêche pas le gain de performance causé par l'entraînement. Il est également près de deux fois supérieur dans le groupe entraîné lorsque les animaux sont en hypoxie et supplémentés en DHA.

De plus, dans le soléaire et le gastrocnémien blanc, nous observons une augmentation du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP en présence de GMS dans les trois groupes entraînés (NE, HE et HE + DHA) lorsque nous les comparons à leurs groupes correspondants de l'étude 2 (N, H et H + DHA). Cette baisse de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP est caractéristique de l'entraînement en endurance et avait déjà été observée sur le muscle plantaire et vaste latéral, bien qu'avec des substrats différents (Zoll et al. 2002; Zoll et al. 2003; Zoll et al. 2003; Guzun et al. 2012).

Si l'on compare les respirations mesurées sur les fibres de soléaire des animaux du groupe N de l'étude précédente et ceux du groupe NE, nous observons une augmentation de la respiration dans le groupe NE pour tous les substrats, que ce soit en état 2 ou 3. L'entraînement a donc induit chez nos animaux une augmentation de la respiration mitochondriale mesurée sur fibres perméabilisées. Ceci est en accord avec des résultats de la littérature (Habouzit et al. 2009). Mais l'hypoxie réduit cet effet de l'entraînement en présence des substrats GMS et S, particulièrement pour l'état 3, sans que le DHA ne le rétablisse. L'augmentation de respiration liée à l'entraînement est cependant maintenue en présence de GM, l'hypoxie semble donc limiter les effets de l'entraînement en agissant sur le complexe II.

L'entraînement induit également une augmentation de la respiration mesurée sur le gastrocnémien blanc (groupes N et NE), mais uniquement si le substrat est le GM ou la combinaison GMS. Contrairement à ce que nous observions dans le soléaire, le complexe II n'apparaît pas intervenir dans les adaptations mitochondriales dues à l'entraînement en endurance dans ce muscle glycolytique. Les différences d'effet de l'entraînement observées entre ces deux muscles dans notre étude pourraient provenir d'une moindre sollicitation du gastrocnémien. Des études d'électromyographie comparant les muscles sollicités lors de la course chez le rat indiquent en effet que le type d'exercice choisi dans ce protocole, la course sur tapis roulant incliné, sollicite majoritairement le soléaire. Le gastrocnémien n'est lui que peu recruté (Roy et al. 1991).

L'amélioration du temps d'endurance et les modifications du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP dues à l'entraînement ne s'accompagnent cependant pas d'une augmentation de la citrate synthase normalisée par g de tissu, dans le soléaire ou le gastrocnémien blanc, pourtant habituellement observée avec l'entraînement. Il est possible que l'âge de nos animaux ait joué dans l'absence

d'effet de l'entraînement sur ce paramètre. Des études montrent cependant que la capacité à répondre à l'entraînement ne disparaît pas avec l'âge (Rossiter et al. 2005; Betik et al. 2008; Murias et al. 2011). Toutefois, Betik et al, rapportent que l'activité de la CS est diminuée dans le plantaire à la suite d'un entraînement chez des rats âgés de 34 et 36 mois. Cet effet disparaît cependant lorsque la CS est normalisée par la quantité de protéines et non par le poids du tissu (Betik et al. 2009). Dans notre étude, lorsque la CS est normalisée par la quantité de protéines, nous observons bien une augmentation de 23% de l'activité de la citrate synthase dans le muscle soléaire à la suite de l'entraînement ($p=0,002$). Cette différence liée à la normalisation pourrait provenir du fait qu'avec l'âge survient une accumulation de lipides intramusculaires (Rivas et al. 2011). La composition du tissu musculaire est alors altérée, le contenu relatif en protéine diminuant au profit de celui des triglycérides. Evaluer l'activité de la citrate synthase par rapport à la quantité de tissu pourrait donc masquer une augmentation de la densité mitochondriale.

Même normalisée par rapport à la quantité de protéines, la CS dans le gastrocnémien reste insensible à l'entraînement. L'absence de modifications de la densité mitochondriale dans ce muscle pourrait reposer sur les paramètres de l'entraînement appliqué. Sur le rat jeune, une vitesse de course de 25m/min est couramment utilisée et souvent considérée comme correspondant à environ 85% de la $VO_2\text{max}$ chez des rats jeunes (Wisloff et al. 2001). Nous projetions d'employer ce protocole d'entraînement dans nos études, mais cette vitesse de course s'est révélée trop élevée pour nos rats âgés de 10 à 12 mois, ils étaient incapables de produire l'effort demandé. Nous avons donc décidé de réduire la vitesse à 20m/min. L'intensité d'exercice appliquée à notre modèle ressort par conséquent difficile à quantifier par manque de repères chez le rat d'âge moyen. Néanmoins, le fait que les rats peinent à maintenir leur effort, notamment dans les premiers jours de l'entraînement, laisse penser qu'elle était plutôt élevée et ne pourrait donc être mise en cause pour expliquer l'absence d'augmentation de la densité mitochondriale dans le muscle gastrocnémien.

En revanche, la durée d'entraînement de 3 semaines est courte et pourrait ne pas avoir été suffisante pour rendre visible une augmentation de la densité mitochondriale chez ces animaux d'âge moyen. Burelle et al, ne rapportent ainsi pas d'augmentation de la citrate synthase dans la partie blanche du muscle gastrocnémien après un entraînement de 4 semaines au cours duquel les animaux couraient 5 jours par semaine à une vitesse de 22m/min sur un tapis incliné à 15% et atteignaient progressivement une durée d'exercice de 90min (Burelle et Hochachka 2002).

Comme dans les travaux de Betik et al, nous retrouvons cependant une augmentation de l'activité du complexe IV avec l'entraînement, ainsi que du complexe III (Murakami et al. 1994; Betik et al. 2008; Betik et al. 2009). Il est intéressant de noter que cet effet de l'entraînement est similaire à ce qu'induisait la supplémentation en DHA sans entraînement dans l'étude 1.

La comparaison des résultats des études 2 et 3, semble donc indiquer que notre protocole d'exercice est suffisant pour induire des adaptations à l'entraînement, même si tous les paramètres habituellement impactés ne le sont pas, probablement du fait de la faible durée d'entraînement utilisée ainsi que de l'âge des animaux qui pourrait diminuer leur réponse à l'entraînement.

Effet de l'hypoxie

Nous retrouvons bien sur ce modèle de rats entraînés des effets de l'hypoxie classiquement attendus. Ainsi, nous observons bien une hypertrophie ventriculaire droite comme nous l'indique l'augmentation de l'indice de Fulton dans les deux groupes en hypoxie. La pression développée par le ventricule droit est elle aussi plus élevée chez les animaux en hypoxie de manière concordante avec ce qui est habituellement observé (Kolar et Ostadal 1991). L'entraînement semble améliorer la réponse du cœur à l'hypoxie chez nos animaux d'âge moyen. En effet, dans la deuxième étude, le ventricule droit des animaux en hypoxie seule ne s'hypertrophiait pas significativement, indiquant une réponse moindre à l'augmentation des résistances périphériques induites par l'hypoxie des rats d'âge moyen.

DHA et prise alimentaire

Comme pour les études 1 et 2, nous avons souhaité nous assurer que la supplémentation en DHA ne modifiait pas la prise alimentaire. Elle est identique entre les 3 groupes jusqu'à la mise en hypoxie et le début de l'entraînement. Si l'on moyenne la prise alimentaire lors des 6 premières semaines de conditionnement et lors des 3 dernières, nous observons qu'elle est significativement plus faible pour les 3 groupes lors des 3 dernières semaines par rapport aux 6 premières. Dans les études 1 et 2, la prise alimentaire restait constante dans le groupe contrôle. Ceci indique que l'entraînement est responsable dans l'étude 3 de la baisse de prise alimentaire observée dans le groupe en normoxie. Cependant, la prise alimentaire à la 7^{ème} semaine est significativement plus faible dans les 2 groupes en hypoxie et entraînés par rapport au groupe NE. L'effet anorexigène de l'hypoxie est donc bien

présent dans cette étude et plus marqué que celui lié à l'entraînement. La supplémentation en DHA n'induit pas d'effet particulier sur la prise alimentaire des animaux.

Effet du DHA sur la composition corporelle : le tissu adipeux

Cette baisse de prise alimentaire chez tous les animaux conduit à une perte de poids dans tous les groupes entre le début et la fin du conditionnement. Elle est toutefois plus marquée dans les groupes HE et HE + DHA que dans le groupe NE. Contrairement à ce que nous observions dans l'étude 2, la perte de poids dans les groupes HE et HE + DHA est identique dans cette étude. Le DHA ne provoque donc pas de perte de poids supplémentaire.

Chez nos rats entraînés, la part du tissu adipeux viscéral rapportée au poids corporel total est diminuée dans les 2 groupes de rats en hypoxie, avec ou sans supplémentation en DHA. La diminution du poids corporel causée par l'hypoxie apparaît donc liée en partie à une perte de masse adipeuse. Nous observons également un effet spécifique du DHA pris en hypoxie puisqu'il induit une perte de tissu adipeux rétro-péritonéal qui n'est pas retrouvée en hypoxie seule. Les mesures de calorimétrie sur 24h nous indiquent que la dépense énergétique dans le groupe combinant supplémentation en DHA et hypoxie est supérieure à celle des deux autres groupes. Ceci pourrait expliquer la diminution de masse adipeuse rétro-péritonéale accrue dans le groupe supplémenté en DHA spécifiquement. Le fait que la dépense énergétique soit plus élevée dans ce groupe indépendamment des phases diurnes et nocturnes suggère qu'elle est plutôt induite par un métabolisme de base plus élevé que par une augmentation de l'activité physique des animaux. La hausse de la dépense énergétique n'apparaissait pas dans nos études précédentes. Cette absence de changement avait été également rapportée par Noreen et al, et Kratz et al, chez des sujets humains sains ou obèses supplémentés en huile de poisson ou préparation enrichie en n-3 (Kratz et al. 2009; Noreen et al. 2010). Nos résultats peuvent laisser penser que la supplémentation en DHA doit nécessairement être associée à un entraînement pour induire cet effet. Toutefois, une étude combinant pendant 10 jours la prise d'une supplémentation riche en AGPI avec un entraînement en endurance ne montre pas d'augmentation de la dépense énergétique de repos chez des hommes sédentaires (Boss et al. 2010). La faible durée d'entraînement et de supplémentation utilisée par ces auteurs pourrait expliquer la différence de résultat entre leur étude et la nôtre. De plus, l'intensité d'exercice choisie par ces auteurs, évoluant de 50 à 65% de la VO_2 max pour des durées d'effort comprises entre 30 et 45 min par jour, est relativement faible, alors que comme indiqué précédemment cela ne semble pas être le cas dans notre étude.

Le QR mesuré sur 24h dans cette étude n'est pas différent d'un groupe à l'autre et il ne varie pas non plus par rapport au groupe N des études précédentes. Comme pour les deux études précédentes, la perte de masse adipeuse plus marquée dans le groupe supplémenté en DHA ne semble pas s'expliquer par une oxydation préférentielle des acides gras au repos. Cependant, dans l'étude 2, le QR était significativement augmenté chez les animaux du groupe supplémenté en DHA et placé en hypoxie. Cette augmentation de QR suggérait une utilisation accrue de substrats glucidiques causée par le DHA pris en hypoxie. Nous ne retrouvons pas un tel effet dans la présente étude lorsque les animaux placés en hypoxie et supplémentés en DHA sont entraînés en endurance. Plusieurs auteurs s'accordent à dire que l'entraînement en endurance a pour conséquence d'augmenter l'oxydation des acides gras au repos et donc de diminuer le QR (Romijn et al. 1993; Goodpaster et al. 2003; Barwell et al. 2009). Il est possible que l'augmentation de QR induite par la supplémentation en DHA prise en hypoxie dans l'étude 2 n'ait pu se révéler dans la présente étude du fait de l'entraînement en endurance qui au contraire favorise la diminution du QR en raison d'une plus grande oxydation des acides gras au repos.

Les QR mesurés dans les groupes NE et HE de la présente étude n'apparaissent pas différents de ceux évalués dans les groupes N et H de l'étude 2. L'entraînement aurait donc simplement normalisé les QR entre les différents groupes sans induire de baisse supplémentaire.

Nous n'observons pas chez nos rats entraînés de changement du contenu en ARNm de l'adiponectine, de PPAR- δ et de HAD, qui sont impliqués dans l'oxydation des acides gras. De manière concordante avec les résultats de QR évalué sur 24h, ceci suggère que l'oxydation des acides gras n'est pas favorisée par l'un des traitements expérimentaux.

L'hypoxie est connue pour favoriser l'utilisation des glucides et limite donc l'oxydation des lipides. Dans notre étude, nous observons une hausse du contenu protéique de la protéine totale ACC dans les deux groupes en hypoxie, sans que sa phosphorylation ne soit augmentée. Bien que le ratio pACC/ACC ne soit pas significativement abaissé dans ces groupes par rapport au groupe NE, cette accumulation d'ACC pourrait limiter l'oxydation des acides gras. En effet, cette protéine inhibe l'oxydation des lipides si elle n'est pas phosphorylée par l'AMPK (Hardie et Pan 2002). Ce résultat apparait contradictoire avec la diminution de masse adipeuse observée dans nos groupes en hypoxie. Cependant, et comme discuté dans l'étude 1, la lipolyse peut être augmentée indépendamment d'ACC, via notamment la β -oxydation peroxysomale.

Effet du DHA sur la composition corporelle : le tissu musculaire

Les poids du soléaire, du plantaire et de l'EDL rapportés au poids corporel total ne sont pas différents d'un groupe à l'autre. Ceci indique que les animaux perdent de la masse corporelle en hypoxie, sans changement de la part de différents muscles dans le poids corporel total, suggérant que la diminution de masse corporelle serait accompagnée d'une diminution de la masse musculaire. Dans l'étude 2, le DHA apparaissait préserver la masse du soléaire et du plantaire de la fonte musculaire induite par l'hypoxie. Dans cette étude, le réentrainement semble gommer cet effet bénéfique du DHA.

Afin de déterminer si une baisse de la protéosynthèse pouvait être impliquée en hypoxie, nous avons étudié des éléments de la voie PI3K/Akt/mTOR sur homogénat de soléaire (figure 95).

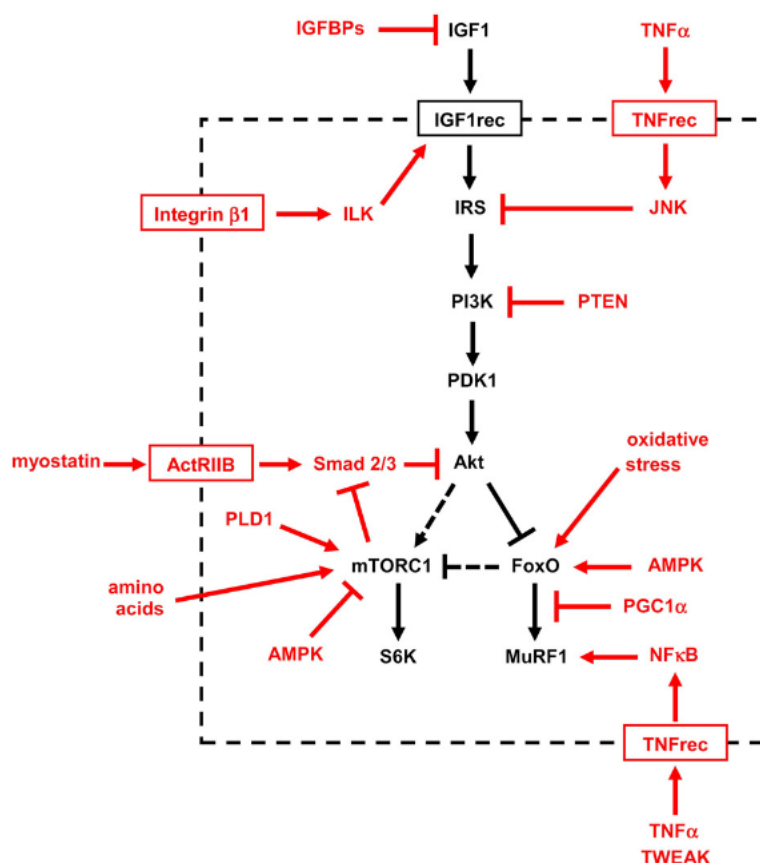


Figure 95:

Multiples facteurs et voies de signalisation affectant la voie de signalisation IGF-1/Akt. D'après (Schiaffino et Mammucari 2011).

La phosphorylation d'Akt est diminuée dans les groupes HE et HE + DHA par rapport au groupe NE, ce qui aboutit à la diminution du ratio pAkt/Akt dans ces deux groupes. Ceci suggère que la voie PI3K/Akt/mTOR serait inhibée en hypoxie lorsque les rats sont entraînés.

Cependant, l'absence de modifications de la phosphorylation de mTOR en hypoxie apparaît réfuter cette possibilité. Il convient toutefois de noter que nous n'avons étudié la phosphorylation d'Akt qu'au niveau de son résidu sérine 473. Or, Akt peut également être phosphorylée au niveau de sa sérine 308. La phosphorylation sur la sérine 473 en plus de la sérine 308 est nécessaire pour l'activation maximale d'Akt et notamment pour son action inhibitrice sur Foxo. Cependant, la phosphorylation d'Akt sur la sérine 308 seule est suffisante pour activer mTOR *via* TSC2 (pour revue (Schiaffino et Mammucari 2011)). Il serait donc intéressant de mesurer également le niveau de phosphorylation d'Akt^{ser308}, afin de confirmer que l'absence de diminution de phosphorylation de mTOR provient de son activation par Akt phosphorylée au niveau du résidu 308. En revanche, la baisse de phosphorylation d'Akt^{ser473} en hypoxie devrait lever son inhibition sur Foxo et donc permettre la transcription des ubiquitines ligases MuRF-1 et MAFbx impliquées dans la protéolyse (Doucet et al. 2007). Mais nous avons mesuré le contenu en transcrite de MuRF-1 et il n'apparaît modifié ni par l'hypoxie ni par l'hypoxie combinée à la supplémentation en DHA. Cependant, d'autres facteurs qu'Akt peuvent réguler son expression (figure 95).

Dans l'étude 2, le rapport pmTOR/mTOR était diminué dans le groupe H + DHA par rapport aux groupes N et H, nous supposons alors un effet inhibiteur de l'AMPK sur l'expression de ce facteur. Lorsque les animaux sont entraînés, cet effet disparaît. Pourtant, le rapport pAMPK/AMPK apparaît quant à lui toujours augmenté par la supplémentation en DHA dans la présente étude, mais uniquement par rapport à la condition HE. Cet écart de rapport pAMPK/AMPK entre les deux groupes découle cependant plutôt d'une augmentation de l'expression de la forme totale de l'AMPK dans le groupe HE que d'une diminution de son activation par phosphorylation dans le groupe HE ou d'une augmentation de sa phosphorylation dans le groupe supplémentation en DHA. L'activation de l'AMPK ne semble donc pas être vraiment différente d'un groupe à l'autre et pourrait expliquer que mTOR ne soit pas inhibé par la supplémentation dans cette étude.

La perte de masse corporelle en hypoxie, probablement accompagnée d'une diminution de la masse musculaire, ne serait donc pas expliquée par une augmentation de la protéolyse liée à ce facteur, ni par une diminution de la protéosynthèse comme l'indiquent les résultats concernant mTOR. Toutefois, il serait intéressant de confirmer et de compléter ces résultats par l'étude d'autres facteurs de la protéolyse comme Foxo et MAFbx, ou d'autres éléments en aval de mTOR dans la voie PI3K/Akt/mTOR.

L'augmentation du temps d'endurance ne semble donc pas pouvoir s'expliquer par un maintien de la masse musculaire.

Effet du DHA sur la respiration et l'affinité pour l'ADP de la mitochondrie

Alors que le DHA permettait une spectaculaire hausse du $K_{m_{app}}$ pour l'ADP en présence de GMS sur le soléaire de rats en normoxie, nous avons vu dans l'étude 2 que cet effet disparaissait en hypoxie, le DHA allant même jusqu'à limiter la hausse de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP induite par l'hypoxie seule. Dans cette troisième étude, le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP est similaire dans tous les groupes lorsque la chaîne respiratoire est alimentée en électrons *via* les complexes I et II. Nous ne retrouvons aucun effet de l'hypoxie ou de la supplémentation en DHA sur ce paramètre. Les effets de l'entraînement pourraient les avoir masqués.

Contrairement aux études précédentes, outre les mesures en présence des substrats GMS combinés, nous avons également évalué le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP avec le substrat GM. Cette condition de substrat est plus classiquement utilisée dans la littérature et permet d'alimenter la chaîne de transport des électrons *via* le complexe I uniquement. Le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP en présence de GM est proche de 350 μ M dans le soléaire et de 2,25 μ M dans le gastrocnémien blanc chez les rats entraînés. Il est effectivement plus élevé avec ce substrat qu'avec la combinaison de substrats GMS, comme nous le soupçonnions dans l'étude 2 en comparant nos résultats avec ceux de la littérature (Saks et al. 1998).

Sur le soléaire, le $K_{m_{app}}$ à l'ADP en présence de GM est plus élevé dans le groupe NE par rapport aux deux autres groupes. L'hypoxie semble donc induire une augmentation de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP chez des rats entraînés, sans effet du DHA. Dans l'étude 2, nous observions une diminution de l'affinité de la mitochondrie dans ce muscle en situation d'hypoxie. L'entraînement annule cet effet de l'hypoxie.

Dans le gastrocnémien blanc, le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP en présence de GMS est significativement augmenté dans le groupe HE + DHA par rapport au groupe HE. La prise de DHA provoquerait donc une diminution de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP, de manière similaire à ce qu'il se produit au cours d'un entraînement. Comme évoqué lorsque nous évaluions l'efficacité de notre protocole d'entraînement, celui-ci avait déjà induit une diminution de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP dans ce muscle. Il apparaît que lorsque la chaîne de transport des électrons est alimentée en équivalents réduits *via* les complexes I et II simultanément, l'effet du DHA se surajoute donc à celui de l'entraînement. Dans les études précédentes, nous n'observions aucun effet de la supplémentation ou de l'hypoxie sur l'affinité des mitochondries de gastrocnémien blanc pour l'ADP en présence de GMS. Nous faisons l'hypothèse que cette absence de résultat était due au seuil de sensibilité de la

technique peut-être insuffisant du fait des très faibles valeurs de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP que nous obtenions. Le fait que nous observions une variation de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP dans cette étude alors que nous n'en observions pas dans les précédentes peut provenir de deux raisons. Soit le DHA n'influence pas le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP lorsqu'il n'est pas combiné à un entraînement, soit l'ampleur de la variation de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP induite par l'effet du DHA couplé à celui de l'entraînement a permis d'atteindre le seuil de sensibilité de notre technique les rendant visibles. Il serait intéressant de reproduire ces expériences avec un matériel d'oxygraphie de haute résolution qui pourrait permettre de visualiser des modifications de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP plus faibles.

Lorsqu'elle est évaluée en présence de GM dans le gastrocnémien, nous ne retrouvons pas d'effet de l'hypoxie ou de la supplémentation en DHA sur l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP. L'augmentation de $K_{m_{app}}$ pour l'ADP observée en présence de GMS dans le groupe HE + DHA pourrait donc être liée à des modifications touchant le complexe II de la chaîne respiratoire. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP en présence de S seul dans les différents groupes.

Les différences de résultats obtenues en fonction des substrats utilisés dans les deux muscles pointent l'importance du choix des substrats. Bien que l'utilisation des substrats GM et S séparément permette l'étude distincte de chacun des complexes, étudier la fonction mitochondriale lorsque la chaîne respiratoire est activée dans son ensemble se rapproche certainement plus des conditions physiologiques. L'augmentation de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP en présence de GM visible en hypoxie sur le soléaire est ainsi supprimée lorsque la chaîne respiratoire est activée *via* les complexes I et II simultanément. De même, la baisse d'affinité dans le gastrocnémien blanc dans le groupe HE + DHA n'est pas visible lorsque la chaîne respiratoire est alimentée par le complexe I uniquement. Le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP mesuré en présence d'un substrat alimentant la chaîne respiratoire par un seul complexe ne permet donc pas d'extrapoler les résultats à l'ensemble de la chaîne respiratoire et pourrait mener à de fausses interprétations.

Outre le $K_{m_{app}}$ pour l'ADP, la fonction mitochondriale a été évaluée par des mesures de respiration mitochondriale sur mitochondries isolées de quadriceps et sur fibres perméabilisées de soléaire et de gastrocnémien. Le choix du quadriceps comme muscle utilisé pour la préparation des mitochondries isolées repose sur une raison technique, le protocole d'isolation des mitochondries et les mesures subséquentes requièrent une quantité de tissu importante, qui nécessite l'utilisation d'un muscle volumineux comme le quadriceps. Pour les fibres perméabilisées, nous n'avons pas cette contrainte de quantité de tissu et cela nous a

permis de choisir les muscles en fonction de leur métabolisme, oxydatif pour le soléaire et glycolytique pour le gastrocnémien.

Dans cette étude, la respiration mitochondriale mesurée sur mitochondries isolées n'apparaît influencée ni par l'hypoxie, ni par la supplémentation en DHA. Et ceci alors même que, lorsque les rats n'étaient pas entraînés (étude 2), elle était diminuée dans les deux conditions d'hypoxie dans le muscle soléaire en présence de GMS. L'entraînement permet donc de normaliser le niveau de respiration des mitochondries des rats hypoxiques.

Sur fibres perméabilisées, les résultats sont différents. La respiration mitochondriale est diminuée par l'hypoxie dans le muscle soléaire en état 3 dans les 3 conditions de substrat différentes (GM, S, et GMS). Elle est également diminuée en état 2 dès lors que le substrat utilisé alimente la chaîne respiratoire par le complexe II seul ou de manière combinée au complexe I. Ceci confirme que, comme observé dans l'étude précédente sur le muscle gastrocnémien, le complexe II de la chaîne respiratoire apparaît plus touché par l'hypoxie. Le DHA ne permet pas de limiter cette baisse comme il semblait le faire sur le muscle gastrocnémien lorsque les animaux n'étaient pas entraînés (étude 2).

La respiration mitochondriale mesurée sur fibres perméabilisées de muscle gastrocnémien n'est pas influencée par l'hypoxie quelque soit le substrat. En revanche, elle est modifiée par la supplémentation en DHA prise en hypoxie chez ces animaux entraînés. Ainsi, en présence de GM, elle est diminuée de près de moitié en état 2 dans le groupe HE + DHA par rapport aux groupes NE et HE, ce qui rendrait compte d'une moindre fuite des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale. La respiration en état 3 étant identique entre les trois groupes, le RCI est significativement augmenté dans le groupe HE + DHA par rapport aux deux autres. Le DHA permettrait donc dans ce cas un meilleur couplage mitochondrial. Cet effet du DHA n'est pas retrouvé pour les conditions de substrat GMS et S, le complexe I semble donc impliqué dans cet effet du DHA, qui serait masqué lorsque la chaîne respiratoire est activée dans son ensemble.

En résumé, lorsque les rats sont entraînés, la respiration mitochondriale ressort plus impactée par l'hypoxie dans le soléaire qui est un muscle oxydatif, que dans le gastrocnémien qui est plus glycolytique. Dans l'étude précédente, lorsque les animaux n'étaient pas entraînés en endurance, nous observions l'inverse. Le fait de s'entraîner influence donc les effets du conditionnement hypoxique d'une manière muscle-dépendante.

Il est possible que du fait de la sollicitation probablement plus importante du soléaire lors de la course sur tapis roulant, comme le suggère une étude comparant l'implication des muscles à la course par électromyographie (Roy et al. 1991), ce muscle mette en place des

adaptations à l'entraînement en endurance plus poussées que dans le muscle gastrocnémien. L'hypoxie, qui altère les capacités oxydatives *via* notamment une diminution de la respiration mitochondriale (Galbes et al. 2008; Gamboa et Andrade 2012), limiterait alors de façon plus nette la mise en place de ces adaptations.

Effet du DHA sur les activités d'enzymes mitochondriales

Toutes ces modifications de la respiration mitochondriale ont lieu alors que l'activité de la citrate synthase est identique entre les différents groupes, que ce soit dans le soléaire ou dans le gastrocnémien blanc. D'après cet indicateur, les variations de respiration entre les groupes ne seraient donc pas liées à des modifications de la densité mitochondriale. De plus, le contenu en ARNm de PGC1- α ne varie pas non plus d'un groupe à l'autre, les traitements appliqués aux rats ne semblent donc pas impliquer de modifications de la biogénèse mitochondriale.

Dans cette étude, les activités des complexes de la chaîne respiratoire ne sont pas influencées par l'hypoxie et la supplémentation en DHA chez nos rats entraînés. Dans l'étude 2, nous observions une augmentation de l'activité du complexe III et une diminution de celle du complexe I chez les rats supplémentés en DHA. Ceci ne se traduisait toutefois pas par des modifications de la respiration mitochondriale. Ces effets du DHA disparaissent lorsque les rats sont entraînés.

Effet du DHA sur la CRC des mitochondries de muscle squelettique

Nous avons également étudié la mitochondrie par des mesures de CRC de mitochondries isolées de quadriceps. Elle est supérieure dans le groupe HE par rapport aux deux autres groupes lorsque le substrat utilisé est le GM. L'augmentation de CRC liée à l'hypoxie serait donc limitée par la supplémentation en DHA chez nos animaux entraînés et permettrait de maintenir une CRC similaire à celle observée en normoxie. Cet effet sensibilisateur à l'ouverture du PTP lors de la prise d'une supplémentation en DHA avait déjà été observé dans l'étude 1 chez des rats normoxiques. L'hypoxie annulait cet effet dans l'étude 2 mais l'entraînement apparaît contrecarrer l'effet de l'hypoxie sur ce paramètre.

Cependant, dans l'étude 2, nous n'observions pas d'effet de l'hypoxie, combinée ou non à la supplémentation en DHA sur la CRC quelque soit le substrat utilisé. Ceci indique que dans notre modèle, c'est la combinaison de l'entraînement et de l'hypoxie qui produit cette augmentation de la CRC. Ceci paraît étonnant au vu du fait que l'entraînement a été montré comme provoquant une diminution de la CRC (Lumini-Oliveira et al. 2009). Picard et al, ont

comparé des sujets sains à des patients BPCO et montrent que la CRC mesurée sur fibres perméabilisées dans le muscle de ces derniers est augmentée (Picard et al. 2008). Ceci abonde dans le sens des résultats de la présente étude mais ne correspond pas à l'absence de modification de la CRC observée dans l'étude 2. Il convient toutefois de noter que nos mesures ont été réalisées sur mitochondries isolées et que donc la comparaison avec celles de Picard et al, ne peut être qu'approximative. A notre connaissance, aucune étude n'avait évalué les effets de l'hypoxie et de l'entraînement combinés sur la CRC dans le muscle squelettique. Ces résultats étonnants mériteraient donc d'être confirmés et complétés. Concernant les effets du DHA, les données disponibles proviennent d'études sur des mitochondries isolées de cœur. Elles rapportent que le DHA permet de retarder l'ouverture du PTP en augmentant la CRC (Khairallah et al. 2010). Ce résultat va à l'encontre de ce que nous observons dans notre étude, où le DHA ne modifie pas la sensibilité à l'ouverture du PTP par rapport à des animaux en normoxie, mais au contraire limite l'augmentation de CRC induite par l'hypoxie. Notre étude est à notre connaissance la première à évaluer un tel effet du DHA sur la mitochondrie de muscle squelettique. Cet effet du DHA, ainsi que le fait qu'il semble être tissu-dépendant, mériterait d'être étudié plus précisément. Des expériences menées au laboratoire indiquent par exemple que la roténone ne possède pas le même effet inhibiteur de l'ouverture du pore selon que la CRC est mesurée sur le muscle squelettique ou sur le foie (données non-publiées).

Lorsque la CRC est mesurée en présence de GM et de CsA, nous observons là encore une augmentation dans le groupe HE par rapport au groupe NE. Picard et al, ne rapportaient également pas de différences de la CRC mesurée en présence de CsA entre les sujets sains et les patients BPCO (Picard et al. 2008). Contrairement à ce qu'il se passait en l'absence de CsA, la CRC n'est pas significativement différente entre les groupes HE et HE + DHA en présence de l'inhibiteur du PTP. Nous observons toutefois une tendance à ce que la CRC dans le groupe HE soit supérieure à celle du groupe HE + DHA ($p=0,080$), tandis que les CRC des groupes HE et NE restent quant à elles identiques. Ceci indique que même en présence de l'inhibiteur spécifique de l'ouverture du PTP, le DHA empêche les conséquences de l'hypoxie en maintenant la CRC à un niveau similaire à celui observé en normoxie.

La CRC mesurée en présence de S, avec ou sans CsA, n'est impactée ni par l'hypoxie, ni par la supplémentation en DHA. Ceci suggère que la sensibilisation à l'ouverture du PTP induite par la supplémentation en DHA pourrait être liée au complexe I de la chaîne respiratoire. Khairallah et al, montraient quant à eux sur le cœur que la CRC était augmentée en présence de S chez les animaux supplémentés en DHA. Les effets du DHA sur cette

condition de CRC impliquant le complexe II de la chaîne respiratoire seraient donc également tissu-dépendants (Khairallah et al. 2010).

Une plus grande susceptibilité à l'ouverture du PTP est habituellement considérée comme délétère puisque cela peut conduire à l'apoptose de la cellule. Toutefois, et comme évoqué précédemment, cette activation de l'apoptose n'a lieu que si l'ouverture du PTP est définitive (Hunter et al. 1976). Si elle est transitoire, elle permettrait au contraire la régulation de l'homéostasie calcique et du potentiel de membrane mitochondrial (Gunter et Pfeiffer 1990; Rasola et Bernardi 2007; Brenner et Moulin 2012). Lumini-Oliveira et al, montrent par ailleurs que l'entraînement en endurance provoque également une augmentation de la sensibilité à l'ouverture du PTP des mitochondries de muscle gastrocnémien (Magalhaes et al. 2005; Lumini-Oliveira et al. 2009). Le DHA semble donc mimer un effet de l'entraînement en endurance. Il serait intéressant en perspective de ce travail de mesurer le degré d'apoptose des cellules musculaires, notamment par l'étude de marqueurs comme le relargage de cytochrome c, de nos rats supplémentés en DHA afin de déterminer le caractère bénéfique ou délétère de cette augmentation de sensibilité à l'ouverture du PTP.

Effet du DHA sur le stress oxydant

La fonction musculaire, et donc probablement la capacité d'exercice, peuvent être altérées par le stress oxydant, connu pour provoquer des dommages dans les cellules musculaires (Reid 2001; Couillard et al. 2003), et particulièrement présent chez le patient BPCO (Allaire et al. 2002; Couillard et al. 2003; Koechlin et al. 2004; Picard et al. 2008).

Plusieurs études montrent que les AGPI n-3 améliorent le statut oxydant *via* notamment une augmentation de la vitamine E dans les plaquettes sanguines (Croset et al. 1990; Mori et al. 2000; Calzada et al. 2010; Lionetti et al. 2012). L'entraînement provoque lui aussi des adaptations du système antioxydant permettant de réduire le stress oxydant (Powers et Lennon 1999; Bloomer et Fisher-Wellman 2008) alors que l'hypoxie est plutôt reconnue comme inductrice de stress oxydant, comme le révèlent des études réalisées sur modèle cellulaire et sur des souris lors d'une hypoxie sévère aiguë (Chandel et al. 2000; Magalhaes et al. 2005). Une autre étude rapporte que la prise d'antioxydant en situation d'hypoxie intermittente permet de prévenir la faiblesse musculaire des muscles respiratoires (Skelly et al. 2012).

Chez nos animaux entraînés, nous n'observons pas d'augmentation de la production de ROS au niveau mitochondrial qu'ils soient en hypoxie seule ou en hypoxie et supplémentés en DHA. Toutefois, la technique de mesure utilisée ne permet de rendre compte que de la

production mitochondriale de H₂O₂. D'autres voies de production comme la xanthine oxydase pourraient être activées, notamment en hypoxie (Kayyali et al. 2001). Notre technique ne tient pas compte des autres ROS (O₂⁻, OH[•]), ni des RNS qui participent pourtant au stress oxydant.

Le niveau de transcrit de NF-κB est augmenté dans les deux groupes d'animaux en hypoxie (HE et HE + DHA). Or son expression est connue pour être activée par les ROS (Schreck et al. 1991). Il est donc possible qu'il existe en hypoxie une production de radicaux libres accrue, mais indépendante de l'activité mitochondriale et susceptible d'activer au moins une voie de signalisation impliquée dans la réponse à cette production. Toutefois, la transcription de NF-κB pourrait avoir été activée par d'autres facteurs, comme par exemple l'inflammation.

En effet, NF-κB permet la transcription de gènes impliqués dans les défenses antioxydantes parmi lesquels les SOD cytosolique et mitochondriale (Wan et al. 1994). Cependant, nous n'observons pas chez nos animaux d'augmentation du niveau de transcrits de ces deux enzymes. Des études indiquent toutefois que l'augmentation du contenu en ARNm de la SOD mitochondriale consécutive à un exercice aigu est très transitoire et ne perdure généralement pas plus de trois heures après le stimulus (Hollander et al. 2001; Jiang et al. 2009). L'augmentation du niveau de transcrit des SOD n'est d'ailleurs pas retrouvée dans les études portant sur des entraînements en endurance du fait que les prélèvements sont généralement effectués à distance du dernier entraînement, empêchant d'observer l'augmentation transitoire de transcription (Hollander et al. 1999).

Chez nos animaux, nous avons évalué les défenses antioxydantes par des mesures de FRAP. Ce paramètre est augmenté dans le groupe HE par rapport aux deux autres groupes. Ceci indique que le stimulus hypoxique couplé à l'entraînement permet une augmentation du pouvoir antioxydant global au niveau plasmatique. Cependant, le DHA annule cet effet. Or, dans l'étude précédente, les animaux du groupe H + DHA avaient au contraire un niveau de FRAP supérieur à celui des deux autres groupes. L'entraînement semble modifier fortement les réponses à la supplémentation en DHA et à l'hypoxie pour ce paramètre.

Si nous nous intéressons maintenant aux dommages induits par le stress oxydant dans nos différents groupes, nous observons une augmentation de l'oxydation des protéines dans le groupe HE par rapport aux deux autres groupes, alors même qu'il est le seul groupe dont les défenses antioxydantes non-enzymatiques ont augmenté. Il serait pertinent de mesurer également des éléments du système antioxydant enzymatique pour déterminer si l'absence de

hausse des oxydations protéiques dans le groupe HE + DHA pourrait être causée par une amélioration du système de défense enzymatique.

A l'inverse des oxydations protéiques, les peroxydations lipidiques apparaissent diminuées par l'hypoxie, sans que la supplémentation en DHA ne modifie cet effet. Une hypoxie sévère, aigüe ou intermittente, induit chez la souris et le rat une augmentation des dommages protéiques et des peroxydations lipidiques, des marqueurs de stress oxydant (Magalhaes et al. 2005). Même si l'entraînement permettrait de réduire le stress oxydant en hypoxie en stimulant les défenses antioxydantes (Bo et al. 2008), il ne peut expliquer ce résultat car les peroxydations lipidiques seraient également diminuées dans le groupe NE, voire même plus faibles que dans les deux autres groupes.

Il ressort donc que les dommages induits par le stress oxydant lié à l'hypoxie sur notre modèle atteignent différemment les lipides et les protéines, favorisant l'oxydation des dernières et évitant l'altération des premiers. Pour les deux types de dommages, les animaux du groupe HE + DHA ont un niveau de marqueurs des dommages identique à celui observé dans le groupe NE. Concernant l'oxydation des protéines, l'effet protecteur viendrait de la supplémentation en DHA, alors que dans le cas des peroxydations lipidiques il serait lié à la condition d'hypoxie. Cet effet protecteur n'est cependant pas dû à une amélioration des défenses antioxydantes non-enzymatiques.

Bien que les défenses antioxydantes non-enzymatiques ne soient pas améliorées par la supplémentation, le DHA apparait limiter le stress oxydant.

Conclusion

Dans cette étude, il ressort que le DHA pris en hypoxie par des rats entraînés permet une augmentation du temps d'endurance des animaux. La combinaison de l'entraînement et de la supplémentation apparait donc pertinente dans l'objectif de soin des patients BPCO. En revanche, les mécanismes à l'origine de cet effet ne sont pas clairs. Le DHA induit une diminution de l'affinité des mitochondries de gastrocnémien blanc pour l'ADP, qui est une adaptation habituellement observée suite à un entraînement et est le signe d'une transition vers un métabolisme plus oxydatif. Le DHA limite également la hausse de CRC induite par l'hypoxie, cependant l'aspect positif ou négatif d'un tel effet n'est pas établi, même si là aussi c'est un effet similaire à ce qui peut être observé à la suite d'un entraînement.

CONCLUSION

Dans toute maladie chronique et/ou handicap, on utilise la CIF-2 ou Classification Internationale du Fonctionnement qui comprend 3 dimensions : Déficience, Activités et Participation. Dans le cadre de la BPCO, la déficience en termes de perte de masse et d'altération de la fonction musculaire a des conséquences délétères sur les Activités, *via* une diminution de la tolérance à l'effort, et la Participation avec une baisse de la qualité de vie et de la survie. Par conséquent, le maintien de la masse et de la fonction musculaire dans le contexte de la BPCO apparaît primordial.

Outre la réhabilitation physique, il convient de développer de nouvelles pistes pour limiter cette dysfonction musculaire, comme la réhabilitation nutritionnelle à base d'acides gras polyinsaturés (AGPI).

L'objectif de cette thèse est de caractériser les effets d'une supplémentation nutritionnelle en DHA sur la tolérance à l'effort et sur des aspects qualitatifs et quantitatifs du muscle squelettique dans le but d'évaluer l'intérêt d'une telle supplémentation dans la prise en charge de la dysfonction musculaire rencontrée dans des pathologies chroniques comme la BPCO.

Pour répondre à cet objectif principal, nous avons dans un premier temps cherché à caractériser les effets du DHA sur le muscle squelettique d'animaux d'âge moyen ayant terminé leur croissance musculaire.

Il ressort de cette première étude que la prise de DHA en dehors de tout entraînement permet une amélioration des capacités d'endurance par un effet mimétique de l'entraînement chez des animaux d'âge moyen.

Le DHA induit en effet une augmentation de la respiration mitochondriale mesurée sur fibres perméabilisées, une spectaculaire diminution de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP dans le soléaire et une diminution de la CRC. Les mécanismes responsables de ces effets pourraient reposer sur un profond remodelage de la composition lipidique des membranes que nous avons pu mettre en évidence dans le muscle plantaire et dans les érythrocytes. Les AGPI sont également connus pour être activateurs de facteurs de transcription. Dans notre étude, le DHA induit une augmentation de la transcription de PPAR- δ , un facteur impliqué dans la transcription de nombreux gènes du métabolisme oxydatif et lipidique. La stimulation par le DHA de la phosphorylation de l'AMPK, une protéine clé de

l'énergétique cellulaire activée notamment par l'exercice, pourrait également être à l'origine de ces adaptations mimétiques de l'entraînement en endurance.

Nous pouvons conclure de cette première étude que le DHA représente donc une approche nutritionnelle prometteuse pour l'amélioration des capacités d'exercice d'adultes en bonne santé en jouant sur les propriétés métaboliques du muscle.

Nous avons ensuite examiné la pertinence d'une telle supplémentation en DHA sur le muscle squelettique et la tolérance à l'effort sur un modèle de rat d'âge moyen exposé à l'hypoxie.

La prise de DHA dans un tel contexte provoque également une augmentation de la capacité d'endurance des animaux en dehors de tout entraînement. Cependant, les mécanismes à l'origine de cet effet sur la tolérance à l'effort paraissent différents de ceux caractérisés dans la première étude. En effet, nous ne retrouvons pas d'effets du DHA comparables à ceux d'un entraînement en endurance. Ainsi, à l'inverse de ce que nous observons dans la première étude, le DHA ne permet pas une amélioration franche du fonctionnement de la mitochondrie, et la diminution de l'affinité de la mitochondrie est moindre qu'en hypoxie seule.

En revanche, le DHA semble permettre un maintien de la masse musculaire en situation d'hypoxie. L'absence de modification de la phosphorylation d'Akt apparaît indiquer que la voie de signalisation de l'hypertrophie PI3K/Akt/mTOR ne serait pas impliquée dans ce phénomène. MuRF-1, un élément du versant protéolyse de la balance protéique a également été étudié et suggère que la protéolyse ne serait pas inhibée par le DHA, bien que l'étude d'autres éléments de ce système soit nécessaire pour confirmer ce premier résultat.

Outre un potentiel rôle du maintien de la masse musculaire, l'amélioration de l'endurance observée avec la supplémentation en DHA semble en fait provenir d'une limitation par le DHA des effets de l'hypoxie sur l'organisme. L'expression de REDD1, une protéine normalement activée par l'hypoxie, n'est ainsi pas observée dans le groupe supplémenté en DHA et pourtant exposé à l'hypoxie. Le DHA limite également la diminution de respiration mitochondriale induite par l'hypoxie dans le muscle gastrocnémien, ainsi que la baisse d'affinité des mitochondries de soléaire pour l'ADP, également induite en hypoxie.

Bien que les mécanismes d'action du DHA soient différents de ceux caractérisés dans la première étude, cet AG permet malgré tout une amélioration de la capacité d'endurance. La supplémentation en DHA représente donc une piste prometteuse pour la prise en charge de la dysfonction musculaire liée à la baisse de disponibilité en oxygène comme par exemple dans

la BPCO, notamment pour les patients qui ne pourraient pas prendre part à un programme de réhabilitation physique.

La troisième étude visait à déterminer sur ce modèle de rat d'âge moyen exposé à l'hypoxie si la supplémentation en DHA pouvait toujours être efficace lorsqu'elle était appliquée à des organismes soumis par ailleurs à un entraînement en endurance.

Comme dans les deux études précédentes, le DHA permet un gain de capacité d'endurance dans notre modèle de rats entraînés.

Mais là encore, les mécanismes à l'origine de cette amélioration sont plus complexes à déterminer. Le DHA combiné à l'hypoxie chez les animaux entraînés ne permet pas de maintien de la masse musculaire. Couplée à un entraînement, l'hypoxie impacte négativement le fonctionnement des mitochondries de muscle soléaire, probablement en limitant les effets de l'entraînement, et augmente leur affinité pour l'ADP mesurée en présence du substrat du complexe I, sans que le DHA ne limite ces effets. Toujours dans le soléaire, la phosphorylation de l'AMPK apparaît moins nettement stimulée par le DHA que dans les précédentes études. Le muscle gastrocnémien semble en revanche peu affecté par l'hypoxie chez ces rats entraînés et apparaît plus sensible au DHA. En effet, le DHA semble induire un meilleur couplage mitochondrial dans les fibres perméabilisées en présence d'un substrat du complexe I. L'affinité de la mitochondrie pour l'ADP dans ce muscle glycolytique est également diminuée par le DHA, semblant potentialiser l'effet attendu de l'entraînement.

Avec l'amélioration du temps d'endurance dans cette troisième étude, on note également une amélioration du fonctionnement de la mitochondrie dans le muscle glycolytique alors que le muscle soléaire oxydatif apparaît au contraire influencé négativement par l'hypoxie. La réponse au DHA semble donc muscle-dépendante chez les animaux entraînés pour deux raisons principales. Elle pourrait être due à la différence de métabolisme entre les muscles, les muscles glycolytiques répondant mieux au DHA alors que les muscles oxydatifs seraient plus contraints par l'hypoxie. Elle pourrait également dépendre de la différence de sollicitation entre le muscle soléaire et le muscle gastrocnémien lors d'un entraînement à base de course sur tapis roulant incliné.

Bien que les mécanismes d'action du DHA ne soient pas clairement identifiés dans cette situation où les animaux sont entraînés, le gain en termes de capacité d'endurance que le DHA induit confirme qu'il est intéressant de combiner une supplémentation en DHA à une réhabilitation physique dans la prise en charge de la dysfonction musculaire associée à des pathologies comme la BPCO.

L'ensemble de ce travail de thèse nous amène à la conclusion que la prise d'une supplémentation en DHA représente une approche prometteuse pour améliorer la tolérance à l'exercice dans le contexte du vieillissement musculaire et de la BPCO. Cette supplémentation pourrait être proposée comme complément d'un réentraînement ou en alternative à celui-ci chez les patients ne pouvant prendre part à un protocole de réhabilitation physique.

Perspectives cliniques

La perspective logique de ce travail est l'évaluation de l'efficacité d'une telle supplémentation en DHA directement chez le patient BPCO.

Une supplémentation nutritionnelle à base d'AGPI n-3 a déjà été proposée à des patients BPCO de stade GOLD II à IV dans le cadre d'une réhabilitation pulmonaire. Elle indiquait que la prise d'AGPI n-3 combinée à un entraînement permettait une amélioration de la puissance maximale et de l'endurance lors d'un exercice de pédalage (Broekhuizen et al. 2005). Cependant, elle ne discriminait pas les effets du DHA de ceux des autres AGPI n-3, nos résultats semblent indiquer pourtant que le DHA seul suffit à améliorer l'endurance. Au vu des effets du DHA que nous avons mis en évidence en dehors de tout entraînement, il est possible d'imaginer proposer la supplémentation en DHA à des patients BPCO de différents degrés de sévérité d'atteinte et ne pouvant participer à un protocole de réentraînement. Cette approche nutritionnelle à base de DHA pourrait être alors envisagée comme une alternative à la réhabilitation physique pour les patients non-adhérents ou non-répondeurs au réentraînement.

Une autre application prometteuse serait la prise en charge des patients BPCO, quel que soit leur stade GOLD, présentant une obésité, situation de plus en plus fréquente où des modifications quantitatives et qualitatives de la masse grasse, notamment viscérale et rétro-péritonéale serait hautement désirables. En effet, une comorbidité souvent associée à la BPCO est l'insulino-résistance et le diabète de type II. Or les AGPI n-3 ont un effet positif sur la régulation par l'insuline de l'entrée de glucose et d'acides gras dans le foie et le muscle (Luo et al. 1996; D'Alessandro et al. 2000; Ramel et al. 2008), il serait donc intéressant de proposer la supplémentation en DHA non seulement aux patients cachectiques, mais également aux patients BPCO obèses et/ou diabétiques qui pourraient bénéficier de cette propriété des n-3 en plus de l'effet du DHA sur la capacité d'endurance.

Perspectives fondamentales

D'un point de vue plus fondamental, il serait intéressant d'améliorer le modèle de rat, en intégrant par exemple une inflammation systémique, un état de dénutrition, un âge encore plus avancé... afin de nous rapprocher d'un modèle présentant les conséquences de la BPCO, notamment sur le muscle squelettique. En effet, un facteur comme l'inflammation n'est pas pris en compte dans notre modèle et a été montré comme potentiellement limitant des effets de la réhabilitation nutritionnelle (Creutzberg et al. 2000). Cependant, les vertus anti-inflammatoires des AGPI, et particulièrement du DHA, pourraient réduire cet effet de l'inflammation sur la réponse à la réhabilitation nutritionnelle.

Dans ce travail de thèse, l'étude des effets du DHA sur le maintien de la masse musculaire n'était pas un objectif central. Nous n'avons donc fait qu'aborder les effets du DHA sur les voies de signalisation de l'hypertrophie et de l'atrophie afin de tenter d'expliquer le maintien relatif de la masse musculaire en hypoxie observé dans la deuxième étude. Il conviendrait donc de poursuivre la caractérisation des effets des AGPI n-3 sur ces voies. Nous pouvons en effet imaginer que si le DHA agit sur la balance protéique, comme semblent l'indiquer par ailleurs certains travaux (Smith et al. 2011), il pourrait potentiellement améliorer les effets d'un entraînement en force, comme cela a été montré chez la femme âgée (Rodacki et al. 2012), et donc limiter une atrophie voire même provoquer une hypertrophie.

Enfin, nous montrons plusieurs modifications de l'activité des mitochondries de muscles squelettiques et notamment de l'affinité de ses mitochondries pour l'ADP. Il conviendrait d'étudier les facteurs régulateurs de l'activité de certaines protéines membranaires potentiellement impliquées dans la régulation des flux de nucléotides à travers la membrane mitochondriale comme l'ANT, VDAC et des protéines du cytosquelette (Guzun et al. 2012).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbatecola, A. M., A. Cherubini, J. M. Guralnik, C. Andres Lacueva, C. Ruggiero, M. Maggio, S. Bandinelli, G. Paolisso and L. Ferrucci** (2009). "Plasma polyunsaturated fatty acids and age-related physical performance decline." *Rejuvenation Res* **12**(1): 25-32.
- AFSSA (2001). ACIDES GRAS DE LA FAMILLE OMÉGA 3 ET SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE : intérêt nutritionnel et allégations.
- Aguilaniu, B., P. Flore, H. Perrault, J. E. Page, E. Payan and J. R. Lacour** (1995). "Exercise-induced hypoxaemia in master athletes: effects of a polyunsaturated fatty acid diet." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **72**(1-2): 44-50.
- Agusti, A., L. D. Edwards, S. I. Rennard, W. MacNee, R. Tal-Singer, B. E. Miller, J. Vestbo, D. A. Lomas, P. M. Calverley, E. Wouters, C. Crim, J. C. Yates, E. K. Silverman, H. O. Coxson, P. Bakke, R. J. Mayer and B. Celli** (2012). "Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype." *PLoS One* **7**(5): e37483.
- Agusti, A., M. Morla, J. Sauleda, C. Saus and X. Busquets** (2004). "NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight." *Thorax* **59**(6): 483-7.
- Agusti, A. G., J. Sauleda, C. Miralles, C. Gomez, B. Togores, E. Sala, S. Batle and X. Busquets** (2002). "Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(4): 485-9.
- Allaire, J., F. Maltais, J. F. Doyon, M. Noel, P. LeBlanc, G. Carrier, C. Simard and J. Jobin** (2004). "Peripheral muscle endurance and the oxidative profile of the quadriceps in patients with COPD." *Thorax* **59**(8): 673-8.
- Allaire, J., F. Maltais, P. LeBlanc, P. M. Simard, F. Whittom, J. F. Doyon, C. Simard and J. Jobin** (2002). "Lipofuscin accumulation in the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Muscle Nerve* **25**(3): 383-9.
- Allen, D. L., J. K. Linderman, R. R. Roy, A. J. Bigbee, R. E. Grindeland, V. Mukku and V. R. Edgerton** (1997). "Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting." *Am J Physiol* **273**(2 Pt 1): C579-87.
- Andersson, A., C. Nalsen, S. Tengblad and B. Vessby** (2002). "Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans." *Am J Clin Nutr* **76**(6): 1222-9.
- Aniansson, A., M. Hedberg, G. B. Henning and G. Grimby** (1986). "Muscle morphology, enzymatic activity, and muscle strength in elderly men: a follow-up study." *Muscle Nerve* **9**(7): 585-91.
- Anker, S. D. and A. J. Coats** (2002). "How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH." *Int J Cardiol* **86**(2-3): 123-30.
- ANSES (2011). Actualisation des Apports Nutritionnels Conseillés pour les acides gras, Rapport d'expertise collective, ANSES.
- Arnardottir, R. H., G. Boman, K. Larsson, H. Hedenstrom and M. Emtner** (2007). "Interval training compared with continuous training in patients with COPD." *Respir Med* **101**(6): 1196-204.
- Arsham, A. M., J. J. Howell and M. C. Simon** (2003). "A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets." *J Biol Chem* **278**(32): 29655-60.

- ATS (1999). "Pulmonary rehabilitation-1999. American Thoracic Society." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(5 Pt 1): 1666-82.
- ATS (1999). "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. A statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(4 Pt 2): S1-40.
- Aubier, M., R. Marthan, P. Berger, A. Chambellan, P. Chanez, B. Aguilaniu, P. Y. Brillet, P. R. Burgel, A. Chaouat, P. Devillier, R. Escamilla, R. Louis, H. Mal, J. F. Muir, T. Perez, T. Similowski, B. Wallaert and N. Roche** (2010). "[COPD and inflammation: statement from a French expert group: inflammation and remodelling mechanisms]." *Rev Mal Respir* **27**(10): 1254-66.
- Ayre, K. J. and A. J. Hulbert** (1996). "Dietary fatty acid profile influences the composition of skeletal muscle phospholipids in rats." *J Nutr* **126**(3): 653-62.
- Ayre, K. J. and A. J. Hulbert** (1996). "Effects of changes in dietary fatty acids on isolated skeletal muscle functions in rats." *J Appl Physiol* **80**(2): 464-71.
- Baar, K., A. R. Wende, T. E. Jones, M. Marison, L. A. Nolte, M. Chen, D. P. Kelly and J. O. Holloszy** (2002). "Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1." *FASEB J* **16**(14): 1879-86.
- Baarends, E. M., A. M. Schols, D. J. Slebos, R. Mostert, P. P. Janssen and E. F. Wouters** (1995). "Metabolic and ventilatory response pattern to arm elevation in patients with COPD and healthy age-matched subjects." *Eur Respir J* **8**(8): 1345-51.
- Baarends, E. M., A. M. Schols, K. R. Westerterp and E. F. Wouters** (1997). "Total daily energy expenditure relative to resting energy expenditure in clinically stable patients with COPD." *Thorax* **52**(9): 780-5.
- Bagga, D., L. Wang, R. Farias-Eisner, J. A. Glaspy and S. T. Reddy** (2003). "Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1751-6.
- Baillie, R. A., R. Takada, M. Nakamura and S. D. Clarke** (1999). "Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **60**(5-6): 351-6.
- Balagopal, P., O. E. Rooyackers, D. B. Adey, P. A. Ades and K. S. Nair** (1997). "Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans." *Am J Physiol* **273**(4 Pt 1): E790-800.
- Baltzell, J. K., J. T. Wooten and D. A. Otto** (1991). "Lipoprotein lipase in rats fed fish oil: apparent relationship to plasma insulin levels." *Lipids* **26**(4): 289-94.
- Barber, M. D., J. A. Ross, A. C. Voss, M. J. Tisdale and K. C. Fearon** (1999). "The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer." *Br J Cancer* **81**(1): 80-6.
- Barnes, P. J. and B. R. Celli** (2009). "Systemic manifestations and comorbidities of COPD." *Eur Respir J* **33**(5): 1165-85.
- Barreiro, E., D. Ferrer, F. Sanchez, J. Minguella, J. Marin-Corral, J. Martinez-Llorens, J. Lloreta and J. Gea** (2011). "Inflammatory cells and apoptosis in respiratory and limb muscles of patients with COPD." *J Appl Physiol* **111**(3): 808-17.
- Barreiro, E., J. Gea, J. M. Corominas and S. N. Hussain** (2003). "Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**(6): 771-8.
- Barreiro, E., R. Rabinovich, J. Marin-Corral, J. A. Barbera, J. Gea and J. Roca** (2009). "Chronic endurance exercise induces quadriceps nitrosative stress in patients with severe COPD." *Thorax* **64**(1): 13-9.

- Barreiro, E., A. M. Schols, M. I. Polkey, J. B. Galdiz, H. R. Gosker, E. B. Swallow, C. Coronell and J. Gea** (2008). "Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD." *Thorax* **63**(2): 100-7.
- Barwell, N. D., D. Malkova, M. Leggate and J. M. Gill** (2009). "Individual responsiveness to exercise-induced fat loss is associated with change in resting substrate utilization." *Metabolism* **58**(9): 1320-8.
- Batandier, C., B. Guigas, D. Detaille, M. Y. El-Mir, E. Fontaine, M. Rigoulet and X. M. Leverve** (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." *J Bioenerg Biomembr* **38**(1): 33-42.
- Belman, M. J. and B. A. Kendregan** (1981). "Exercise training fails to increase skeletal muscle enzymes in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am Rev Respir Dis* **123**(3): 256-61.
- Benatti, P., G. Peluso, R. Nicolai and M. Calvani** (2004). "Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties." *J Am Coll Nutr* **23**(4): 281-302.
- Benderro, G. F. and J. C. Lamanna** (2011). "Hypoxia-induced angiogenesis is delayed in aging mouse brain." *Brain Res* **1389**: 50-60.
- Benit, P. and P. Rustin** (2012). "Changing the diet to make more mitochondria and protect the heart." *Circ Res* **110**(8): 1047-8.
- Benzie, I. F. and J. J. Strain** (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." *Anal Biochem* **239**(1): 70-6.
- Berg, H. E., L. Larsson and P. A. Tesch** (1997). "Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest." *J Appl Physiol* **82**(1): 182-8.
- Bernard, S., P. LeBlanc, F. Whittom, G. Carrier, J. Jobin, R. Belleau and F. Maltais** (1998). "Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **158**(2): 629-34.
- Bernard, S., F. Whittom, P. Leblanc, J. Jobin, R. Belleau, C. Berube, G. Carrier and F. Maltais** (1999). "Aerobic and strength training in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(3): 896-901.
- Bernardi, P.** (2013). "The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?" *Front Physiol* **4**: 95.
- Bestall, J. C., E. A. Paul, R. Garrod, R. Garnham, P. W. Jones and J. A. Wedzicha** (1999). "Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **54**(7): 581-6.
- Betik, A. C., D. J. Baker, D. J. Krause, M. J. McConkey and R. T. Hepple** (2008). "Exercise training in late middle-aged male Fischer 344 x Brown Norway F1-hybrid rats improves skeletal muscle aerobic function." *Exp Physiol* **93**(7): 863-71.
- Betik, A. C., M. M. Thomas, K. J. Wright, C. D. Riel and R. T. Hepple** (2009). "Exercise training from late middle age until senescence does not attenuate the declines in skeletal muscle aerobic function." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**(3): R744-55.
- Bhasin, S., T. W. Storer, N. Berman, C. Callegari, B. Clevenger, J. Phillips, T. J. Bunnell, R. Tricker, A. Shirazi and R. Casaburi** (1996). "The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men." *N Engl J Med* **335**(1): 1-7.
- Bigard, A. X., E. Boehm, V. Veksler, P. Mateo, K. Anflous and R. Ventura-Clapier** (1998). "Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **30**(11): 2391-401.

- Biron, E., P. Carre, P. Chanez, B. Crestani, C. Cretin, B. Dautzenberg, B. Eichler, P. Godard, J. P. Grignet, Y. Grillet, B. Housset, G. Huchon, V. Jouniaux, N. Lemaitre, J. F. Muir, E. Orvoen Frija, J. C. Pairon, E. Parlange, D. Piperno, N. Roche, J. C. Roussel, A. Stoebner, I. Tillie Leblond, F. Trebuchon and L. Valdes** (2006). "[A operational plan on behalf of chronic obstructive bronchopneumopathy. 2005-2010. Knowledge, prevention and improved management of COBP]." *Rev Mal Respir* **23 Spec No 3**: 8S9-8S55.
- Blasbalg, T. L., J. R. Hibbeln, C. E. Ramsden, S. F. Majchrzak and R. R. Rawlings** (2011). "Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century." *Am J Clin Nutr* **93(5)**: 950-62.
- Bloomer, R. J. and K. H. Fisher-Wellman** (2008). "Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake." *Gen Med* **5(3)**: 218-28.
- Bluhm, A. L., J. Weinstein and J. A. Sousa** (1971). "Free radicals in tobacco smoke." *Nature* **229(5285)**: 500.
- Bo, H., Y. H. Wang, H. Y. Li, J. Zhao, H. Y. Zhang and C. Q. Tong** (2008). "Endurance training attenuates the bioenergetics alterations of rat skeletal muscle mitochondria submitted to acute hypoxia: role of ROS and UCP3." *Sheng Li Xue Bao* **60(6)**: 767-76.
- Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass** (2001). "Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy." *Science* **294(5547)**: 1704-8.
- Bolster, D. R., S. J. Crozier, S. R. Kimball and L. S. Jefferson** (2002). "AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling." *J Biol Chem* **277(27)**: 23977-80.
- Bosch-Marce, M., H. Okuyama, J. B. Wesley, K. Sarkar, H. Kimura, Y. V. Liu, H. Zhang, M. Strazza, S. Rey, L. Savino, Y. F. Zhou, K. R. McDonald, Y. Na, S. Vandiver, A. Rabi, Y. Shaked, R. Kerbel, T. Lavalley and G. L. Semenza** (2007). "Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia." *Circ Res* **101(12)**: 1310-8.
- Boschetto, P., B. Beghe, L. M. Fabbri and C. Ceconi** (2012). "Link between chronic obstructive pulmonary disease and coronary artery disease: implication for clinical practice." *Respirology* **17(3)**: 422-31.
- Boss, A., V. Lecoultre, C. Ruffieux, L. Tappy and P. Schneiter** (2010). "Combined effects of endurance training and dietary unsaturated fatty acids on physical performance, fat oxidation and insulin sensitivity." *Br J Nutr* **103(8)**: 1151-9.
- Boveris, A. and E. Cadenas** (1975). "Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration." *FEBS Lett* **54(3)**: 311-4.
- Boveris, A. and B. Chance** (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* **134(3)**: 707-16.
- Boyer, S. J. and F. D. Blume** (1984). "Weight loss and changes in body composition at high altitude." *J Appl Physiol* **57(5)**: 1580-5.
- Brand, M. D., J. A. Buckingham, T. C. Esteves, K. Green, A. J. Lambert, S. Miwa, M. P. Murphy, J. L. Pakay, D. A. Talbot and K. S. Echtay** (2004). "Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production." *Biochem Soc Symp*(71): 203-13.
- Brenner, C. and M. Moulin** (2012). "Physiological roles of the permeability transition pore." *Circ Res* **111(9)**: 1237-47.

- Broekhuizen, R., E. C. Creutzberg, C. A. Weling-Scheepers, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2005). "Optimizing oral nutritional drink supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Br J Nutr* **93**(6): 965-71.
- Broekhuizen, R., R. F. Grimble, W. M. Howell, D. J. Shale, E. C. Creutzberg, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2005). "Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1beta -511 single nucleotide polymorphism." *Am J Clin Nutr* **82**(5): 1059-64.
- Broekhuizen, R., E. F. Wouters, E. C. Creutzberg and A. M. Schols** (2006). "Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD." *Thorax* **61**(1): 17-22.
- Broekhuizen, R., E. F. Wouters, E. C. Creutzberg, C. A. Weling-Scheepers and A. M. Schols** (2005). "Polyunsaturated fatty acids improve exercise capacity in chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **60**(5): 376-82.
- Brossard, N., M. Croset, C. Pachiardi, J. P. Riou, J. L. Tayot and M. Lagarde** (1996). "Retroconversion and metabolism of [¹³C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [¹³C]22:6n-3-triacylglycerols." *Am J Clin Nutr* **64**(4): 577-86.
- Bruera, E., F. Strasser, J. L. Palmer, J. Willey, K. Calder, G. Amyotte and V. Baracos** (2003). "Effect of fish oil on appetite and other symptoms in patients with advanced cancer and anorexia/cachexia: a double-blind, placebo-controlled study." *J Clin Oncol* **21**(1): 129-34.
- Bua, E. A., S. H. McKiernan, J. Wanagat, D. McKenzie and J. M. Aiken** (2002). "Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia." *J Appl Physiol* **92**(6): 2617-24.
- Buck, M. and M. Chojkier** (1996). "Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants." *EMBO J* **15**(8): 1753-65.
- Buckley, J. D. and P. R. Howe** (2009). "Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids." *Obes Rev* **10**(6): 648-59.
- Buckley, J. D. and P. R. Howe** (2010). "Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review." *Nutrients* **2**(12): 1212-30.
- Buist, A. S., M. A. McBurnie, W. M. Vollmer, S. Gillespie, P. Burney, D. M. Mannino, A. M. Menezes, S. D. Sullivan, T. A. Lee, K. B. Weiss, R. L. Jensen, G. B. Marks, A. Gulsvik and E. Nizankowska-Mogilnicka** (2007). "International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study." *Lancet* **370**(9589): 741-50.
- Burdet, L., B. de Mural, Y. Schutz, C. Pichard and J. W. Fitting** (1997). "Administration of growth hormone to underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, randomized, controlled study." *Am J Respir Crit Care Med* **156**(6): 1800-6.
- Burdge, G.** (2004). "Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**(2): 137-44.
- Burdge, G. C., A. E. Jones and S. A. Wootton** (2002). "Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men*." *Br J Nutr* **88**(4): 355-63.
- Burelle, Y. and P. W. Hochachka** (2002). "Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers." *J Appl Physiol* **92**(6): 2429-38.
- Cai, D., J. D. Frantz, N. E. Tawa, Jr., P. A. Melendez, B. C. Oh, H. G. Lidov, P. O. Hasselgren, W. R. Frontera, J. Lee, D. J. Glass and S. E. Shoelson** (2004).

- "IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice." *Cell* **119**(2): 285-98.
- Calder, P. C.** (2013). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?" *Br J Clin Pharmacol* **75**(3): 645-62.
- Calzada, C., R. Colas, N. Guillot, M. Guichardant, M. Laville, E. Vericel and M. Lagarde** (2010). "Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men." *Atherosclerosis* **208**(2): 467-72.
- Cansell, M., F. Nacka and N. Combe** (2003). "Marine lipid-based liposomes increase in vivo FA bioavailability." *Lipids* **38**(5): 551-9.
- Carnielli, V. P., I. H. Luijendijk, J. B. Van Goudoever, E. J. Sulkers, A. A. Boerlage, H. J. Degenhart and P. J. Sauer** (1996). "Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **23**(5): 553-60.
- Caron, M. A., R. Debigare, P. N. Dekhuijzen and F. Maltais** (2011). "[Diaphragm and skeletal muscle dysfunction in COPD]." *Rev Mal Respir* **28**(10): 1250-64.
- Casaburi, R., S. Bhasin, L. Cosentino, J. Porszasz, A. Somfay, M. I. Lewis, M. Fournier and T. W. Storer** (2004). "Effects of testosterone and resistance training in men with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(8): 870-8.
- Casaburi, R., A. Patessio, F. Ioli, S. Zanaboni, C. F. Donner and K. Wasserman** (1991). "Reductions in exercise lactic acidosis and ventilation as a result of exercise training in patients with obstructive lung disease." *Am Rev Respir Dis* **143**(1): 9-18.
- Celli, B. R., C. G. Cote, J. M. Marin, C. Casanova, M. Montes de Oca, R. A. Mendez, V. Pinto Plata and H. J. Cabral** (2004). "The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease." *N Engl J Med* **350**(10): 1005-12.
- Celli, B. R. and W. MacNee** (2004). "Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper." *Eur Respir J* **23**(6): 932-46.
- Cerci Neto, A., O. F. Ferreira Filho and S. Parreira Jde** (2006). "The relative frequency of hypomagnesemia in outpatients with chronic airflow limitation treated at a referral center in the north of the state of Parana, Brazil." *J Bras Pneumol* **32**(4): 294-300.
- Cesari, M., C. Pedone, D. Chiurco, L. Cortese, M. E. Conte, S. Scarlata and R. A. Incalzi** (2012). "Physical performance, sarcopenia and respiratory function in older patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Age Ageing* **41**(2): 237-41.
- Chaillou, T., N. Koulmann, A. Meunier, A. Malgoyre, B. Serrurier, M. Beaudry and X. Bigard** (2013). "Effect of hypoxia exposure on the phenotypic adaptation in remodelling skeletal muscle submitted to functional overload." *Acta Physiol (Oxf)*.
- Chaillou, T., N. Koulmann, N. Simler, A. Meunier, B. Serrurier, R. Chapot, A. Peinnequin, M. Beaudry and X. Bigard** (2012). "Hypoxia transiently affects skeletal muscle hypertrophy in a functional overload model." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**(5): R643-54.
- Chandel, N. S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C. E. Mathieu, M. C. Simon and P. T. Schumacker** (1998). "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11715-20.
- Chandel, N. S., D. S. McClintock, C. E. Feliciano, T. M. Wood, J. A. Melendez, A. M. Rodriguez and P. T. Schumacker** (2000). "Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing." *J Biol Chem* **275**(33): 25130-8.

- Chaudhary, P., G. Suryakumar, R. Prasad, S. N. Singh, S. Ali and G. Ilavazhagan** (2012). "Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy: role of ubiquitin-proteasome pathway and calpains." *Mol Cell Biochem* **364**(1-2): 101-13.
- Chen, J., Y. Jiang, Y. Liang, X. Tian, C. Peng, K. Y. Ma, J. Liu, Y. Huang and Z. Y. Chen** (2012). "DPA n-3, DPA n-6 and DHA improve lipoprotein profiles and aortic function in hamsters fed a high cholesterol diet." *Atherosclerosis* **221**(2): 397-404.
- Chouabe, C., E. Ricci, J. Amsellem, S. Blaineau, Y. Dalmaz, R. Favier, J. M. Pequignot and R. Bonvallet** (2004). "Effects of aging on the cardiac remodeling induced by chronic high-altitude hypoxia in rat." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(3): H1246-53.
- Chung, S. W., B. Y. Kang, S. H. Kim, Y. K. Pak, D. Cho, G. Trinchieri and T. S. Kim** (2000). "Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B." *J Biol Chem* **275**(42): 32681-7.
- Church, D. F. and W. A. Pryor** (1985). "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications." *Environ Health Perspect* **64**: 111-26.
- Cicero, A. F., A. Reggi, A. Parini and C. Borghi** (2012). "Application of polyunsaturated fatty acids in internal medicine: beyond the established cardiovascular effects." *Arch Med Sci* **8**(5): 784-93.
- Clanton, T. L.** (2007). "Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle." *J Appl Physiol* **102**(6): 2379-88.
- Clark, C. J., L. Cochrane and E. Mackay** (1996). "Low intensity peripheral muscle conditioning improves exercise tolerance and breathlessness in COPD." *Eur Respir J* **9**(12): 2590-6.
- Clark, C. J., L. M. Cochrane, E. Mackay and B. Paton** (2000). "Skeletal muscle strength and endurance in patients with mild COPD and the effects of weight training." *Eur Respir J* **15**(1): 92-7.
- Clavel, S., L. Farout, M. Briand, Y. Briand and P. Jouanel** (2002). "Effect of endurance training and/or fish oil supplemented diet on cytoplasmic fatty acid binding protein in rat skeletal muscles and heart." *Eur J Appl Physiol* **87**(3): 193-201.
- Coen, P. M., S. A. Jubrias, G. Distefano, F. Amati, D. C. Mackey, N. W. Glynn, T. M. Manini, S. E. Wohlgenuth, C. Leeuwenburgh, S. R. Cummings, A. B. Newman, L. Ferrucci, F. G. Toledo, E. Shankland, K. E. Conley and B. H. Goodpaster** (2013). "Skeletal muscle mitochondrial energetics are associated with maximal aerobic capacity and walking speed in older adults." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**(4): 447-55.
- Collins, P. F., M. Elia and R. J. Stratton** (2013). "Nutritional support and functional capacity in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis." *Respirology* **18**(4): 616-29.
- Colomer, R., J. M. Moreno-Nogueira, P. P. Garcia-Luna, P. Garcia-Peris, A. Garcia-de-Lorenzo, A. Zarazaga, L. Quecedo, J. del Llano, L. Usan and C. Casimiro** (2007). "N-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature." *Br J Nutr* **97**(5): 823-31.
- Congleton, J.** (1999). "The pulmonary cachexia syndrome: aspects of energy balance." *Proc Nutr Soc* **58**(2): 321-8.
- Constantin, D., M. K. Menon, L. Houchen-Wolloff, M. D. Morgan, S. J. Singh, P. Greenhaff and M. C. Steiner** (2013). "Skeletal muscle molecular responses to resistance training and dietary supplementation in COPD." *Thorax* **68**(7): 625-33.

- Coppoolse, R., A. M. Schols, E. M. Baarends, R. Mostert, M. A. Akkermans, P. P. Janssen and E. F. Wouters** (1999). "Interval versus continuous training in patients with severe COPD: a randomized clinical trial." *Eur Respir J* **14**(2): 258-63.
- Coronell, C., M. Orozco-Levi, R. Mendez, A. Ramirez-Sarmiento, J. B. Galdiz and J. Gea** (2004). "Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD." *Eur Respir J* **24**(1): 129-36.
- Cortopassi, F., M. Divo, V. Pinto-Plata and B. Celli** (2011). "Resting handgrip force and impaired cardiac function at rest and during exercise in COPD patients." *Respir Med* **105**(5): 748-54.
- Coudert, J. (1976). exercice musculaire et altitude.
- Couet, C., J. Delarue, P. Ritz, J. M. Antoine and F. Lamisse** (1997). "Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults." *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**(8): 637-43.
- Couillard, A., C. Koechlin, J. P. Cristol, A. Varray and C. Prefaut** (2002). "Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients." *Eur Respir J* **20**(5): 1123-9.
- Couillard, A., F. Maltais, D. Saey, R. Debigare, A. Michaud, C. Koechlin, P. LeBlanc and C. Prefaut** (2003). "Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **167**(12): 1664-9.
- Couillard, A. and C. Prefaut** (2005). "From muscle disuse to myopathy in COPD: potential contribution of oxidative stress." *Eur Respir J* **26**(4): 703-19.
- Crane, J. D., M. C. Devries, A. Safdar, M. J. Hamadeh and M. A. Tarnopolsky** (2010). "The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**(2): 119-28.
- Creutzberg, E. C., A. M. Schols, F. C. Bothmer-Quaedvlieg and E. F. Wouters** (1998). "Prevalence of an elevated resting energy expenditure in patients with chronic obstructive pulmonary disease in relation to body composition and lung function." *Eur J Clin Nutr* **52**(6): 396-401.
- Creutzberg, E. C., A. M. Schols, C. A. Weling-Scheepers, W. A. Buurman and E. F. Wouters** (2000). "Characterization of nonresponse to high caloric oral nutritional therapy in depleted patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **161**(3 Pt 1): 745-52.
- Creutzberg, E. C., E. F. Wouters, R. Mostert, R. J. Pluymers and A. M. Schols** (2003). "A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with COPD? A double-blind, placebo-controlled, randomized trial." *Chest* **124**(5): 1733-42.
- Cristovao, C., L. Cristovao, F. Nogueira and M. Bicho** (2013). "Evaluation of the oxidant and antioxidant balance in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease." *Rev Port Pneumol* **19**(2): 70-5.
- Croset, M., E. Vericel, M. Rigaud, M. Hanss, P. Courpron, M. Dechavanne and M. Lagarde** (1990). "Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid." *Thromb Res* **57**(1): 1-12.
- Crul, T., M. A. Spruit, G. Gayan-Ramirez, R. Quarck, R. Gosselink, T. Troosters, F. Pitta and M. Decramer** (2007). "Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients." *Eur J Clin Invest* **37**(11): 897-904.
- Crul, T., D. Testelmans, M. A. Spruit, T. Troosters, R. Gosselink, I. Geeraerts, M. Decramer and G. Gayan-Ramirez** (2010). "Gene expression profiling in vastus lateralis muscle during an acute exacerbation of COPD." *Cell Physiol Biochem* **25**(4-5): 491-500.

- Cruz-Jentoft, A. J., J. P. Baeyens, J. M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F. C. Martin, J. P. Michel, Y. Rolland, S. M. Schneider, E. Topinkova, M. Vandewoude and M. Zamboni** (2010). "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People." *Age Ageing* **39**(4): 412-23.
- Cuthbertson, D., K. Smith, J. Babraj, G. Leese, T. Waddell, P. Atherton, H. Wackerhage, P. M. Taylor and M. J. Rennie** (2005). "Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle." *FASEB J* **19**(3): 422-4.
- D'Alessandro, M. E., A. Chicco, L. Karabatas and Y. B. Lombardo** (2000). "Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil." *J Nutr Biochem* **11**(5): 273-80.
- Daneshrad, Z., M. P. Garcia-Riera, M. Verdys and A. Rossi** (2000). "Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium." *Mol Cell Biochem* **210**(1-2): 159-66.
- Daneshrad, Z., V. Novel-Chate, O. Birot, B. Serrurier, H. Sanchez, A. X. Bigard and A. Rossi** (2001). "Diet restriction plays an important role in the alterations of heart mitochondrial function following exposure of young rats to chronic hypoxia." *Pflugers Arch* **442**(1): 12-8.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha, G. A. Brooks and L. Packer** (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." *Biochem Biophys Res Commun* **107**(4): 1198-205.
- de Batlle, J., J. Sauleda, E. Balcells, F. P. Gomez, M. Mendez, E. Rodriguez, E. Barreiro, J. J. Ferrer, I. Romieu, J. Gea, J. M. Anto and J. Garcia-Aymerich** (2012). "Association between Omega3 and Omega6 fatty acid intakes and serum inflammatory markers in COPD." *J Nutr Biochem* **23**(7): 817-21.
- de La Roque, E. D., E. Thiaudiere, T. Ducret, R. Marthan, J. M. Franconi, C. Guibert and E. Parzy** (2011). "Effect of chronic hypoxia on pulmonary artery blood velocity in rats as assessed by electrocardiography-triggered three-dimensional time-resolved MR angiography." *NMR Biomed* **24**(3): 225-30.
- De Larichaudy, J., A. Zufferli, F. Serra, A. M. Isidori, F. Naro, K. Dessalle, M. Desgeorges, M. Piraud, D. Cheillan, H. Vidal, E. Lefai and G. Nemoz** (2012). "TNF-alpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism." *Skelet Muscle* **2**(1): 2.
- de Theije, C., F. Costes, R. C. Langen, C. Pison and H. R. Gosker** (2011). "Hypoxia and muscle maintenance regulation: implications for chronic respiratory disease." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**(6): 548-53.
- Deacon, S. J., E. E. Vincent, P. L. Greenhaff, J. Fox, M. C. Steiner, S. J. Singh and M. D. Morgan** (2008). "Randomized controlled trial of dietary creatine as an adjunct therapy to physical training in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **178**(3): 233-9.
- Debigare, R., C. H. Cote, F. S. Hould, P. LeBlanc and F. Maltais** (2003). "In vitro and in vivo contractile properties of the vastus lateralis muscle in males with COPD." *Eur Respir J* **21**(2): 273-8.
- Debigare, R., K. Marquis, C. H. Cote, R. R. Tremblay, A. Michaud, P. LeBlanc and F. Maltais** (2003). "Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD." *Chest* **124**(1): 83-9.
- Decramer, M., V. de Bock and R. Dom** (1996). "Functional and histologic picture of steroid-induced myopathy in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(6 Pt 1): 1958-64.

- Decramer, M., R. Gosselink, T. Troosters, M. Verschueren and G. Evers** (1997). "Muscle weakness is related to utilization of health care resources in COPD patients." *Eur Respir J* **10**(2): 417-23.
- Decramer, M., W. Janssens and M. Miravittles** (2012). "Chronic obstructive pulmonary disease." *Lancet* **379**(9823): 1341-51.
- Decramer, M., L. M. Lacquet, R. Fagard and P. Rogiers** (1994). "Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction." *Am J Respir Crit Care Med* **150**(1): 11-6.
- Degens, H., J. M. Sanchez Horneros, Y. F. Heijdra, P. N. Dekhuijzen and M. T. Hopman** (2005). "Skeletal muscle contractility is preserved in COPD patients with normal fat-free mass." *Acta Physiol Scand* **184**(3): 235-42.
- delarue, J.** (2007). "Inflammation et acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3." *objectif nutrition, la lettre de l'institut Danone* **82**.
- Delmonico, M. J., T. B. Harris, M. Visser, S. W. Park, M. B. Conroy, P. Velasquez-Mieyer, R. Boudreau, T. M. Manini, M. Nevitt, A. B. Newman and B. H. Goodpaster** (2009). "Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration." *Am J Clin Nutr* **90**(6): 1579-85.
- Desagher, S. and J. C. Martinou** (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." *Trends Cell Biol* **10**(9): 369-77.
- Dewey, A., C. Baughan, T. Dean, B. Higgins and I. Johnson** (2007). "Eicosapentaenoic acid (EPA, an omega-3 fatty acid from fish oils) for the treatment of cancer cachexia." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD004597.
- Dey, D. K., I. Bosaeus, L. Lissner and B. Steen** (2009). "Changes in body composition and its relation to muscle strength in 75-year-old men and women: a 5-year prospective follow-up study of the NORA cohort in Goteborg, Sweden." *Nutrition* **25**(6): 613-9.
- Diep, Q. N., H. D. Intengan and E. L. Schiffrin** (2000). "Endothelin-1 attenuates omega3 fatty acid-induced apoptosis by inhibition of caspase 3." *Hypertension* **35**(1 Pt 2): 287-91.
- Dietrich, M. O. and T. L. Horvath** (2010). "The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan." *Pflugers Arch* **459**(2): 269-75.
- Donaldson, G. C., T. A. Seemungal, I. S. Patel, A. Bhowmik, T. M. Wilkinson, J. R. Hurst, P. K. Maccallum and J. A. Wedzicha** (2005). "Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD." *Chest* **128**(4): 1995-2004.
- Dornstauder, B., M. Suh, S. Kuny, F. Gaillard, I. M. Macdonald, M. T. Clandinin and Y. Sauve** (2012). "Dietary docosahexaenoic acid supplementation prevents age-related functional losses and A2E accumulation in the retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**(4): 2256-65.
- Doucet, M., A. P. Russell, B. Leger, R. Debigare, D. R. Joanisse, M. A. Caron, P. LeBlanc and F. Maltais** (2007). "Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **176**(3): 261-9.
- Dressel, U., T. L. Allen, J. B. Pippal, P. R. Rohde, P. Lau and G. E. Muscat** (2003). "The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells." *Mol Endocrinol* **17**(12): 2477-93.
- Duclos, M., C. Gouarne, C. Martin, C. Rocher, P. Mormede and T. Letellier** (2004). "Effects of corticosterone on muscle mitochondria identifying different sensitivity to glucocorticoids in Lewis and Fischer rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(2): E159-67.

- Duranteau, J., N. S. Chandel, A. Kulisz, Z. Shao and P. T. Schumacker** (1998). "Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes." *J Biol Chem* **273**(19): 11619-24.
- Duteil, D., C. Chambon, F. Ali, R. Malivindi, J. Zoll, S. Kato, B. Geny, P. Chambon and D. Metzger** (2010). "The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles." *Cell Metab* **12**(5): 496-508.
- Eagan, T. M., P. Aukrust, T. Ueland, J. A. Hardie, A. Johannessen, T. E. Mollnes, J. K. Damas, P. S. Bakke and P. D. Wagner** (2010). "Body composition and plasma levels of inflammatory biomarkers in COPD." *Eur Respir J* **36**(5): 1027-33.
- Eaton, S. B. and M. Konner** (1985). "Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications." *N Engl J Med* **312**(5): 283-9.
- Efthimiou, J., J. Fleming, C. Gomes and S. G. Spiro** (1988). "The effect of supplementary oral nutrition in poorly nourished patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am Rev Respir Dis* **137**(5): 1075-82.
- Ehrenborg, E. and A. Krook** (2009). "Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta." *Pharmacol Rev* **61**(3): 373-93.
- Eisner, M. D., N. Anthonisen, D. Coultas, N. Kuenzli, R. Perez-Padilla, D. Postma, I. Romieu, E. K. Silverman and J. R. Balmes** (2010). "An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **182**(5): 693-718.
- Ekman, M. J., M. Klintenberg, U. Bjorck, F. Norstrom and M. Ridderstrale** (2013). "Six-minute walk test before and after a weight reduction program in obese subjects." *Obesity (Silver Spring)* **21**(3): E236-43.
- El-Khoury, R., A. Bradford and K. D. O'Halloran** (2012). "Chronic hypobaric hypoxia increases isolated rat fast-twitch and slow-twitch limb muscle force and fatigue." *Physiol Res* **61**(2): 195-201.
- Eldho, N. V., S. E. Feller, S. Tristram-Nagle, I. V. Polozov and K. Gawrisch** (2003). "Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid-differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond." *J Am Chem Soc* **125**(21): 6409-21.
- Eliason, G., S. M. Abdel-Halim, K. Piehl-Aulin and F. Kadi** (2010). "Alterations in the muscle-to-capillary interface in patients with different degrees of chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Res* **11**: 97.
- Eltzschig, H. K. and P. Carmeliet** (2011). "Hypoxia and inflammation." *N Engl J Med* **364**(7): 656-65.
- Engelen, M. P., N. E. Deutz, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2000). "Enhanced levels of whole-body protein turnover in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(4 Pt 1): 1488-92.
- Engelen, M. P., A. M. Schols, W. C. Baken, G. J. Wesseling and E. F. Wouters** (1994). "Nutritional depletion in relation to respiratory and peripheral skeletal muscle function in out-patients with COPD." *Eur Respir J* **7**(10): 1793-7.
- Ertel, W., M. H. Morrison, A. Ayala and I. H. Chaudry** (1995). "Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release." *Am J Physiol* **269**(1 Pt 2): R160-6.
- Ervin, R. B., J. D. Wright, C. Y. Wang and J. Kennedy-Stephenson** (2004). "Dietary intake of fats and fatty acids for the United States population: 1999-2000." *Adv Data*(348): 1-6.

- Esteva, S., P. Panisello, J. R. Torrella, T. Pages and G. Viscor** (2009). "Blood rheology adjustments in rats after a program of intermittent exposure to hypobaric hypoxia." *High Alt Med Biol* **10**(3): 275-81.
- Evans, W. J., J. E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W. E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F. Rossi Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe and S. D. Anker** (2008). "Cachexia: a new definition." *Clin Nutr* **27**(6): 793-9.
- Ezzati, M. and A. D. Lopez** (2003). "Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000." *Lancet* **362**(9387): 847-52.
- Faager, G., K. Soderlund, C. M. Skold, S. Rundgren, A. Tollback and P. Jakobsson** (2006). "Creatine supplementation and physical training in patients with COPD: a double blind, placebo-controlled study." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **1**(4): 445-53.
- Fabbri, L. M. and K. F. Rabe** (2007). "From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome?" *Lancet* **370**(9589): 797-9.
- Fahrman, J. F., O. F. Ballester, G. Ballester, T. R. Witte, A. J. Salazar, B. Kordusky, K. G. Cowen, G. Ion, D. A. Primerano, G. Boskovic, J. Denvir and W. E. Hardman** (2013). "Inhibition of nuclear factor kappa B activation in early-stage chronic lymphocytic leukemia by omega-3 fatty acids." *Cancer Invest* **31**(1): 24-38.
- Faloon, G. R. and P. A. Srere** (1969). "Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties." *Biochemistry* **8**(11): 4497-503.
- Fasshauer, M., R. Paschke and M. Stumvoll** (2004). "Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease." *Biochimie* **86**(11): 779-84.
- Faucher, M., C. Guillot, T. Marqueste, N. Kipson, M. H. Mayet-Sornay, D. Desplanches, Y. Jammes and M. Badier** (2005). "Matched adaptations of electrophysiological, physiological, and histological properties of skeletal muscles in response to chronic hypoxia." *Pflugers Arch* **450**(1): 45-52.
- Faure P, L. J.** (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. . *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, Birkhäuser Basel: 237-248.
- Favier, F. B., F. Costes, A. Defour, R. Bonnefoy, E. Lefai, S. Bauge, A. Peinnequin, H. Benoit and D. Freyssenet** (2010). "Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**(6): R1659-66.
- Fearon, K. C., M. F. Von Meyenfeldt, A. G. Moses, R. Van Geenen, A. Roy, D. J. Gouma, A. Giacosa, A. Van Gossum, J. Bauer, M. D. Barber, N. K. Aaronson, A. C. Voss and M. J. Tisdale** (2003). "Effect of a protein and energy dense N-3 fatty acid enriched oral supplement on loss of weight and lean tissue in cancer cachexia: a randomised double blind trial." *Gut* **52**(10): 1479-86.
- Feenstra, T. L., M. L. van Genugten, R. T. Hoogenveen, E. F. Wouters and M. P. Rutten-van Molken** (2001). "The impact of aging and smoking on the future burden of chronic obstructive pulmonary disease: a model analysis in the Netherlands." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(4): 590-6.
- Feige, J. N., L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne and W. Wahli** (2006). "From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions." *Prog Lipid Res* **45**(2): 120-59.

- Feller, S. E. and K. Gawrisch** (2005). "Properties of docosahexaenoic-acid-containing lipids and their influence on the function of rhodopsin." *Curr Opin Struct Biol* **15**(4): 416-22.
- Fermoselle, C., R. Rabinovich, P. Ausin, E. Puig-Vilanova, C. Coronell, F. Sanchez, J. Roca, J. Gea and E. Barreiro** (2012). "Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients?" *Eur Respir J* **40**(4): 851-62.
- Ferreira, I. M., D. Brooks, Y. Lacasse and R. S. Goldstein** (2000). "Nutritional support for individuals with COPD: a meta-analysis." *Chest* **117**(3): 672-8.
- Ferreira, I. M., D. Brooks, J. White and R. Goldstein** (2012). "Nutritional supplementation for stable chronic obstructive pulmonary disease." *Cochrane Database Syst Rev* **12**: CD000998.
- Ferreira, I. M., I. T. Verreschi, L. E. Nery, R. S. Goldstein, N. Zamel, D. Brooks and J. R. Jardim** (1998). "The influence of 6 months of oral anabolic steroids on body mass and respiratory muscles in undernourished COPD patients." *Chest* **114**(1): 19-28.
- Ferrucci, L., A. Cherubini, S. Bandinelli, B. Bartali, A. Corsi, F. Lauretani, A. Martin, C. Andres-Lacueva, U. Senin and J. M. Guralnik** (2006). "Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(2): 439-46.
- Fetterman, J. W., Jr. and M. M. Zdanowicz** (2009). "Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease." *Am J Health Syst Pharm* **66**(13): 1169-79.
- Fiacadori, E., S. Del Canale, P. Vitali, E. Coffrini, N. Ronda and A. Guariglia** (1987). "Skeletal muscle energetics, acid-base equilibrium and lactate metabolism in patients with severe hypercapnia and hypoxemia." *Chest* **92**(5): 883-7.
- Finklea, J. D., R. E. Grossmann and V. Tangpricha** (2011). "Vitamin D and chronic lung disease: a review of molecular mechanisms and clinical studies." *Adv Nutr* **2**(3): 244-53.
- Finlin, B. S., V. Varma, G. T. Nolen, J. Dube, C. P. Starnes, N. Rasouli, P. A. Kern and C. A. Peterson** (2011). "DHA reduces the atrophy-associated Fn14 protein in differentiated myotubes during coculture with macrophages." *J Nutr Biochem* **23**(8): 885-91.
- Fitzpatrick, S. F., M. M. Tambuwala, U. Bruning, B. Schaible, C. C. Scholz, A. Byrne, A. O'Connor, W. M. Gallagher, C. R. Lenihan, J. F. Garvey, K. Howell, P. G. Fallon, E. P. Cummins and C. T. Taylor** (2011). "An intact canonical NF-kappaB pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia." *J Immunol* **186**(2): 1091-6.
- Flachs, P., V. Mohamed-Ali, O. Horakova, M. Rossmeisl, M. J. Hosseinzadeh-Attar, M. Hensler, J. Ruzickova and J. Kopecky** (2006). "Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet." *Diabetologia* **49**(2): 394-7.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley** (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* **226**(1): 497-509.
- Fournier, M., A. B. Tonnel, B. Housset, G. Huchon, P. Godard, D. Vervloet, D. Huas, I. Durand-Zaleski, I. Chanal and C. Pribil** (2005). "[Economic burden of COPD: the SCOPE study]." *Rev Mal Respir* **22**(2 Pt 1): 247-55.
- Franssen, F. M., R. Broekhuizen, P. P. Janssen, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2005). "Limb muscle dysfunction in COPD: effects of muscle wasting and exercise training." *Med Sci Sports Exerc* **37**(1): 2-9.
- Franssen, F. M., E. F. Wouters and A. M. Schols** (2002). "The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases." *Clin Nutr* **21**(1): 1-14.

- Frontera, W. R., V. A. Hughes, R. A. Fielding, M. A. Fiatarone, W. J. Evans and R. Roubenoff** (2000). "Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study." *J Appl Physiol* **88**(4): 1321-6.
- Fuhrman, C. and M. C. Delmas** (2010). "[Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in France]." *Rev Mal Respir* **27**(2): 160-8.
- Fuld, J. P., L. P. Kilduff, J. A. Neder, Y. Pitsiladis, M. E. Lean, S. A. Ward and M. M. Cotton** (2005). "Creatine supplementation during pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **60**(7): 531-7.
- Gagnon, P., D. Saey, I. Vivodtzev, L. Laviolette, V. Mainguy, J. Milot, S. Provencher and F. Maltais** (2009). "Impact of preinduced quadriceps fatigue on exercise response in chronic obstructive pulmonary disease and healthy subjects." *J Appl Physiol* **107**(3): 832-40.
- Galbes, O., L. Goret, C. Caillaud, J. Mercier, P. Obert, R. Candau and G. Py** (2008). "Combined effects of hypoxia and endurance training on lipid metabolism in rat skeletal muscle." *Acta Physiol (Oxf)* **193**(2): 163-73.
- Gamboa, J. L. and F. H. Andrade** "Muscle endurance and mitochondrial function after chronic normobaric hypoxia: contrast of respiratory and limb muscles." *Pflugers Arch* **463**(2): 327-38.
- Gamboa, J. L. and F. H. Andrade** (2012). "Muscle endurance and mitochondrial function after chronic normobaric hypoxia: contrast of respiratory and limb muscles." *Pflugers Arch* **463**(2): 327-38.
- Gan, W. Q., S. F. Man, A. Senthilselvan and D. D. Sin** (2004). "Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis." *Thorax* **59**(7): 574-80.
- Garcia-Aymerich, J., P. Lange, M. Benet, P. Schnohr and J. M. Anto** (2006). "Regular physical activity reduces hospital admission and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a population based cohort study." *Thorax* **61**(9): 772-8.
- Garrod, R., J. Marshall, E. Barley and P. W. Jones** (2006). "Predictors of success and failure in pulmonary rehabilitation." *Eur Respir J* **27**(4): 788-94.
- Gayan-Ramirez, G. and M. Decramer** (2013). "Mechanisms of striated muscle dysfunction during acute exacerbations of COPD." *J Appl Physiol* **114**(9): 1291-9.
- Gea, J. G., M. Pasto, M. A. Carmona, M. Orozco-Levi, J. Palomeque and J. Broquetas** (2001). "Metabolic characteristics of the deltoid muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **17**(5): 939-45.
- Gertz, I., G. Hedenstierna, G. Hellers and J. Wahren** (1977). "Muscle metabolism in patients with chronic obstructive lung disease and acute respiratory failure." *Clin Sci Mol Med* **52**(4): 396-403.
- Gilson, H., O. Schakman, L. Combaret, P. Lause, L. Grobet, D. Attaix, J. M. Ketelslegers and J. P. Thissen** (2007). "Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy." *Endocrinology* **148**(1): 452-60.
- Gingras, A. A., P. J. White, P. Y. Chouinard, P. Julien, T. A. Davis, L. Dombrowski, Y. Couture, P. Dubreuil, A. Myre, K. Bergeron, A. Marette and M. C. Thivierge** (2007). "Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt-mTOR-S6K1 pathway and insulin sensitivity." *J Physiol* **579**(Pt 1): 269-84.
- Glass, D. J.** (2005). "Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(10): 1974-84.
- Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech and J. Vina** (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training." *Free Radic Biol Med* **44**(2): 126-31.

- Gomez-Cabrera, M. C., F. V. Pallardo, J. Sastre, J. Vina and L. Garcia-del-Moral** (2003). "Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France." *JAMA* **289**(19): 2503-4.
- Gomez, B., Jr. and N. C. Robinson** (1999). "Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1." *Biochemistry* **38**(28): 9031-8.
- Gonzalez-Periz, A., A. Planaguma, K. Gronert, R. Miquel, M. Lopez-Parra, E. Titos, R. Horrillo, N. Ferre, R. Deulofeu, V. Arroyo, J. Rodes and J. Claria** (2006). "Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA." *FASEB J* **20**(14): 2537-9.
- Goodpaster, B. H., A. Katsiaras and D. E. Kelley** (2003). "Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity." *Diabetes* **52**(9): 2191-7.
- Gosker, H. R., A. Bast, G. R. Haenen, M. A. Fischer, G. J. van der Vusse, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2005). "Altered antioxidant status in peripheral skeletal muscle of patients with COPD." *Respir Med* **99**(1): 118-25.
- Gosker, H. R., M. P. Engelen, H. van Mameren, P. J. van Dijk, G. J. van der Vusse, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2002). "Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Clin Nutr* **76**(1): 113-9.
- Gosker, H. R., M. K. Hesselink, H. Duimel, K. A. Ward and A. M. Schols** (2007). "Reduced mitochondrial density in the vastus lateralis muscle of patients with COPD." *Eur Respir J* **30**(1): 73-9.
- Gosker, H. R., B. Kubat, G. Schaart, G. J. van der Vusse, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2003). "Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **22**(2): 280-5.
- Gosker, H. R., N. H. Lencer, F. M. Franssen, G. J. van der Vusse, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2003). "Striking similarities in systemic factors contributing to decreased exercise capacity in patients with severe chronic heart failure or COPD." *Chest* **123**(5): 1416-24.
- Gosker, H. R., H. van Mameren, P. J. van Dijk, M. P. Engelen, G. J. van der Vusse, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2002). "Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **19**(4): 617-25.
- Gosker, H. R., E. F. Wouters, G. J. van der Vusse and A. M. Schols** (2000). "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives." *Am J Clin Nutr* **71**(5): 1033-47.
- Gosker, H. R., M. P. Zeegers, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2007). "Muscle fibre type shifting in the vastus lateralis of patients with COPD is associated with disease severity: a systematic review and meta-analysis." *Thorax* **62**(11): 944-9.
- Gosselink, R., T. Troosters and M. Decramer** (1996). "Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(3): 976-80.
- Green, H. J., E. Bombardier, M. Burnett, S. Iqbal, C. L. D'Arsigny, D. E. O'Donnell, J. Ouyang and K. A. Webb** (2008). "Organization of metabolic pathways in vastus lateralis of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**(3): R935-41.
- Green, H. J., J. R. Sutton, A. Cymerman, P. M. Young and C. S. Houston** (1989). "Operation Everest II: adaptations in human skeletal muscle." *J Appl Physiol* **66**(5): 2454-61.

- Greer, E. L., M. R. Banko and A. Brunet** (2009). "AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity." *Ann N Y Acad Sci* **1170**: 688-92.
- Gronn, M., E. Christensen, T. A. Hagve and B. O. Christophersen** (1991). "Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells." *Biochim Biophys Acta* **1081**(1): 85-91.
- Guell, R., P. Casan, J. Belda, M. Sangenis, F. Morante, G. H. Guyatt and J. Sanchis** (2000). "Long-term effects of outpatient rehabilitation of COPD: A randomized trial." *Chest* **117**(4): 976-83.
- Guerrero, K., B. Wuyam, P. Mezin, I. Vivodtzev, M. Vendelin, J. C. Borel, R. Hacini, O. Chavanon, S. Imbeaud, V. Saks and C. Pison** (2005). "Functional coupling of adenine nucleotide translocase and mitochondrial creatine kinase is enhanced after exercise training in lung transplant skeletal muscle." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(4): R1144-54.
- Guezennec, C. Y., J. F. Nadaud, P. Satabin, F. Leger and P. Lafargue** (1989). "Influence of polyunsaturated fatty acid diet on the hemorrheological response to physical exercise in hypoxia." *Int J Sports Med* **10**(4): 286-91.
- Gunter, T. E. and D. R. Pfeiffer** (1990). "Mechanisms by which mitochondria transport calcium." *Am J Physiol* **258**(5 Pt 1): C755-86.
- Guo, W., W. Xie, T. Lei and J. A. Hamilton** (2005). "Eicosapentaenoic acid, but not oleic acid, stimulates beta-oxidation in adipocytes." *Lipids* **40**(8): 815-21.
- Guralnik, J. M., L. Ferrucci, E. M. Simonsick, M. E. Salive and R. B. Wallace** (1995). "Lower-extremity function in persons over the age of 70 years as a predictor of subsequent disability." *N Engl J Med* **332**(9): 556-61.
- Gurgun, A., S. Deniz, M. Argin and H. Karapolat** (2013). "Effects of nutritional supplementation combined with conventional pulmonary rehabilitation in muscle-wasted chronic obstructive pulmonary disease: a prospective, randomized and controlled study." *Respirology* **18**(3): 495-500.
- Guttridge, D. C., M. W. Mayo, L. V. Madrid, C. Y. Wang and A. S. Baldwin, Jr.** (2000). "NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia." *Science* **289**(5488): 2363-6.
- Guzun, R., B. Aguilaniu, B. Wuyam, P. Mezin, C. Koechlin-Ramonatxo, C. Auffray, V. Saks and C. Pison** (2012). "Effects of training at mild exercise intensities on quadriceps muscle energy metabolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Acta Physiol (Oxf)* **205**(2): 236-46.
- Guzun, R., M. Gonzalez-Granillo, M. Karu-Varikmaa, A. Grichine, Y. Usson, T. Kaambre, K. Guerrero-Roesch, A. Kuznetsov, U. Schlattner and V. Saks** (2012). "Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome." *Biochim Biophys Acta* **1818**(6): 1545-54.
- Ha, H., P. Hajek, D. M. Bedwell and P. D. Burrows** (1993). "A mitochondrial porin cDNA predicts the existence of multiple human porins." *J Biol Chem* **268**(16): 12143-9.
- Habouzit, E., H. Richard, H. Sanchez, N. Koulmann, B. Serrurier, R. Monnet, R. Ventura-Clapier and X. Bigard** (2009). "Decreased muscle ACE activity enhances functional response to endurance training in rats, without change in muscle oxidative capacity or contractile phenotype." *J Appl Physiol* **107**(1): 346-53.
- Halliwell, B.** (1989). "Tell me about free radicals, doctor: a review." *J R Soc Med* **82**(12): 747-52.

- Hamilton, A. L., K. J. Killian, E. Summers and N. L. Jones** (1995). "Muscle strength, symptom intensity, and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders." *Am J Respir Crit Care Med* **152**(6 Pt 1): 2021-31.
- Hamilton, A. L., K. J. Killian, E. Summers and N. L. Jones** (1996). "Symptom intensity and subjective limitation to exercise in patients with cardiorespiratory disorders." *Chest* **110**(5): 1255-63.
- Hardie, D. G.** (2011). "AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function." *Genes Dev* **25**(18): 1895-908.
- Hardie, D. G. and D. A. Pan** (2002). "Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 1064-70.
- Hardin, B. J., K. S. Campbell, J. D. Smith, S. Arbogast, J. Smith, J. S. Moylan and M. B. Reid** (2008). "TNF-alpha acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force in murine skeletal muscle." *J Appl Physiol* **104**(3): 694-9.
- Harris, W. S.** (2006). "The omega-6/omega-3 ratio and cardiovascular disease risk: uses and abuses." *Curr Atheroscler Rep* **8**(6): 453-9.
- Hartmann, G., M. Tschop, R. Fischer, C. Bidlingmaier, R. Riepl, K. Tschop, H. Hautmann, S. Endres and M. Toepfer** (2000). "High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein." *Cytokine* **12**(3): 246-52.
- Haworth, R. A. and D. R. Hunter** (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site." *Arch Biochem Biophys* **195**(2): 460-7.
- Hayot, M., J. Rodriguez, B. Vernus, G. Carnac, E. Jean, D. Allen, L. Goret, P. Obert, R. Candau and A. Bonnieu** (2011). "Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli." *Mol Cell Endocrinol* **332**(1-2): 38-47.
- Helge, J. W., B. J. Wu, M. Willer, J. R. Dugaard, L. H. Storlien and B. Kiens** (2001). "Training affects muscle phospholipid fatty acid composition in humans." *J Appl Physiol* **90**(2): 670-7.
- Henin, N., M. F. Vincent, H. E. Gruber and G. Van den Berghe** (1995). "Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase." *FASEB J* **9**(7): 541-6.
- Hikida, R. S., R. S. Staron, F. C. Hagerman, S. Walsh, E. Kaiser, S. Shell and S. Hervey** (2000). "Effects of high-intensity resistance training on untrained older men. II. Muscle fiber characteristics and nucleo-cytoplasmic relationships." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**(7): B347-54.
- Hirayama, F., A. H. Lee, C. W. Binns, N. Hiramatsu, M. Mori and K. Nishimura** (2010). "Dietary intake of isoflavones and polyunsaturated fatty acids associated with lung function, breathlessness and the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease: possible protective effect of traditional Japanese diet." *Mol Nutr Food Res* **54**(7): 909-17.
- Hollander, J., R. Fiebig, M. Gore, J. Bejma, T. Ookawara, H. Ohno and L. L. Ji** (1999). "Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training." *Am J Physiol* **277**(3 Pt 2): R856-62.
- Hollander, J., R. Fiebig, M. Gore, T. Ookawara, H. Ohno and L. L. Ji** (2001). "Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle." *Pflugers Arch* **442**(3): 426-34.
- Hong, S., K. Gronert, P. R. Devchand, R. L. Moussignac and C. N. Serhan** (2003). "Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation." *J Biol Chem* **278**(17): 14677-87.

- Hooijmans, C. R., C. E. Van der Zee, P. J. Dederen, K. M. Brouwer, Y. D. Reijmer, T. van Groen, L. M. Broersen, D. Lutjohann, A. Heerschap and A. J. Kiliaan** (2009). "DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APPswe/PS1dE9 mice." *Neurobiol Dis* **33**(3): 482-98.
- Hopkinson, N. S., W. D. Man, M. J. Dayer, E. T. Ross, A. H. Nickol, N. Hart, J. Moxham and M. I. Polkey** (2004). "Acute effect of oral steroids on muscle function in chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **24**(1): 137-42.
- Hopkinson, N. S., A. H. Nickol, J. Payne, E. Hawe, W. D. Man, J. Moxham, H. Montgomery and M. I. Polkey** (2004). "Angiotensin converting enzyme genotype and strength in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(4): 395-9.
- Hopkinson, N. S., R. C. Tennant, M. J. Dayer, E. B. Swallow, T. T. Hansel, J. Moxham and M. I. Polkey** (2007). "A prospective study of decline in fat free mass and skeletal muscle strength in chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Res* **8**: 25.
- Hoppeler, H., H. Howald and P. Cerretelli** (1990). "Human muscle structure after exposure to extreme altitude." *Experientia* **46**(11-12): 1185-7.
- Hoppeler, H., E. Kleinert, C. Schlegel, H. Claassen, H. Howald, S. R. Kayar and P. Cerretelli** (1990). "Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia." *Int J Sports Med* **11 Suppl 1**: S3-9.
- Hoppeler, H. and E. R. Weibel** (2000). "Structural and functional limits for oxygen supply to muscle." *Acta Physiol Scand* **168**(4): 445-56.
- Howald, H., H. Hoppeler, H. Claassen, O. Mathieu and R. Straub** (1985). "Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans." *Pflugers Arch* **403**(4): 369-76.
- Hoyer, H. E. and H. Lippert** (1982). "Biomechanical changes in long limb bones of HAN-Wistar rats during postnatal development." *Anat Embryol (Berl)* **164**(1): 101-11.
- Huang, X. F., X. Xin, P. McLennan and L. Storlien** (2004). "Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression." *Diabetes Obes Metab* **6**(1): 35-44.
- Hunter, D. R. and R. A. Haworth** (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms." *Arch Biochem Biophys* **195**(2): 453-9.
- Hunter, D. R. and R. A. Haworth** (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release." *Arch Biochem Biophys* **195**(2): 468-77.
- Hunter, D. R., R. A. Haworth and J. H. Southard** (1976). "Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria." *J Biol Chem* **251**(16): 5069-77.
- Hunter, R. B., E. Stevenson, A. Koncarevic, H. Mitchell-Felton, D. A. Essig and S. C. Kandarian** (2002). "Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy." *FASEB J* **16**(6): 529-38.
- Ichinose, M., H. Sugiura, S. Yamagata, A. Koarai, M. Tomaki, H. Ogawa, Y. Komaki, P. J. Barnes, K. Shirato and T. Hattori** (2003). "Xanthine oxidase inhibition reduces reactive nitrogen species production in COPD airways." *Eur Respir J* **22**(3): 457-61.
- Ide, T., H. Kobayashi, L. Ashakumary, I. A. Rouyer, Y. Takahashi, T. Aoyama, T. Hashimoto and M. Mizugaki** (2000). "Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver." *Biochim Biophys Acta* **1485**(1): 23-35.
- Irving, G. F., Y. Freund-Levi, M. Eriksdotter-Jonhagen, H. Basun, K. Brismar, E. Hjorth, J. Palmblad, B. Vessby, I. Vedin, L. O. Wahlund and T. Cederholm** (2009). "Omega-3 fatty acid supplementation effects on weight and appetite in patients

- with Alzheimer's disease: the omega-3 Alzheimer's disease study." *J Am Geriatr Soc* **57**(1): 11-7.
- Itoh, K., T. Moritani, K. Ishida, C. Hirofuji, S. Taguchi and M. Itoh** (1990). "Hypoxia-induced fibre type transformation in rat hindlimb muscles. Histochemical and electromechanical changes." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **60**(5): 331-6.
- Jackson, P. A., J. L. Reay, A. B. Scholey and D. O. Kennedy** (2012). "DHA-rich oil modulates the cerebral haemodynamic response to cognitive tasks in healthy young adults: a near IR spectroscopy pilot study." *Br J Nutr* **107**(8): 1093-8.
- Jacobs, R. A., R. Boushel, C. Wright-Paradis, J. A. Calbet, P. Robach, E. Gnaiger and C. Lundby** (2013). "Mitochondrial function in human skeletal muscle following high-altitude exposure." *Exp Physiol* **98**(1): 245-55.
- Jakobsson, P., L. Jorfeldt and A. Brundin** (1990). "Skeletal muscle metabolites and fibre types in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), with and without chronic respiratory failure." *Eur Respir J* **3**(2): 192-6.
- Jakobsson, P., L. Jorfeldt and J. Henriksson** (1995). "Metabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **151**(2 Pt 1): 374-7.
- Janssen-Heininger, Y. M., I. Macara and B. T. Mossman** (1999). "Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)-kappaB: requirement of Ras/mitogen-activated protein kinases in the activation of NF-kappaB by oxidants." *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**(5): 942-52.
- Janssen, S. P., G. Gayan-Ramirez, A. Van den Bergh, P. Herijgers, K. Maes, E. Verbeken and M. Decramer** (2005). "Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats." *Circulation* **111**(8): 996-1005.
- Jatta, K., G. Eliason, G. M. Portela-Gomes, L. Grimelius, O. Caro, L. Nilholm, A. Sirjso, K. Piehl-Aulin and S. M. Abdel-Halim** (2009). "Overexpression of von Hippel-Lindau protein in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *J Clin Pathol* **62**(1): 70-6.
- Jeukendrup, A. E. and S. Aldred** (2004). "Fat supplementation, health, and endurance performance." *Nutrition* **20**(7-8): 678-88.
- Ji, L. L., M. C. Gomez-Cabrera, N. Steinhafel and J. Vina** (2004). "Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle." *FASEB J* **18**(13): 1499-506.
- Jiang, N., G. Zhang, H. Bo, J. Qu, G. Ma, D. Cao, L. Wen, S. Liu, L. L. Ji and Y. Zhang** (2009). "Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function." *Free Radic Biol Med* **46**(2): 138-45.
- Jing, K., K. S. Song, S. Shin, N. Kim, S. Jeong, H. R. Oh, J. H. Park, K. S. Seo, J. Y. Heo, J. Han, J. I. Park, C. Han, T. Wu, G. R. Kweon, S. K. Park, W. H. Yoon, B. D. Hwang and K. Lim** (2011). "Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53." *Autophagy* **7**(11): 1348-58.
- Jonker, R., N. E. Deutz, M. L. Erbland, P. J. Anderson and M. P. Engelen** (2013). "Hydrolyzed casein and whey protein meals comparably stimulate net whole-body protein synthesis in COPD patients with nutritional depletion without an additional effect of leucine co-ingestion." *Clin Nutr*.
- Joseph, A. M., P. J. Adhietty, T. W. Buford, S. E. Wohlgemuth, H. A. Lees, L. M. Nguyen, J. M. Aranda, B. D. Sandesara, M. Pahor, T. M. Manini, E. Marzetti and C. Leeuwenburgh** (2012). "The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals." *Aging Cell* **11**(5): 801-9.

- Juaneda, P., G. Rocquelin and P. O. Astorg** (1990). "Separation and quantification of heart and liver phospholipid classes by high-performance liquid chromatography using a new light-scattering detector." *Lipids* **25**(11): 756-9.
- Kabir, M., G. Skurnik, N. Naour, V. Pechtner, E. Meugnier, S. Rome, A. Quignard-Boulangé, H. Vidal, G. Slama, K. Clement, M. Guerre-Millo and S. W. Rizkalla** (2007). "Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study." *Am J Clin Nutr* **86**(6): 1670-9.
- Kaiser, F. E., A. J. Silver and J. E. Morley** (1991). "The effect of recombinant human growth hormone on malnourished older individuals." *J Am Geriatr Soc* **39**(3): 235-40.
- Kamada, T., S. Tokuda, S. Aozaki and S. Otsuji** (1993). "Higher levels of erythrocyte membrane fluidity in sprinters and long-distance runners." *J Appl Physiol* **74**(1): 354-8.
- Karadag, F., H. Ozcan, A. B. Karul, M. Yilmaz and O. Cildag** (2009). "Sex hormone alterations and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease." *Int J Clin Pract* **63**(2): 275-81.
- Kayyali, U. S., C. Donaldson, H. Huang, R. Abdelnour and P. M. Hassoun** (2001). "Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia." *J Biol Chem* **276**(17): 14359-65.
- Keller, H., C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato and W. Wahli** (1993). "Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers." *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(6): 2160-4.
- Kennedy, E. P. and A. L. Lehninger** (1950). "The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria." *J Biol Chem* **185**(1): 275-85.
- Kent, B. D., P. D. Mitchell and W. T. McNicholas** "Hypoxemia in patients with COPD: cause, effects, and disease progression." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **6**: 199-208.
- Keranis, E., D. Makris, P. Rodopoulou, H. Martinou, G. Papamakarios, Z. Daniil, E. Zintzaras and K. I. Gourgoulialis** (2010). "Impact of dietary shift to higher-antioxidant foods in COPD: a randomised trial." *Eur Respir J* **36**(4): 774-80.
- Kew, S., M. D. Mesa, S. Tricon, R. Buckley, A. M. Minihane and P. Yaquob** (2004). "Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans." *Am J Clin Nutr* **79**(4): 674-81.
- Khairallah, R. J., J. Kim, K. M. O'Shea, K. A. O'Connell, B. H. Brown, T. Galvao, C. Daneault, C. Des Rosiers, B. M. Polster, C. L. Hoppel and W. C. Stanley** (2012). "Improved mitochondrial function with diet-induced increase in either docosahexaenoic acid or arachidonic acid in membrane phospholipids." *PLoS One* **7**(3): e34402.
- Khairallah, R. J., K. M. O'Shea, B. H. Brown, N. Khanna, C. Des Rosiers and W. C. Stanley** (2010). "Treatment with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, delays Ca²⁺-induced mitochondria permeability transition in normal and hypertrophied myocardium." *J Pharmacol Exp Ther* **335**(1): 155-62.
- Khairallah, R. J., G. C. Sparagna, N. Khanna, K. M. O'Shea, P. A. Hecker, T. Kristian, G. Fiskum, C. Des Rosiers, B. M. Polster and W. C. Stanley** (2010). "Dietary supplementation with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, dramatically alters cardiac mitochondrial phospholipid fatty acid composition and prevents permeability transition." *Biochim Biophys Acta* **1797**(8): 1555-62.
- Kim, H. J., M. Takahashi and O. Ezaki** (1999). "Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c

- mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs." *J Biol Chem* **274**(36): 25892-8.
- Klausen, T., N. V. Olsen, T. D. Poulsen, J. P. Richalet and B. K. Pedersen** (1997). "Hypoxemia increases serum interleukin-6 in humans." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **76**(5): 480-2.
- Klenk, E. and H. Mohrhauer** (1960). "[Studies on the metabolism of polyenoic fatty acids in the rat]." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **320**: 218-32.
- Kliwer, S. A., S. S. Sundseth, S. A. Jones, P. J. Brown, G. B. Wisely, C. S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T. M. Willson, J. M. Lenhard and J. M. Lehmann** (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4318-23.
- Koechlin, C., A. Couillard, J. P. Cristol, P. Chanez, M. Hayot, D. Le Gallais and C. Prefaut** (2004). "Does systemic inflammation trigger local exercise-induced oxidative stress in COPD?" *Eur Respir J* **23**(4): 538-44.
- Koechlin, C., A. Couillard, D. Simar, J. P. Cristol, H. Bellet, M. Hayot and C. Prefaut** (2004). "Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease?" *Am J Respir Crit Care Med* **169**(9): 1022-7.
- Koechlin, C., F. Maltais, D. Saey, A. Michaud, P. LeBlanc, M. Hayot and C. Prefaut** (2005). "Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **60**(10): 834-41.
- Koehler, F., W. Doehner, S. Hoernig, C. Witt, S. D. Anker and M. John** (2007). "Anorexia in chronic obstructive pulmonary disease--association to cachexia and hormonal derangement." *Int J Cardiol* **119**(1): 83-9.
- Kolar, F. and B. Ostadal** (1991). "Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension." *Pflugers Arch* **419**(2): 121-6.
- Komaki, Y., H. Sugiura, A. Koarai, M. Tomaki, H. Ogawa, T. Akita, T. Hattori and M. Ichinose** (2005). "Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways." *Pulm Pharmacol Ther* **18**(4): 297-302.
- Komatsu, W., K. Ishihara, M. Murata, H. Saito and K. Shinohara** (2003). "Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **34**(8): 1006-16.
- Kondo, K. and W. G. Kaelin, Jr.** (2001). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene." *Exp Cell Res* **264**(1): 117-25.
- Koritzinsky, M., K. M. Rouschop, T. van den Beucken, M. G. Magagnin, K. Savelkouls, P. Lambin and B. G. Wouters** (2007). "Phosphorylation of eIF2alpha is required for mRNA translation inhibition and survival during moderate hypoxia." *Radiother Oncol* **83**(3): 353-61.
- Kortianou, E. A., I. G. Nasis, S. T. Spetsioti, A. M. Daskalakis and I. Vogiatzis** (2010). "Effectiveness of Interval Exercise Training in Patients with COPD." *Cardiopulm Phys Ther J* **21**(3): 12-9.
- Kozora, E., Z. V. Tran and B. Make** (2002). "Neurobehavioral improvement after brief rehabilitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *J Cardiopulm Rehabil* **22**(6): 426-30.
- Kratz, M., H. S. Callahan, P. Y. Yang, C. C. Matthys and D. S. Weigle** (2009). "Dietary n-3-polyunsaturated fatty acids and energy balance in overweight or moderately obese men and women: a randomized controlled trial." *Nutr Metab (Lond)* **6**: 24.
- Krey, G., O. Braissant, F. L'Horset, E. Kalkhoven, M. Perroud, M. G. Parker and W. Wahli** (1997). "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as

- ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay." *Mol Endocrinol* **11**(6): 779-91.
- Kumar, A., Y. Takada, A. M. Boriek and B. B. Aggarwal** (2004). "Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease." *J Mol Med (Berl)* **82**(7): 434-48.
- Kuo, T., M. J. Lew, O. Mayba, C. A. Harris, T. P. Speed and J. C. Wang** (2012). "Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(28): 11160-5.
- Kurth-Kraczek, E. J., M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and W. W. Winder** (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle." *Diabetes* **48**(8): 1667-71.
- Kuznetsov, A. V., V. Veksler, F. N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter and W. S. Kunz** (2008). "Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells." *Nat Protoc* **3**(6): 965-76.
- Kyle, U. G., L. Genton, D. Hans, L. Karsegard, D. O. Slosman and C. Pichard** (2001). "Age-related differences in fat-free mass, skeletal muscle, body cell mass and fat mass between 18 and 94 years." *Eur J Clin Nutr* **55**(8): 663-72.
- Lacasse, Y., R. Goldstein, T. J. Lasserson and S. Martin** (2006). "Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD003793.
- Lacasse, Y., E. Wong, G. H. Guyatt, D. King, D. J. Cook and R. S. Goldstein** (1996). "Meta-analysis of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease." *Lancet* **348**(9035): 1115-9.
- Laghi, F., A. Antonescu-Turcu, E. Collins, J. Segal, D. E. Tobin, A. Jubran and M. J. Tobin** (2005). "Hypogonadism in men with chronic obstructive pulmonary disease: prevalence and quality of life." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(7): 728-33.
- Laghi, F., W. E. Langbein, A. Antonescu-Turcu, A. Jubran, C. Bammert and M. J. Tobin** (2005). "Respiratory and skeletal muscles in hypogonadal men with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(6): 598-605.
- Lainscak, M., S. Andreas, P. D. Scanlon, V. K. Somers and S. D. Anker** (2006). "Ghrelin and neurohumoral antagonists in the treatment of cachexia associated with cardiopulmonary disease." *Intern Med* **45**(13): 837.
- Lands, L. C., A. A. Smountas, G. Mesiano, L. Brosseau, H. Shennib, M. Charbonneau and R. Gauthier** (1999). "Maximal exercise capacity and peripheral skeletal muscle function following lung transplantation." *J Heart Lung Transplant* **18**(2): 113-20.
- Langen, R. C., H. R. Gosker, A. H. Remels and A. M. Schols** (2013). "Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease." *Int J Biochem Cell Biol*.
- Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, J. L. van der Velden, E. F. Wouters and Y. M. Janssen-Heininger** (2006). "Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation." *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**(6): 689-96.
- Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters and Y. M. Janssen-Heininger** (2001). "Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB." *FASEB J* **15**(7): 1169-80.
- Lanza, I. R., A. Blachnio-Zabielska, M. L. Johnson, J. M. Coenen-Schimke, D. R. Jakaitis, N. K. Lebrasseur, M. D. Jensen, K. S. Nair and P. Zabielski** (2013). "Influence of Fish Oil on Skeletal Muscle Mitochondrial Energetics and Lipid Metabolites during High-Fat Diet." *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

- Larsen, S., J. Nielsen, C. N. Hansen, L. B. Nielsen, F. Wibrand, N. Stride, H. D. Schroder, R. Boushel, J. W. Helge, F. Dela and M. Hey-Mogensen** (2012). "Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects." *J Physiol* **590**(Pt 14): 3349-60.
- Larsson, L. and T. Ansved** (1985). "Effects of long-term physical training and detraining on enzyme histochemical and functional skeletal muscle characteristic in man." *Muscle Nerve* **8**(8): 714-22.
- Le Foll, C., C. Corporeau, V. Le Guen, J. P. Gouygou, J. P. Berge and J. Delarue** (2007). "Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3'-kinase activity in rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(4): E1223-30.
- Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch and A. L. Goldberg** (1999). "Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J Nutr* **129**(1S Suppl): 227S-237S.
- Lee, I. T. and C. M. Yang** (2012). "Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases." *Biochem Pharmacol* **84**(5): 581-90.
- Lee, W. J., M. Kim, H. S. Park, H. S. Kim, M. J. Jeon, K. S. Oh, E. H. Koh, J. C. Won, M. S. Kim, G. T. Oh, M. Yoon, K. U. Lee and J. Y. Park** (2006). "AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1." *Biochem Biophys Res Commun* **340**(1): 291-5.
- Legrand, P.** (2003). "Données récentes sur les désaturases chez l'animal et l'Homme." *Cahiers de nutrition et de diététique* **Vol 38** (N° 6): P. 376-383.
- Legrand, P.** (2007). "Les acides gras: structures, fonctions, apports nutritionnels conseillés." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **42**(Supplement 1): Pages 7-12.
- Lemaitre-Delaunay, D., C. Pachiardi, M. Laville, J. Pousin, M. Armstrong and M. Lagarde** (1999). "Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine." *J Lipid Res* **40**(10): 1867-74.
- Lemire, B. B., R. Debigare, A. Dube, M. E. Theriault, C. H. Cote and F. Maltais** (2012). "MAPK signaling in the quadriceps of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *J Appl Physiol* **113**(1): 159-66.
- Levett, D. Z., E. J. Radford, D. A. Menassa, E. F. Graber, A. J. Morash, H. Hoppeler, K. Clarke, D. S. Martin, A. C. Ferguson-Smith, H. E. Montgomery, M. P. Grocott and A. J. Murray** (2012). "Acclimatization of skeletal muscle mitochondria to high-altitude hypoxia during an ascent of Everest." *FASEB J* **26**(4): 1431-41.
- Levine, S., M. H. Bashir, T. L. Clanton, S. K. Powers and S. Singhal** (2013). "COPD elicits remodeling of the diaphragm and vastus lateralis muscles in humans." *J Appl Physiol* **114**(9): 1235-45.
- Levine, S., L. Kaiser, J. Lefterovich and B. Tikunov** (1997). "Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease." *N Engl J Med* **337**(25): 1799-806.
- Lewis, M. I., M. J. Belman and L. Dorr-Uyemura** (1987). "Nutritional supplementation in ambulatory patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am Rev Respir Dis* **135**(5): 1062-8.
- Lexell, J., C. C. Taylor and M. Sjostrom** (1988). "What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men." *J Neurol Sci* **84**(2-3): 275-94.
- Li, H., S. Malhotra and A. Kumar** (2008). "Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy." *J Mol Med (Berl)* **86**(10): 1113-26.

- Li, Y. P., Y. Chen, A. S. Li and M. B. Reid** (2003). "Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes." *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(4): C806-12.
- Li, Y. P. and M. B. Reid** (2000). "NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**(4): R1165-70.
- Liao, Z., J. Dong, W. Wu, T. Yang, T. Wang, L. Guo, L. Chen, D. Xu and F. Wen** (2012). "Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPARgamma/NF-kappaB pathway." *Respir Res* **13**: 110.
- Lieu, F. K., S. K. Powers, R. A. Herb, D. Criswell, D. Martin, C. Wood, W. Stainsby and C. L. Chen** (1993). "Exercise and glucocorticoid-induced diaphragmatic myopathy." *J Appl Physiol* **75**(2): 763-71.
- Lionetti, L., G. Cavaliere, P. Bergamo, G. Trinchese, C. De Filippo, G. Gifuni, M. Gaita, A. Pignalosa, I. Donizzetti, R. Putti, R. Di Palo, A. Barletta and M. P. Mollica** (2012). "Diet supplementation with donkey milk upregulates liver mitochondrial uncoupling, reduces energy efficiency and improves antioxidant and antiinflammatory defences in rats." *Mol Nutr Food Res* **56**(10): 1596-600.
- Liu, L., T. P. Cash, R. G. Jones, B. Keith, C. B. Thompson and M. C. Simon** (2006). "Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth." *Mol Cell* **21**(4): 521-31.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Livolsi, A., V. Busuttil, V. Imbert, R. T. Abraham and J. F. Peyron** (2001). "Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B. Requirement for p56 LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases." *Eur J Biochem* **268**(5): 1508-15.
- Lo, C. J., K. C. Chiu, M. Fu, R. Lo and S. Helton** (1999). "Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity." *J Surg Res* **82**(2): 216-21.
- Lopez, A. D., K. Shibuya, C. Rao, C. D. Mathers, A. L. Hansell, L. S. Held, V. Schmid and S. Buist** (2006). "Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections." *Eur Respir J* **27**(2): 397-412.
- Lu, J., F. Borthwick, Z. Hassanali, Y. Wang, R. Mangat, M. Ruth, D. Shi, A. Jaeschke, J. C. Russell, C. J. Field, S. D. Proctor and D. F. Vine** (2011). "Chronic dietary n-3 PUFA intervention improves dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA- cp rat model of the metabolic syndrome." *Br J Nutr* **105**(11): 1572-82.
- Lumini-Oliveira, J., J. Magalhaes, C. V. Pereira, I. Aleixo, P. J. Oliveira and A. Ascensao** (2009). "Endurance training improves gastrocnemius mitochondrial function despite increased susceptibility to permeability transition." *Mitochondrion* **9**(6): 454-62.
- Lundby, C., J. A. Calbet and P. Robach** (2009). "The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia." *Cell Mol Life Sci* **66**(22): 3615-23.
- Lundby, C., H. Pilegaard, J. L. Andersen, G. Van Hall, N. Sanser, J. A. Calbet** (2004). "Acclimatization to 4100 m does not change capillary density or mRNA expression of potential angiogenesis regulatory factors in human skeletal muscle." *J Exp Biol* **207**(pt22): 3865-71.
- Luo, J., S. W. Rizkalla, J. Boillot, C. Alamowitch, H. Chaib, F. Bruzzo, N. Desplanque, A. M. Dalix, G. Durand and G. Slama** (1996). "Dietary (n-3) polyunsaturated fatty

- acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids." *J Nutr* **126**(8): 1951-8.
- Luo, J., S. W. Rizkalla, H. Vidal, J. M. Oppert, C. Colas, A. Boussairi, M. Guerre-Millo, A. S. Chapuis, A. Chevalier, G. Durand and G. Slama** (1998). "Moderate intake of n-3 fatty acids for 2 months has no detrimental effect on glucose metabolism and could ameliorate the lipid profile in type 2 diabetic men. Results of a controlled study." *Diabetes Care* **21**(5): 717-24.
- MacDougall, J. D., H. J. Green, J. R. Sutton, G. Coates, A. Cymerman, P. Young and C. S. Houston** (1991). "Operation Everest II: structural adaptations in skeletal muscle in response to extreme simulated altitude." *Acta Physiol Scand* **142**(3): 421-7.
- MacNee, W.** (2005). "Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease." *Proc Am Thorac Soc* **2**(1): 50-60.
- Mador, M. J. and E. Bozkanat** (2001). "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Res* **2**(4): 216-24.
- Mador, M. J., E. Bozkanat and T. J. Kufel** (2003). "Quadriceps fatigue after cycle exercise in patients with COPD compared with healthy control subjects." *Chest* **123**(4): 1104-11.
- Mador, M. J., O. Deniz, A. Aggarwal and T. J. Kufel** (2003). "Quadriceps fatigability after single muscle exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **168**(1): 102-8.
- Magalhaes, J., A. Ascensao, J. M. Soares, R. Ferreira, M. J. Neuparth, F. Marques and J. A. Duarte** (2005). "Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle." *J Appl Physiol* **99**(4): 1247-53.
- Mahlin, C., H. von Sydow, A. Osmancevic, M. Emtner, A. M. Gronberg, S. Larsson and F. Slinde** (2013). "Vitamin D status and dietary intake in a Swedish COPD population." *Clin Respir J*.
- Maltais, F., J. Jobin, M. J. Sullivan, S. Bernard, F. Whittom, K. J. Killian, M. Desmeules, M. Belanger and P. LeBlanc** (1998). "Metabolic and hemodynamic responses of lower limb during exercise in patients with COPD." *J Appl Physiol* **84**(5): 1573-80.
- Maltais, F., P. Leblanc, J. Jobin and R. Casaburi** (2002). "[Peripheral muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease]." *Rev Mal Respir* **19**(4): 444-53.
- Maltais, F., P. LeBlanc, F. Whittom, C. Simard, K. Marquis, M. Belanger, M. J. Breton and J. Jobin** (2000). "Oxidative enzyme activities of the vastus lateralis muscle and the functional status in patients with COPD." *Thorax* **55**(10): 848-53.
- Maltais, F., A. A. Simard, C. Simard, J. Jobin, P. Desgagnes and P. LeBlanc** (1996). "Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(1): 288-93.
- Maltais, F., M. J. Sullivan, P. LeBlanc, B. D. Duscha, F. H. Schachat, C. Simard, J. M. Blank and J. Jobin** (1999). "Altered expression of myosin heavy chain in the vastus lateralis muscle in patients with COPD." *Eur Respir J* **13**(4): 850-4.
- Mapel, D. W., M. A. Picchi, J. S. Hurley, F. J. Frost, H. V. Petersen, V. M. Mapel and D. B. Coultas** (2000). "Utilization in COPD: patient characteristics and diagnostic evaluation." *Chest* **117**(5 Suppl 2): 346S-53S.
- Marcel, Y. L., K. Christiansen and R. T. Holman** (1968). "The preferred metabolic pathway from linoleic acid to arachidonic acid in vitro." *Biochim Biophys Acta* **164**(1): 25-34.

- Marquis, K., R. Debigare, Y. Lacasse, P. LeBlanc, J. Jobin, G. Carrier and F. Maltais** (2002). "Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(6): 809-13.
- Marti, S., X. Munoz, J. Rios, F. Morell and J. Ferrer** (2006). "Body weight and comorbidity predict mortality in COPD patients treated with oxygen therapy." *Eur Respir J* **27**(4): 689-96.
- Martin, C., H. Dubouchaud, L. Mosoni, J. M. Chardigny, A. Oudot, E. Fontaine, C. Vergely, C. Keriel, L. Rochette, X. Leverve and L. Demaison** (2007). "Abnormalities of mitochondrial functioning can partly explain the metabolic disorders encountered in sarcopenic gastrocnemius." *Aging Cell* **6**(2): 165-77.
- Martinelli, M., R. Winterhalder, P. Cerretelli, H. Howald and H. Hoppeler** (1990). "Muscle lipofuscin content and satellite cell volume is increased after high altitude exposure in humans." *Experientia* **46**(7): 672-6.
- Mason, S. D., R. A. Howlett, M. J. Kim, I. M. Olfert, M. C. Hogan, W. McNulty, R. P. Hickey, P. D. Wagner, C. R. Kahn, F. J. Giordano and R. S. Johnson** (2004). "Loss of skeletal muscle HIF-1alpha results in altered exercise endurance." *PLoS Biol* **2**(10): e288.
- Mathur, S., K. P. Takai, D. L. Macintyre and D. Reid** (2008). "Estimation of thigh muscle mass with magnetic resonance imaging in older adults and people with chronic obstructive pulmonary disease." *Phys Ther* **88**(2): 219-30.
- Mattson, J. P., M. D. Delp and D. C. Poole** (2004). "Differential effects of emphysema on skeletal muscle fibre atrophy in hamsters." *Eur Respir J* **23**(5): 703-7.
- Mattson, J. P. and D. C. Poole** (1998). "Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity." *J Appl Physiol* **85**(1): 210-4.
- Mayer, A. S. and L. S. Newman** (2001). "Genetic and environmental modulation of chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Physiol* **128**(1): 3-11.
- McKeever, T. M., S. A. Lewis, P. A. Cassano, M. Ocke, P. Burney, J. Britton and H. A. Smit** (2008). "The relation between dietary intake of individual fatty acids, FEV1 and respiratory disease in Dutch adults." *Thorax* **63**(3): 208-14.
- McKenzie, M., M. Lazarou, D. R. Thorburn and M. T. Ryan** (2006). "Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients." *J Mol Biol* **361**(3): 462-9.
- McLennan, P. L., M. Y. Abeywardena, J. A. Dallimore and D. Raederstorff** (2012). "Dietary fish oil preserves cardiac function in the hypertrophied rat heart." *Br J Nutr* **108**(4): 645-54.
- Menon, M. K., L. Houchen, S. Harrison, S. J. Singh, M. D. Morgan and M. C. Steiner** (2012). "Ultrasound assessment of lower limb muscle mass in response to resistance training in COPD." *Respir Res* **13**: 119.
- Merrill, G. F., E. J. Kurth, D. G. Hardie and W. W. Winder** (1997). "AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 1): E1107-12.
- Meydani, S. N., S. Endres, M. M. Woods, B. R. Goldin, C. Soo, A. Morrill-Labrode, C. A. Dinarello and S. L. Gorbach** (1991). "Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women." *J Nutr* **121**(4): 547-55.
- Meyer, A., J. Zoll, A. L. Charles, A. Charloux, F. de Blay, P. Diemunsch, J. Sibilis, F. Piquard and B. Geny** (2013). "Skeletal muscle mitochondrial dysfunction during chronic obstructive pulmonary disease: central actor and therapeutic target." *Exp Physiol* **98**(6): 1063-78.

- Miki, K., R. Maekura, N. Nagaya, S. Kitada, M. Miki, K. Yoshimura, Y. Tateishi, M. Motone, T. Hiraga, M. Mori and K. Kangawa** (2013). "Effects of Ghrelin Treatment on Exercise Capacity in Underweight COPD Patients: a substudy of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ghrelin treatment." *BMC Pulm Med* **13**: 37.
- Miki, K., R. Maekura, N. Nagaya, M. Nakazato, H. Kimura, S. Murakami, S. Ohnishi, T. Hiraga, M. Miki, S. Kitada, K. Yoshimura, Y. Tateishi, Y. Arimura, N. Matsumoto, M. Yoshikawa, K. Yamahara and K. Kangawa** (2012). "Ghrelin treatment of cachectic patients with chronic obstructive pulmonary disease: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *PLoS One* **7**(5): e35708.
- Miller, M. R., C. A. Shaw and J. P. Langrish** (2012). "From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution." *Future Cardiol* **8**(4): 577-602.
- Miravittles, M., A. Anzueto, D. Legnani, L. Forstmeier and M. Fargel** (2007). "Patient's perception of exacerbations of COPD--the PERCEIVE study." *Respir Med* **101**(3): 453-60.
- Miravittles, M., M. Ferrer, A. Pont, R. Zalacain, J. L. Alvarez-Sala, F. Masa, H. Vereza, C. Murio, F. Ros and R. Vidal** (2004). "Effect of exacerbations on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a 2 year follow up study." *Thorax* **59**(5): 387-95.
- Mishra, A., A. Chaudhary and S. Sethi** (2004). "Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF-kappaB activation via a PPARalpha-dependent pathway." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(9): 1621-7.
- Mitch, W. E. and A. L. Goldberg** (1996). "Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway." *N Engl J Med* **335**(25): 1897-905.
- Mitch, W. E., R. Medina, S. Griebler, R. C. May, B. K. England, S. R. Price, J. L. Bailey and A. L. Goldberg** (1994). "Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes." *J Clin Invest* **93**(5): 2127-33.
- Mitchell, W. K., J. Williams, P. Atherton, M. Larvin, J. Lund and M. Narici** (2012). "Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review." *Front Physiol* **3**: 260.
- Mizuno, M., G. K. Savard, N. H. Areskog, C. Lundby and B. Saltin** (2008). "Skeletal muscle adaptations to prolonged exposure to extreme altitude: a role of physical activity?" *High Alt Med Biol* **9**(4): 311-7.
- Mohrhauer, H., K. Christiansen, M. V. Gan, M. Deubig and R. T. Holman** (1967). "Chain elongation of linoleic acid and its inhibition by other fatty acids in vitro." *J Biol Chem* **242**(19): 4507-14.
- Mohrhauer, H. and R. T. Holman** (1963). "Effect of Linolenic Acid Upon the Metabolism of Linoleic Acid." *J Nutr* **81**: 67-74.
- Montes de Oca, M., S. H. Torres, J. De Sanctis, A. Mata, N. Hernandez and C. Talamo** (2005). "Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD." *Eur Respir J* **26**(3): 390-7.
- Montuschi, P., J. V. Collins, G. Ciabattini, N. Lazzeri, M. Corradi, S. A. Kharitonov and P. J. Barnes** (2000). "Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(3 Pt 1): 1175-7.
- Moore, L., L. Hogg and P. White** (2012). "Acceptability and feasibility of pulmonary rehabilitation for COPD: a community qualitative study." *Prim Care Respir J* **21**(4): 419-24.

- Mori, T. A., I. B. Puddey, V. Burke, K. D. Croft, D. W. Dunstan, J. H. Rivera and L. J. Beilin** (2000). "Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion." *Redox Rep* **5**(1): 45-6.
- Moses, A. W., C. Slater, T. Preston, M. D. Barber and K. C. Fearon** (2004). "Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids." *Br J Cancer* **90**(5): 996-1002.
- Mostert, R., A. Goris, C. Weling-Scheepers, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2000). "Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Med* **94**(9): 859-67.
- Murakami, T., Y. Shimomura, N. Fujitsuka, N. Nakai, S. Sugiyama, T. Ozawa, M. Sokabe, S. Horai, K. Tokuyama and M. Suzuki** (1994). "Enzymatic and genetic adaptation of soleus muscle mitochondria to physical training in rats." *Am J Physiol* **267**(3 Pt 1): E388-95.
- Murias, J. M., J. M. Kowalchuk, D. Ritchie, R. T. Hepple, T. J. Doherty and D. H. Paterson** (2011). "Adaptations in capillarization and citrate synthase activity in response to endurance training in older and young men." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **66**(9): 957-64.
- Murphy, B. J., E. D. Robin, D. P. Tapper, R. J. Wong and D. A. Clayton** (1984). "Hypoxic coordinate regulation of mitochondrial enzymes in mammalian cells." *Science* **223**(4637): 707-9.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez** (2013). "Measuring the global burden of disease." *N Engl J Med* **369**(5): 448-57.
- Murray, J. A., L. A. Waterman, J. Ward, J. C. Baird and D. A. Mahler** (2009). "Perceptual and physiologic responses during treadmill and cycle exercise in patients with COPD." *Chest* **135**(2): 384-90.
- Nagahuedi, S., J. T. Popesku, V. L. Trudeau and J. M. Weber** (2009). "Mimicking the natural doping of migrant sandpipers in sedentary quails: effects of dietary n-3 fatty acids on muscle membranes and PPAR expression." *J Exp Biol* **212**(Pt 8): 1106-14.
- Nagasawa, T., T. Hatayama, Y. Watanabe, M. Tanaka, Y. Niisato and D. D. Kitts** (1997). "Free radical-mediated effects on skeletal muscle protein in rats treated with Fenitrioltriacetate." *Biochem Biophys Res Commun* **231**(1): 37-41.
- Nagaya, N., T. Itoh, S. Murakami, H. Oya, M. Uematsu, K. Miyatake and K. Kangawa** (2005). "Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD." *Chest* **128**(3): 1187-93.
- Naimi, A. I., J. Bourbeau, H. Perrault, J. Baril, C. Wright-Paradis, A. Rossi, T. Taivassalo, A. W. Sheel, R. Rabol, F. Dela and R. Boushel** (2011). "Altered mitochondrial regulation in quadriceps muscles of patients with COPD." *Clin Physiol Funct Imaging* **31**(2): 124-31.
- Nakatani, T., H. J. Kim, Y. Kaburagi, K. Yasuda and O. Ezaki** (2003). "A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity." *J Lipid Res* **44**(2): 369-79.
- Narkar, V. A., M. Downes, R. T. Yu, E. Embler, Y. X. Wang, E. Banayo, M. M. Mihaylova, M. C. Nelson, Y. Zou, H. Juguilon, H. Kang, R. J. Shaw and R. M. Evans** (2008). "AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics." *Cell* **134**(3): 405-15.
- Nasis, I. G., I. Vogiatzis, G. Stratakos, D. Athanasopoulos, A. Koutsoukou, A. Daskalakis, S. Spetsioti, A. Evangelodimou, C. Roussos and S. Zakynthinos** (2009). "Effects of interval-load versus constant-load training on the BODE index in COPD patients." *Respir Med* **103**(9): 1392-8.

- Neschen, S., I. Moore, W. Regittnig, C. L. Yu, Y. Wang, M. Pypaert, K. F. Petersen and G. I. Shulman (2002). "Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(2): E395-401.
- Newell, S. Z., D. K. McKenzie and S. C. Gandevia (1989). "Inspiratory and skeletal muscle strength and endurance and diaphragmatic activation in patients with chronic airflow limitation." *Thorax* **44**(11): 903-12.
- Nici, L., C. Donner, E. Wouters, R. Zuwallack, N. Ambrosino, J. Bourbeau, M. Carone, B. Celli, M. Engelen, B. Fahy, C. Garvey, R. Goldstein, R. Gosselink, S. Lareau, N. MacIntyre, F. Maltais, M. Morgan, D. O'Donnell, C. Prefault, J. Reardon, C. Rochester, A. Schols, S. Singh and T. Troosters (2006). "American Thoracic Society/European Respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation." *Am J Respir Crit Care Med* **173**(12): 1390-413.
- Nioka, S., Z. Argov, G. P. Dobson, R. E. Forster, H. V. Subramanian, R. L. Veech and B. Chance (1992). "Substrate regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in hypercapnic rabbit muscle." *J Appl Physiol* **72**(2): 521-8.
- Nishino, T., K. Okamoto, B. T. Eger and E. F. Pai (2008). "Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase." *FEBS J* **275**(13): 3278-89.
- Noreen, E. E., M. J. Sass, M. L. Crowe, V. A. Pabon, J. Brandauer and L. K. Averill (2010). "Effects of supplemental fish oil on resting metabolic rate, body composition, and salivary cortisol in healthy adults." *J Int Soc Sports Nutr* **7**: 31.
- Norrbom, J., C. J. Sundberg, H. Ameln, W. E. Kraus, E. Jansson and T. Gustafsson (2004). "PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle." *J Appl Physiol* **96**(1): 189-94.
- Novak, T. E., T. A. Babcock, D. H. Jho, W. S. Helton and N. J. Espat (2003). "NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(1): L84-9.
- Nowak, D., M. Kasielski, A. Antczak, T. Pietras and P. Bialasiewicz (1999). "Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking." *Respir Med* **93**(6): 389-96.
- O'Donnell, D. E. (2006). "Hyperinflation, dyspnea, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease." *Proc Am Thorac Soc* **3**(2): 180-4.
- O'Neill, H. M. (2013). "AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity." *Diabetes Metab J* **37**(1): 1-21.
- O'Shea, K. M., R. J. Khairallah, G. C. Sparagna, W. Xu, P. A. Hecker, I. Robillard-Frayne, C. Des Rosiers, T. Kristian, R. C. Murphy, G. Fiskum and W. C. Stanley (2009). "Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition." *J Mol Cell Cardiol* **47**(6): 819-27.
- Ojuka, E. O., T. E. Jones, L. A. Nolte, M. Chen, B. R. Wamhoff, M. Sturek and J. O. Holloszy (2002). "Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca²⁺." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(5): E1008-13.
- OMS (2004). The Global Burden of Disease : 2004 update Organisation mondiale de la santé.
- OMS (2008). "World health statistics."
- Orozco-Levi, M. (2003). "Structure and function of the respiratory muscles in patients with COPD: impairment or adaptation?" *Eur Respir J Suppl* **46**: 41s-51s.

- Ortega, F., J. Toral, P. Cejudo, R. Villagomez, H. Sanchez, J. Castillo and T. Montemayor** (2002). "Comparison of effects of strength and endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(5): 669-74.
- Ovide-Bordeaux, S. and A. Grynberg** (2004). "Docosahexaenoic acid affects insulin deficiency- and insulin resistance-induced alterations in cardiac mitochondria." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**(3): R519-27.
- Papi, A., C. M. Bellettato, F. Braccioni, M. Romagnoli, P. Casolari, G. Caramori, L. M. Fabbri and S. L. Johnston** (2006). "Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations." *Am J Respir Crit Care Med* **173**(10): 1114-21.
- Penaloza, D. and J. Arias-Stella** (2007). "The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness." *Circulation* **115**(9): 1132-46.
- Petersen, K. F., D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura, C. Ariyan, D. L. Rothman, L. DiPietro, G. W. Cline and G. I. Shulman** (2003). "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance." *Science* **300**(5622): 1140-2.
- Petronilli, V., G. Miotto, M. Canton, R. Colonna, P. Bernardi and F. Di Lisa** (1998). "Imaging the mitochondrial permeability transition pore in intact cells." *Biofactors* **8**(3-4): 263-72.
- Phinney, S. D., R. S. Odion, S. B. Johnson and R. T. Holman** (1990). "Reduced arachidonate in serum phospholipids and cholesteryl esters associated with vegetarian diets in humans." *Am J Clin Nutr* **51**(3): 385-92.
- Picard, M., R. Godin, M. Sinnreich, J. Baril, J. Bourbeau, H. Perrault, T. Taivassalo and Y. Burelle** (2008). "The mitochondrial phenotype of peripheral muscle in chronic obstructive pulmonary disease: disuse or dysfunction?" *Am J Respir Crit Care Med* **178**(10): 1040-7.
- Picard, M., T. Taivassalo, G. Gousspillou and R. T. Hepple** (2011). "Mitochondria: isolation, structure and function." *J Physiol* **589**(Pt 18): 4413-21.
- Picard, M., T. Taivassalo, D. Ritchie, K. J. Wright, M. M. Thomas, C. Romestaing and R. T. Hepple** (2011). "Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods." *PLoS One* **6**(3): e18317.
- Pichard, C., U. Kyle, J. C. Chevolet, P. Jolliet, D. Slosman, N. Mensi, E. Temler and B. Ricou** (1996). "Lack of effects of recombinant growth hormone on muscle function in patients requiring prolonged mechanical ventilation: a prospective, randomized, controlled study." *Crit Care Med* **24**(3): 403-13.
- Pierson, D. J.** (2000). "Pathophysiology and clinical effects of chronic hypoxia." *Respir Care* **45**(1): 39-51; discussion 51-3.
- Pike, L. J.** (2003). "Lipid rafts: bringing order to chaos." *J Lipid Res* **44**(4): 655-67.
- Pilegaard, H., B. Saltin and P. D. Neuffer** (2003). "Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle." *J Physiol* **546**(Pt 3): 851-8.
- Pinto-Plata, V. M., H. Mullerova, J. F. Toso, M. Feudjo-Tepie, J. B. Soriano, R. S. Vessey and B. R. Celli** (2006). "C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers." *Thorax* **61**(1): 23-8.
- Pison, C. M., N. J. Cano, C. Cherion, F. Caron, I. Court-Fortune, M. T. Antonini, J. Gonzalez-Bermejo, L. Meziane, L. C. Molano, J. P. Janssens, F. Costes, B. Wuyam, T. Similowski, B. Melloni, M. Hayot, J. Augustin, C. Tardif, H. Lejeune, H. Roth and C. Pichard** (2011). "Multimodal nutritional rehabilitation improves

- clinical outcomes of malnourished patients with chronic respiratory failure: a randomised controlled trial." *Thorax* **66**(11): 953-60.
- Pitta, F., T. Troosters, V. S. Probst, D. Langer, M. Decramer and R. Gosselink** (2008). "Are patients with COPD more active after pulmonary rehabilitation?" *Chest* **134**(2): 273-80.
- Pitta, F., T. Troosters, M. A. Spruit, V. S. Probst, M. Decramer and R. Gosselink** (2005). "Characteristics of physical activities in daily life in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(9): 972-7.
- Plant, P. J., D. Brooks, M. Faughnan, T. Bayley, J. Bain, L. Singer, J. Correa, D. Pearce, M. Binnie and J. Batt** (2010). "Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**(4): 461-71.
- Plourde, M. and S. C. Cunnane** (2007). "Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements." *Appl Physiol Nutr Metab* **32**(4): 619-34.
- Polkey, M. I. and K. F. Rabe** (2009). "Chicken or egg: physical activity in COPD revisited." *Eur Respir J* **33**(2): 227-9.
- Pouw, E. M., E. Koerts-de Lang, H. R. Gosker, G. Freling, G. J. van der Vusse, E. F. Wouters and A. M. Schols** (2000). "Muscle metabolic status in patients with severe COPD with and without long-term prednisolone." *Eur Respir J* **16**(2): 247-52.
- Pouw, E. M., A. M. Schols, G. J. van der Vusse and E. F. Wouters** (1998). "Elevated inosine monophosphate levels in resting muscle of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(2): 453-7.
- Power, G. W. and E. A. Newsholme** (1997). "Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle." *J Nutr* **127**(11): 2142-50.
- Powers, S. K. and S. L. Lennon** (1999). "Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle." *Proc Nutr Soc* **58**(4): 1025-33.
- Prescott, S. M. and W. F. Stenson** (2005). "Fish oil fix." *Nat Med* **11**(6): 596-8.
- Prior, S. J., J. M. Hagberg, D. A. Phares, M. D. Brown, L. Fairfull, R. E. Ferrell and S. M. Roth** (2003). "Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A): association with maximal oxygen consumption." *Physiol Genomics* **15**(1): 20-6.
- Pryor, W. A. and K. Stone** (1993). "Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite." *Ann N Y Acad Sci* **686**: 12-27; discussion 27-8.
- Puente-Maestu, L., A. Lazaro, A. Tejedor, S. Camano, M. Fuentes, M. Cuervo, B. O. Navarro and A. Agusti** (2011). "Effects of exercise on mitochondrial DNA content in skeletal muscle of patients with COPD." *Thorax* **66**(2): 121-7.
- Puente-Maestu, L., J. Perez-Parra, R. Godoy, N. Moreno, A. Tejedor, F. Gonzalez-Aragoneses, J. L. Bravo, F. V. Alvarez, S. Camano and A. Agusti** (2009). "Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients." *Eur Respir J* **33**(5): 1045-52.
- Puente-Maestu, L., J. Perez-Parra, R. Godoy, N. Moreno, A. Tejedor, A. Torres, A. Lazaro, A. Ferreira and A. Agusti** (2009). "Abnormal transition pore kinetics and cytochrome C release in muscle mitochondria of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**(6): 746-50.
- Puente-Maestu, L., T. Tena, C. Trascasa, J. Perez-Parra, R. Godoy, M. J. Garcia and W. W. Stringer** (2003). "Training improves muscle oxidative capacity and oxygenation recovery kinetics in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Eur J Appl Physiol* **88**(6): 580-7.

- Puhan, M. A., H. J. Schunemann, M. Frey, M. Scharplatz and L. M. Bachmann** (2005). "How should COPD patients exercise during respiratory rehabilitation? Comparison of exercise modalities and intensities to treat skeletal muscle dysfunction." *Thorax* **60**(5): 367-75.
- Qadhi, R., N. Alsaleh, V. Samokhvalov, H. El-Sikhry, J. Bellenger and J. M. Seubert** (2013). "Differential responses to docosahexaenoic acid in primary and immortalized cardiac cells." *Toxicol Lett* **219**(3): 288-97.
- Rabinovich, R. A., E. Ardite, A. M. Mayer, M. F. Polo, J. Vilaro, J. M. Argiles and J. Roca** (2006). "Training depletes muscle glutathione in patients with chronic obstructive pulmonary disease and low body mass index." *Respiration* **73**(6): 757-61.
- Rabinovich, R. A., E. Ardite, T. Troosters, N. Carbo, J. Alonso, J. M. Gonzalez de Suso, J. Vilaro, J. A. Barbera, M. F. Polo, J. M. Argiles, J. C. Fernandez-Checa and J. Roca** (2001). "Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(7): 1114-8.
- Rabinovich, R. A., R. Bastos, E. Ardite, L. Llinas, M. Orozco-Levi, J. Gea, J. Vilaro, J. A. Barbera, R. Rodriguez-Roisin, J. C. Fernandez-Checa and J. Roca** (2007). "Mitochondrial dysfunction in COPD patients with low body mass index." *Eur Respir J* **29**(4): 643-50.
- Rabinovich, R. A. and J. Vilaro** (2010). "Structural and functional changes of peripheral muscles in chronic obstructive pulmonary disease patients." *Curr Opin Pulm Med* **16**(2): 123-33.
- Rahm, J. J. and R. T. Holman** (1964). "Effect of Linoleic Acid Upon the Metabolism of Linolenic Acid." *J Nutr* **84**: 15-9.
- Rahman, I., P. S. Gilmour, L. A. Jimenez and W. MacNee** (2002). "Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation." *Mol Cell Biochem* **234-235**(1-2): 239-48.
- Rahman, I., D. Morrison, K. Donaldson and W. MacNee** (1996). "Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers." *Am J Respir Crit Care Med* **154**(4 Pt 1): 1055-60.
- Rajamoorthi, K., H. I. Petrache, T. J. McIntosh and M. F. Brown** (2005). "Packing and viscoelasticity of polyunsaturated omega-3 and omega-6 lipid bilayers as seen by (2)H NMR and X-ray diffraction." *J Am Chem Soc* **127**(5): 1576-88.
- Ramel, A., A. Martinez, M. Kiely, G. Morais, N. M. Bandarra and I. Thorsdottir** (2008). "Beneficial effects of long-chain n-3 fatty acids included in an energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese European young adults." *Diabetologia* **51**(7): 1261-8.
- Rasola, A. and P. Bernardi** (2007). "The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis." *Apoptosis* **12**(5): 815-33.
- Razeghi, P., K. K. Baskin, S. Sharma, M. E. Young, S. Stepkowski, M. F. Essop and H. Taegtmeyer** (2006). "Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart." *Biochem Biophys Res Commun* **342**(2): 361-4.
- Regnault, T. R., L. Zhao, J. S. Chiu, S. K. Gottheil, A. Foran and S. P. Yee** (2010). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -beta/delta, -gamma Agonists and Resveratrol Modulate Hypoxia Induced Changes in Nuclear Receptor Activators of Muscle Oxidative Metabolism." *PPAR Res* **2010**: 129173.
- Reid, M. B.** (2001). "Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't." *J Appl Physiol* **90**(2): 724-31.

- Reid, M. B., J. Lannergren and H. Westerblad** (2002). "Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor-alpha: involvement of muscle myofilaments." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(4): 479-84.
- Reid, M. B. and Y. P. Li** (2001). "Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective." *Respir Res* **2**(5): 269-72.
- Remels, A. H., H. R. Gosker, R. C. Langen and A. M. Schols** (2013). "The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD." *J Appl Physiol* **114**(9): 1253-62.
- Remels, A. H., H. R. Gosker, P. Schrauwen, P. P. Hommelberg, P. Sliwinski, M. Polkey, J. Galdiz, E. F. Wouters, R. C. Langen and A. M. Schols** (2010). "TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia?" *FASEB J* **24**(12): 5052-62.
- Remels, A. H., P. Schrauwen, R. Broekhuizen, J. Willems, S. Kersten, H. R. Gosker and A. M. Schols** (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD." *Eur Respir J* **30**(2): 245-52.
- Ren, B., A. P. Thelen, J. M. Peters, F. J. Gonzalez and D. B. Jump** (1997). "Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha." *J Biol Chem* **272**(43): 26827-32.
- Ren, H., D. Accili and C. Duan** (2010). "Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(13): 5857-62.
- Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein and D. J. Mangelsdorf** (2000). "Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta." *Genes Dev* **14**(22): 2819-30.
- Repine, J. E., A. Bast and I. Lankhorst** (1997). "Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group." *Am J Respir Crit Care Med* **156**(Pt 1): 341-57.
- Ricci-Vitor, A. L., R. Bonfim, L. C. Fosco, G. N. Bertolini, E. M. Ramos, D. Ramos, C. M. Pastre, M. Godoy and L. C. Vanderlei** (2013). "Influence of the resistance training on heart rate variability, functional capacity and muscle strength in the chronic obstructive pulmonary disease." *Eur J Phys Rehabil Med*.
- Richard, M. J., B. Portal, J. Meo, C. Coudray, A. Hadjian and A. Favier** (1992). "Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid." *Clin Chem* **38**(5): 704-9.
- Richardson, R. S., B. T. Leek, T. P. Gavin, L. J. Haseler, S. R. Mudaliar, R. Henry, O. Mathieu-Costello and P. D. Wagner** (2004). "Reduced mechanical efficiency in chronic obstructive pulmonary disease but normal peak VO₂ with small muscle mass exercise." *Am J Respir Crit Care Med* **169**(1): 89-96.
- Richardson, R. S., J. Sheldon, D. C. Poole, S. R. Hopkins, A. L. Ries and P. D. Wagner** (1999). "Evidence of skeletal muscle metabolic reserve during whole body exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(3): 881-5.
- Riddoch-Contreras, J., T. George, S. A. Natanek, G. S. Marsh, N. S. Hopkinson, R. Tal-Singer, P. Kemp and M. I. Polkey** (2012). "p38 mitogen-activated protein kinase is not activated in the quadriceps of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease." *COPD* **9**(2): 142-50.
- Ries, A. L., R. M. Kaplan, T. M. Limberg and L. M. Prewitt** (1995). "Effects of pulmonary rehabilitation on physiologic and psychosocial outcomes in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Ann Intern Med* **122**(11): 823-32.

- Rivas, D. A., E. P. Morris and R. A. Fielding** (2011). "Lipogenic regulators are elevated with age and chronic overload in rat skeletal muscle." *Acta Physiol (Oxf)* **202**(4): 691-701.
- Robinson, S. M., K. A. Jameson, S. F. Batelaan, H. J. Martin, H. E. Syddall, E. M. Dennison, C. Cooper and A. A. Sayer** (2008). "Diet and its relationship with grip strength in community-dwelling older men and women: the Hertfordshire cohort study." *J Am Geriatr Soc* **56**(1): 84-90.
- Rochester, C. L.** (2003). "Exercise training in chronic obstructive pulmonary disease." *J Rehabil Res Dev* **40**(5 Suppl 2): 59-80.
- Rockl, K. S., C. A. Witzak and L. J. Goodyear** (2008). "Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise." *IUBMB Life* **60**(3): 145-53.
- Rodacki, C. L., A. L. Rodacki, G. Pereira, K. Naliwaiko, I. Coelho, D. Pequito and L. C. Fernandes** (2012). "Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women." *Am J Clin Nutr* **95**(2): 428-36.
- Rodriguez, D. A., S. Kalko, E. Puig-Vilanova, M. Perez-Olabarria, F. Falciani, J. Gea, M. Cascante, E. Barreiro and J. Roca** (2012). "Muscle and blood redox status after exercise training in severe COPD patients." *Free Radic Biol Med* **52**(1): 88-94.
- Rogers, R. M., M. Donahoe and J. Costantino** (1992). "Physiologic effects of oral supplemental feeding in malnourished patients with chronic obstructive pulmonary disease. A randomized control study." *Am Rev Respir Dis* **146**(6): 1511-7.
- Roig, M., J. J. Eng, D. L. MacIntyre, J. D. Road and W. D. Reid** (2011). "Deficits in muscle strength, mass, quality, and mobility in people with chronic obstructive pulmonary disease." *J Cardiopulm Rehabil Prev* **31**(2): 120-4.
- Romijn, J. A., E. F. Coyle, L. S. Sidossis, A. Gastaldelli, J. F. Horowitz, E. Endert and R. R. Wolfe** (1993). "Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration." *Am J Physiol* **265**(3 Pt 1): E380-91.
- Rooyackers, O. E., D. B. Adey, P. A. Ades and K. S. Nair** (1996). "Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15364-9.
- Rossiter, H. B., R. A. Howlett, H. H. Holcombe, P. L. Entin, H. E. Wagner and P. D. Wagner** (2005). "Age is no barrier to muscle structural, biochemical and angiogenic adaptations to training up to 24 months in female rats." *J Physiol* **565**(Pt 3): 993-1005.
- Roth, S. M., E. J. Metter, S. Ling and L. Ferrucci** (2006). "Inflammatory factors in age-related muscle wasting." *Curr Opin Rheumatol* **18**(6): 625-30.
- Rousseau, J. H., A. Kleppinger and A. M. Kenny** (2009). "Self-reported dietary intake of omega-3 fatty acids and association with bone and lower extremity function." *J Am Geriatr Soc* **57**(10): 1781-8.
- Roy, R. R., D. L. Hutchison, D. J. Pierotti, J. A. Hodgson and V. R. Edgerton** (1991). "EMG patterns of rat ankle extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming." *J Appl Physiol* **70**(6): 2522-9.
- Ruf, T., T. Valencak, F. Tataruch and W. Arnold** (2006). "Running speed in mammals increases with muscle n-6 polyunsaturated fatty acid content." *PLoS One* **1**: e65.
- Rufer, A. C., R. Thoma and M. Hennig** (2009). "Structural insight into function and regulation of carnitine palmitoyltransferase." *Cell Mol Life Sci* **66**(15): 2489-501.
- Ruljancic, N., S. Popovic-Grle, V. Rumenjak, B. Sokolic, A. Malic, M. Mihanovic and I. Cepelak** (2007). "COPD: magnesium in the plasma and polymorphonuclear cells of patients during a stable phase." *COPD* **4**(1): 41-7.

- Russo, G. L.** (2009). "Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention." *Biochem Pharmacol* **77**(6): 937-46.
- Rutten, E. P., F. M. Franssen, M. P. Engelen, E. F. Wouters, N. E. Deutz and A. M. Schols** (2006). "Greater whole-body myofibrillar protein breakdown in cachectic patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Clin Nutr* **83**(4): 829-34.
- Ruzickova, J., M. Rossmeisl, T. Prazak, P. Flachs, J. Sponarova, M. Veck, E. Tvrzicka, M. Bryhn and J. Kopecky** (2004). "Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue." *Lipids* **39**(12): 1177-85.
- Sabit, R., T. L. Griffiths, A. J. Watkins, W. Evans, C. E. Bolton, D. J. Shale and K. E. Lewis** (2008). "Predictors of poor attendance at an outpatient pulmonary rehabilitation programme." *Respir Med* **102**(6): 819-24.
- Saey, D., R. Debigare, P. LeBlanc, M. J. Mador, C. H. Cote, J. Jobin and F. Maltais** (2003). "Contractile leg fatigue after cycle exercise: a factor limiting exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **168**(4): 425-30.
- Saey, D., A. Michaud, A. Couillard, C. H. Cote, M. J. Mador, P. LeBlanc, J. Jobin and F. Maltais** (2005). "Contractile fatigue, muscle morphometry, and blood lactate in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(10): 1109-15.
- Saha, A. K. and N. B. Ruderman** (2003). "Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership." *Mol Cell Biochem* **253**(1-2): 65-70.
- Saks, V. A., V. I. Veksler, A. V. Kuznetsov, L. Kay, P. Sikk, T. Tiivel, L. Tranqui, J. Olivares, K. Winkler, F. Wiedemann and W. S. Kunz** (1998). "Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo." *Mol Cell Biochem* **184**(1-2): 81-100.
- Sala, E., J. Roca, R. M. Marrades, J. Alonso, J. M. Gonzalez De Suso, A. Moreno, J. A. Barbera, J. Nadal, L. de Jover, R. Rodriguez-Roisin and P. D. Wagner** (1999). "Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(6): 1726-34.
- Sanders, T. A.** (2000). "Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe." *Am J Clin Nutr* **71**(1 Suppl): 176S-8S.
- Sanders, T. A., F. Lewis, S. Slaughter, B. A. Griffin, M. Griffin, I. Davies, D. J. Millward, J. A. Cooper and G. J. Miller** (2006). "Effect of varying the ratio of n-6 to n-3 fatty acids by increasing the dietary intake of alpha-linolenic acid, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid, or both on fibrinogen and clotting factors VII and XII in persons aged 45-70 y: the OPTILIP study." *Am J Clin Nutr* **84**(3): 513-22.
- Satta, A., G. B. Migliori, A. Spanevello, M. Neri, R. Bottinelli, M. Canepari, M. A. Pellegrino and C. Reggiani** (1997). "Fibre types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance." *Eur Respir J* **10**(12): 2853-60.
- Sauleda, J., F. Garcia-Palmer, R. J. Wiesner, S. Tarraga, I. Harting, P. Tomas, C. Gomez, C. Saus, A. Palou and A. G. Agusti** (1998). "Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(5 Pt 1): 1413-7.
- Schakman, O., S. Kalista, L. Bertrand, P. Lause, J. Verniers, J. M. Ketelslegers and J. P. Thissen** (2008). "Role of Akt/GSK-3beta/beta-catenin transduction pathway in the

muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats." *Endocrinology* **149**(8): 3900-8.

- Schiaffino, S. and C. Mammucari** (2011). "Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models." *Skelet Muscle* **1**(1): 4.
- Schlame, M., J. A. Towbin, P. M. Heerdt, R. Jehle, S. DiMauro and T. J. Blanck** (2002). "Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome." *Ann Neurol* **51**(5): 634-7.
- Schmitz, G. and J. Ecker** (2008). "The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids." *Prog Lipid Res* **47**(2): 147-55.
- Schols, A. M., R. Broekhuizen, C. A. Weling-Scheepers and E. F. Wouters** (2005). "Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Clin Nutr* **82**(1): 53-9.
- Schols, A. M., W. A. Buurman, A. J. Staal van den Brekel, M. A. Dentener and E. F. Wouters** (1996). "Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **51**(8): 819-24.
- Schols, A. M., P. B. Soeters, A. M. Dingemans, R. Mostert, P. J. Frantzen and E. F. Wouters** (1993). "Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation." *Am Rev Respir Dis* **147**(5): 1151-6.
- Schols, A. M., P. B. Soeters, R. Mostert, R. J. Pluymers and E. F. Wouters** (1995). "Physiologic effects of nutritional support and anabolic steroids in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A placebo-controlled randomized trial." *Am J Respir Crit Care Med* **152**(4 Pt 1): 1268-74.
- Schols, A. M., P. B. Soeters, R. Mostert, W. H. Saris and E. F. Wouters** (1991). "Energy balance in chronic obstructive pulmonary disease." *Am Rev Respir Dis* **143**(6): 1248-52.
- Schols, A. M., G. Wesseling, A. D. Kester, G. de Vries, R. Mostert, J. Slangen and E. F. Wouters** (2001). "Dose dependent increased mortality risk in COPD patients treated with oral glucocorticoids." *Eur Respir J* **17**(3): 337-42.
- Schonhofer, B., P. Ardes, M. Geibel, D. Kohler and P. W. Jones** (1997). "Evaluation of a movement detector to measure daily activity in patients with chronic lung disease." *Eur Respir J* **10**(12): 2814-9.
- Schreck, R., P. Rieber and P. A. Baeuerle** (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." *EMBO J* **10**(8): 2247-58.
- Schwall, C. T., V. L. Greenwood and N. N. Alder** (2012). "The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent." *Biochim Biophys Acta* **1817**(9): 1588-96.
- Semenza, G. L.** (1999). "Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 551-78.
- Semple, P. D., G. H. Beastall, W. S. Watson and R. Hume** (1980). "Serum testosterone depression associated with hypoxia in respiratory failure." *Clin Sci (Lond)* **58**(1): 105-6.
- Sergi, G., A. Coin, S. Marin, A. Vianello, A. Manzan, S. Peruzza, E. M. Inelmen, L. Busetto, S. Mulone and G. Enzi** (2006). "Body composition and resting energy expenditure in elderly male patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Med* **100**(11): 1918-24.
- Serhan, C. N., C. B. Clish, J. Brannon, S. P. Colgan, N. Chiang and K. Gronert** (2000). "Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions

- generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing." *J Exp Med* **192**(8): 1197-204.
- Serres, I., V. Gautier, A. Varray and C. Prefaut** (1998). "Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients." *Chest* **113**(4): 900-5.
- Serres, I., A. Varray, G. Vallet, J. P. Micallef and C. Prefaut** (1997). "Improved skeletal muscle performance after individualized exercise training in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *J Cardiopulm Rehabil* **17**(4): 232-8.
- Sevenoaks, M. J. and R. A. Stockley** (2006). "Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity--a common inflammatory phenotype?" *Respir Res* **7**: 70.
- Seymour, J. M., M. A. Spruit, N. S. Hopkinson, S. A. Natanek, W. D. Man, A. Jackson, H. R. Gosker, A. M. Schols, J. Moxham, M. I. Polkey and E. F. Wouters** (2010). "The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity." *Eur Respir J* **36**(1): 81-8.
- Shahar, E., A. R. Folsom, S. L. Melnick, M. S. Tockman, G. W. Comstock, V. Gennaro, M. W. Higgins, P. D. Sorlie, W. J. Ko and M. Szklo** (1994). "Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and smoking-related chronic obstructive pulmonary disease. Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators." *N Engl J Med* **331**(4): 228-33.
- Shaikh, S. R., B. D. Rockett, M. Salameh and K. Carraway** (2009). "Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells." *J Nutr* **139**(9): 1632-9.
- Shiota, S., T. Okada, H. Naitoh, R. Ochi and Y. Fukuchi** (2004). "Hypoxia and hypercapnia affect contractile and histological properties of rat diaphragm and hind limb muscles." *Pathophysiology* **11**(1): 23-30.
- Short, K. R., M. L. Bigelow, J. Kahl, R. Singh, J. Coenen-Schimke, S. Raghavakaimal and K. S. Nair** (2005). "Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(15): 5618-23.
- Short, K. R., J. L. Vittone, M. L. Bigelow, D. N. Proctor and K. S. Nair** (2004). "Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(1): E92-101.
- Shoup, R., G. Dalsky, S. Warner, M. Davies, M. Connors, M. Khan, F. Khan and R. ZuWallack** (1997). "Body composition and health-related quality of life in patients with obstructive airways disease." *Eur Respir J* **10**(7): 1576-80.
- Shrikrishna, D., M. Patel, R. J. Tanner, J. M. Seymour, B. A. Connolly, Z. A. Puthuchery, S. L. Walsh, S. A. Bloch, P. S. Sidhu, N. Hart, P. R. Kemp, J. Moxham, M. I. Polkey and N. S. Hopkinson** "Quadriceps wasting and physical inactivity in patients with COPD." *Eur Respir J* **40**(5): 1115-22.
- Shrikrishna, D., M. Patel, R. J. Tanner, J. M. Seymour, B. A. Connolly, Z. A. Puthuchery, S. L. Walsh, S. A. Bloch, P. S. Sidhu, N. Hart, P. R. Kemp, J. Moxham, M. I. Polkey and N. S. Hopkinson** (2012). "Quadriceps wasting and physical inactivity in patients with COPD." *Eur Respir J* **40**(5): 1115-22.
- Simopoulos, A. P.** (1999). "Essential fatty acids in health and chronic disease." *Am J Clin Nutr* **70**(3 Suppl): 560S-569S.
- Simopoulos, A. P.** (2001). "Evolutionary aspects of diet and essential fatty acids." *World Rev Nutr Diet* **88**: 18-27.
- Simopoulos, A. P.** (2006). "Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases." *Biomed Pharmacother* **60**(9): 502-7.

- Simopoulos, A. P.** (2007). "Omega-3 fatty acids and athletics." *Curr Sports Med Rep* **6**(4): 230-6.
- Simopoulos, A. P.** (2008). "The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases." *Exp Biol Med (Maywood)* **233**(6): 674-88.
- Simpson, K., K. Killian, N. McCartney, D. G. Stubbing and N. L. Jones** (1992). "Randomised controlled trial of weightlifting exercise in patients with chronic airflow limitation." *Thorax* **47**(2): 70-5.
- Sin, D. D. and S. F. Man** (2006). "Skeletal muscle weakness, reduced exercise tolerance, and COPD: is systemic inflammation the missing link?" *Thorax* **61**(1): 1-3.
- Sin, D. D. and W. D. Reid** (2008). "Is inflammation good, bad or irrelevant for skeletal muscles in COPD?" *Thorax* **63**(2): 95-6.
- Skelly, J. R., D. Edge, C. M. Shortt, J. F. Jones, A. Bradford and K. D. O'Halloran** (2012). "Tempol ameliorates pharyngeal dilator muscle dysfunction in a rodent model of chronic intermittent hypoxia." *Am J Respir Cell Mol Biol* **46**(2): 139-48.
- Smith, G. I., P. Atherton, D. N. Reeds, B. S. Mohammed, D. Rankin, M. J. Rennie and B. Mittendorfer** (2011). "Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* **93**(2): 402-12.
- Smith, M. A. and M. B. Reid** (2006). "Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle." *Respir Physiol Neurobiol* **151**(2-3): 229-41.
- Sofi, F., G. Giorgi, F. Cesari, A. M. Gori, L. Mannini, G. Parisi, A. Casini, R. Abbate, G. F. Gensini and B. M. Poli** (2013). "The atherosclerotic risk profile is affected differently by fish flesh with a similar EPA and DHA content but different n-6/n-3 ratio." *Asia Pac J Clin Nutr* **22**(1): 32-40.
- Soler-Cataluna, J. J., M. A. Martinez-Garcia, P. Roman Sanchez, E. Salcedo, M. Navarro and R. Ochando** (2005). "Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **60**(11): 925-31.
- Song, J. H., Y. Inoue and T. Miyazawa** (1997). "Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters." *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(12): 2085-8.
- Sorice, M., V. Mattei, P. Matarrese, T. Garofalo, A. Tinari, L. Gambardella, L. Ciarlo, V. Manganeli, V. Tasciotti, R. Misasi and W. Malorni** (2012). "Dynamics of mitochondrial raft-like microdomains in cell life and death." *Commun Integr Biol* **5**(2): 217-9.
- SPLF** (2009). "[Recommendations of the French Language Society of Pneumology on the management of COPD (update 2009)]." *Presse Med* **39**(9): 895-8.
- Spragg, R. G., D. B. Hinshaw, P. A. Hyslop, I. U. Schraufstatter and C. G. Cochrane** (1985). "Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D1 cells after oxidant injury." *J Clin Invest* **76**(4): 1471-6.
- Spruit, M. A., R. Gosselink, T. Troosters, K. De Paepe and M. Decramer** (2002). "Resistance versus endurance training in patients with COPD and peripheral muscle weakness." *Eur Respir J* **19**(6): 1072-8.
- Spruit, M. A., R. Gosselink, T. Troosters, A. Kasran, G. Gayan-Ramirez, P. Bogaerts, R. Bouillon and M. Decramer** (2003). "Muscle force during an acute exacerbation in hospitalised patients with COPD and its relationship with CXCL8 and IGF-I." *Thorax* **58**(9): 752-6.
- Sridhar, M. K., A. Galloway, M. E. Lean and S. W. Banham** (1994). "An out-patient nutritional supplementation programme in COPD patients." *Eur Respir J* **7**(4): 720-4.

- Stadtman, E. R.** (1993). "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions." *Annu Rev Biochem* **62**: 797-821.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine** (2000). "Protein oxidation." *Ann N Y Acad Sci* **899**: 191-208.
- Stangel, M., U. K. Zettl, E. Mix, J. Zielasek, K. V. Toyka, H. P. Hartung and R. Gold** (1996). "H₂O₂ and nitric oxide-mediated oxidative stress induce apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts." *J Neuropathol Exp Neurol* **55**(1): 36-43.
- Stark, K. D., S. Y. Lim and N. Salem, Jr.** (2007). "Docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid supplementation alter rat skeletal muscle fatty acid composition." *Lipids Health Dis* **6**: 13.
- Steiner, M. C., R. L. Barton, S. J. Singh and M. D. Morgan** (2003). "Nutritional enhancement of exercise performance in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial." *Thorax* **58**(9): 745-51.
- Steyten, L. M., E. C. Creutzberg, H. J. Vrijhoef and E. F. Wouters** (2006). "COPD as a multicomponent disease: inventory of dyspnoea, underweight, obesity and fat free mass depletion in primary care." *Prim Care Respir J* **15**(2): 84-91.
- Stevenson, C. S., L. G. Koch and S. L. Britton** (2006). "Aerobic capacity, oxidant stress, and chronic obstructive pulmonary disease--a new take on an old hypothesis." *Pharmacol Ther* **110**(1): 71-82.
- Stillwell, W. and S. R. Wassall** (2003). "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid." *Chem Phys Lipids* **126**(1): 1-27.
- Strle, K., S. R. Broussard, R. H. McCusker, W. H. Shen, J. M. LeClerc, R. W. Johnson, G. G. Freund, R. Dantzer and K. W. Kelley** (2006). "C-jun N-terminal kinase mediates tumor necrosis factor-alpha suppression of differentiation in myoblasts." *Endocrinology* **147**(9): 4363-73.
- Stulnig, T. M., J. Huber, N. Leitinger, E. M. Imre, P. Angelisova, P. Nowotny and W. Waldhausl** (2001). "Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition." *J Biol Chem* **276**(40): 37335-40.
- Sugano, M. and F. Hirahara** (2000). "Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Japan." *Am J Clin Nutr* **71**(1 Suppl): 189S-96S.
- Sugawara, K., H. Takahashi, T. Kashiwagura, K. Yamada, S. Yanagida, M. Homma, K. Dairiki, H. Sasaki, A. Kawagoshi, M. Satake and T. Shioya** (2012). "Effect of anti-inflammatory supplementation with whey peptide and exercise therapy in patients with COPD." *Respir Med* **106**(11): 1526-34.
- Svanes, C., J. Sunyer, E. Plana, S. Dharmage, J. Heinrich, D. Jarvis, R. de Marco, D. Norback, C. Raheerison, S. Villani, M. Wjst, K. Svanes and J. M. Anto** (2010). "Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **65**(1): 14-20.
- Swallow, E. B., D. Reyes, N. S. Hopkinson, W. D. Man, R. Porcher, E. J. Cetti, A. J. Moore, J. Moxham and M. I. Polkey** (2007). "Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* **62**(2): 115-20.
- Szabo, I. and M. Zoratti** (1992). "The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore." *J Bioenerg Biomembr* **24**(1): 111-7.
- Tada, H., H. Kato, T. Misawa, F. Sasaki, S. Hayashi, H. Takahashi, Y. Kutsumi, T. Ishizaki, T. Nakai and S. Miyabo** (1992). "31P-nuclear magnetic resonance evidence of abnormal skeletal muscle metabolism in patients with chronic lung disease and congestive heart failure." *Eur Respir J* **5**(2): 163-9.
- Tai, C. C. and S. T. Ding** (2010). "N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention." *J Nutr Biochem* **21**(5): 357-63.

- Takabatake, N., H. Nakamura, S. Abe, S. Inoue, T. Hino, H. Saito, H. Yuki, S. Kato and H. Tomoike** (2000). "The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **161**(4 Pt 1): 1179-84.
- Tanaka, T., J. Yamamoto, S. Iwasaki, H. Asaba, H. Hamura, Y. Ikeda, M. Watanabe, K. Magoori, R. X. Ioka, K. Tachibana, Y. Watanabe, Y. Uchiyama, K. Sumi, H. Iguchi, S. Ito, T. Doi, T. Hamakubo, M. Naito, J. Auwerx, M. Yanagisawa, T. Kodama and J. Sakai** (2003). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15924-9.
- Tang, X., Z. J. Li, J. Xu, Y. Xue, J. Z. Li, J. F. Wang, T. Yanagita, C. H. Xue and Y. M. Wang** (2012). "Short term effects of different omega-3 fatty acid formulation on lipid metabolism in mice fed high or low fat diet." *Lipids Health Dis* **11**: 70.
- Taylor, C. T. and E. P. Cummins** (2009). "The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression." *Ann N Y Acad Sci* **1177**: 178-84.
- Taylor, L. A., L. Pletschen, J. Arends, C. Unger and U. Massing** (2010). "Marine phospholipids--a promising new dietary approach to tumor-associated weight loss." *Support Care Cancer* **18**(2): 159-70.
- Terkeltaub, R.** (2006). "Gout in 2006: the perfect storm." *Bull NYU Hosp Jt Dis* **64**(1-2): 82-6.
- Thomas, P. K., J. M. Cooper, R. H. King, J. M. Workman, A. H. Schapira, M. A. Goss-Sampson and D. P. Muller** (1993). "Myopathy in vitamin E deficient rats: muscle fibre necrosis associated with disturbances of mitochondrial function." *J Anat* **183** (Pt 3): 451-61.
- Thompson, C. H., R. J. Davies, G. J. Kemp, D. J. Taylor, G. K. Radda and B. Rajagopalan** (1993). "Skeletal muscle metabolism during exercise and recovery in patients with respiratory failure." *Thorax* **48**(5): 486-90.
- Totland, G. K., L. Madsen, B. Klementsén, H. Vaagenes, H. Kryvi, L. Froyland, S. Hexeberg and R. K. Berge** (2000). "Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids." *Biol Cell* **92**(5): 317-29.
- Trebble, T. M., S. A. Wootton, E. A. Miles, M. Mullee, N. K. Arden, A. B. Ballinger, M. A. Stroud, G. C. Burdge and P. C. Calder** (2003). "Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation." *Am J Clin Nutr* **78**(3): 376-82.
- Trendelenburg, A. U., A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama and D. J. Glass** (2009). "Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(6): C1258-70.
- Trupin, L., G. Earnest, M. San Pedro, J. R. Balmes, M. D. Eisner, E. Yelin, P. P. Katz and P. D. Blanc** (2003). "The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **22**(3): 462-9.
- Turan, N., S. Kalko, A. Stincone, K. Clarke, A. Sabah, K. Howlett, S. J. Curnow, D. A. Rodriguez, M. Cascante, L. O'Neill, S. Egginton, J. Roca and F. Falciani** (2011). "A systems biology approach identifies molecular networks defining skeletal muscle abnormalities in chronic obstructive pulmonary disease." *PLoS Comput Biol* **7**(9): e1002129.
- Turk, H. F. and R. S. Chapkin** (2013). "Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **88**(1): 43-7.

- Ubhi, B. K., J. H. Riley, P. A. Shaw, D. A. Lomas, R. Tal-Singer, W. MacNee, J. L. Griffin and S. C. Connor** (2012). "Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients." *Eur Respir J* **40**(2): 345-55.
- Udaka, J., T. Terui, I. Ohtsuki, K. Marumo, S. Ishiwata, S. Kurihara and N. Fukuda** (2011). "Depressed contractile performance and reduced fatigue resistance in single skinned fibers of soleus muscle after long-term disuse in rats." *J Appl Physiol* **111**(4): 1080-7.
- Ulven, S. M., B. Kirkhus, A. Lamglait, S. Basu, E. Elind, T. Haider, K. Berge, H. Vik and J. I. Pedersen** (2011). "Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers." *Lipids* **46**(1): 37-46.
- Vagaggini, B., F. Costa, S. Antonelli, C. De Simone, G. De Cusatis, F. Martino, S. Santerini and P. Paggiaro** (2009). "Clinical predictors of the efficacy of a pulmonary rehabilitation programme in patients with COPD." *Respir Med* **103**(8): 1224-30.
- Vandenbergh, E., K. P. Van de Woestijne and A. Gyselen** (1967). "Weight changes in the terminal stages of chronic obstructive pulmonary disease. Relation to respiratory function and prognosis." *Am Rev Respir Dis* **95**(4): 556-66.
- Vandervoort, A. A.** (2002). "Aging of the human neuromuscular system." *Muscle Nerve* **25**(1): 17-25.
- Vanfleteren, L. E., M. A. Spruit, M. Groenen, S. Gaffron, V. P. van Empel, P. L. Bruijnzeel, E. P. Rutten, J. Op 't Roodt, E. F. Wouters and F. M. Franssen** (2013). "Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **187**(7): 728-35.
- Vaughan, R. A., R. Garcia-Smith, M. Bisoffi, C. A. Conn and K. A. Trujillo** (2012). "Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis and metabolism in skeletal muscle cells." *Lipids Health Dis* **11**: 142.
- Vermeeren, M. A., A. M. Schols and E. F. Wouters** (1997). "Effects of an acute exacerbation on nutritional and metabolic profile of patients with COPD." *Eur Respir J* **10**(10): 2264-9.
- Vestbo, J., S. S. Hurd, A. G. Agustí, P. W. Jones, C. Vogelmeier, A. Anzueto, P. J. Barnes, L. M. Fabbri, F. J. Martinez, M. Nishimura, R. A. Stockley, D. D. Sin and R. Rodriguez-Roisin** (2013). "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary." *Am J Respir Crit Care Med* **187**(4): 347-65.
- Vianna, L. G., N. Koulouris, C. Lanigan and J. Moxham** (1990). "Effect of acute hypercapnia on limb muscle contractility in humans." *J Appl Physiol* **69**(4): 1486-93.
- Vogiatzis, I., S. Nanas and C. Roussos** (2002). "Interval training as an alternative modality to continuous exercise in patients with COPD." *Eur Respir J* **20**(1): 12-9.
- Vogiatzis, I., D. C. Simoes, G. Stratakis, E. Kourepini, G. Terzis, P. Manta, D. Athanasopoulos, C. Roussos, P. D. Wagner and S. Zakyntinos** (2010). "Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD." *Eur Respir J* **36**(2): 301-10.
- Vogiatzis, I., G. Stratakis, D. C. Simoes, G. Terzis, O. Georgiadou, C. Roussos and S. Zakyntinos** (2007). "Effects of rehabilitative exercise on peripheral muscle TNFalpha, IL-6, IGF-I and MyoD expression in patients with COPD." *Thorax* **62**(11): 950-6.
- Vogiatzis, I., G. Terzis, S. Nanas, G. Stratakis, D. C. Simoes, O. Georgiadou, S. Zakyntinos and C. Roussos** (2005). "Skeletal muscle adaptations to interval training in patients with advanced COPD." *Chest* **128**(6): 3838-45.

- Vogiatzis, I., G. Terzis, G. Stratakos, E. Cherouveim, D. Athanasopoulos, S. Spetsioti, I. Nasis, P. Manta, C. Roussos and S. Zakynthinos** (2011). "Effect of pulmonary rehabilitation on peripheral muscle fiber remodeling in patients with COPD in GOLD stages II to IV." *Chest* **140**(3): 744-52.
- Vogiatzis, I., G. Zakynthinos and V. Andrianopoulos** (2012). "Mechanisms of physical activity limitation in chronic lung diseases." *Pulm Med* **2012**: 634761.
- von Haehling, S., J. E. Morley and S. D. Anker** (2012). "From muscle wasting to sarcopenia and myopenia: update 2012." *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **3**(4): 213-7.
- Vorrink, S. N., H. S. Kort, T. Troosters and J. W. Lammers** (2011). "Level of daily physical activity in individuals with COPD compared with healthy controls." *Respir Res* **12**: 33.
- Wada, M., C. J. DeLong, Y. H. Hong, C. J. Rieke, I. Song, R. S. Sidhu, C. Yuan, M. Warnock, A. H. Schmaier, C. Yokoyama, E. M. Smyth, S. J. Wilson, G. A. FitzGerald, R. M. Garavito, X. Sui de, J. W. Regan and W. L. Smith** (2007). "Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products." *J Biol Chem* **282**(31): 22254-66.
- Wagner, P. D.** (2006). "Skeletal muscles in chronic obstructive pulmonary disease: deconditioning, or myopathy?" *Respirology* **11**(6): 681-6.
- Wagner, P. D.** (2008). "Possible mechanisms underlying the development of cachexia in COPD." *Eur Respir J* **31**(3): 492-501.
- Wan, X. S., M. N. Devalaraja and D. K. St Clair** (1994). "Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene." *DNA Cell Biol* **13**(11): 1127-36.
- Wang, J., J. C. Yu, W. M. Kang and Z. Q. Ma** (2012). "Superiority of a fish oil-enriched emulsion to medium-chain triacylglycerols/long-chain triacylglycerols in gastrointestinal surgery patients: a randomized clinical trial." *Nutrition* **28**(6): 623-9.
- Wang, Y., Q. W. Lin, P. P. Zheng, J. S. Zhang and F. R. Huang** (2013). "DHA Inhibits Protein Degradation More Efficiently than EPA by Regulating the PPARgamma/NFkappaB Pathway in C2C12 Myotubes." *Biomed Res Int* **2013**: 318981.
- Wang, Y. C., W. H. Kuo, C. Y. Chen, H. Y. Lin, H. T. Wu, B. H. Liu, C. H. Chen, H. J. Mersmann, K. J. Chang and S. T. Ding** (2010). "Docosahexaenoic acid regulates serum amyloid A protein to promote lipolysis through down regulation of perilipin." *J Nutr Biochem* **21**(4): 317-24.
- Wasse, L. K., C. Sunderland, J. A. King, R. L. Batterham and D. J. Stensel** (2012). "Influence of rest and exercise at a simulated altitude of 4,000 m on appetite, energy intake, and plasma concentrations of acylated ghrelin and peptide YY." *J Appl Physiol* **112**(4): 552-9.
- Wedzicha, J. A., T. A. Seemungal, P. K. MacCallum, E. A. Paul, G. C. Donaldson, A. Bhowmik, D. J. Jeffries and T. W. Meade** (2000). "Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels." *Thromb Haemost* **84**(2): 210-5.
- Weed, H. G., M. L. Ferguson, R. L. Gaff, D. S. Hustead, J. L. Nelson and A. C. Voss** (2011). "Lean body mass gain in patients with head and neck squamous cell cancer treated perioperatively with a protein- and energy-dense nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid." *Head Neck* **33**(7): 1027-33.
- Weekes, C. E., P. W. Emery and M. Elia** (2009). "Dietary counselling and food fortification in stable COPD: a randomised trial." *Thorax* **64**(4): 326-31.

- Wei, H. K., Y. Zhou, S. Jiang, Y. X. Tao, H. Sun and J. Peng** (2013). "Feeding a DHA-enriched diet increases skeletal muscle protein synthesis in growing pigs: association with increased skeletal muscle insulin action and local mRNA expression of insulin-like growth factor 1." *Br J Nutr*: 1-10.
- Weldon, S. M., A. C. Mullen, C. E. Loscher, L. A. Hurley and H. M. Roche** (2007). "Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid." *J Nutr Biochem* **18**(4): 250-8.
- Welle, S., K. Bhatt, B. Shah, N. Needler, J. M. Delehanty and C. A. Thornton** (2003). "Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle." *J Appl Physiol* **94**(4): 1479-84.
- Westerterp-Plantenga, M. S., K. R. Westerterp, M. Rubbens, C. R. Verwegen, J. P. Richelet and B. Gardette** (1999). "Appetite at "high altitude" [Operation Everest III (Comex-'97)]: a simulated ascent of Mount Everest." *J Appl Physiol* **87**(1): 391-9.
- Weylandt, K. H., C. Y. Chiu, B. Gomolka, S. F. Waechter and B. Wiedenmann** (2012). "Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectin formation." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **97**(3-4): 73-82.
- Whittaker, J. S., C. F. Ryan, P. A. Buckley and J. D. Road** (1990). "The effects of refeeding on peripheral and respiratory muscle function in malnourished chronic obstructive pulmonary disease patients." *Am Rev Respir Dis* **142**(2): 283-8.
- Whittom, F., J. Jobin, P. M. Simard, P. Leblanc, C. Simard, S. Bernard, R. Belleau and F. Maltais** (1998). "Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Med Sci Sports Exerc* **30**(10): 1467-74.
- Wijendran, V. and K. C. Hayes** (2004). "Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health." *Annu Rev Nutr* **24**: 597-615.
- Williams, T. J. and G. I. Snell** (1997). "Early and long-term functional outcomes in unilateral, bilateral, and living-related transplant recipients." *Clin Chest Med* **18**(2): 245-57.
- Wilson, D. O., R. M. Rogers, E. C. Wright and N. R. Anthonisen** (1989). "Body weight in chronic obstructive pulmonary disease. The National Institutes of Health Intermittent Positive-Pressure Breathing Trial." *Am Rev Respir Dis* **139**(6): 1435-8.
- Winder, W. W., E. B. Taylor and D. M. Thomson** (2006). "Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise." *Med Sci Sports Exerc* **38**(11): 1945-9.
- Wisloff, U., J. Helgerud, O. J. Kemi and O. Ellingsen** (2001). "Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max and cardiac hypertrophy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(3): H1301-10.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman** (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." *Cell* **98**(1): 115-24.
- Wuyam, B., J. F. Payen, P. Levy, H. Bensaidane, H. Reutenauer, J. F. Le Bas and A. L. Benabid** (1992). "Metabolism and aerobic capacity of skeletal muscle in chronic respiratory failure related to chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **5**(2): 157-62.
- Xu, J., M. T. Nakamura, H. P. Cho and S. D. Clarke** (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats." *J Biol Chem* **274**(33): 23577-83.

- Xue, B., Z. Yang, X. Wang and H. Shi** (2012). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids antagonize macrophage inflammation via activation of AMPK/SIRT1 pathway." *PLoS One* **7**(10): e45990.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn and T. Kadowaki** (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nat Med* **8**(11): 1288-95.
- Yaqoob, P. and P. Calder** (1995). "Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages." *Cell Immunol* **163**(1): 120-8.
- Ye, M., H. Yu, W. Yu, G. Zhang, L. Xiao, X. Zheng and J. Wu** (2012). "Evaluation of the significance of circulating insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *J Int Med Res* **40**(3): 1025-35.
- Yende, S., G. W. Waterer, E. A. Tolley, A. B. Newman, D. C. Bauer, D. R. Taaffe, R. Jensen, R. Crapo, S. Rubin, M. Nevitt, E. M. Simonsick, S. Satterfield, T. Harris and S. B. Kritchevsky** (2006). "Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects." *Thorax* **61**(1): 10-6.
- Yoshikawa, T., T. Ide, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, S. Yatoh, T. Kitamine, H. Okazaki, Y. Tamura, M. Sekiya, A. Takahashi, A. H. Hastay, R. Sato, H. Sone, J. Osuga, S. Ishibashi and N. Yamada** (2003). "Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling." *Mol Endocrinol* **17**(7): 1240-54.
- You, Y. N., K. R. Short, M. Jourdan, K. A. Klaus, S. Walrand and K. S. Nair** (2009). "The effect of high glucocorticoid administration and food restriction on rodent skeletal muscle mitochondrial function and protein metabolism." *PLoS One* **4**(4): e5283.
- Youle, R. J. and A. M. van der Bliek** (2012). "Mitochondrial fission, fusion, and stress." *Science* **337**(6098): 1062-5.
- Young, P., M. Dewse, W. Fergusson and J. Kolbe** (1999). "Respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease: predictors of nonadherence." *Eur Respir J* **13**(4): 855-9.
- Yu, F., M. Hedstrom, A. Cristea, N. Dalen and L. Larsson** (2007). "Effects of ageing and gender on contractile properties in human skeletal muscle and single fibres." *Acta Physiol (Oxf)* **190**(3): 229-41.
- Yu, Y. H., S. C. Wu, W. T. Cheng, H. J. Mersmann, T. L. Shen and S. T. Ding** (2011). "The function of porcine PPARgamma and dietary fish oil effect on the expression of lipid and glucose metabolism related genes." *J Nutr Biochem* **22**(2): 179-86.
- Zhang, G., N. Shirai and H. Suzuki** (2011). "Relationship between the effect of dietary fat on swimming endurance and energy metabolism in aged mice." *Ann Nutr Metab* **58**(4): 282-9.
- Zhao, Y., S. Joshi-Barve, S. Barve and L. H. Chen** (2004). "Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation." *J Am Coll Nutr* **23**(1): 71-8.
- Zheng, B., S. Ohkawa, H. Li, T. K. Roberts-Wilson and S. R. Price** (2010). "FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy." *FASEB J* **24**(8): 2660-9.

- Zhou, D., K. Ghebremeskel, M. A. Crawford and R. Reifen** (2006). "Vitamin A deficiency enhances docosahexaenoic and osbond acids in liver of rats fed an alpha linolenic acid-adequate diet." *Lipids* **41**(3): 213-9.
- Zierhut, W. and H. G. Zimmer** (1989). "Effect of calcium antagonists and other drugs on the hypoxia-induced increase in rat right ventricular pressure." *J Cardiovasc Pharmacol* **14**(2): 311-8.
- Zimmer, H. G.** (1983). "Measurement of left ventricular hemodynamic parameters in closed-chest rats under control and various pathophysiologic conditions." *Basic Res Cardiol* **78**(1): 77-84.
- Zimmer, H. G., W. Zierhut, R. C. Seesko and A. E. Varekamp** (1988). "Right heart catheterization in rats with pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy." *Basic Res Cardiol* **83**(1): 48-57.
- Zoll, J., N. Koulmann, L. Bahi, R. Ventura-Clapier and A. X. Bigard** (2003). "Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity." *J Cell Physiol* **194**(2): 186-93.
- Zoll, J., B. N'Guessan, F. Ribera, E. Lampert, D. Fortin, V. Veksler, X. Bigard, B. Geny, J. Lonsdorfer, R. Ventura-Clapier and B. Mettauer** (2003). "Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients." *J Am Coll Cardiol* **42**(1): 126-32.
- Zoll, J., H. Sanchez, B. N'Guessan, F. Ribera, E. Lampert, X. Bigard, B. Serrurier, D. Fortin, B. Geny, V. Veksler, R. Ventura-Clapier and B. Mettauer** (2002). "Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle." *J Physiol* **543**(Pt 1): 191-200.

Annexe 1

Publication dans une revue à comité de lecture international

Mourmoura E, Le Guen M, Dubouchaud H, Couturier K, Vitiello D, Lafond JL, Richardson M, Leverve X, Demaison L. **Middle age aggravates myocardial ischemia through surprising upholding of complex II activity, oxidative stress, and reduced coronary perfusion.** Age (Dordr). 2011 Sep;33(3):321-36. Epub 2010 Sep 29.

Communications orales et affichées

- Meetochondrie, Aussois, mai 2010 (communication affichée)

Effet d'un exercice aigu d'intensité modérée sur le fonctionnement de la mitochondrie de muscle squelettique

Le Guen Marie, Coisne Tom, Batandier Cécile, Leverve Xavier, Dubouchaud Hervé

- Meetochondrie, La colle sur loup, mai 2011 (communication affichée)

Effects of an oral administration of polyunsaturated fatty acids (DHA) on muscular metabolism during hypoxia

Marie Le Guen, Valérie Chaté, Gérard Pieron², Thierry Coste, Christophe Piso¹, Hervé Dubouchaud

- 4^{ème} symposium international Nutrition, Biologie de l'Oxygène et Médecine Radicaux libres, nutrition et vieillissement : des aspects fondamentaux aux applications cliniques, Paris, juin 2011 (communication affichée)

Differential effects of a High-Fructose diet or a High-Fat/high-Sucrose diet on the mitochondrial ROS production and respiration in rat liver and skeletal muscle

Couturier K, Le Guen M, Coudray C, Feillet-Coudray C, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Dubouchaud H.

- ACAPS 2011, Rennes, octobre 2011 (communication orale)

Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés omega-3 (DHA) sur le métabolisme musculaire en hypoxie

Marie Le Guen, Valérie Chaté, Gérard Pieroni, Thierry Coste, Christophe Pison, Hervé Dubouchaud

- Biophysical meeting, San Diego, février 2012 (communication affichée)

Quantitative study of tubulin distribution in skeletal muscle cells

Marie Le Guen, Marcela Gonzalez-Granillo, Rita Guzun, Alexei Grichine, François Boucher, Hervé Dubouchaud, Yves Usson and Valdur Saks

- Experimental biology 2012, San Diego, avril 2012 (communication affichée)

Effects of an oral supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids on muscle mass, function and metabolism under hypoxia

Hervé Dubouchaud¹, Marie Le Guen¹, Valérie Chaté¹, Gérard Pieroni², Thierry Coste³, Christophe Pison¹

- Journées alpines de pneumologie, Briançon, avril 2013 (communication orale)

Intérêts d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga-3 (DHA) sur la fonte musculaire des patients BPCO : apports d'un modèle animal

Marie Le Guen, Valérie Chaté, Gérard Pieroni, Thierry Coste, Christophe Pison, Hervé Dubouchaud

Annexe 2

Composition du mélange enrichi en GPL-DHA produit par l'entreprise Application Santé des Lipides

Description		Propriétés physiques	
Lécithine d'œuf sans graisses contenant 8% (p/p) de DHA avec 64-79% de phosphatidylcholine		Consistance : agglomérat brut Couleur : jaune clair	
CAS-No	93685-90-6	Solubilité (solution à 5%)	
Caractéristiques		Eau dispersible à 20°C Graisse soluble à 60°C Solvants chlorés soluble à 20°C Ethanol soluble à 20°C	
Composition chimique		Données bactériologiques	
Phospholipides [g/100]		C.F.U. [g] p.p.q. 1000 Levures [g] p.p.q. 10 Champignons [g] p.p.q. 10 Escherichia Coli [/10g] négatif Salmonelles [/10g] négatif	
Phosphatidylcholine	64.0-79.0		
Phosphatidyléthanolamine	12.0-18.0		
Lysophosphatidylcholine	p.p.q. 3.0		
Sphingomyéline	p.p.q. 3.0		
Autres composants naturels	p.p.q. 1.5		
Lipides non polaires			
Triglycérides	p.p.q. 5.0		
Cholestérol	p.p.q. 3.0		
Acides gras libres	p.p.q. 1.0		
DL- α -Tocopherol	0.05-0.15		
Composition type en acides gras (en % des acides gras totaux)		Conditionnement	
Acide palmitique	28 - 34	Conditionnement standard : 5 kg dans un double sachet en PE	
Acide stéarique	10 - 14		
Acide oléique	20 - 28		
Acide linoléique	10 - 16		
Acide linoléique (Oméga 3)	p.p.q. 0.5		
Acide arachidonique	p.p.q. 3.0		
Acide eicosapentaénoïque (EPA, Oméga 3)	p.p.q. 1.5		
Acide docosahexaénoïque (DHA, Oméga 3)	11 - 14		
Données Analytiques		Conditions de stockage	
Phosphore [g/100g]	3.5 - 4.1	Stockage recommandé : dans un récipient fermé à <-20°C+/- 5°C	
Protéines [g/100g]	p.p.q. 1.0	Fermer les récipients ouverts immédiatement.	
Eau [g/100g]	p.p.q. 2.0		
Ethanol [g/100g]	p.p.q. 0.5		
Indice de peroxyde [meq O2/kg]	p.p.q. 5		
Indice d'iode	75 - 85		
Métaux lourds [ppm]	p.p.q. 10		

Toutes les données et les recommandations comme les formulations faites ci-dessus sont basées sur notre état actuel de la connaissance. Nous démentons toute la responsabilité sur les risques ou les formules qui peuvent résulter de l'utilisation de nos produits, y compris l'utilisation inexacte et illicite.

p.p.q. = pas plus que

Supplémentation en DHA et muscle squelettique de rat adulte en hypoxie

Le maintien ou le renforcement de la masse et de la fonction musculaire, altérées chez les patients BPCO, est un objectif primordial pour préserver, voire améliorer leur tolérance à l'effort, leur qualité de vie et leur survie. Afin d'optimiser la prise en charge de cette dysfonction musculaire, la réhabilitation est complétée par des interventions nutritionnelles, encore appelées réhabilitations nutritionnelles. Dans ce contexte, l'apport d'acides gras polyinsaturés de la série n-3, et plus particulièrement d'acide docosahexaénoïque (DHA), pourrait s'avérer intéressant en raison de leurs effets bénéfiques démontrés dans plusieurs pathologies chroniques. L'objectif de ce travail était donc de caractériser les effets d'une supplémentation en DHA sur la tolérance à l'effort et sur le métabolisme énergétique des muscles squelettiques de rats adultes exposés à une hypoxie comme modèle de muscle de patient BPCO au stade de l'insuffisance respiratoire chronique. La tolérance à l'effort est améliorée par le DHA, que les rats soient conditionnés en normoxie ou en hypoxie. En normoxie, les mécanismes impliqués seraient liés à un effet du DHA mimétique de celui d'un exercice d'endurance, avec une activation de l'AMPK et une amélioration de la fonction mitochondriale étudiée sur fibres musculaires perméabilisées. En hypoxie, le DHA agirait différemment, réduisant les effets de l'hypoxie sur le muscle, sans que les mécanismes mimétiques de l'exercice d'endurance ne soient clairement retrouvés. La prise de DHA chez des rats entraînés et conditionnés en hypoxie permet également un gain d'endurance mais les mécanismes à l'origine de cet effet ne sont pas élucidés et nécessitent des travaux complémentaires. Au vu des résultats sur le muscle, la supplémentation en DHA pourrait donc être bénéfique dans la prise en charge de la dysfonction musculaire dans les maladies chroniques telles que la BPCO.

Mots clés: BPCO, mitochondrie, nutrition, fibre musculaire, exercice, tolérance à l'effort.

DHA supplementation and skeletal muscle of adult rat in hypoxia

The maintenance and reinforcement of skeletal muscle mass and function, impaired in COPD patients, is a crucial aim to preserve, and even improve, their exercise tolerance, quality of life and survival. In order to optimize the management of such a muscular dysfunction, rehabilitation could be completed by nutritional interventions, also called nutritional rehabilitation. In this context, the intake of polyunsaturated fatty acids of the n-3 class, and particularly of docosahexaenoic acid (DHA), could be interesting, due to their benefic effects demonstrated in many chronic pathologies. Therefore, the aim of our work was to characterize the effects of DHA supplementation on exercise tolerance and skeletal muscle metabolism in rats exposed to hypoxia as a model of muscle dysfunction as seen in COPD patients suffering chronic respiratory failure. Results showed that exercise tolerance was improved by DHA in both normoxia and hypoxia conditions. In normoxia, the involved mechanisms may rely on an endurance exercise mimetic effect of DHA, including AMPK activation and improved mitochondrial function studied on permeabilized muscular fibers. In hypoxia, DHA acts differently, probably by minimizing hypoxia effects on muscle. However, the endurance exercise mimetic mechanisms were not clearly found. In hypoxia exposed-endurance trained-rats, DHA improved endurance exercise capacity but the involved mechanisms were not fully characterized and need further work. In conclusion, our results on muscle suggest that DHA supplementation could be beneficial in management of muscular dysfunction induced by chronic diseases such as COPD.

Keywords: COPD, mitochondria, nutrition, muscle fibre, exercise, exercise tolerance