

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS D'UN RÉGIME RICHE EN GRAS SUR LES FONCTIONS ET LA  
DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DANS DES MUSCLES OXYDATIFS ET  
GLYCOLYTIQUES DE JEUNES RATS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN KINANTHROPOLOGIE

PAR

JEAN-PHILIPPE LEDUC-GAUDET

MAI 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à remercier mon directeur le Dr. Gilles Gouspillou et mon co-directeur le Dr. David H. St-Pierre pour leurs encadrements durant mon parcours à la maîtrise. Encore une fois, merci pour votre confiance, pour la motivation et le soutien que vous m'avez apporté durant ses 2 années. Au fil de nos nombreuses discussions de nature scientifique, vous m'avez transmis votre passion et votre rigueur intellectuelle. Vous avez été un mentor pour moi merci encore Gilles pour m'avoir partagé votre savoir mitochondrial, on est d'accord sur un point : « La mitochondrie c'est la vie ! ».

Un merci tout particulier aux membres de mon jury les Drs. Antony Karelis (UQAM) et Jean-Claude Lavoie (UdM) qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit de mémoire et pour la discussion très enrichissante qui a suivi la présentation de mon avant-projet. Merci, Dr. Karelis de m'avoir donné l'envie d'aller plus loin et pour les discussions, votre aide, votre support et les échanges enrichissants depuis le début de mon parcours universitaire.

Je tiens également à remercier les organismes de santé qui m'ont supportée financièrement durant ma maîtrise, soit l'Institut de Recherche en Santé du Canada (IRSC), ainsi que les Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS).

Merci à l'ensemble de l'équipe de recherche du département des sciences de l'activité physique de l'Université de Québec à Montréal pour leur précieuse aide dans mon parcours universitaire. Un merci tout spécial à Carole Roy (UQAM) technicienne de laboratoire, à Robin Drolet (UQAM) technicien en électronique et à Jocelyne Mercier assistante de recherche (Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine) pour votre soutien technique au laboratoire.

Merci à tous les collègues étudiants qui ont su m'appuyer et m'encourager lors mon cheminement à l'UQAM tel que Sébastien Barbat, François Chabot, Charlotte Pion, François Lemieux, Sarah Bogard, Julie Faitg, Yannick Feiter-Murphy et Félix St-Jean.

Un merci tout spécial à mon collègue Olivier Reynaud pour ta persévérance avec les Western-blot et ton aide précieuse qui a permis de finaliser ce projet.

Également, un énorme merci à mes parents et ma famille pour votre soutien pendant mes études. Je réserve un merci tout particulier à ma conjointe Josée-Claude Dufour pour ton support du début à la fin.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	II
TABLE DES MATIÈRES .....	IV
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
RÉSUMÉ .....	X
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction générale sur l'obésité.....	1
1.1.1 L'obésité, une épidémie mondiale?.....	1
1.2 La définition du surpoids et de l'obésité.....	3
1.2.1 Les causes de l'obésité.....	4
1.2.2 Les conséquences de l'obésité .....	4
1.3 La mitochondrie, un organite fascinant.....	7
1.3.1 Généralités.....	7
1.3.2 La phosphorylation oxydative.....	9
1.3.3 La morphologie mitochondriale .....	13
1.3.4 Dynamique mitochondriale.....	17
1.3.5 La mitochondrie, un site important de production de RLDO .....	18
1.4 Obésité, dysfonctions mitochondriales et complications métaboliques : des relations controversées .....	20
1.4.1 Énoncé du problème.....	26
1.4.2 Objectifs de la recherche.....	27
1.4.3 Hypothèses .....	27
CHAPITRE II MÉTHODOLOGIE.....	28
2.1 Protocole expérimentale.....	28
2.1.1 Étude in vivo du métabolisme énergétique .....	29
2.1.2 Procédure lors du sacrifice des animaux.....	29
2.1.3 Respiration mitochondriale .....	30

2.2 Production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
2.3 Expression d'ARNm par réaction en chaîne polymérase (qPCR) .....	36
2.4 Étude du contenu et de la dynamique des mitochondries par Western blot.....	39
2.5 Limites .....	41
2.6 Quantifications et analyses.....	41
CHAPITRE III RÉSULTATS .....	42
3.1 Caractéristiques des animaux .....	42
3.2 Respiration mitochondriale .....	47
3.3 Production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
3.4 Effet d'un REG sur l'expression des gènes impliqués dans le transport des acides gras et dans la régulation de la dynamique mitochondriale en qPCR.....	56
3.5 Quantification du contenu des sous-unités représentatives des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative .....	59
3.6 Contenu en protéines Mfn2 et OPA1 .....	60
CHAPITRE IV DISCUSSION .....	62
4.1 Impact d'un REG sur la respiration mitochondriale .....	63
4.2 Effet d'un REG sur la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	65
4.3 Impact d'un REG sur le contenu en protéines sur la phosphorylation oxydative.	67
4.4 Effet d'un REG sur la dynamique mitochondriale.....	68
CHAPITRE V CONCLUSION & PERSPECTIVES .....	71
5.1 Pertinence scientifique .....	72

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Évolution de la prévalence des adultes en surpoids. ....	1
Figure 1.2 : Prévalence des enfants en surpoids. ....	2
Figure 1.3 : Complications de l'obésité chez les enfants. ....	5
Figure 1.4 : Anatomie mitochondriale .....	7
Figure 1.5 : Phosphorylation oxydative .....	10
Figure 1.6 : Complexité de la mitochondrie .....	14
Figure 1.7 : Morphologie mitochondriale .....	15
Figure 1.8 : Populations mitochondriales en orientation longitudinale .....	16
Figure 1.9 : Dynamique mitochondriale .....	17
Figure 1.10 : Mécanismes potentiels reliant l'altération des fonctions mitochondriales et l'insulino-résistance .....	21
Figure 2.1 : Design expérimental .....	28
Figure 2.2 : Cage métabolique .....	29
Figure 2.3 : Séparation mécanique des fibres musculaires .....	31
Figure 3.1 : Évolution du poids pendant 14 jours .....	42
Figure 3.2 : Prise de poids après 14 jours .....	43
Figure 3.3 : Poids des muscles soléaires .....	44
Figure 3.4 : Poids des muscles EDL .....	44
Figure 3.5 : Effet des diètes sur le RER .....	46
Figure 3.6: Flexibilité métaboliques .....	47
Figure 3.7 : Effet d'un REG sur respiration mitochondriale du SOL en présence de substrats du complexe I .....	49
Figure 3.8 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries du SOL en présence de substrats du complexe I.....	49
Figure 3.9 : Effet d'un REG sur respiration mitochondriale des EDL en présence de substrats du complexe I .....	50

Figure 3.10 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries d'EDL en présence de substrats du complexe I .....	50
Figure 3.11 : Effet d'un REG sur la respiration mitochondriale des muscles SOL en présence de palmitoyl-carnitine .....	51
Figure 3.12 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries des muscles SOL en présence de palmitoyl-carnitine .....	51
Figure 3.13 : Effet d'un REG sur la respiration mitochondriale d'EDL en présence de palmitoyl-carnitine .....	52
Figure 3.14 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries d'EDL en présence de palmitoyl-carnitine .....	52
Figure 3.15 : Production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B) .....	54
Figure 3.16 : Fuite d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec le SOL (Fig.A) et l'EDL (Fig.B).....	54
Figure 3.17 : Production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B) en présence palmitoyl-carnitine .....	55
Figure 3.18 : Fuite d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec le SOL (Fig.A) et l'EDL (Fig.B) en présence palmitoyl-carnitine .....	55
Figure 3.19 : Effet d'un REG sur l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides gras dans le SOL (Fig.3.19A) et l'EDL (Fig. 3.19B) .....	57
Figure 3.20 : Effet d'un REG sur l'expression des gènes régulant la dynamique mitochondriale dans le SOL (Fig.3.20A) et l'EDL (Fig. 3.20B) .....	58
Figure 3.21 : Contenu OXPHOS dans les muscles SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B) .....	59
Figure 3.22 : Contenu en Mfn-2 dans les muscles SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B) .....	60
Figure 3.23 : Contenu en OPA1 dans les muscles SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B) .....	61



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Complexes de la chaîne de transport des électrons .....	11
Tableau 2.1 : Protocole 1 d'évaluation de la respiration mitochondriale .....	32
Tableau 2.2 : Protocole 2 d'évaluation de la respiration mitochondriale .....	33
Tableau 2.3 : Protocole 1 pour l'évaluation de l'émission d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
Tableau 2.4 : Protocole 2 pour l'évaluation de l'émission d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	35
Tableau 2.5 : Séquences des amorces utilisées pour les gènes utilisés en qPCR.....	37
Tableau 2.6 : Description des gènes analysés en qPCR.....	38
Tableau 3.1: Paramètres alimentaires et métaboliques .....	45

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### A

- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- ADP : Adénosine DiPhosphate
- ATP : Adénosine TriPhosphate
- AGL : Acides gras libre
- ACR (acceptor control ratio)
- AGLC : Acides gras à longue chaîne
- ADN mt : ADN mitochondrial

### B

- DRP1: Dynamin-Related Protein 1
- DAG: Diacylglycérols

### C

- CER : Céramide
- Cox : Cytochrome c oxydase
- CS : Citrate synthase
- CPT1 : Carnitine O-Palmitoyltransférase 1

### E

- EDL: Muscle long extenseur des orteils

### F

- FIS1 : Mitochondrial-FISsion 1 protein

### I

- IR : Récepteur à l'insuline

### M

- Mfn-1: Pro-fusion Mitofusin 1
- Mfn-2: Pro-fusion Mitofusin 2
- Mn-SOD : Superoxyde dismutase associée au manganèse

### O

- OPA-1: OPTic Atrophy 1
- OXPHOS : Phosphorylation oxydative

### P

- PGC-1  $\alpha$  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1
- PL : Muscle plantaire

### R

- RLDO : Radicaux libres dérivés de l'oxygène
- RC : Rat contrôle
- REG : Régime enrichi en gras

### S

- SOL : Muscle soléaire

### T

- TA : Tibial antérieur
- Tfam : Facteur A de transcription mitochondrial

## RÉSUMÉ

L'obésité est un facteur de risque majeur du développement de complications métaboliques. Avec la suralimentation, l'inactivité physique et la sédentarité dans les pays industrialisés, la prévalence de l'obésité est à la hausse, et ce, même chez les enfants. En effet, un apport nutritionnel supérieur à la dépense énergétique accompagné d'un mode de vie sédentaire amène une augmentation excessive d'acides gras et de dérivés lipidiques, dans divers tissus, incluant les tissus musculaires. Parmi les différentes hypothèses proposées pour expliquer les effets néfastes de l'obésité sur la santé, il existe une hypothèse impliquant l'accumulation de dysfonctions mitochondriales. Ainsi, une accumulation excessive de lipides au niveau intramyocellulaire pourrait causer une augmentation de la production de radicaux libres ainsi qu'une réduction de la capacité oxydative au niveau mitochondrial. Ces dysfonctions mitochondriales pourraient conséquemment avoir des effets néfastes majeurs sur le développement des dysfonctions métaboliques induites par l'obésité. Cependant, cette hypothèse impliquant une augmentation de la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène et une diminution de la capacité oxydative mitochondriale, reste très controversée à l'heure actuelle. Ainsi, les mécanismes cellulaires et moléculaires susceptibles de contribuer aux dysfonctions métaboliques induites par l'obésité nécessitent davantage d'études. Une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant le fonctionnement des mitochondries et de l'impact d'une diète obésogène sur leur fonctionnement permettra de mieux lutter contre les conséquences néfastes de l'obésité.

Pour cela, ce présent travail de mémoire a consisté d'étudier l'impact d'un régime hyperlipidique chez de jeunes rats Wistar mâles sur le fonctionnement mitochondrial dans les muscles oxydatifs et glycolytiques.

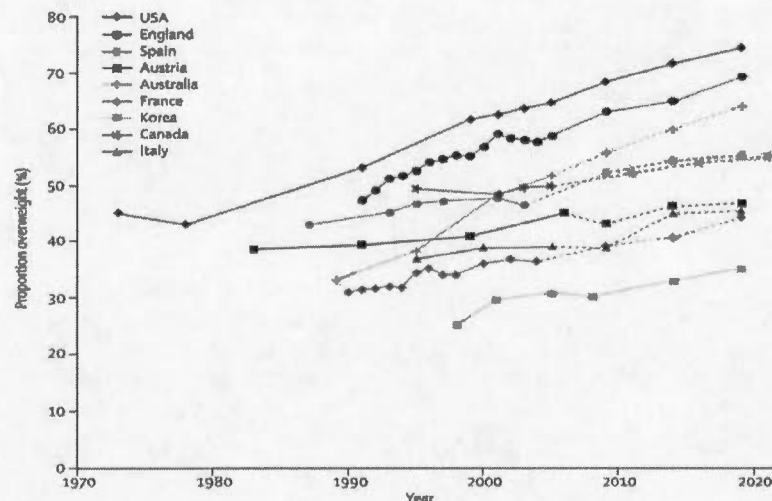
**Mots clés :** Obésité, muscle squelettique, mitochondries, métabolisme, production de radicaux libres, énergétique mitochondriale, dynamique mitochondriale

## CHAPITRE I INTRODUCTION

### 1.1 Introduction générale sur l'obésité

#### 1.1.1 L'obésité, une épidémie mondiale?

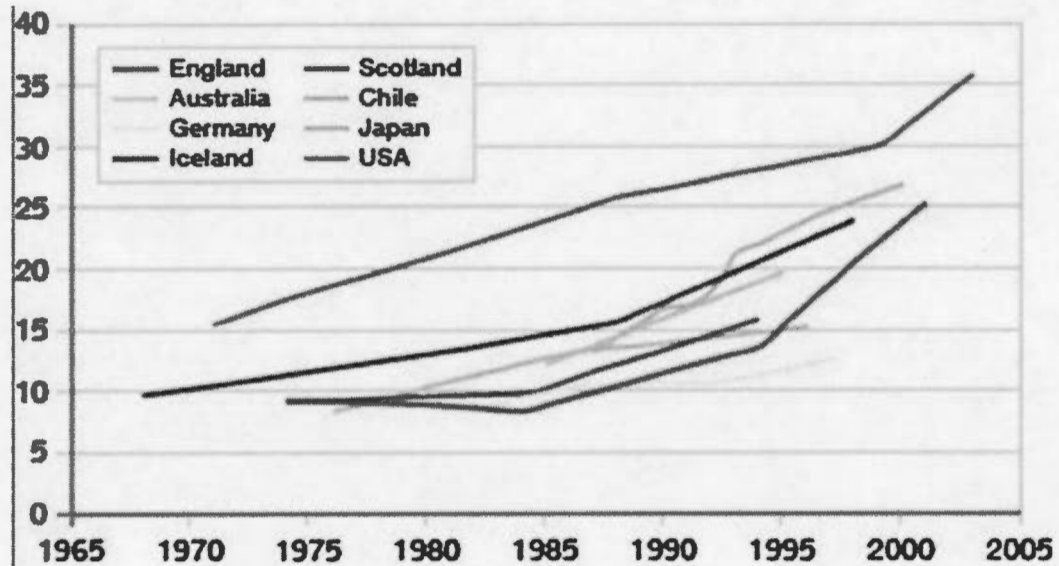
Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la prévalence de l'obésité est à la hausse inquiétante et ce phénomène se répercute à un niveau global. En 2015, il est estimé que 700 millions de personnes souffrent d'obésité et que plus de 2.3 milliards de personnes sont en surpoids (Farag & Gaballa, 2011). La figure 1.1 illustre bien la forte expansion de la prévalence des adultes en surpoids dans divers pays (Wang et al., 2011).



**Figure 1.1 : Évolution de la prévalence des adultes en surpoids.**  
Legende : Image tirée de (Wang et al., 2011).

Le problème est particulièrement sérieux aux États-Unis où l'on retrouve la plus grande proportion d'adultes en surpoids (environ 60%) dans la population adulte. Malheureusement cette forte hausse des taux d'obésité est également présente chez les enfants.

Au Canada, la prévalence de l'obésité a triplé dans les populations pédiatriques depuis 1981. En effet, on y observe qu'environ 20% des enfants sont en surpoids et 12% d'entre eux sont obèses (Janssen, 2013). La figure 2 illustre bien la forte augmentation de la proportion des enfants en surpoids (Garver et al., 2013), un phénomène particulièrement alarmant aux Etats-Unis.



**Figure 1.2 : Prévalence des enfants en surpoids.**  
Légende : Image tirée de l'article de (Garver et al., 2013).

L'obésité sévère chez les enfants et adolescents augmente le risque de développer le syndrome métabolique d'environ 50% en grandissant (Weiss et al., 2004). De plus, l'obésité sévère chez les enfants est associée au développement précoce du diabète de type II (Sinha et al., 2002).

## 1.2 La définition du surpoids et de l'obésité

Le surpoids et l'obésité sont caractérisés par un excès de graisse corporelle pouvant nuire à l'état de santé de l'individu. Au niveau clinique, le surpoids se définit par un indice de masse corporelle (IMC : poids (kg) / taille (m<sup>2</sup>)) supérieur à 25 kg/m<sup>2</sup> et l'obésité par un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup>.

Deux types d'obésité existent: I) l'obésité androïde, qui se caractérise par un excès de masse adipeuse au niveau du tronc et de l'abdomen et II) l'obésité gynoïde, qui se distingue par une accumulation préférentielle de masse grasse au niveau des cuisses et des hanches. En ce qui concerne l'obésité androïde (abdominal) elle se définit par un tour de taille  $\geq 102$ cm chez l'homme et  $\geq 88$ cm chez la femme (Douketis et al., 2005). L'obésité de type gynoïde, contrairement à l'obésité androïde, est moins associée aux risques de développer des complications métaboliques (Pouliot et al., 1994; Despres et al., 2008).

Il est admis qu'il y existe un lien étroit entre la graisse viscérale intra-abdominale, l'insulino-résistance et le diabète de type II. D'un point de vue épidémiologie, 80% des patients atteints du diabète de type II sont obèses. Ceci démontre une forte association entre le diabète de type II et une adiposité excessive (Aguer & Harper, 2012).

Il est important de noter que l'IMC est de nos jours moins en vogue qu'il y a quelques années de cela, et plusieurs autres techniques, beaucoup plus précises, sont maintenant utilisées pour évaluer les différents degrés d'obésité. À titre d'exemple, nous pouvons citer l'absorption biphotonique à rayons X (DEXA) qui permet une estimation précise de la composition corporelle (quantité et pourcentages des masses grasse et maigre).

### **1.2.1 Les causes de l'obésité**

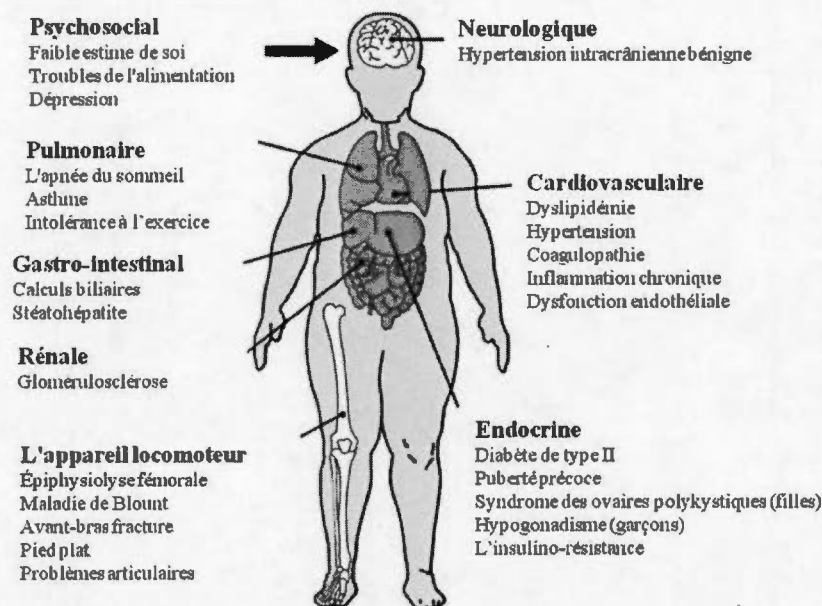
Plusieurs facteurs influençant le gain de masse grasse, tel que l'hérédité, l'âge, l'ethnie, l'environnement social, le sexe, le temps de sommeil et le niveau d'activité physique. Dans notre société les problèmes de mauvaise alimentation sont un facteur important favorisant le gain de masse grasse (Francis et al., 2009). Une alimentation riche en lipides s'accompagne souvent d'apport calorique plus élevé menant à la prise de masse grasse. Il a plusieurs évidences suggèrent que la régulation des comportements alimentaires chez les enfants soit un mécanisme par lequel certains gènes influence la prédisposition à l'obésité (Carnell et al., 2008; Carnell & Wardle, 2008). Les voies de signalisations périphériques contrôlant la sensation de satiété ont également un impact direct sur l'obésité (cf. (Luquet et al., 2008) pour une revue détaillée).

### **1.2.2 Les conséquences de l'obésité**

Les conséquences de l'obésité sont énormes, elles ne se limitent pas seulement au niveau de la perte de qualité de vie causée par l'excès de graisse, mais engendrent également un large éventail de complications métaboliques. Par exemple, au niveau de notre système de santé, les coûts associés à l'obésité sont extrêmement élevés. Il existe une étroite association entre l'augmentation de l'IMC et les coûts directs ou indirects en terme de santé sociale, la réduction de la productivité et une mortalité précoce (Dee et al., 2014). En 2006 au Canada, les coûts directs reliés aux soins associés au surpoids et à l'obésité représentaient environ 6 milliards de dollars, soit 4.1% du budget total de la santé et environ 5 milliards de dollars en coûts indirects (Anis et al., 2010).

Les conséquences de l'obésité ne se limitent pas à la perte de qualité de vie causée par l'excès de graisse. Il est en effet bien reconnu, tel qu'indiqué précédemment, que l'obésité est étroitement reliée au développement de complications métaboliques. Chez les enfants et les adultes, l'obésité est le premier facteur de risque modifiable qui augmente considérablement les risques de développer plusieurs complications telles

que le diabète de type II, l'hypertension et des maladies cardiovasculaires (cf. (Goran et al., 2003)). La figure 3, tirée de l'étude de Garver et al., liste quelques complications associées à l'obésité chez les enfants (Garver et al., 2013).



**Figure 1.3 : Complications de l'obésité chez les enfants.**

**Légende :** Schéma illustrant les principales complications de l'obésité et pathologies associées chez les enfants, adaptée de l'article de (Garver et al., 2013).

L'obésité chez l'enfant n'est pas seulement un problème de santé au cours de la jeunesse, mais le devient aussi chez l'adulte. Un excès de masse grasse entraîne plusieurs complications chez les enfants et adolescents (complication cardiovasculaire, complications pulmonaires, complications métaboliques, etc.) qui souvent persistent et s'aggravent à l'âge adulte.

Il y a une étroite relation entre la résistance à l'insuline et l'accumulation lipidique dans les tissus ectopiques, particulièrement dans les muscles squelettiques (Summers, 2006; Bosma et al., 2012). En raison de sa masse qui représente environ 40% de la masse corporelle totale, le tissu musculaire joue un rôle prépondérant dans le développement de l'insulino-résistance (DeFronzo & Tripathy, 2009). Le muscle squelettique est le



principal tissu permettant l'absorption du glucose en réponse à l'insuline in vivo; par conséquent, l'absorption du glucose par ce tissu joue un rôle important dans la régulation de la glycémie (Klip & Paquet, 1990).

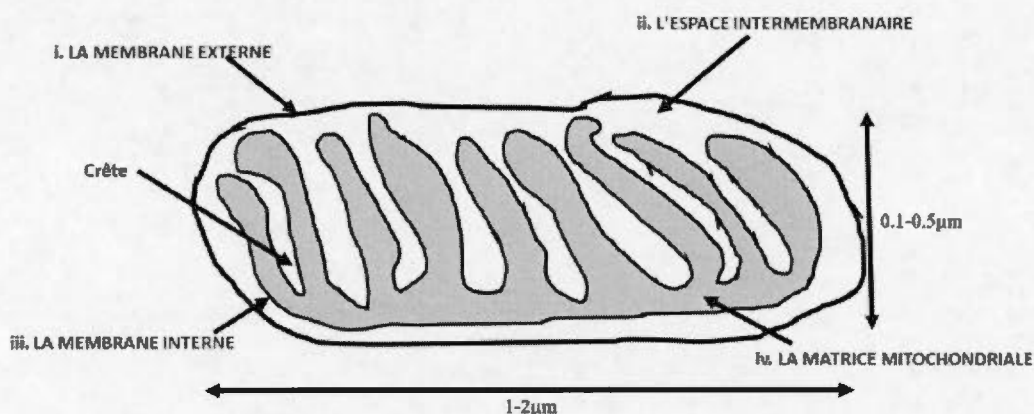
Parmi les différentes hypothèses proposées pour expliquer les effets néfastes de l'obésité sur la santé, il existe une hypothèse suggérant l'influence de l'accumulation de dysfonctions mitochondriales. Cette hypothèse est basée sur le fait qu'une accumulation excessive de lipides au niveau intramyocellulaire pourrait causer une accumulation de dysfonctions mitochondriales au niveau des muscles squelettiques et qui, incidemment, perturberait le fonctionnement des voies de signalisation du récepteur à l'insuline. Cependant, les mécanismes sous-jacents sont encore partiellement élucidés et la littérature scientifique reste à ce jour très controversée. La prochaine partie du présent mémoire détaillera, après une présentation brève de notions essentielles de biologie mitochondriale, cette hypothèse mitochondriale liant obésité et complications métaboliques.

### 1.3 La mitochondrie, un organe fascinant

#### 1.3.1 Généralités

Les mitochondries sont des organites retrouvés dans les cellules eucaryotes et jouant un rôle central au niveau du métabolisme énergétique cellulaire. Aussi, les mitochondries sont impliquées dans plusieurs autres aspects de la vie cellulaire, tels que la régulation de l'apoptose, l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  et la régulation du potentiel d'oxydoréduction (REDOX) cellulaire.

La structure des mitochondries est complexe et peut être découpée en quatre composantes : (i) la membrane externe (ii) l'espace intermembranaire (iii) la membrane interne, et (iv) la matrice mitochondriale. Il y a également des crêtes mitochondriales, telles qu'illustrées dans la figure 1.4.



**Figure 1.4 : Anatomie mitochondriale**  
**Légende :** Schéma de l'anatomie d'une mitochondrie.

**La membrane externe** est constituée de lipides ( $\approx 50\%$ ) et de protéines ( $\approx 50\%$ ), les protéines de la membrane externe permettent les échanges entre le cytosol et l'espace intermembranaire (cf (Fontanesi, 2015) pour une revue détaillée). Au niveau de la membrane externe, les porines, étant des protéines transmembranaires, également appelées pores anioniques voltage-dépendants (VDAC), permettent les échanges d'ions et de petits métabolites hydrosolubles, dans les 2 sens. Un autre système de transport existe, le complexe TOM de 450kDA (translocase de la membrane externe) ancré dans la membrane externe permettant la translocation de plus grosses molécules cytotoliques vers l'espace inter-membranaire.

**L'espace inter-membranaire** est le compartiment situé entre les deux membranes avec une composition similaire au cytosol. Cette espace contient une forte concentration en protons, ce qui est à l'origine de sa charge positive. Ce compartiment contient des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative mitochondriale (i.e. cytochrome C) et des protéines pro-apoptotiques (endonuclease G et l'apoptosis-inducing factor AIF par exemple).

**La membrane interne** est constituée majoritairement de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative mitochondriale (ratio protéines/lipides : 75 : 25%). Les lipides de la membrane interne sont en grande proportion des cardiolipines et des phospholipides. Plusieurs transporteurs sont ancrés dans la membrane interne, telle que le complexe TOM (translocase de la membrane interne), qui permet la translocation de protéines située dans l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. Cette membrane a également une perméabilité sélective permettant de maintenir divers gradients nécessaires au bon fonctionnement mitochondrial et notamment à la synthèse de l'ATP.

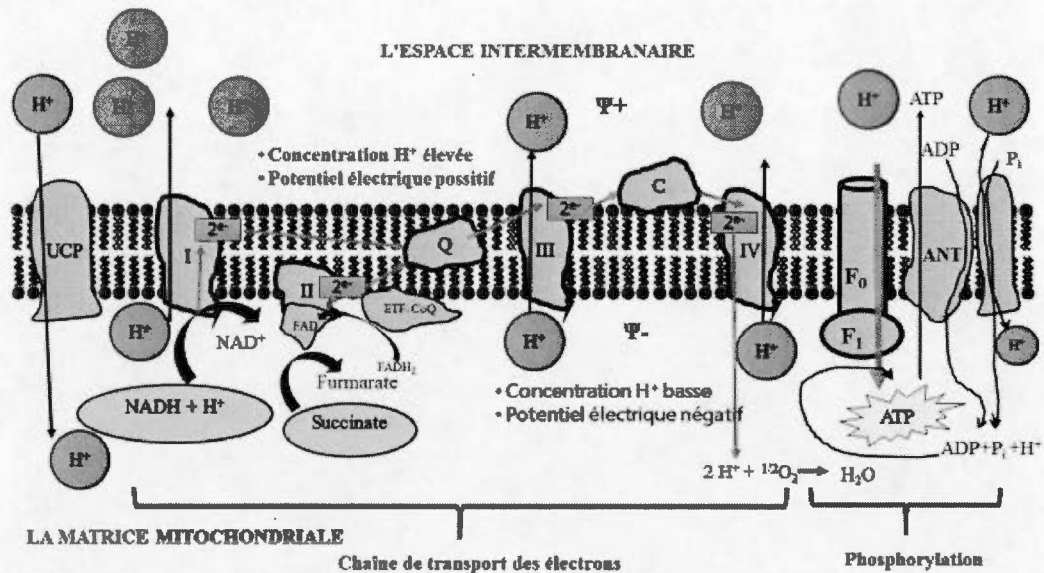
**La matrice** est un compartiment contenant l'ADN mitochondrial (ADNmt), des molécules d'ARNmt, d'ARNt et plusieurs enzymes notamment celles impliquées dans le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation.

**Le génome mitochondrial :** le génome mitochondrial code 37 gènes; 2ARN ribosomique, 22 ARN de transfert et 13 sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire. La molécule d'ADNmt est circulaire, comparativement à l'ADN nucléaire qui lui est linéaire. La majorité des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires, synthétisées dans le cytosol et importées dans les mitochondries (cf (Scarpulla, 2002; Scarpulla et al., 2012) pour une revue détaillée). Parmi les protéines impliquées dans la chaîne de transport des électrons, seul le complexe II est totalement encodé par l'ADN nucléaire (Tableau 1). Par ailleurs, le génome nucléaire encode la grande majorité des protéines mitochondriales, tel que le facteur de transcription mitochondriale A (TFAM). Il existe également des cofacteurs, tels que PGC-1  $\alpha$  ( Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1) participant directement ou indirectement à la régulation de la réplication des sous-unités de la chaîne de transport des électrons codés par l'ADNmt, notamment en co-activant NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) (Wu et al., 1999).

### **1.3.2 La phosphorylation oxydative**

La phosphorylation oxydative mitochondriale représente l'ensemble des processus biochimiques couplant consommation d'oxygène à phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP). La théorie du fonctionnement de la phosphorylation oxydative a été proposée par le biochimiste britannique Peter Mitchell en 1961, bien avant que son fonctionnement ne soit établi expérimentalement (Mitchell, 1961).

La majorité de la conversion d'énergie chimique utilisable par la cellule provient de réactions au niveau de la matrice et de la membrane interne mitochondriale. Le schéma ci-dessous illustre la phosphorylation oxydative mitochondriale.



**Figure 1.5 : Phosphorylation oxydative**

**Légende :** Schéma de la phosphorylation oxydative inspiré de la théorie de (Mitchell, 1961; Mitchell & Moyle, 1967) et de la revue de (Bottje, 2015). I, complexe I; II, complexe II; Q; Coenzyme Q; III, complexe III; C, cytochrome C; IV, complexe IV; H<sup>+</sup>, proton; NADH, nicotinamide adénine di-nucléotide réduit; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé; FADH<sub>2</sub>, flavine adénine di-nucléotide réduit; FAD, flavine adénine di-nucléotide oxydé; e<sup>-</sup>, électron; P<sub>i</sub>, phosphate inorganique; ADP, adénosine di-phosphate; ATP, adénosine-triphosphate; ETF-CoQ, ETF Coenzyme Q oxydoréductase; ANT, adénine nucléotide translocase; UCP, protéine découplante.

Les mécanismes de transformation d'énergie par la phosphorylation oxydative débutent au niveau de la chaîne de transport des électrons permettant l'établissement d'un gradient électrochimique de H<sup>+</sup>. La chaîne de transport des électrons se situe au niveau de la membrane interne mitochondriale. La chaîne de transport des électrons est composée de quatre complexes protéiques (Tableau 1).

**Tableau 1.1: Complexes de la chaîne de transport des électrons**

	Fonction enzymatique	Sous unités ADN nucléaire	Sous unités ADN mt
I	NADH-Coenzyme Q oxydoréductase	~30	7
II	Succinate-Coenzyme Q oxydoréductase	4	0
III	Coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase	~8	1
IV	Cytochrome C oxydase	~6	3

**Légende :** Tableau adapté de l'article de (Lemire, 2005).

Le tableau 1 résume les sous-unités protéiques des 4 complexes de la chaîne respiratoire qui sont codées par des gènes nucléaires et mitochondriaux. Les complexes I, III et IV expulsent des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, permettent l'établissement d'un gradient électrochimique de  $H^+$ .

Il y a également 2 accepteurs d'électrons mobiles, le Coenzyme Q et le cytochrome C, qui connectent les complexes les uns aux autres, tel qu'illustré dans la figure 1.5. Ces complexes protéiques sont impliqués dans l'oxydation des coenzymes  $NADH + H^+$  provenant de la glycolyse, et  $NADH + H^+$  et  $FADH_2$  provenant du cycle de krebs et de la  $\beta$ -oxyation. L'ATP synthase, une protéine enchassée dans la membrane interne mitochondriale, permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP, de phosphate inorganique ( $P_i$ ) et d'un proton ( $H^+$ ) en utilisant le gradient électro-chimique de protons généré par la chaîne de transfert des électrons.

Tel qu'illustré dans la figure 1.5, le complexe I (NADH-Coenzyme oxydoréductase) de la chaîne respiratoire récupère les 2 électrons du  $NADH + H^+$  pour les transférer à l'ubiquinone (Coenzyme Q). Cette réaction d'oxydoréduction s'accompagne d'un transfert de 4  $H^+$  vers l'espace inter-membranaire. L'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) catalyse la réaction permettant la formation d'AcétylCoA. Les enzymes glutamate déshydrogénase et malate déshydrogénase permettent d'oxyder le glutamate et le malate en  $\alpha$ -kétoglutarate et l'oxaloacetate respectivement, deux intermédiaires

du cycle de Krebs. Ces réactions permettent simultanément de générer du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  pour approvisionner le complexe I en électrons.

Le complexe II (Succinate-Coenzyme Q oxydoréductase) arrache 2 électrons au succinate, puis transfère ces 2 électrons à la Coenzyme Q. Le complexe II ne permet cependant pas de pomper de proton vers l'espace inter-membranaire. Le complexe II permet l'oxydation du succinate en fumarate, permettant ainsi de réduire son centre  $\text{FAD}^+$  en  $\text{FADH}_2$ . Il existe d'autres substrats pouvant être oxydés par des déshydrogénases contenant un centre  $\text{FAD}^+$  afin de transférer des électrons au Coenzyme Q. Par exemple, l'enzyme ETF ubiquinone Coenzyme Q oxydoréductase approvisionne la Coenzyme Q en électrons provenant de la  $\beta$ -oxydation (cf (Eaton, 2002) pour une revue détaillée).

La Coenzyme Q intervient en tant que transporteur mobile d'électrons vers le complexe III (Coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase). Le complexe III transite de la Coenzyme Q au cytochrome C, ce dernier étant un accepteur d'électron mobile situé dans l'espace intermembranaire, tel qu'illustré dans la figure 1.5. L'énergie de ce transfert d'électrons permet au complexe III de pomper  $4\text{H}^+$  vers l'espace intermembranaire, augmentant ainsi le gradient électrochimique de protons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). Les 2 électrons du cytochrome C sont transférés au complexe IV. Les électrons cédés au complexe IV sont transférés vers l'oxygène qui est l'accepteur final d'électrons de cette chaîne d'oxydoréduction. La liaison des électrons avec l'oxygène au niveau du complexe IV amène à sa réduction en  $\text{H}_2\text{O}$ . L'énergie de cette réaction permettra de pomper  $2\text{H}^+$  vers l'espace intermembranaire.

La matrice mitochondriale est un compartiment avec une faible quantité de  $\text{H}^+$  et un potentiel électrique négatif, comparativement à l'espace intermembranaire ayant une grande quantité de  $\text{H}^+$  et un potentiel électrique positif. Les complexes I, III et IV pompent plusieurs  $\text{H}^+$  vers l'espace intermembranaire favorisant le gradient électrochimique de protons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). Les 2 composantes du gradient électrochimique

sont : (I) la composante électrique ou potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) et (II) la composante chimique ou le  $\Delta\text{pH}$ .

L'ATP synthase utilisera ce gradient électrochimique, souvent appelé force motrice, pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP, du phosphate inorganique ( $\text{P}_i$ ) et d'un proton ( $\text{H}^+$ ). Il y a 2 composantes de l'ATP synthase catalysant la synthèse de l'ATP. La première composante  $\text{F}_0$  est située dans la membrane interne, celle-ci participe au transfert des protons vers la matrice. La deuxième composante  $\text{F}_1$  contient plusieurs sous-unités et se caractérise par une structure sphérique essentielle à la synthèse d'ATP.

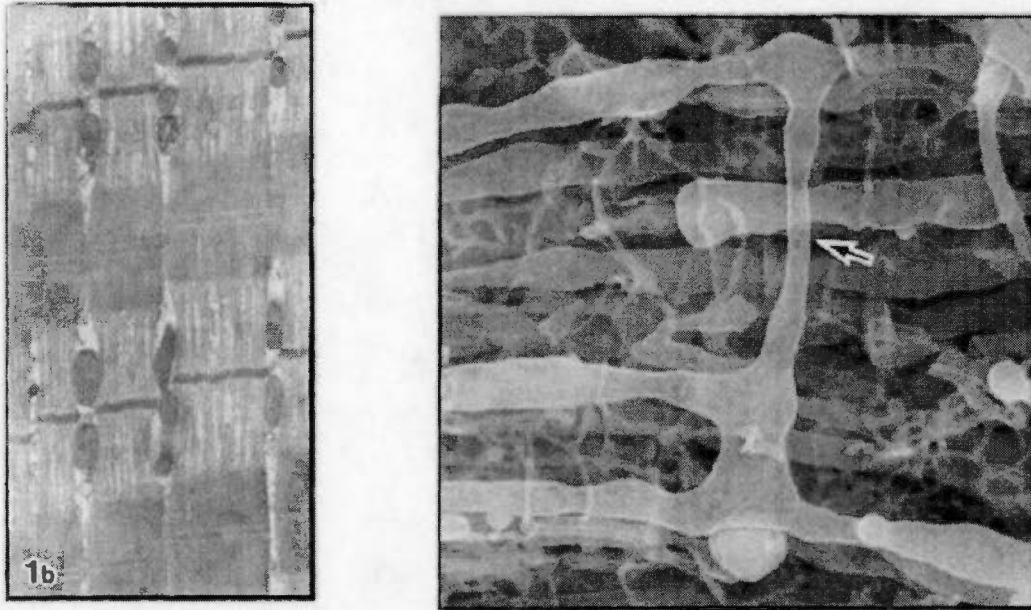
La protéine ANT (adénine nucléotide translocase) joue un rôle central au niveau de l'énergie mitochondriale en co-transportant l'ATP vers l'espace intermembranaire et l'ADP vers la matrice. L'activité de l'ANT est très importante pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Tel que présenté à la figure 1.5, la synthèse d'ATP nécessite de l'ADP, du phosphate inorganique et un proton. Les transporteurs de phosphate sont importants pour le ravitaillement en  $\text{P}_i$  et en  $\text{H}^+$  au niveau de la matrice mitochondriale.

### **1.3.3 La morphologie mitochondriale**

La compréhension de l'effet de la morphologie des mitochondries sur leurs fonctionnements n'est pas encore bien établie. Avec les progrès technologiques depuis les années 1900, plusieurs études ont contribué à une meilleure caractérisation de la structure des mitochondries (cf (Ernster & Schatz, 1981) pour une revue détaillée). Par exemple, une étude datant de 1945, suggère, avec des images de mitochondries obtenues à l'aide d'un microscope à transmission électronique (TEM), l'existence d'une membrane externe (Claude & Fullam, 1945). En 1997, les chercheurs Ogata & Yamasaki ont décrit la morphologie des mitochondries au niveau musculaire en



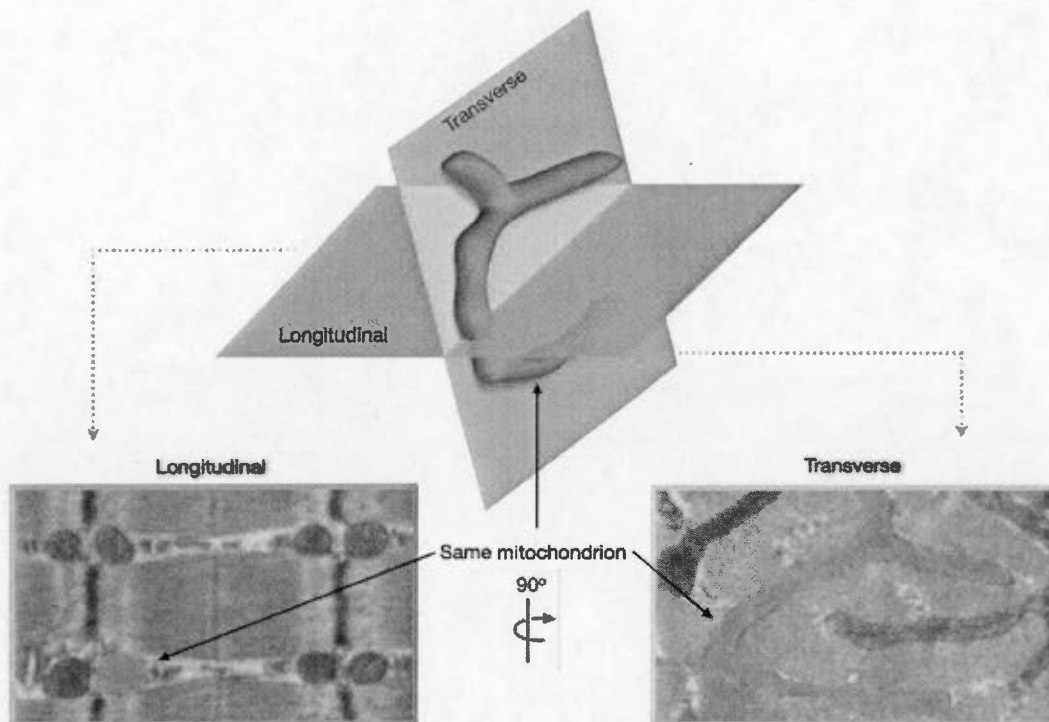
utilisant une technique de cryofracture en microscopie par balayage électronique (SEM) (Ogata & Yamasaki, 1997). La figure 1.6 dérivée de l'étude Ogata & Yamasaki illustre bien la complexité des réseaux mitochondriaux dans le muscle squelettique.



**Figure 1.6 : Complexité de la mitochondrie**

**Légende :** Image tirée de l'article (Ogata & Yamasaki, 1997) montrant la complexité du réseau mitochondriaux.

Dans la majorité des livres de physiologie, la mitochondrie est présentée comme un organe ayant la forme d'un haricot. Il est maintenant reconnu que la morphologie des mitochondries est beaucoup plus complexe. La morphologie des mitochondries peut être étudiée en utilisant la microscopie électronique en transmission (TEM). Cette méthode étant très fiable pour caractériser les mitochondries sur le plan transversal et longitudinal, tel que présentée à la figure 1.7.



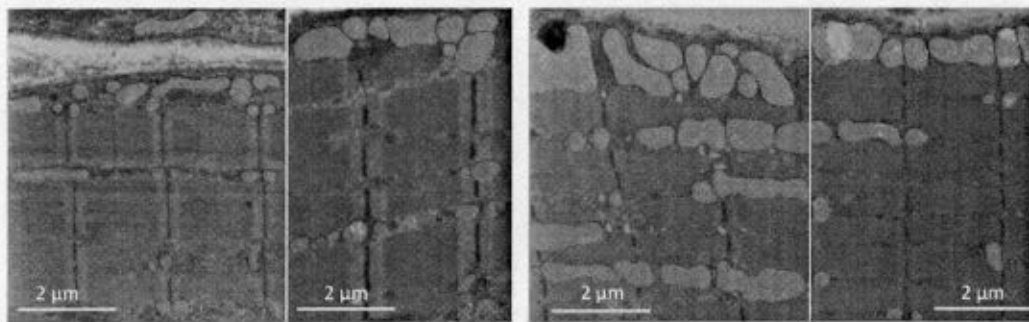
### Figure 1.7 : Morphologie mitochondriale

**Légende :** Figure adaptée de (Leduc-Gaudet et al., 2015), illustrant l'importance d'étudier la morphologie mitochondriales en tenant compte de l'orientation longitudinale et transversale.

La figure 1.7, provenant d'une étude de notre laboratoire publiée dans le journal *Oncotarget* souligne l'importance d'investiguer la morphologie en tenant compte l'orientation longitudinale et transversale. Avec l'orientation longitudinale on observe bien les sarcomères qui sont les plus petites unités contractiles du muscle, ceux-ci étant situés entre 2 bandes/disques Z. Les mitochondries sur le plan longitudinal sont principalement localisées à proximité des bandes Z. Cette étude a permis de faire une caractérisation détaillée de la morphologie mitochondriale dans un contexte de vieillissement musculaire en tenant compte de l'orientation longitudinale et transversale des 2 populations de mitochondries (Leduc-Gaudet et al., 2015). Ceci nous a permis de mettre en évidence que le vieillissement musculaire s'accompagne d'une

augmentation de la complexité (branchement) des mitochondries inter-myofibrillaires et d'un élargissement des mitochondries sous-sarcolemmales. Dans cet article, nous proposons également un mécanisme moléculaire qui pourrait permettre d'expliquer ces changements de morphologie mitochondriale. En effet, nous rapportons que le ratio Mfn2 sur DRP1 (processus détaillé dans la prochaine section) est augmenté avec le vieillissement, suggérant une augmentation de la fusion des mitochondries.

Au niveau musculaire, il existe deux populations de mitochondries, soient les mitochondries sous-sarcolemmales, SS (en jaune) et inter-myofibrillaires, IMF (en bleu), tel que présentées ci-dessous.



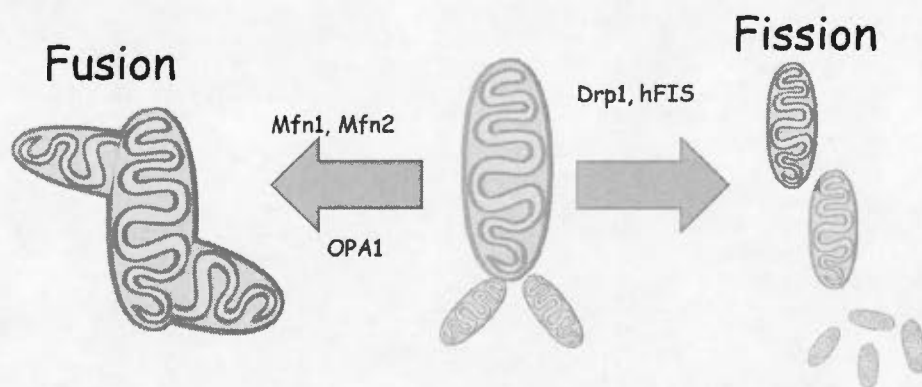
**Figure 1.8 : Populations mitochondriales en orientation longitudinale**  
**Légende :** Image tirée de l'article de (Leduc-Gaudet et al., 2015).

Les deux sous-populations mitochondriales sont connues pour avoir différentes propriétés biochimiques et des niveaux d'activité enzymatique différents (e.g. capacité d'oxydation des acides gras plus élevé dans les mitochondries IMF) et peuvent également varier selon la typologie musculaire (Cogswell et al., 1993; Chen et al., 2003; Holloway et al., 2012). Ces deux sous-populations mitochondriales semblent également répondre différemment au stress métabolique (Chen et al., 2003). On sait maintenant qu'il existe une interrelation entre la fonction et la morphologie mitochondriale. Bien que les relations morphologie / fonctions des mitochondries sont encore mal caractérisées, il est maintenant reconnu que la morphologie mitochondriale influence le fonctionnement des mitochondries (Chen et al., 2005; Jahani-Asl et al.,

2007; Yu et al., 2008; Ong et al., 2010; Gomes et al., 2011) et vice versa (Benard et al., 2007).

### 1.3.4 Dynamique mitochondriale

Une des découvertes récentes dans le domaine de la biologie mitochondriale est le fait que les mitochondries forment un réseau dynamique, c'est-à-dire qu'elles sont capables de changer de forme par l'intermédiaire de processus de fusion et fission (cf (Chan, 2006) pour une revue détaillée). Alors que la fusion est régulée par les protéines pro-fusion Mitofusine 1 & 2 (Mfn-1 & -2) et Optic Atrophy 1 (OPA-1), la fission quant à elle est régulée par les protéines pro-fission Dynamin-Related Protein 1 (DRP1) et mitochondrial-Fission 1 protein (FIS1). Les principales protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale intervenant le processus fission/fusion sont présentées dans la figure 1.9.



**Figure 1.9 : Dynamique mitochondriale**

**Légende :** Schéma des processus de la dynamique mitochondriale avec les protéines pro-fusion (Mfn1, Mfn2 et OPA1) et pro-fission (Drp1 et hFIS).

L'importance de la dynamique et de la morphologie mitochondriales a été confirmée *in vivo* au niveau musculaire, puisqu'il a récemment été démontré que dans des souris transgéniques que l'absence des protéines pro-fusion Mfn 1 & 2 induit au niveau musculaire une morphologie mitochondriale anormale, des dysfonctions mitochondriales sévères et une accumulation de mutation de l'ADN mt (Chen et al.,

2010). L'étude de Chen et al., suggèrent que les processus de la dynamique mitochondriale sont importants pour la stabilité et l'intégrité de l'ADN mt. De plus, au cours de la dernière décennie, plusieurs recherches ont montré l'implication de la dynamique mitochondriale dans l'obésité et d'autres maladies métaboliques (Bach et al., 2005; Chan, 2012; Sebastian et al., 2012; Cheng & Almeida, 2014; Liu et al., 2014; Putti et al., 2015). Par exemple, il a été montré qu'un régime enrichi en gras d'une durée de 40 semaines diminue le contenu des protéines pro-fusion Mfn 1 & 2 et augmente le contenu des protéines DRP1 et FIS1 dans le muscle squelettique de souris (Liu et al., 2014).

### **1.3.5 La mitochondrie, un site important de production de RLDO**

Par définition les RLDO sont des espèces réactives oxygénées (eg.  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) dérivés du métabolisme de l'oxygène. Il est connu que l'augmentation de la consommation d'oxygène amène une augmentation de production de RLDO par la chaîne de transport des électrons. Un déséquilibre du statut d'oxydoréduction (REDOX), peut être délétère pour l'intégrité cellulaire (cf. (Droge, 2002) pour une revue détaillée). La production de RLDO en faible concentration participe à régulation de plusieurs processus cellulaires (e.g. réponse immunitaire, inflammation). Une production élevée de RLDO, quant à elle peut provoquer des dommages cellulaires en augmentant la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines et des mutations à l'ADN. Au niveau de l'organisme, il existe plusieurs sources de RLDO provenant du réticulum endoplasmique, de la xanthine oxydase, de la NADPH oxydase, des peroxysomes et des mitochondries.

La mitochondrie, mais plus précisément la chaîne de transport des électrons, joue un rôle important dans la production de RLDO. L'étude de Balaban et al., suggère qu'environ 90% des RLDO sont d'origine mitochondriale (Balaban et al., 2005). Des études in vitro sur des mitochondries isolées suggèrent qu'environ 1 à 3% de l' $\text{O}_2$  utilisées par les mitochondries conduiraient à la formation de RLDO (Boveris et al.,

1972; Boveris & Chance, 1973). Ce chiffre semble être surévalué comparativement aux expériences *in vivo* indiquant qu'environ 0.4 à 0.8% conduiraient à la formation de RLDO (Hansford et al., 1997).

Les complexes I et III sont les principaux sites de productions de RLDO mitochondriaux (cf (Andreyev et al., 2005) pour une revue détaillée). La chaîne de transport des électrons produit énormément d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Il y a plusieurs dérivés de l' $O_2^{\cdot-}$ , tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Une quantité d'anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) peuvent également réagir directement avec l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ) résultant en la formation de peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ), une molécule très réactive étant très néfaste pour le fonctionnement mitochondrial contribuant à l'inhibition des sites de la chaîne de transport des électrons (cf. (Brown & Borutaite, 2007) pour une revue détaillée).

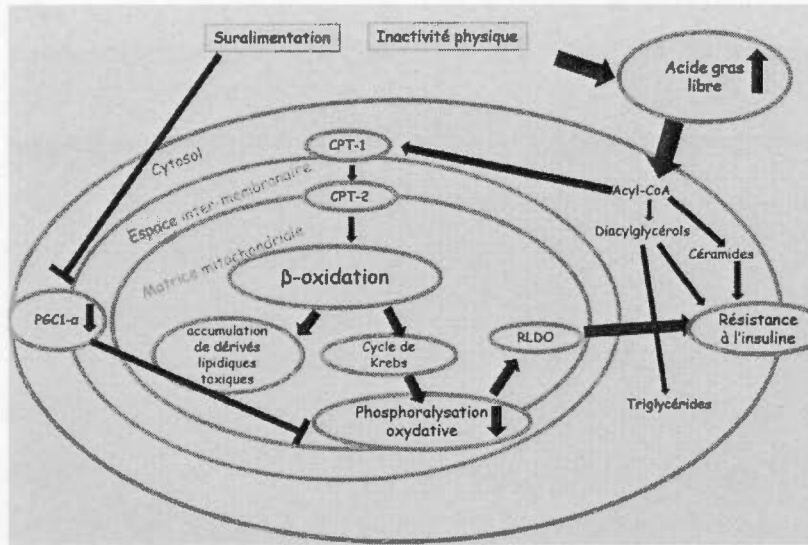
On sait qu'il existe plusieurs défenses antioxydantes, par exemple McCord et Fridovich en 1969 ont découvert la superoxyde dismutase (SOD) comme une enzyme permettant de convertir l' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  (McCord & Fridovich, 1969). Chez les mammifères, la superoxyde dismutase existe sous trois isoformes différentes (cf (Shadel & Horvath, 2015) pour revue détaillée); I (CuZn-SOD, SOD1) une forme située dans l'espace intermembranaire des mitochondries et dans le cytosol, II Mn-SOD ou SOD2 localisés dans la matrice mitochondriale et III EC-SOD ou SOD3 une forme extracellulaire (Marklund, 1984). La répartition des diverses isoformes de SOD varie selon le tissu et même selon la typologie musculaires. En ce qui concerne le muscle le soléaire, environ 15% de l'activité totale de la SOD provient de la Mn-SOD (Leeuwenburgh et al., 1997). La production d' $H_2O_2$  peut être réduite en eau ( $H_2O$ ) avec la catalase, étant situé surtout dans les peroxysomes et dans le cytosol. Enfin, la glutathion peroxydase (GPx) une enzyme antioxydante dans la matrice, qui permet également l'élimination l' $H_2O_2$ . Le calcul du rapport glutathion réduit / glutathion oxydé (GSH/GSSG) sont couramment utilisés en tant que marqueur de stress oxydant (Ji et al., 1992; Sen, 1998).

Le maintien de l'équilibre entre la production de RLDO et les défenses antioxydantes est important pour le fonctionnement cellulaire. Des niveaux excessifs de RLDO peuvent endommager les cellules par l'oxydation de l'ADN mt, de protéines, de lipides, mais également interférer avec certaines voies de signalisation intracellulaire sensibles au stress oxydant (Ray et al., 2012).

#### **1.4 Obésité, dysfonctions mitochondriales et complications métaboliques : des relations controversées**

En 1975, Yamada T et al., ont décrit pour la première fois un dysfonctionnement mitochondrial dans un contexte d'intolérance au glucose (Yamada et al., 1975). Depuis, plusieurs études ont suggéré que l'accumulation de dysfonctions mitochondriales pourrait jouer un rôle important dans le développement des désordres métaboliques induits par l'obésité (Simoneau et al., 1999; Sparks et al., 2005; Amengual-Cladera et al., 2012; Martins et al., 2012; Cheng & Almeida, 2014).

Un mécanisme proposé reliant les fonctions mitochondriales et l'insulino-résistance est qu'un régime trop riche en gras, associé à une dépense énergétique faible (comportements sédentaires) entraîne une accumulation intra-myocellulaire de lipides. Un excès de lipides intra-myocellulaire favorise la production mitochondriale de RLDO pouvant être délétère pour les récepteurs à l'insuline. L'accumulation intracellulaire de triglycérides, mais plus précisément de dérivés lipidique interfèrerait avec la voie de signalisation de l'insuline menant à une perte progressive de l'affinité de l'insuline avec son récepteur.



**Figure 1.10 : Mécanismes potentiels reliant l'altération des fonctions mitochondriales et l'insulino-résistance**

**Légende :** Schéma adapté selon (Dumas et al., 2009; Samuel & Shulman, 2012).

La figure 1.10 illustre les effets néfastes de la suralimentation, l'inactivité physique et la sédentarité menant à une accumulation lipidique intra-myocellulaires. Un apport nutritionnel supérieur à la dépense énergétique accompagné d'un mode de vie sédentaire résulte en un stockage lipidique excessif, dans divers tissus, incluant les tissus musculaires jouant un rôle prédominant dans le développement de l'insulino-résistance. L'obésité s'accompagne également souvent d'hyperlipidémie augmentant ainsi les risques d'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline.



Les relations existant entre obésité, dysfonctions mitochondriales et complications métaboliques sont très controversés. D'un côté, il a été montré dans des modèles animaux sédentaires et chez l'homme qu'un régime enrichi en gras induit une réduction du contenu mitochondrial dans les muscles squelettiques, une diminution de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif mitochondrial, une réduction de la capacité maximale de la phosphorylation oxydative et une augmentation de la production mitochondriale de RLDO (Lowell & Shulman, 2005; Skovbro et al., 2011; Martins et al., 2012). L'étude de Lauren M. Sparks et al. suggèrent qu'un régime riche en gras (REG) chez l'humain et la souris diminue plusieurs gènes codant les protéines d'OXPPOS (Sparks et al., 2005). Dans la même étude les chercheurs observent une diminution de PGC-1 $\alpha$  (un régulateur majeur de la biogenèse et de la biologie mitochondriales) d'environ 40% chez les souris soumises à un REG (3 semaines), comparativement au groupe contrôle. Ces données suggèrent également la réduction du contenu mitochondrial et de la respiration mitochondriale rapportées chez des sujets obèses et diabétiques de type 2 (Lowell & Shulman, 2005; Martins et al., 2012).

La majorité des études chez l'humain indiquent que les personnes obèses ou/et insulino-résistantes ont une réduction de l'activité enzymes mitochondriale (CS; citrate synthase, COX; cytochrome c oxydase; CPT; carnitine O-palmitoyltransférase) et une diminution du métabolisme lipidique musculaire comparativement au groupe contrôle (Simoneau et al., 1999; Kim et al., 2000). Il est admis qu'il y a un lien étroit entre l'obésité et le développement de l'insulino-résistance musculaire. L'accumulation intra-myocellulaire de lipides s'accompagne d'une augmentation de dérivés lipidiques toxiques, notamment les diacylglycérols (DAG) et les céramides (CER) qui peuvent perturber/inhiber les voies de signalisation contrôlées par l'insuline (Koves et al., 2008; Martins et al., 2012; Montgomery & Turner, 2014).

Un autre argument en faveur de l'implication mitochondriale provient l'étude du groupe de Muoio qui souligne qu'un REG résulte d'une augmentation excessive de la  $\beta$ -oxydation par l'activation de gènes PPAR (Koves et al., 2008). Ce déséquilibre

entre de l'apport énergétique et la dépense énergétique résulte d'une oxydation incomplète des substrats énergétique, principalement du métabolisme lipidique, ceci pouvant mener à l'insulino-résistance musculaire. L'ensemble des résultats expérimentaux présentés ci-dessus supportent l'hypothèse qu'une altération du fonctionnement mitochondrial et qu'une augmentation de la production de RLDO sont impliqués dans l'obésité et l'insulino-résistance. Cependant, les liens entre l'obésité, les altérations mitochondriales et l'insulino-résistance sont très controversés.

Les détracteurs de ces liens basent principalement leur raisonnement sur les arguments suivants (Garcia-Roves et al., 2007; Dela & Helge, 2013; Holloszy, 2013): i) certaines études ont indiquent que des animaux en développement soumis à un régime enrichi en gras, ou pour lesquels la concentration plasmatique en acides gras a été artificiellement augmentée, développent une insulino-résistance alors que la biogenèse, la respiration et la capacité à oxyder des acides gras des mitochondries sont augmentées; ii) dans certaines conditions pathologiques ou dans des modèles transgéniques induisant une réduction du contenu en mitochondries et/ou de la fonction mitochondriale, la captation musculaire de glucose et l'action de l'insuline sont fréquemment augmentées; iii) une amélioration de la sensibilité à l'insuline a été observée chez des sujets obèses soumis à un régime alimentaire faible en calories alors que la capacité oxydative mitochondriale était inchangée, voire diminuée après ces interventions; et iv) il a été rapporté chez des patients atteints de diabète de type 2 qu'un entraînement en endurance peut augmenter le contenu mitochondrial sans affecter la sensibilité à l'insuline (cf. Tableau 2).

Malgré plusieurs oppositions dans la littérature, il semble que la surexpression musculaire de Mn-SOD, une enzyme localisée exclusivement dans la matrice mitochondriale, ou la surexpression musculaire du co-activateur de transcription PGC-1 $\alpha$  atténue l'effet néfaste d'un régime enrichi en gras sur la sensibilité à l'insuline

(Tanaka et al., 2003; Hoehn et al., 2009; Boden et al., 2012). Les résultats de l'étude de Kyle L. Hoehn et al. montrent in vivo que des souris transgéniques surexprimant la Mn-SOD sont partiellement protégées de l'effet d'un REG induisant une insulino-résistance (Hoehn et al., 2009). De même, la surexpression musculaire de la catalase ou l'utilisation du peptide SS31, un antioxydant mitochondrial, semble complètement empêcher le développement de la résistance à l'insuline musculaire chez des souris soumises à une diète obésogène (Anderson et al., 2009). Ces données expérimentales, associées à de nombreuses autres (cf (Goodpaster, 2013) pour une revue détaillée), indiquent que les mitochondries jouent très probablement un rôle important dans le contrôle du métabolisme cellulaire lorsqu'on induit l'obésité avec un régime riche en gras. De ce fait, il apparaît clairement que cette hypothèse mitochondriale mérite de plus amples investigations (Szendroedi et al., 2012; Goodpaster, 2013).

La littérature sur le rôle des mitochondries dans le développement de complications métaboliques induites par l'obésité est très divergente, comme en témoigne le tableau 2. Ce dernier présente une liste de plusieurs éléments en faveur ou contre cette hypothèse reliant les altérations mitochondriales et les complications métaboliques induites par l'obésité.

**Tableau 1.2 : Revue littérature**

	Population étudiées	Résultats	Références
Mitochondries isolées	TA de Rats IR induit REG	= état 3 (P+M), = état 4 pour 2.5 et 25sem, état 3 ↑ 30% avec M+PC (25sem), ↑ CS, SDH	(van den Broek et al., 2010)
	Rats REG pendant 7 semaines	↓ 16% en état 3 sur les mitochondries sous-sarcolemmales	(Lionetti et al., 2007)
	Rats REG pendant 8 semaines	= avec 2 protocoles de substrats (i.e P vs P+PC)	(Hoeks et al., 2008)
	Rats REG 15 jours	↑ en état 3 (G+M), ↑ en état 3 (M+PC) et en état 4, mais ≠ activité CS et SDH	(Iossa et al., 2002)
	Rats REG pendant 1 semaine	↑ en état 3 avec du palmitate sur les mitochondries sous-sarcolemmales	(Crescenzo et al., 2014)
	Souris REG 5 et 20 semaines	↑ en état 2 (M+PC+ADP) et état 3 (M+PC+ADP), ↑ activité CS	(Turner et al., 2007)
	Rats REG 12 semaines Gastro	↑ en utilisant des radiomarqueur pour l'oxydation de oléate	(Koves et al., 2008)
	Obèses vs Obèses DT2	↓ en état 3 (P+M+ADP), ≠ état 3 avec (M+PC+ADP)	(Mogensen et al., 2007)
	Souris REG 40 semaines	↓ en état 3 (G+M+ADP) et ACR, ↓ Mfn1, Mfn2, ↑ hFis 1, Drp1	(Liu et al., 2014)
	DT2 (population Indienne)	≠ état respiratoire (non diabétique vs diabétique population Indienne) ≠ protéines OXPHOS	(Nair et al., 2008)
		≠ état respiratoire ↓ CS, protéine du CI	(Asmann et al., 2006)
	Souris REG+sucre 4/16 semaines	≠ 4 sem ↓ 16 sem- état 3 (G+M+ADP) et en état 4, ↓ état 3 (β-oxydation) ↓ CS, PGC1α, Mfn2	(Bonnard et al., 2008)
	Rats REG 6 semaines	↓ Sol, en état 2 (G+M), en état 3 et l'activité COX, ≠ TA	(Chanseume et al., 2006)
	Souris REG respiration et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑ en état (M+PC), ≠ en état 3, ↑ émission maximale de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Anderson et al., 2009)
Control vs DT2	↓ en état 3 (G+M+ADP), avec (G+M+ADP+SUCC) et (G+M+ADP+SUCC+FCCP)	(Boushel et al., 2007)	
Control vs obèses DT2	↓ en état 3 (GMS+ADP) et pour le couplage, ≠ en état 3 avec (M+PC+Glut+ADP)	(Phielix et al., 2008)	
Control vs obèses DT2	↓ VL, en état 3 (M+P+G+ADP) et (M+P+G+Succ+ADP) ≠ Deltotide	(Rabol et al., 2010)	
Contôles vs Obèses et/ou DT2	↓ CS (-23%) et ↓ de la superficie (µm <sup>2</sup> ) avec l'orientation longitudinale et transversale	(Kelley et al., 2002)	
VL Obèses et/ou DT2	↓ CS (-30%)	(Vondra et al., 1977)	
Obèses et/ou DT2	↓ ADN mt, protéine complexe II	(Ritov et al., 2005)	
Souris REG 3 semaines	↓ contenu en protéine PGC1α et cytochrome C	(Sparks et al., 2005)	
Rats REG et Heparin	↑ CPT-1, PPARα	(Garcia-Roves et al., 2007)	
Souris 3 et 8sem de REG	≠ protéine OXPHOS muscle SOL et EDL	(Trajcevski et al., 2013)	
Fibres			
Expression			
Contenu et			

**Légende :** Résumé d'articles scientifiques, TA : Tibial Antérieur, REG : Régime Riche en Gras, DT2 : Diabète de

Type 2, VL : Vaste Latéral, IR : Insulino-résistance, SDH : Succinate Dehydrogenase, CS : Citrate Synthase, Heparin : anticoagulant utilisé pour faire des infusions de lipide, État 4 (respiration mitochondriale ralenti); FCCP, carbonylcyanure-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone; GMS, glutamate, malate, succinate.

### 1.4.1 Énoncé du problème

Comme mentionné précédemment, l'impact de l'obésité sur le fonctionnement mitochondrial reste à ce jour très controversé (cf. tableau 2). Il est important de souligner que la majorité des études s'intéressant aux effets d'un REG sur les fonctions mitochondriales ont utilisé des préparations de mitochondries isolées (Lionetti et al., 2007; Turner et al., 2007; Hancock et al., 2008; Hoeks et al., 2008; Hoeks et al., 2011; Flamment et al., 2012; Crescenzo et al., 2014) (cf. tableau 2). Or, de solides évidences scientifiques indiquent que le processus d'extraction des mitochondries pourrait altérer la morphologie des mitochondries et par conséquent leurs fonctions (Saks et al., 1998; Kuznetsov et al., 2008; Picard et al., 2010; Picard et al., 2011b; Picard et al., 2011c). En tenant compte que la morphologie des mitochondries est étroitement reliée à leur fonctionnement, il est de ce fait urgent de réévaluer les effets d'un REG sur les fonctions mitochondriales en utilisant des approches permettant l'étude du fonctionnement des mitochondries tout en préservant l'intégrité de leur morphologie mitochondriale telle qu'avec la technique des fibres musculaires perméabilisées.

Il est également important de noter qu'à l'heure actuelle, les effets d'un régime enrichi en gras chez de jeunes rats sur les fonctions mitochondriales in situ dans des muscles oxydatif et glycolique restent largement inexplorés. Or, il est reconnu que le fonctionnement des mitochondries diffère entre les muscles oxydatifs et glycolytiques chez les mammifères (Jackman & Willis, 1996; Picard et al., 2012). En conséquence, il se pourrait qu'un REG affecte différemment les muscles oxydatifs et glycolytiques. Obtenir de telles informations est essentiel pour précisément définir les effets d'un REG sur les muscles squelettiques et ainsi mieux comprendre l'importance du rôle joué par les mitochondries dans les complications liées à l'obésité.

Enfin, il est important de noter que les effets d'un REG sur la dynamique mitochondriale restent à être caractérisés. Également, à l'heure actuelle les effets d'un

REG sur la dynamique mitochondriale dans les muscles oxydatifs vs glycolytiques sont encore inconnus.

#### **1.4.2 Objectifs de la recherche**

Les objectifs du présent projet de recherche sont de caractériser de manière approfondie les effets d'un régime riche en gras dans un muscle oxydatif et glycolytique de jeunes rats: **(i)** sur les principales fonctions mitochondriales (respiration et production d' $H_2O_2$ ), **(ii)** sur le contenu de plusieurs protéines clés impliquées dans le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons et **(iii)** sur le contenu de Mfn2 et de OPA1, deux protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale.

#### **1.4.3 Hypothèses**

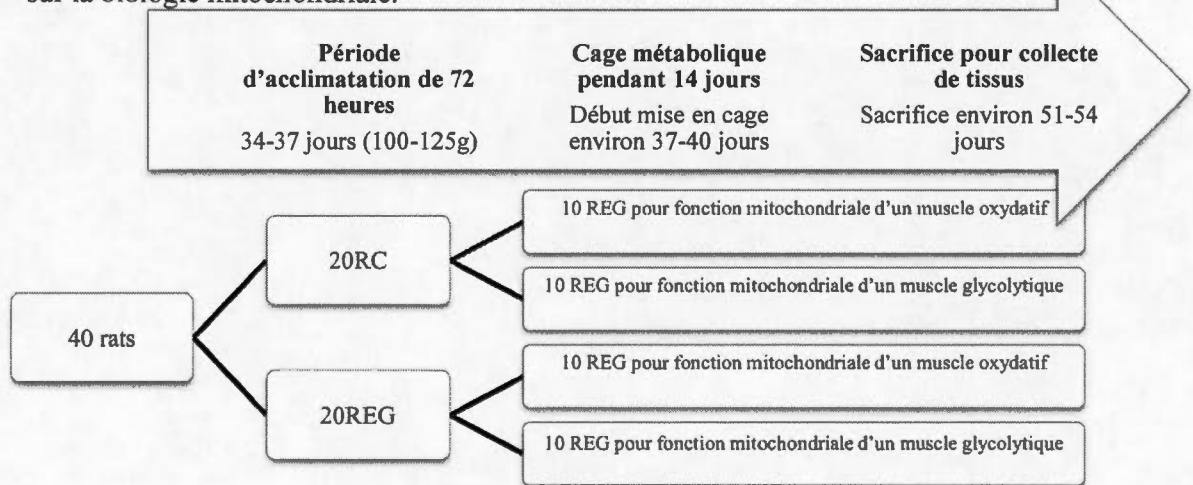
Chez des jeunes rats, un régime enrichi en gras va **(i)** altérer les fonctions mitochondriales (réduire la respiration, augmenter la production d' $H_2O_2$ ), **(ii)** altérer l'expression de protéines de la phosphorylation oxydative, **(iii)** réduire le contenu musculaire de Mfn2 et OPA1 étant des protéines impliquées dans le processus de fusion mitochondriale et **(iv)** réduire l'expression des gènes impliqués dans la fusion (Mfn-1,-2 et OPA-1) et augmenter l'expression des gènes impliqués dans la fission (Drp1 et FIS1).

## CHAPITRE II

### MÉTHODOLOGIE

#### 2.1 Protocole expérimentale

Dans cette étude, 40 rats Wistar, âgés d'environ 34-37 jours (100-125g), ont été utilisés avec l'approbation du Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) de l'UQAM. Après une période d'acclimatation de 3 jours à l'animalerie de l'UQAM, ces rats ont été divisés en 2 groupes : le premier groupe (n=20) a été soumis à un régime enrichi en gras (REG ; Research diet, Diet-induced Obesity #D123492 ; composition : protéines 19%, glucides 19.2%, lipides 61.8%, avec un apport de 4.80 kcal/g) et a été comparé à un second groupe (n=20) soumis à un régime alimentaire contrôle (RC ; Charles River Rodent Diet # 5075, St-Constant, QC, Canada; composition : protéines 21.4%, glucides 65.6%, lipides 13% avec un apport de 2.89 kcal/g). Deux semaines après le début de l'intervention, les rats ont été sacrifiés pour les expérimentations. Ce design expérimental vise à étudier les effets à court terme d'un régime enrichi en gras sur la biologie mitochondriale.

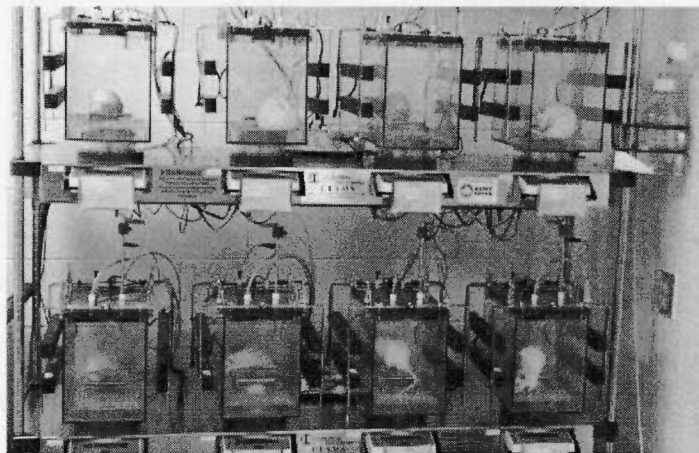


**Figure 2.1 : Design expérimental**

**Légende :** Schéma du design expérimental.

### 2.1.1 Étude in vivo du métabolisme énergétique

Les rats sont placés en cage métabolique pour la durée de l'intervention (CLAMS, Columbus Instruments, OH, USA) afin d'étudier le métabolisme énergétique diurne et nocturne avec un cycle de lumière/noirceur de 12 heures dans une pièce à température de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Plusieurs paramètres ont été mesurés pendant la durée de l'intervention, tels que la prise alimentaire, le gain de poids, la dépense énergétique, le ratio d'échange respiratoire et les déplacements. Les rats ont été pesés chaque jour pour évaluer la prise de poids durant l'intervention de 14 jours. Les expériences avec les cages métaboliques ont été effectuées sur 8 rats à la fois (4-RC et 4-REG).



**Figure 2.2 : Cage métabolique**

**Légende :** Image du système de cage métabolique permettant d'étudier le métabolisme énergétique.

### 2.1.2 Procédure lors du sacrifice des animaux

Les procédures d'anesthésie des rats ont été effectuées par l'inhalation de 3% d'Isoflurane dans une chambre d'induction. Une fois anesthésié le rat est placé sur la table de dissection avec un masque facial (1,5% d'Isoflurane) pour procéder au prélèvements des muscles. Les muscles de la patte gauche (soléaire (SOL) ou long extenseur des orteils (EDL)) ont été prélevés immédiatement pour évaluer les fonctions



mitochondriales. Certaines pièces de muscles ont été conservées dans une solution de RNA later pour permettre l'extraction d'ARN messager, la production d'ADN complémentaire par RT-PCR et la quantification de gènes d'intérêts par PCR quantitatif. Les morceaux de muscle restants ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide pour la quantification de protéines mitochondriale, notamment les protéines régulant la dynamique mitochondriale. Après les prélèvements des muscles et tissus, les rats ont été sacrifiés avec une ponction aortique.

### **2.1.3 Respiration mitochondriale**

La préparation des fibres a été réalisée faite en suivant la technique décrite dans l'article de Kuznetsov et al. en 2008. En utilisant la saponine pour perméabiliser les fibres, il est possible d'étudier le fonctionnement mitochondriale in situ (Kuznetsov et al., 2008). En utilisant des protocoles d'additions de substrats et d'inhibiteurs classiques tel que décrit précédemment (Burelle & Hochachka, 2002; Gouspillou et al., 2010; Picard et al., 2010; Gouspillou et al., 2011; Gouspillou et al., 2014a), il est possible de déterminer la respiration basale, la capacité de respiration maximale et l'affinité des mitochondries pour l'ADP.

La consommation d'oxygène des mitochondries provenant de fibres perméabilisées a été mesurée par polarographie avec un oxygraphe Oxytherm (Hansatech instruments, Cergy Pontoise, France). L'oxygraphe contenait une cellule thermostatée à (4-40°C) et une électrode à oxygène (électrode de Clack) reliés à un ordinateur permettant de mesurer la concentration d'oxygène (nmol/mL) en fonction du temps (minutes). Les expériences de respiration mitochondriale sur les fibres perméabilisées ont été effectuées à 37°C. Les vitesses de respiration ont été quantifiées à l'aide du logiciel Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). Les résultats en nmol/min/mL ont été convertis en nmol d'O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> pour les mesures de respirations mitochondriales.

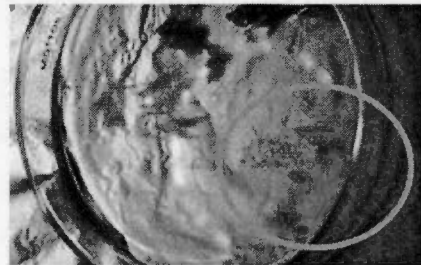
### 2.1.4 Protocole d'évaluation de la respiration mitochondriale

**Étape 1 :** Préparation du système Oxytherm tel que décrit ci-dessous :

- i. Décongeler des solutions A, Z et des substrats/inhibiteurs mitochondriaux.
- ii. Polir l'électrode et faire le montage de la membrane (15-20min).
- iii. Ajuster du pH pour les solutions tampons.
- iv. Équilibration de la cellule thermostatée pour ensuite faire une calibration.

**Étape 2 :** Une fois le système Oxytherm calibré, c'est l'étape du prélèvement musculaire. Le muscle prélevé a été rapidement déposé dans une solution tampon (Sol A :  $\text{CaK}_2\text{EGTA}$  2.77mM,  $\text{K}_2\text{EGTA}$  7.23mM,  $\text{MgCl}_2$  6.56mM, Dithiothreitol (DTT) 0.5mM, K-MES 50mM, Imidazole 20mM, Taurine 20mM, Phosphocreatine 15mM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  5.3mM, pH 7.3 à 4°C) se trouvant dans un plat de pétri en verre mis sur glace. Cette solution permet aux fibres musculaires de rester dans des conditions physiologiques.

- **Étape 3 :** Séparation mécanique en petit faisceaux de fibres avec des pinces.



**Figure 2.3 : Séparation mécanique des fibres musculaires**

**Légende :** Image montrant la séparation des fibres musculaires.

- **Étape 4 :** Une fois les fibres séparées, le traitement de saponine a permis de perméabiliser sélectivement le sarcolemme des fibres musculaires sans endommager les membranes mitochondriales. Un tube de 50mL a été utilisé pour la préparation de la dilution soit 0.05 mg de saponine par mL de sol A. La durée d'incubation a été de 30 minutes accompagnée d'une faible vitesse d'agitation pour bien perméabiliser les fibres. Par la suite, les petits faisceaux de fibres ont été soumis

à 3 lavages dans une autre solution tampon (sol Z : K-MES 110mM, KCl 35mM, EGTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>10mM, BSA 0,5mg/mL).

- **Étape 5 :** Une fois les faisceaux de fibres perméabilisés et lavés, la mesure de la respiration mitochondriale a été débutée. Une petite quantité de fibres a été pesée (3-6 mg de fibre humide) et placée dans la chambre de l'oxygraphe contenant 1 mL de solution Z. Par la suite, l'ajout de substrats et d'inhibiteurs des mitochondries a permis de mesurer différents stades de la respiration.

**Tableau 2.1 : Protocole 1 d'évaluation de la respiration mitochondriale**

Étape 1	Ajout de 3-6mg de fibres perméabilisées dans la chambre thermostatée à 37°C contenant 1mL de sol Z (pH à 7.4).
Étape 2	Injection de 10µL de glutamate (10 mM) et de 10µL de malate (5mM) avec des seringues Hamilton, afin d'alimenter le système de transfert des électrons avec du NADH+H <sup>+</sup> (substrat du complexe I). L'ajout de ces substrats correspond à l'activité de base de la chaîne de transport des électrons alimentée en NADH+H <sup>+</sup> (substrats du complexe I) (V <sub>0</sub> ) c'est-à-dire la respiration mitochondriale sans ADP exogène.
Étape 3	Injection de 20µL (2 mM) d'ADP, entraînant une augmentation de la vitesse de consommation d'O <sub>2</sub> , puisque l'ATP synthase utilise la force proton motrice pour phosphoryler l'ADP en ATP. On obtient la respiration maximale lorsque la chaîne de transport des électrons est alimentée en substrats du NADH+H <sup>+</sup> (V <sub>G+M-ADP</sub> ).
Étape 4	Injection de 5µL antimycine A (10 µM) visant à arrêter le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons par l'inhibition du complexe III.

Résumé des protocoles d'évaluation de la respiration mitochondriale

**Protocole 1**

Séquence d'addition	Substrats/Inhibiteurs	Concentration finale	Solution Stock	Volume Injection
1	Glutamate	10 mM	1 M	10 µL
2	Malate (juste après 1)	5 mM	500 mM	10 µL
3	ADP	2 mM	100 mM	20 µL
4	Antimycine A	10 µM	2 mM	5 µL

Légende : Micromole (µM), millimole (mM), mole (M), microlitre (µL)

**Tableau 2.2 : Protocole 2 d'évaluation de la respiration mitochondriale**

Étape 1	Ajout de 3-6mg de fibres perméabilisées dans la chambre thermostatée à 37°C contenant 1mL de sol Z (pH à 7.4).
Étape 2	Injection de 10µL de malate (5mM) et de 5 µL de palmitoyl-carnitine (200 µM) avec des seringues Hamilton, afin d'alimenter le système de transfert des électrons avec du NADH+H <sup>+</sup> (substrat du complexe I) et du FADH <sup>+</sup> via l'ETF Coenzyme Q oxydoréductase provenant de substrats de la β-oxydation. L'ajout de ces substrats correspond à l'activité de base de la chaîne respiratoire en présence de substrats lipidique à chaîne longue (palmitoyl-carnitine).
Étape 3	Injection de 20µL (2 mM) d'ADP, entraînant une augmentation de la vitesse de consommation d'O <sub>2</sub> , puisque l'ATP synthase utilise la force proton motrice pour phosphoryler l'ADP en ATP.
Étape 4	Injection de 5µL antimycine A (10 µM) visant à arrêter le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons par l'inhibition du complexe III.

Résumé du protocole 2 d'évaluation de la respiration mitochondriale				
<b>Protocole 2</b>				
1	Malate	5 mM	500 mM	10 µL
2	Palmitoyl-Carnitine	200µM	40 mM	5 µL
3	ADP	2 mM	100 mM	20 µL
4	Antimycin A	10 µM	2 mM	5 µL
Légende : Micromole (µM), millimole (mM), mole (M), microlitre (µL)				

## 2.2 Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été déterminée à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi FL-2710 (Hitachi High Technologies Canada, Chromabec INC, Qc, Canada) et d'un système fluorescent utilisant l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, AR) et la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase, HRP). En présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'HRP, l'AR est oxydé en un composé qui fluoresce la résorufine (excitation = 563 et émission = 587nm). Le pH de la solution Z a été à 7.4 pour mesurer l'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale. L'utilisation de différents substrats et inhibiteurs, comme ceux utilisés pour la respiration mitochondriale sont utilisés pour obtenir une caractérisation détaillée de la production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Avec un protocole d'ajouts de concentrations croissantes d'ADP, il est possible d'obtenir l'émission mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à différents niveaux d'activité de phosphorylation des mitochondries (Picard et al., 2010; Gouspillou et al., 2014b).

**Tableau 2.3 : Protocole 1 pour l'évaluation de l'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Étape 1	Injection d'Amplex Red et HRP dans la cuve contenant 1mL de sol Z (pH à 7.4 pour mesurer l'émission d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitochondriale).
Étape 2	Ajout de 3-6mg de fibres perméabilisées dans la cuve. Ainsi, l'émission basale d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitochondriale est mesurée sans substrat.
Étape 3	Injection de 10µL de glutamate (10 mM) et de 10µL de malate (5mM), permettant d'évaluer l'émission d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> lorsque la chaîne de transfert des électrons est alimentée NADH+H <sup>+</sup> .
Étape 4	Injection de 10µL de succinate permettant d'évaluer l'émission d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> lorsque la chaîne de transfert des électrons est alimentée en substrats du complexe I et du complexe II. Cette pente s'accompagne d'une grande émission d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
Étape 5	Injection de 20µL (2 mM) d'ADP, permettant de stimuler la respiration en stimulant la phosphorylation oxydative.

Résumé du protocole 1				
Protocole 1				
Séquence d'addition	Substrats/Inhibiteurs	Concentration finale	Solution Stock	Volume Injection
1	Glutamate	10 mM	1 M	10 $\mu$ L
2	Malate (juste après 1)	5 mM	500 mM	10 $\mu$ L
3	Succinate	10 mM	1 M	10 $\mu$ L
5	ADP	2 mM	100 mM	20 $\mu$ L
6	Antimycin A	10 $\mu$ M	2 mM	5 $\mu$ L

Légende : Micromole ( $\mu$ M), millimole (mM), mole (M), microlitre ( $\mu$ L)

**Tableau 2.4 : Protocole 2 pour l'évaluation de l'émission d' $H_2O_2$**

Étape 1	Injection d'Amplex Red et HRP dans la cuve contenant 1mL de sol Z (pH à 7.4 pour mesurer l'émission d' $H_2O_2$ mitochondriale).
Étape 2	Ajout de 3-6mg de fibres perméabilisées dans la cuve. Ainsi, l'émission basale d' $H_2O_2$ mitochondriale est mesurée sans substrat.
Étape 3	Injection de 10 $\mu$ L de malate (5mM) et 5 $\mu$ L de palmitoyl-carnitine (200 $\mu$ M) avec des seringues Hamilton, afin d'alimenter le système de transfert des électrons avec du NADH+H <sup>+</sup> (substrat du complexe I) et du FADH <sup>+</sup> via l'ETF Coenzyme Q oxydoréductase provenant de substrats de la $\beta$ -oxydation, ceci permettant d'évaluer l'émission d' $H_2O_2$ . L'ajout de ces substrats permettra de déterminer l'activité de base de la chaîne respiratoire en présence de substrats lipidique à chaîne longue (palmitoyl-carnitine).
Étape 4	Injection de 10 $\mu$ L de glutamate permettant d'évaluer l'émission d' $H_2O_2$ lorsque la chaîne de transfert des électrons est alimentée avec davantage de substrats du complexe I.
Étape 5	Injection de 10 $\mu$ L de succinate permettant d'évaluer l'émission d' $H_2O_2$ lorsque la chaîne de transfert des électrons est alimentée en substrats du complexe I et du complexe II. Cette pente s'accompagne d'une grande émission d' $H_2O_2$ .
Étape 6	Injection de 20 $\mu$ L (2 mM) d'ADP, permettant de stimuler la respiration en stimulant la phosphorylation oxydative.
Étape 7	Injection de 5 $\mu$ L d'antimycine A 10 $\mu$ M

<b>Résumé du protocole 2</b>				
<b>Protocole 2</b>				
1	Malate	5 mM	500 mM	10 $\mu$ L
2	Palmitoyl-Carnitine	200 $\mu$ M	40 mM	5 $\mu$ L
3	Glutamate	10 mM	1 M	10 $\mu$ L
4	Succinate	10 mM	1 M	10 $\mu$ L
5	ADP	2 mM	100 mM	20 $\mu$ L
6	Antimycin A	10 $\mu$ M	2 mM	5 $\mu$ L

Légende : Micromole ( $\mu$ M), millimole (mM), mole (M), microlitre ( $\mu$ L)

### 2.3 Expression d'ARNm par réaction en chaîne polymérase (qPCR)

L'ARN des tissus musculaires a été extrait à l'aide du kit d'extraction TRIzol® selon le protocole du fournisseur Invitrogen. Par la suite, la réaction en chaîne par polymérase (qPCR) a été réalisée à partir d'ADNc, obtenue par transcriptase inverse (RT) et d'une solution à base de SYBR Green selon les directives de QIAGEN. Plusieurs gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale ont été mesurés. L'utilisation de plusieurs amorces spécifiques à chacun de ces gènes présentés dans le tableau 7 ont été créés en utilisant la base de données NCBI GENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) et ont été ensuite préparées par Integrated DNA Technologies (IDT INC., IA, USA). Des plaques de 96 puits accompagnées de diverses conditions en triplicatas ont été analysées par un lecteur de plaques de PCR en temps réel (QuantStudio™ 6, Life Technologies Inc., ON, Canada). Les produits de l'amplification ont été analysés avec le logiciel qbase+ de Biogazelle. Les niveaux d'expression d'ARNm ont été par la suite normalisée par rapport aux valeurs obtenues avec plusieurs gènes contrôles. Les gènes Pfkfb3, Rpl30, Ppib, Pum1 ont été utilisés pour le SOL et Pum1, Pfkfb3, Psmc4, Rpl30 pour l'EDL.

Tableau 2.5 : Séquences des amorces utilisées pour les gènes utilisés en qPCR

Gène amplifié	Organisme	Séquence des amorces	Identification
UCP3	Rat	5' : AAAGACCCGATACATGAACGCT 3' : AAGGAGGGCATGAATCCTTTGT	NM_013167.2
UCP2	Rat	5' : AGAGAAGCTTGATCTTGGAGGC 3' : GAAAACTGAAGCAGTGGGGAC	NM_019354.3
CPT1B	Rat	5' : TGGGCAACCAACTATGTAAGTG A 3' : TGCTTGTTGGCTCGTGTTCTTA	NM_013200.1
CPT2	Rat	5' : GATTATCTGCAGCACAGCATCG 3' : CTTCTGTTCTCCTGAACTGGCT	NM_012930.1
Drp1	Rat	5' : TAATAAGGGAGTAAGCCCTGAG C 3' : AAGCTCAATATCCTTGGGCTGA	NM_053655.3
Fis1	Rat	5' : ACAATGACGACATCCGTAGAGG 3' : GCCTTTTCATATTCCTTGAGCCG	NM_001105919.1
Mfn1	Rat	5' : CTCGGAATCAACGCTGATGAAC 3' : TGCGCACATCCTCCATATATTCT	NM_138976.1
Mfn2	Rat	5' : TATAAGAATGAACTGCACCGCC A 3' : CACAGGAAGAAGGGGCTTCAA	NM_130894.4
Opal	Rat	5' : GAGGATCCGGTGAGATGATGAC	NM_133585.3



		3' :	CTGCAAGATCTTCCTCCTTGGT	
<b>Tfam</b>	Rat	5' :	GCTAAACACCCAGATGCAAAAG	NM_031326.1
		T		
		3' :	GCTCACAGCTTCTTTGTACACC	
<b>Mn-SOD</b>	Rat	5' :	TGGCTTCAATAAGGAGCAAGGT	NM_017051.2
		3' :	AATCCCCAGCAGTGGATAAGG	

**Tableau 2.6 : Description des gènes analysés en qPCR**

Fonction	Gènes	Abbréviations	Descriptions
Dynamique mitochondriale	Mitofusin 1	Mfn1	La Mfn1 intervient dans le processus de fusion mitochondrial de la membrane externe.
	Mitofusin 2	Mfn2	La Mfn2 intervient dans le processus de fusion mitochondrial de la membrane externe.
	Optic atrophy 1	Opal	Opal intervient dans le processus de fusion mitochondrial de la membrane interne.
	Fission 1	Fis1	Fis1 intervient dans le processus de fission mitochondrial.
	Dynamin-related protein1	Drp1	Drp1 intervient dans le processus de fission mitochondrial.
	Superoxide dismutase 2	Mn-SOD	Sod2 intervient au niveau du de la matrice mitochondriale permettant de convertir l'O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Transcription factor A, mitochondria	Tfam	TFAM intervient dans la transcription et assure la réplication et la stabilisation du

			génom <span style="float:right">e</span> mitochondriale (Ekstrand et al., 2004).
Transporteur d'acide gras mitochondrial	Carnitine O-Palmitoyltransférase 1b	Cpt1b	Cpt1b intervient dans la régulation du transport des acides gras vers l'intérieur de la mitochondrie (Bonfont et al., 2004). L'activité de Cpt1b est située sur la membrane externe de la mitochondrie
	Carnitine O-Palmitoyltransférase 2	Cpt2	Cpt2b intervient dans la régulation du transport des acides gras vers l'intérieur de la matrice mitochondriale (Bonfont et al., 2004).
Couplage énergétique	Protéine découplante 3	UCP3	UCP3 est localisé sur la membrane interne mitochondriale et intervient dans le transport d'H <sup>+</sup> vers la matrice.
	Protéine découplante 2	UCP2	UCP2 est localisé sur la membrane interne mitochondriale et intervient dans le transport d'H <sup>+</sup> vers la matrice.

#### 2.4 Étude du contenu et de la dynamique des mitochondries par Western blot

Le contenu en mitochondrie a été déterminé à l'aide du cocktail d'anticorps OXPHOS (MitoProfile®, Total OXPHOS, ab110413, Abcam), contenant les anticorps reconnaissant : CI : NDUFB8 (20KD); CII : SDHB (30KD); CIII : UQCRC2 (48KD); CIV : MTCO1 (40KD) ; ATP synthase : ATP5A (55KD) dans les muscles soléaire et les long extenseur des orteils. Ces muscles ont également été étudiés pour le contenu en protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale. Le contenu en protéine

Mfn2 (Sigma, M6319) et OPA1 (BD Bioscience, 612606) ont été étudiés à l'aide d'immunoglobulines de type G (IgG) provenant du lapin.

Environ 10mg de chaque muscle a été utilisé pour extraire les protéines avec une solution composée de Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, Triton, X-100 1%, Sodium deoxycolate 0.5%, SDS 0.1% et de 10µl/mL d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma P8340). Les muscles ont été homogénéisés à l'aide de billes métalliques dans un robot à 4°C. Les surnageant ont été récupéré une fois la centrifugation effectuée à 15000 rpm (15 minutes à 4°C). La teneur en protéines dans le surnageant a été déterminée en utilisant la méthode de Bradford (Ponceau S Solution, Biotium, 22001). Des aliquotes de surnageant ont été mélangés avec un tampon de Laemmli et ensuite chauffés à 95 °C pendant 5 min. Environ 30 µg de protéines ont été chargés sur un gel contenant 8 à 12% d'acrylamide (SDS-PAGE). Les protéines ont été soumises à une électrophorèse permettant aux protéines de transférer sur une membrane de PVDF (PolyVinyle Dene Fluoride; Life Sciences). Les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante dans un tampon de blocage composée de 5% (w / v) de lait sans matière grasse et d'une solution saline tamponnée au Tris contenant 0,1% de Tween 20 (TBS-T). Les membranes ont été incubées pendant 1 heure avec les anticorps dilués dans du tampon de blocage. Cela a permis de détecter les protéines, telles que la Mfn2 (Sigma, M6319; 1: 1000) et le cocktail d'OXPPOS Blot (MitoSciences, MS6034, 1: 500). Les membranes ont été lavées 6 fois pendant 5 minutes dans un contenant avec du TBS-T, puis les membranes ont été incubés avec les anticorps secondaires conjugués à de l'HRP (Abcam Ab6721 et Ab6728) dilués dans du tampon de blocage 1 h à température ambiante. Les signaux ont été détectés en utilisant de la chimioluminescence (Biorad, clarté ECL, substrat, 170-5060) et les analyses ont été faites en utilisant ImageJ (NIH).

## 2.5 Limites

Les limites de ce projet sont les suivantes : (i) nous n'avons utilisé que des rats mâles (ii) les mesures de respiration et de production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  in situ sont effectuées dans un environnement contenant une concentration d'oxygène nettement supérieure aux conditions retrouvées in vivo, (iii) les expérimentations mesurant l' $\text{H}_2\text{O}_2$  pourraient être influencées selon l'activité de la Mn-SOD, de la GPx et de la catalase.

## 2.6 Quantifications et analyses

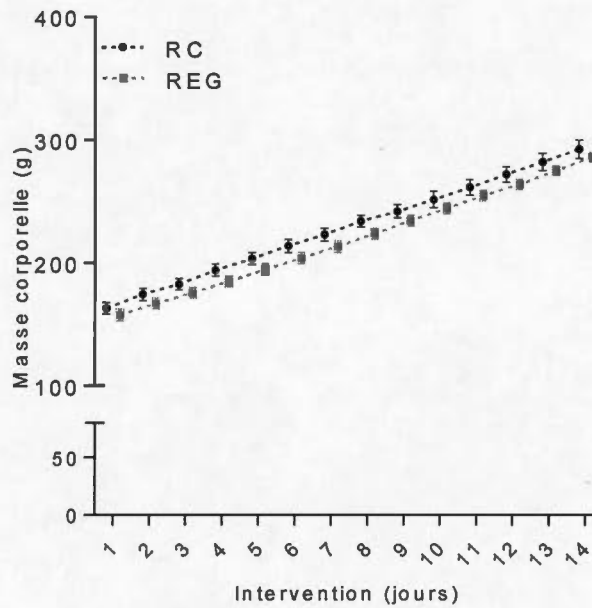
Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les comparaisons des mesures ont été réalisées en utilisant des tests Student bilatéraux pour échantillons non appariés entre les groupes RC vs REG. La comparaison des effets principaux a été effectuée avec une correction pour les comparaisons multiples en utilisant le test Holm-Sidak. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software 6, San Diego, CA, USA). Le seuil de significativité retenu a été  $p < 0,05$ . La taille de l'échantillon a été calculée avec une valeur  $\alpha$  0.05 et une valeur  $\beta$  0.80 en tenant compte de la variabilité (environ 20%) des résultats obtenus sur les mesures de respiration mitochondriale.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

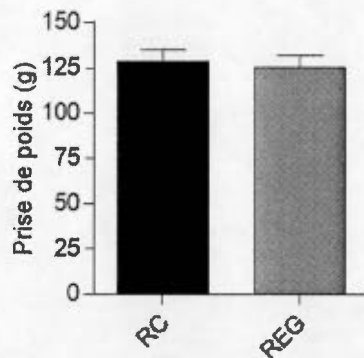
#### 3.1 Caractéristiques des animaux

L'évolution du poids a été évaluée au cours de l'intervention nutritionnelle de 14 jours (Fig. 3.1). Aucun différence de gain de poids n'a été observée durant les 14 jours d'intervention entre les rats ND et REG (Fig.2).



**Figure 3.1 : Évolution du poids pendant 14 jours**

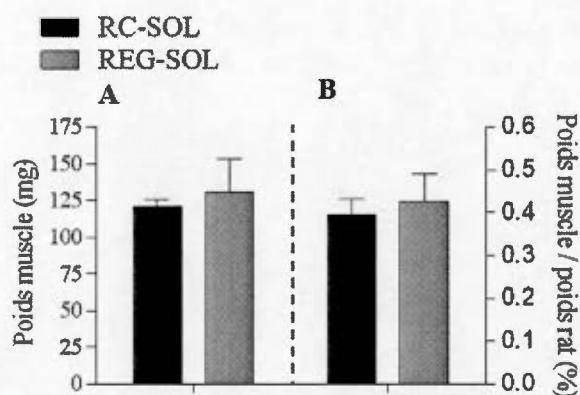
Légende : les résultats de l'évolution du poids des rats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Rats RC : n=10; Rats REG : n=10.



**Figure 3.2 : Prise de poids après 14 jours**

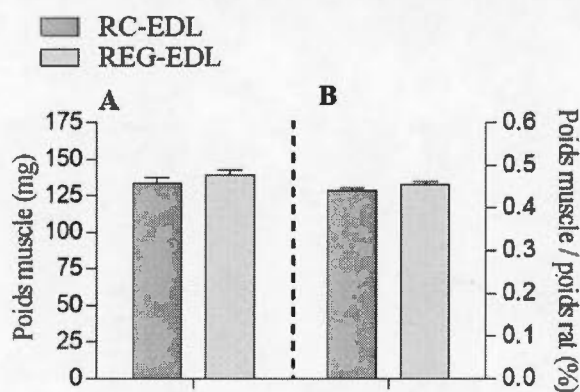
Légende : les résultats de l'évolution du poids des rats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Rats RC : n=10; Rats REG : n=10.

Les prélèvements de différents muscles en fin de protocole ont permis d'étudier le poids des muscles SOL (Fig.3.3A) et EDL (Fig.3.4A). Les poids des muscles SOL et EDL étaient similaires entre les rats RC et REG. Les figures 3.3B (SOL) et 3.4B (EDL) indiquent que les poids relatifs des muscles ( $[\text{poids du muscle (mg)} / \text{poids du rat (g)}]$ ) ne diffèrent pas entre les groupes.



**Figure 3.3 : Poids des muscles soléaires**

**Légende :** les résultats des mesures du poids des soléaires (A) et du pourcentage du poids du SOL sur le poids corporel total (B) sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Rats RC : n=14; Rats REG : n=14.



**Figure 3.4 : Poids des muscles EDL**

**Légende :** les résultats des mesures du poids des Extensor Digitorum Longus ou EDL (A) et du pourcentage du poids des EDL sur le poids corporel total (B) sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Rats RC : n=14; Rats REG : n=14.

Dans notre étude, après 14 jours d'intervention nutritionnelle, on observe que les rats REG ont une prise calorique quotidienne (kcal) significativement plus élevée (Tableau 9). Les rats REG ont un apport énergétique quotidien moyen d'environ 91kcal comparativement à 75 kcal par jours pour les rats sous le RC. En moyenne les rats du groupe REG ont un apport calorique d'environ 15% supérieur au groupe contrôle. Nos résultats indiquent aussi qu'il n'y a pas de différence significative dans la dépense énergétique exprimée en kcal entre les deux groupes. Nos résultats suggèrent enfin que les rats REG présentent une efficacité alimentaire significativement supérieure et une efficacité métabolique significativement inférieures aux rats RC.

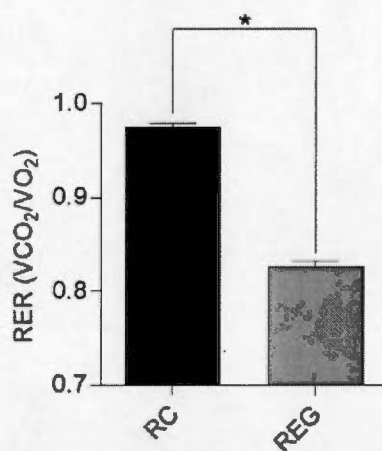
**Tableau 3.1: Paramètres alimentaires et métaboliques**

Variables	RC Moyenne ± SEM	REG Moyenne ± SEM	P-value
Prise alimentaire (kcal) <sup>A</sup>	75.5 ± 3.8	91.7± 2.0	0.002
Dépense énergétique (kcal/jours) <sup>B</sup>	65.0 ± 1.2	66.0 ± 0.9	NS
Efficacité alimentaire <sup>C</sup>	0.36 ± 0.02	0.49± 0.01	0.001
Efficacité métabolique <sup>D</sup>	0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.02

**Légende :** <sup>A</sup>La prise alimentaire en kcal a été obtenue en fonction de la composante des nutriments des diètes. La diète RC a été obtenue en multipliant le nombre de grammes consommés par 2.89kcal et pour la diète REG le nombre de grammes multiplié par 4.8kcal. <sup>B</sup>La dépense énergétique a été obtenue avec la méthode de la calorimétrie indirecte. La dépense énergétique s'exprime en kcal/h/masse corporelle (kg) multipliées par 24h. <sup>C</sup>L'efficacité alimentaire représente le ratio entre le gain de poids quotidien (g) sur la prise alimentaire quotidienne (g). <sup>D</sup>L'efficacité métabolique représente le ratio entre la prise de poids quotidien et la prise alimentaire quotidienne (kcal). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± erreurs standard à la moyenne (SEM) des résultats de l'intervention de 14 jours sur les rats RC (n=8) et REG (n=8). L'analyse statistique entre les rats RC et REG a été réalisée à l'aide d'un test Student bilatéral pour échantillons non appariés. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significativement différentes.

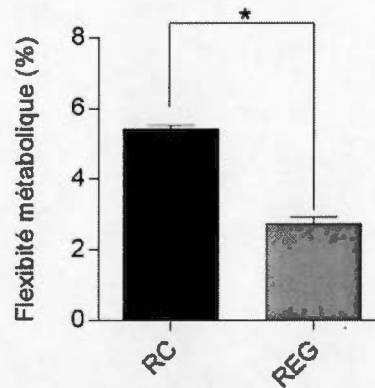


Les résultats des analyses en cages métaboliques indiquent que le ratio d'échange respiratoire (RER) est significativement plus bas chez les rats REG (Fig.3.5). Nos résultats de flexibilité métabolique sont significativement inférieurs chez les rats REG suggérant que les rats REG ont davantage de facilité à utiliser les lipides comme sources d'énergie et plus de difficultés à élever leurs RER pour utiliser les glucides. Cette variable de flexibilité métabolique représente la capacité de modification du RER entre les périodes diurne et nocturne exprimé en pourcentage.



**Figure 3.5 : Effet des diètes sur le RER**

**Légende :** les résultats des mesures de ratio d'échange respiratoire (RER) sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Les mesures ont été réalisées sur des rats RC (n=8) et REG (n=8) à l'aide de cages métaboliques (CLAMS, Columbus Instruments, OH, USA).



**Figure 3.6: Flexibilité métaboliques**

**Légende :** les résultats de flexibilité métabolique sont exprimés en pourcentage de la variation entre le changement de RER diurne et nocturne. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM) des résultats de flexibilité métabolique de 14 jours.

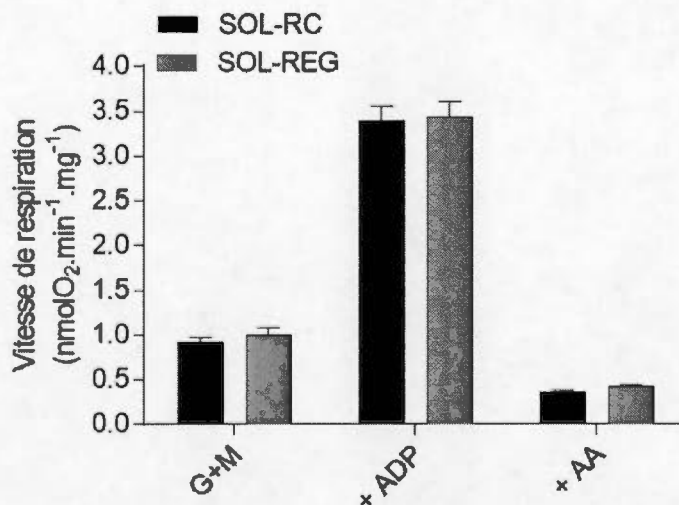
### 3.2 Respiration mitochondriale

Dans l'optique d'évaluer si la respiration mitochondriale est modifiée chez les rats REG, nous avons utilisé la méthode des fibres perméabilisée en utilisant de 2 protocoles d'additions séquentielles de substrats. Le glutamate et le malate (G+M) permettent d'étudier l'activité mitochondriale en état II, lorsque la chaîne de transport des électrons est alimentée par du du  $\text{NADH}+\text{H}^+$  au niveau du complexe I. L'ajout d'Adénosine Di-Phosphate (ADP) permet l'obtention de l'état III, soit la capacité maximale de la phosphorylation oxydative en présence de Glutmate + Malate + ADP. L'ajout de AA (antimycine A) inhibe le complexe III en bloquant le transfert des électrons provenant du Coenzyme Q réduit.

Nos résultats de respiration mitochondriale sont similaires entre les groupes pour les muscles SOL (Fig. 3.7) et EDL (Fig.3.9) en présence de substrats du complexe I (G+M) en état II et en état III. Les valeurs de respiration mitochondriales en état III sont plus élevées dans les muscles SOL que dans les muscles EDL, ceci chez les rats RC et REG.

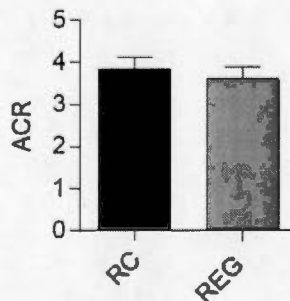
Nos résultats indiquent qu'il n'y a aucune différence entre les groupes pour l'ACR (acceptor control ratio), un index de couplage entre la consommation d'oxygène et la production d'ATP par les mitochondries, et ceci pour les muscles SOL (Fig. 3.8) et EDL (Fig. 3.10).

De manière intéressante, les muscles SOL (Fig. 3.11) et EDL (Fig. 3.13) des rats REG ont une vitesse de respiration significativement plus élevée en état II et en état III en présence de substrats lipidiques, et plus précisément du palmitoyl-carnitine avec du malate (M+PC). Notre étude indique qu'un REG à court terme chez de jeunes rats semble donc favorable à la respiration mitochondriale en présence de substrats de nature lipidique et ce quel que soit le type de muscle. Aucune différence d'ACR n'a été observée entre nos groupes pour les muscles SOL (Fig. 3.12). On observe une tendance inférieure chez les EDL de rats REG (Fig. 3.12) pour l'ACR, ce qui suggèrent un léger découplage de mitochondries dans les EDL des rats REG. Nos résultats indiquent que les ACR sont inférieurs dans les muscles EDL comparativement aux muscles SOL.



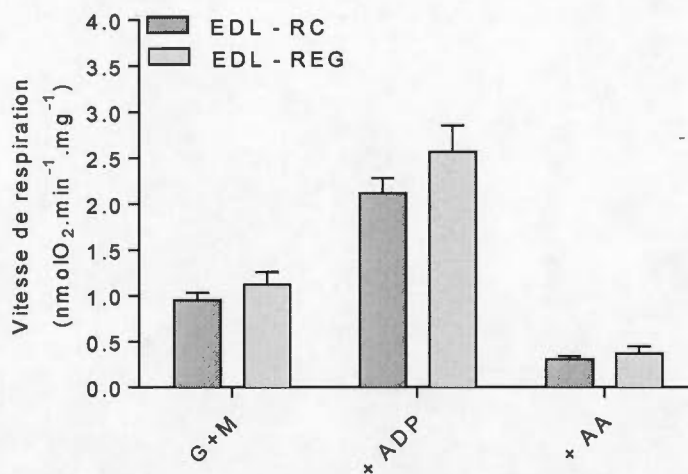
**Figure 3.7 : Effet d'un REG sur respiration mitochondriale du SOL en présence de substrats du complexe I**

**Légende :** les résultats des mesures de respiration mitochondriale réalisées en duplicat sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Les expérimentations ont été déterminées sur le muscle SOL de rats RC (n=12) et REG (n=12).



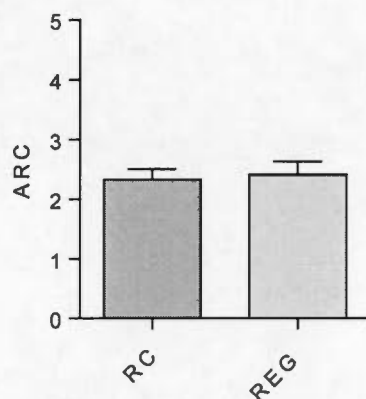
**Figure 3.8 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries du SOL en présence de substrats du complexe I**

**Légende :** les résultats des mesures d'ACR sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). L'ACR des mitochondries des SOL a été déterminée chez les rats RC (n=12) et REG (n=12).



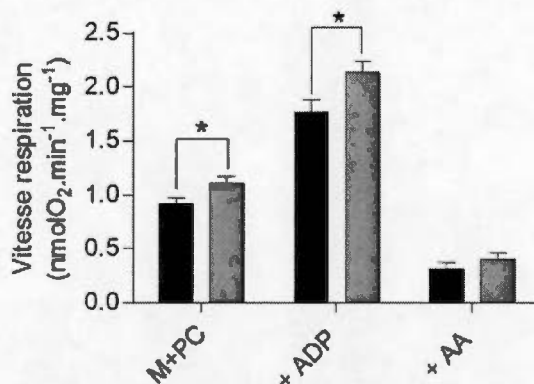
**Figure 3.9 : Effet d'un REG sur respiration mitochondriale des EDL en présence de substrats du complexe I**

**Légende :** les résultats des mesures de respiration mitochondriale faites en duplicat sont présentés sous forme que moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). Les expérimentations ont été déterminées sur le muscle EDL de rats RC (n=8) et REG (n=8).



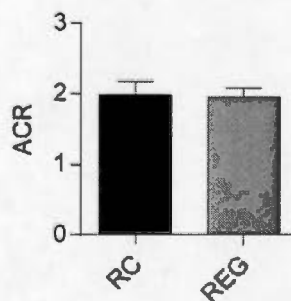
**Figure 3.10 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries d'EDL en présence de substrats du complexe I**

**Légende :** les résultats des mesures d'ACR sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). L'ACR des mitochondries d'EDL ont été déterminées chez les rats RC (n=8) et REG (n=8).



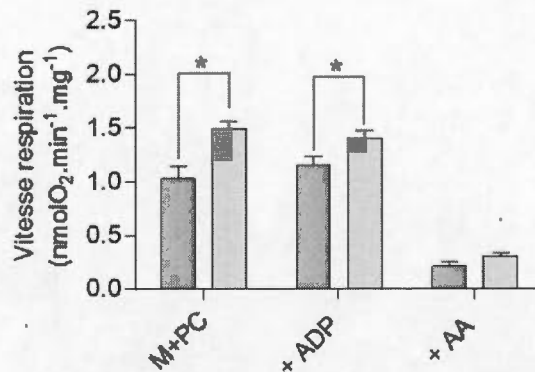
**Figure 3.11 : Effet d'un REG sur la respiration mitochondriale des muscles SOL en présence de palmitoyl-carnitine**

**Légende :** les résultats des mesures de respiration mitochondriale réalisées en duplicat sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Les expériences ont été réalisées sur le muscle SOL de rats RC (n=8) et REG (n=8). L'analyse statistique des valeurs obtenues pour les rats RC et REG a été réalisée par un test Student bilatéral pour échantillons non appariés. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme étant significativement différentes.



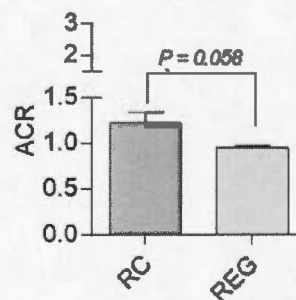
**Figure 3.12 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries des muscles SOL en présence de palmitoyl-carnitine**

**Légende :** les résultats des mesures d'ACR sont représentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). L'ACR des mitochondries des SOL a été déterminé chez les rats RC (n=8) et REG (n=8).



**Figure 3.13 : Effet d'un REG sur la respiration mitochondriale d'EDL en présence de palmitoyl-carnitine**

**Légende :** les résultats des mesures de respiration mitochondriale faites en duplicat sont représentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). Les expériences ont été effectuées sur les muscles EDL de rats RC (n=9) et REG (n=8). L'analyse statistique des valeurs obtenues pour les rats RC et REG a été réalisée par un test Student bilatéral pour échantillons non appariés. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significativement différentes.



**Figure 3.14 : Effet d'un REG sur l'ACR des mitochondries d'EDL en présence de palmitoyl-carnitine**

**Légende :** les résultats des mesures d'ACR sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). L'ACR des mitochondries des EDL a été déterminé chez les rats RC (n=9) et REG (n=8). L'analyse statistique des valeurs obtenues chez les rats RC et REG a été réalisée avec un test Student bilatéral pour échantillons non appariés. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significativement différentes.

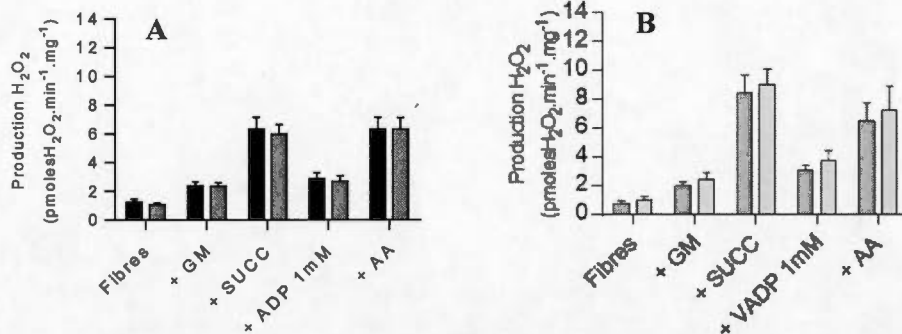
### 3.3 Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Aucune différence de production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'a été mise en évidence ceci pour les muscles SOL (Fig.3.15 A) et EDL (Fig. 3.15 B). L'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été étudiée en ajoutant des substrats du complexe I, tel que le glutamate (5 mM) + malate (1 mM), du succinate (10 mM) pour le complexe II, de l'ADP (2mM) et de l'Antimycin A (10 µM). Nos résultats montrent qu'il n'y a aucun changement de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les jeunes rats soumis à un REG.

Afin de comprendre davantage le fonctionnement mitochondrial, nous avons évalué la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'un palmitoyl-carnitine. On n'observe aucune différence d'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec la stimulation de palmitoyl-carnitine entre les groupes ceci pour les muscles SOL (Fig. 3.17A) et EDL (Fig. 3.17B). Quelle que soit la stimulation des substrats mitochondriaux, nos résultats sont similaires entre les groupes. Ces résultats suggèrent qu'un REG à court terme chez de jeunes rats n'affecte pas la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

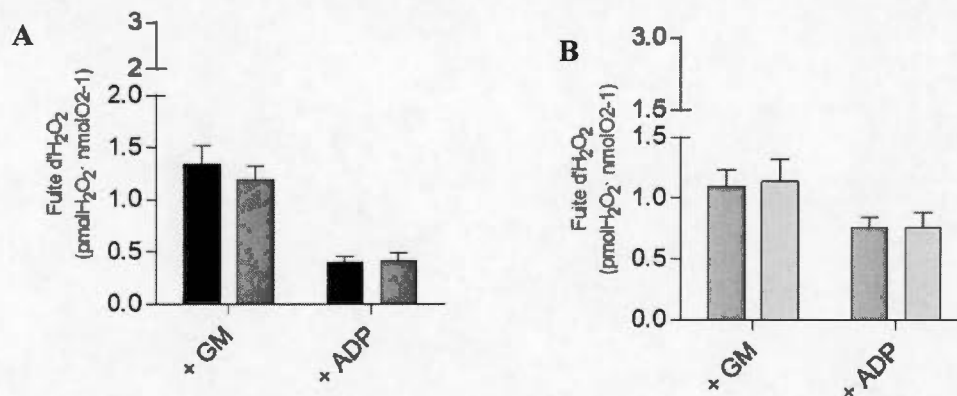
La fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été mesurée avec les deux conditions en utilisant les valeurs de respiration mitochondriales de fibres perméabilisées provenant du même muscle dans des conditions similaires. On n'observe aucun changement de fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre les groupes sur le SOL (Fig. 3.16A) et l'EDL (Fig. 3.16B). En présence de palmitoyl-carnitine, on n'observe aucun changement de la fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour le SOL. On observe cependant une tendance à une production inférieure de la fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de palmitoyl-carnitine dans les muscles EDL de rats REG comparativement aux rats RC.





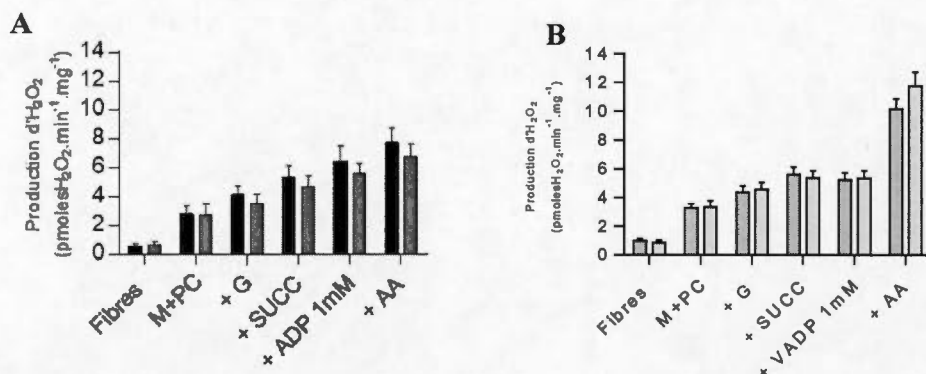
**Figure 3.15 : Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B)**

**Légende :** les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). L'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des SOL (Fig. 3.15A) a été déterminée chez des rats RC (n=12) et REG (n=12). L'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des EDL (Fig.3.15B) a été déterminée chez des rats RC (n=8) et REG (n=8). Les résultats des expériences mesurant l'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont présentés en pmole d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de fibres humides.



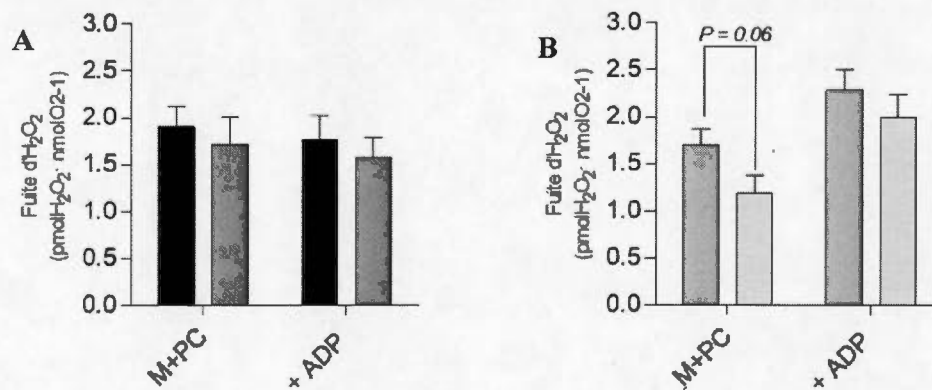
**Figure 3.16 : Fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le SOL (Fig.A) et l'EDL (Fig.B)**

**Légende:** les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). La fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des SOL (Fig. 3.16A) a été déterminée chez des rats RC (n=12) et REG (n=12). La fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des EDL (Fig. 3.16B) a été déterminée chez des rats RC (n=8) et REG (n=8). La fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été obtenue en divisant la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la vitesse de respiration mitochondriale correspondante des muscles SOL et EDL.



**Figure 3.17 : Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B) en présence palmitoyl-carnitine**

**Légende:** les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). L'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des SOL (Fig. 3.17A) a été déterminée chez des rats RC (n=7) et REG (n=8). L'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des EDL (Fig. 3.17B) a été déterminée chez des rats RC (n=9) et REG (n=9). Les résultats des expériences mesurant l'émission d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont présentées en pmole d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de fibres humide.



**Figure 3.18 : Fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le SOL (Fig.A) et l'EDL (Fig.B) en présence palmitoyl-carnitine**

**Légende:** les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM). La fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des SOL (Fig. 3.18A) a été déterminée chez des rats RC (n=7) et REG (n=8). La fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des EDL (Fig. 3.18B) a été déterminée chez des rats RC (n=9) et REG (n=9). La fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été obtenue en divisant la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la vitesse de respiration mitochondriale correspondante des muscles SOL et EDL.

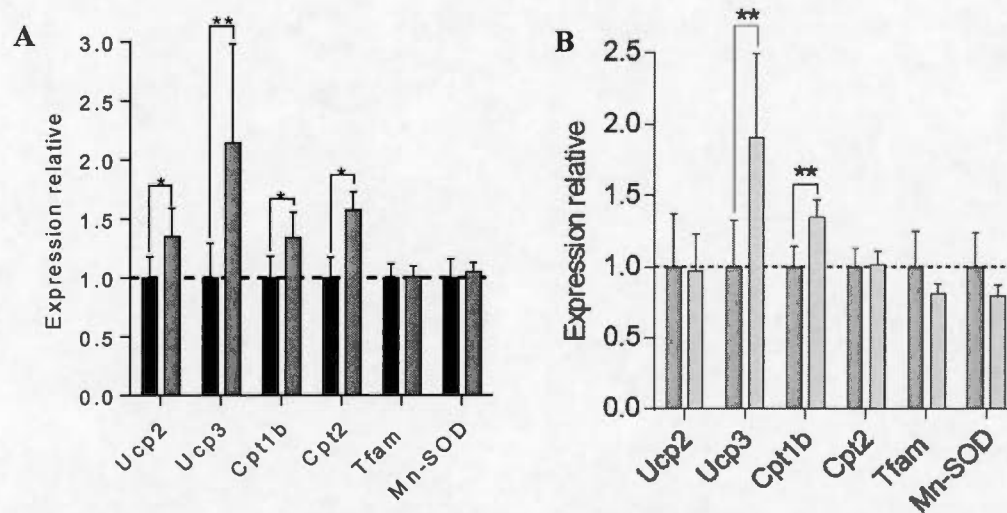
### 3.4 Effet d'un REG sur l'expression des gènes impliqués dans le transport des acides gras et dans la régulation de la dynamique mitochondriale en qPCR

Des expériences de qPCR ont été réalisées avec des extraits de muscles SOL et EDL afin d'investiguer l'abondance relative de différents gènes impliqués dans le (i) métabolisme des acides gras (Cpt1b, Cpt2), (ii) la régulation du couplage de la phosphorylation oxydative (UCP2, UCP3), (iii) dans la régulation de l'expression de l'ADN mitochondrial (Tfam), dans l'activité d'enzyme antioxydante (Mn-SOD) et (iv) dans la régulation de la dynamique mitochondriale.

Les niveaux d'expression d'UCP2 (~35%,  $P=0.019$ ), UCP3 (~114%,  $P=0.002$ ), Cpt1b (~34%,  $P<0.019$ ) et Cpt2 (~57%,  $P<0.000$ ) (Fig. 3.19A) étaient significativement supérieurs dans les muscles SOL des rats REG. L'augmentation de l'abondance de l'ARNm des gènes Cpt1b et Cpt2 dans le SOL des jeunes rats soumis au REG suggère une augmentation de la capacité du transport des acides gras vers la matrice mitochondriale. De manière intéressante, on observe également des changements d'ARNm dans les muscles EDL des rats soumis au REG (Fig. 3.19B). La figure 3.19B montre l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'Ucp3 (~90%,  $P=0.007$ ) et de Cpt1b (~34%,  $P=0.004$ ) dans l'EDL. Que ce soit dans le SOL ou l'EDL, aucun changement de l'expression de Tfam et de la Mn-SOD n'a été observé. Nos résultats indiquent également que l'expression d'ARNm de UCP2 et 3 sont significativement augmentés dans le SOL de rats soumis à un REG.

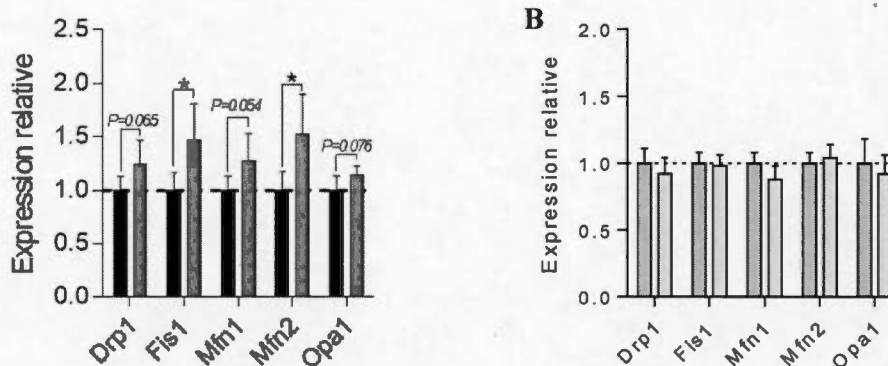
Nos résultats en relation avec les effets d'un REG sur l'expression de gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale sont présentés dans la Figure 3.20. Dans les muscles SOL, les rats REG présentaient un niveau d'expression de Mfn2 supérieur (~52%,  $P=0.013$ ), ainsi qu'une tendance pour des niveaux d'expression supérieurs des gènes

OPA1 ( $P=0.076$ ) et Mfn1 ( $P=0.054$ ) en comparaison avec les rats RC. L'expression de Fis1 ( $\sim 46\%$ ,  $P=0.013$ ) était significativement supérieure chez les rats REG vs RC. Les rats REG présentaient également une tendance pour un expression supérieure de Drp1 ( $P=0.065$ ). Aucun différence d'expression des gènes impliqués dans la régulation de la dynamique mitochondriale n'a été mise en évidence en les rats REG et RC dans l'EDL (Fig.3.20B).



**Figure 3.19 : Effet d'un REG sur l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides gras dans le SOL (Fig.3.19A) et l'EDL (Fig. 3.19B)**

**Légende:** Les résultats de qPCR sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs d'intervalles de confiances de 95% d'approximativement 15 rats RC et 15 REG. Les résultats ont été normalisés par des gènes contrôles. Les gènes contrôles pour le SOL sont Pfkfb3, Rpl30, Ppib, Pum1 et pour l'EDL se sont Pum1, Pfkfb3, Psmc4, Rpl30. Les valeurs de p inférieures à \*0,05 et \*\*0.01 sont considérées comme significativement différentes. Le nom des gènes sont : UCP2 ou 3, protéine découplante CPT1b, carnitine palmitoyl transferase-1 beta; CPT2, carnitine palmitoyl transferase-2; TFAM, facteur de transcription mitochondrial A; Mn-SOD, superoxyde dismutase associée au manganèse.



**Figure 3.20 : Effet d'un REG sur l'expression des gènes régulant la dynamique mitochondriale dans le SOL (Fig.3.20A) et l'EDL (Fig. 3.20B)**

**Légende:** Les résultats de qPCR sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs d'intervalles de confiances de 95% d'approximativement 15 rats RC et 15 REG. Les résultats ont été normalisés par des gènes contrôles. Les gènes contrôles pour le SOL sont Pgk1, Rpl30, Ppib, Pum1 et pour l'EDL se sont Pum1, Pgk1, Psmc4, Rpl30. Les valeurs de p inférieures à \*0,05 et \*\*0.01 sont considérées comme significativement différentes.

### 3.5 Quantification du contenu des sous-unités représentatives des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative

Les quantités de protéines ont été mesurées par Western-Blot afin de déterminer le contenu mitochondrial des sous-unités des complexes CI, CII, CIII, CIV et ATPs. Nos résultats indiquent qu'un REG n'influence pas le contenu des protéines de la phosphorylation oxydative dans les muscles SOL (Fig. 3.21A) et EDL (Fig. 3.21B).

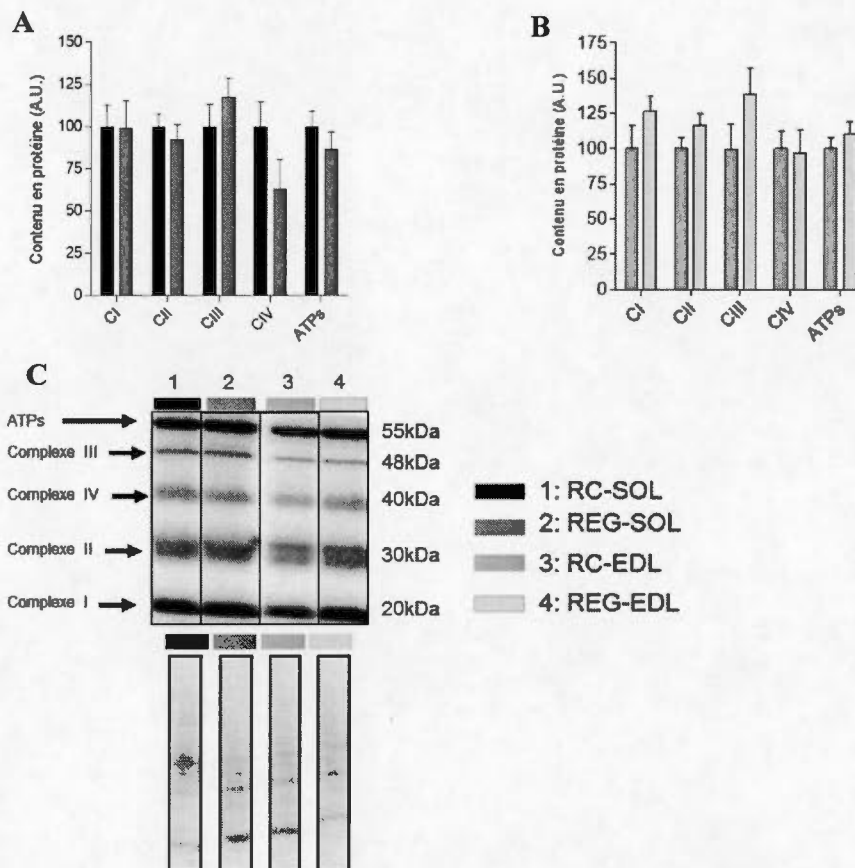
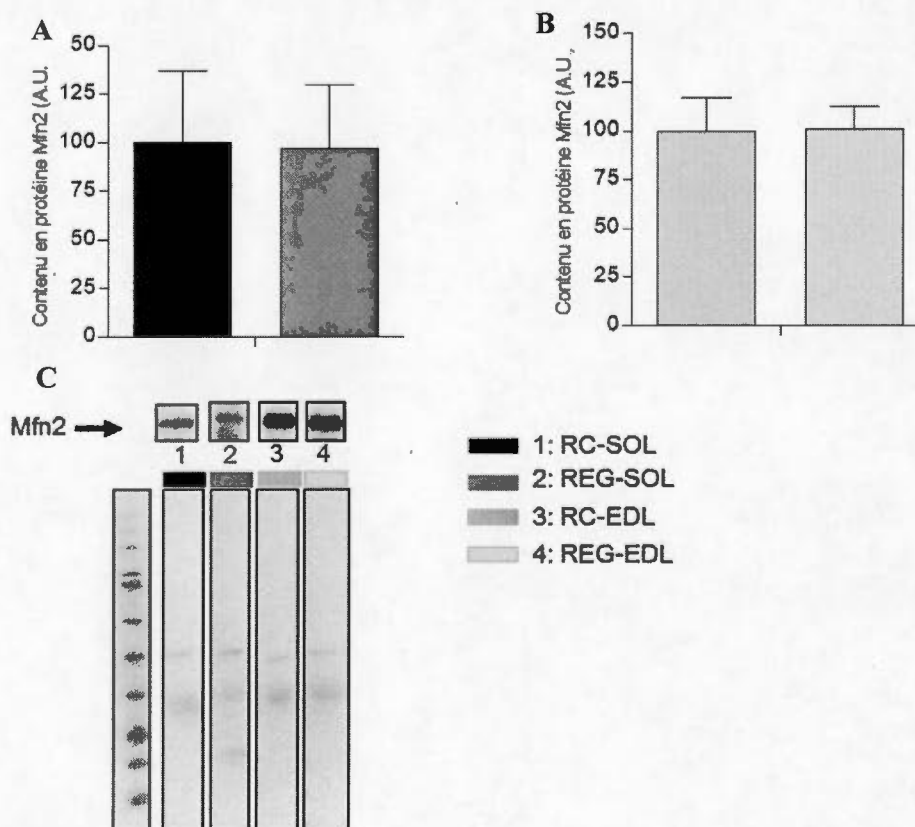


Figure 3.21 : Contenu OXPHOS dans les muscles SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B)

**Légende :** les quantifications du contenu OXPHOS sont représentés par la moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM) rapporté aux valeurs moyennes des rats contrôles. Le contenu OXPHOS des SOL (Fig. 3.21A) a été déterminé chez des rats RC (n=7) et REG (n=8). Le contenu OXPHOS des EDL (Fig. 3.21B) a été déterminé chez des rats RC (n=8) et REG (n=8) et normalisé par rapport à l'intensité du marquage au pinceau rouge (Fig. 3.21C).

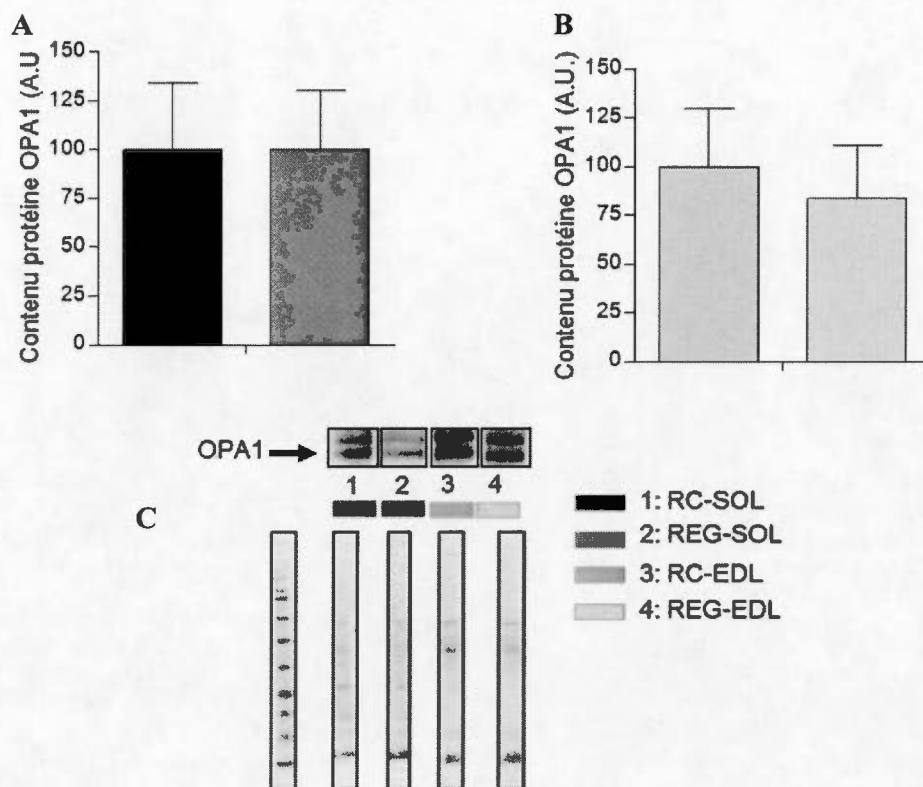
### 3.6 Contenu en protéines Mfn2 et OPA1

Dans l'optique de vérifier si les changements d'expression des ARNm de Mfn2 et de OPA1 résultent en des changements de leurs contenus protéiques nous avons analysé leurs contenus par Western Blot. Aucune différence de contenu en Mfn2 n'a pu être mise en évidence entre les rats REG et RC, que ce soit dans le muscle SOL (Fig. 3.22A) ou l'EDL (Fig. 3.22B). La figure 3.23 montre que le contenu en OPA1 était similaire entre les rats REG et RC et ce dans les SOL et les EDL.



**Figure 3.22 : Contenu en Mfn-2 dans les muscles SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B)**

**Légende :** les quantifications du contenu de Mfn2 sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM) rapporté aux valeurs moyennes des rats contrôles. Le contenu Mfn2 des SOL (Fig. 3.22A) a été déterminé chez des rats RC (n=6) et REG (n=7). Le contenu en Mfn2 des EDL (Fig. 3.22B) a été déterminé chez des rats RC (n=8) et REG (n=8) et normalisé par rapport à l'intensité du marquage au pinceau rouge (Fig. 3.22C).



**Figure 3.23 : Contenu en OPA1 dans les muscles SOL (Fig.A) et EDL (Fig.B)**

**Légende :** les quantifications du contenu de OPA1 sont représentés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs standard à la moyenne (SEM) rapportés aux valeurs moyennes des rats contrôles. Le contenu de OPA1 des SOL (Fig. 3.23A) a été déterminé chez des rats RC (n=7) et REG (n=7). Le contenu de OPA1 des EDL (Fig. 3.23B) a été déterminé chez des rats RC (n=8) et REG (n=6) et normalisé par rapport à l'intensité du marquage au ponceau rouge (Fig. 3.23C).



## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Les principaux objectifs de ce mémoire étaient d'évaluer l'impact d'une diète riche en gras (60%) de 14 jours chez de jeunes rats Wistar males sur le fonctionnement mitochondrial de muscles squelettiques oxydatifs ou glycolytiques. Les expérimentations effectuées dans le cadre de ce mémoire mettent en évidence qu'un REG chez de jeunes rats induit une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras dans les muscles oxydatifs et glycolytiques, sans affecter le contenu en mitochondries. Une des forces de mon mémoire est que les expériences en relation avec les fonctions des mitochondries ont été réalisées in situ, en utilisant la méthode des fibres perméabilisée. Cette méthode permet d'étudier les mitochondries dans leur environnement physiologique ceci en évitant d'endommager leur morphologie. Nos résultats sont différents de notre hypothèse de départ. En effet, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce mémoire indique qu'un REG de 14 jours influence positivement la capacité de respiration des mitochondries en présence de substrats lipidiques dans le SOL et l'EDL sans apporter de modification de la production d' $H_2O_2$ .

Les régimes hyperlipidiques pour induire l'obésité sont utilisés depuis les années 1950 (Masek & Fabry, 1959). Dans notre étude l'objectif n'était pas d'induire l'obésité, mais d'étudier le fonctionnement mitochondrial dans les stades précoces du développement de l'obésité. En effet, nos résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation de la masse corporelle. Malgré l'absence de différence de masse corporelle chez les jeunes rats soumis à un REG nous avons observé une prise de poids régulière tout au long de l'intervention, que ce soit pour les rats RC ou REG. Il est à noter que le RER plus faible des rats soumis au REG indique que les rats utilisent davantage de lipides que de glucides pour combler leurs besoins énergétiques

journaliers. Ces résultats de RER sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature scientifique indiquent que les régimes hyperlipidiques ont un impact sur l'utilisation préférentielle des lipides comme substrats énergétiques (So et al., 2011; Lanza et al., 2013). À notre connaissance, il existe très peu d'études sur les fonctions et la dynamique mitochondriale dans les premiers stades de développement de l'obésité. C'est dans cette optique que nous avons voulu déterminer les adaptations des fonctions et de la dynamique mitochondriales chez de jeunes rats en réponse à REG de 14 jours.

#### **4.1 Impact d'un REG sur la respiration mitochondriale**

Dans un premier temps, nous avons étudié le fonctionnement des mitochondries en utilisant des substrats du complexe I. Nos résultats indiquent que le REG n'influence pas la respiration mitochondriale lorsque des substrats des complexes I et II sont utilisés. Afin de comprendre si le fonctionnement des mitochondries diffère en fonction de la nature des substrats, nous avons réalisé des expériences en utilisant du palmitoyl-carnitine. Le palmitoyl-carnitine est un composé issu de la liaison chimique entre l'acide palmitique (C16:0) et une molécule de carnitine. Ce conjugué sert donc à faciliter le transport d'acides gras vers la matrice mitochondriale. Les résultats obtenus indiquent qu'un REG de seulement 14 jours entraîne une augmentation de respiration mitochondriale en présence de palmitoyl-carnitine. Il est intéressant de souligner que ces adaptations sont similaires pour le SOL et l'EDL, deux muscles qui possèdent pourtant des caractéristiques typologiques et métaboliques bien distinctes. En effet, le SOL est composé exclusivement de fibres à fort potentiel oxydatives contenant davantage de mitochondries, comparativement à l'EDL composé davantage de fibres glycolytiques. À titre de comparaison, des données obtenues à partir d'analyses d'immunohistochimie chez des rats âgés d'environ 5 mois, suggèrent que l'EDL contient environ 96% de fibres de type II (20% IIa, 38% IIx et 38% IIb), comparativement à celles du SOL qui contient environ 84% de fibre de type I, 7% de fibre IIA et 9% de fibre IIx (Delp & Duan, 1996). Par ailleurs, il semble que pendant

la croissance musculaire postnatale chez des rats, une modification de la proportion des fibres de type I (jours 8  $\approx$  50%, jours 21  $\approx$  70%, jours 80  $\approx$  80%) s'exerce dans le SOL (Punkt et al., 2004). L'étude de Agbulut et al. en 2003 suggère également qu'il y a une augmentation de l'expression en protéines des chaînes lourdes de myosine lente (fibre I) durant la période de croissance en comparant des solaires de souris âgé de 21 et 90 jours (Agbulut et al., 2003). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'impact d'un REG sur la typologie musculaire dans de futures études. Ceci devrait se faire en prenant compte que la période croissance qui influence la physiologie et typologie musculaire (Larsson et al., 1991).

En utilisant le palmitoyl-carnitine nous avons évalué la capacité d'alimentation de la chaîne de transport des électrons par le complexe I et l'ETF ubiquinone oxydoréductase approvisionnent le Coenzyme Q avec des électrons. Nos résultats mettent en évidence que différents substrats doivent être utilisés afin de bien caractériser le fonctionnement des mitochondries. De plus, les adaptations de l'état II et III que nous avons obtenues sont cohérentes avec les données dérivées de plusieurs autres études (cf. tableau 2), montrant qu'un REG entraîne une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras par les mitochondries. L'état III en présence de MPC+ADP est supérieur dans les muscles SOL des rats RC et des rats REG. Nos résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par plusieurs autres groupes qui suggèrent que le SOL a une capacité supérieure d'oxydation des acides gras (i.e. palmitoyl-carnitine/octanoyl-carnitine) comparativement aux muscles glycolytiques (eg. plantaris, EDL, gastronémus blanc) de rats (Bahi et al., 2005; Mogensen & Sahlin, 2005; Ponsot et al., 2005) et lapins (Jackman & Willis, 1996). Nos résultats de respiration mitochondriale, qui indiquent une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras chez des rats soumis à un REG, sont parfaitement en ligne avec nos données d'expression d'ARNm. En effet, nous avons pu mettre en évidence qu'un REG s'accompagne d'une augmentation de l'expression de Cpt1b et Cpt2, deux transporteurs d'acides gras mitochondriaux, dans

le SOL et de Cpt1b dans l'EDL. Il apparaît donc clairement qu'un REG stimule les capacités mitochondriales d'oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques.

Il est cependant important de garder à l'esprit qu'une augmentation mitochondriale de l'oxydation des lipides n'est pas nécessairement favorable au développement de la résistance à l'insuline au niveau musculaire. En effet, Hancock et al. ont montré que bien qu'un REG induit une augmentation du contenu en mitochondries et des capacités d'oxydation des lipides dans le muscle, cette augmentation de la capacité mitochondriale d'oxydation des acides gras était associée à une oxydation incomplète des lipides, produisant des dérivés lipidiques interférant avec les voies de signalisation du récepteur à l'insuline (Hancock et al., 2008). Dans le cadre de ce mémoire, il n'a pas été possible de mener les expériences permettant d'écarter l'hypothèse suggérant qu'en présence de palmitoyl-carnitine, l'augmentation de la respiration mitochondriale est accompagnée d'une augmentation de la production de dérivés lipidiques toxiques.

#### **4.2 Effet d'un REG sur la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Des données récentes indiquent que la résistance à l'insuline induite par un REG pourrait être causée par une augmentation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, Anderson et al. ont montré que 3 semaines de REG chez des rats augmentent la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Anderson et al., 2009). Leur résultats montrent également que l'utilisation de l'antioxydant SS31 ciblant spécifiquement les mitochondries ou la surexpression de la catalase au niveau mitochondrial prévient le développement de la résistance à l'insuline induite par un REG chez ces mêmes animaux.

En nous basant sur ces données, nous avons donc émis l'hypothèse qu'un REG de 2 semaines augmenterait la production mitochondriale d' $H_2O_2$  chez des jeunes rats. La production d' $H_2O_2$  dans le cadre de ce mémoire a été évaluée à partir de fibres perméabilisées de SOL et l'EDL de rats RC et REG. Contrairement à notre hypothèse, aucune différence de production d' $H_2O_2$  n'a pu être détectée que ce soit en présence des substrats du complexe I ou de palmitoyl-carnitine entre les rats RC et REG. Renforçant nos résultats de production d' $H_2O_2$ , aucun changement de contenu enARNm de l'enzyme Mn-SOD n'a été détecté, une enzyme dont l'expression est portant augmenté en présence de stress oxydant (cf. (Miao & St Clair, 2009) pour une revue détaillée). Nos observations sur la production d' $H_2O_2$  diffèrent donc de celles de l'étude d'Anderson *et al.* Néanmoins, plusieurs facteurs potentiels pourraient expliquer ces différences, par exemple la souche des rats, leur âge en début de régime, la durée du REG et la composition de la diète qui n'étaient pas identiques à nos conditions expérimentales. D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre les effets d'un REG sur la production mitochondriale d' $H_2O_2$ . Dans cette optique, il serait intéressant et important de déterminer la cinétique des effets d'un REG sur la production d' $H_2O_2$  (i.e. évaluer les effets d'un REG à 2, 6, 12 et 24 semaines) sur des animaux jeunes, adultes et âgés. Il serait également important d'évaluer la cinétique des effets d'un REG sur les différents systèmes antioxydants.

#### **4.3 Impact d'un REG sur le contenu en protéines sur la phosphorylation oxydative**

Dans le cadre de ce mémoire l'expression des protéines de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) a été évaluée par Western blot. Nos résultats confirment qu'il n'y a aucun changement d'expression des protéines OXPHOS chez de jeunes rats RC comparativement aux rats REG, que ce soit pour le SOL ou l'EDL. Nos résultats sont cohérents avec l'étude de Trajcevski et al., qui n'observe aucun changement musculaire de l'expression des protéines OXPHOS à la suite de 3 et 8 semaines d'un REG (Trajcevski et al., 2013). Dans cette même étude, les chercheurs observent qu'après 3 semaines les souris nourries avec REG présentent une meilleure capacité d'oxydation du palmitate dans les muscles EDL, mais pas au niveau des SOL. Il est important de souligner que les souris utilisées dans l'étude de Trajcevski et al., sont âgées de 10 mois et tel que précédemment discuté très peu d'étude s'est intéressée au fonctionnement des mitochondries dans un contexte dépendant de la croissance.

De manière nos résultats indiquent que le contenu en protéines OXPHOS dans les SOL est supérieur comparativement aux EDL. Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études montrant que l'activité enzymatique (Ashmore & Doerr, 1971; Delp & Duan, 1996; Punkt et al., 2004) et l'expression des protéines OXPHOS varient selon la typologie musculaire (Picard et al., 2011a). En effet, le contenu en protéines OXPHOS varie selon la typologie musculaire, les muscles oxydatifs (fibres de types I et IIa) ont une abondance relative supérieure en protéines OXPHOS, comparativement aux muscles plus glycolytiques (fibres de type IIx et IIb).

Dans le contexte de ce travail de mémoire, nos résultats montrent qu'un régime hyperlipidique d'une durée de 14 jours n'influence pas l'expression des protéines

OXPPOS chez de jeunes rats, malgré le fait qu'on observe une augmentation de la respiration mitochondriale en présence de substrats lipidiques. Il est possible que nos observations de la fonction mitochondriale puissent être légèrement influencées par un changement de typologie musculaire entre les rats RC et REG. Toutefois, les résultats d'une étude récente utilisant un modèle de jeune souris (âgé de  $\approx 3$  semaines) soumis à un régime hyperlipidique pour une durée de 3 semaines indiquent que la distribution des types de fibre musculaire au niveau du soléaire n'est pas affectée par un REG (Thomas et al., 2014). Il serait intéressant dans de futures études d'investiguer les changements de distribution de la typologie musculaire en lien avec l'activité mitochondriale par type de fibre en étudiant la cinétique du développement de complication métabolique induite par l'obésité.

#### **4.4 Effet d'un REG sur la dynamique mitochondriale**

Nous avons voulu déterminer si un REG influence l'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale. Présentement, il n'existe que des liens indirects suggérant que la surexpression de Mfn2 chez de jeunes rats Sprague-Dawley ( $\approx 28$  jours) soumis à un régime hyperlipidique pendant 8 semaines améliore l'homéostasie glucidique par l'activation du senseur énergétique AMPK (Kong et al., 2013). De même, plusieurs études soulignent l'existence d'une corrélation positive entre l'expression de Mfn2 et la sensibilité à l'insuline (Bach et al., 2005; Mingrone et al., 2005; Kong et al., 2013). De plus, de multiples évidences ont émergé depuis la dernière décennie associant l'implication du processus de la dynamique mitochondriale dans l'étiologie de plusieurs maladies métaboliques (Bach et al., 2005; Chan, 2012; Sebastian et al., 2012; Cheng & Almeida, 2014; Putti et al., 2015). Cependant, les effets de REG à court terme sur la dynamique mitochondriale sont largement inexplorés.

Notre hypothèse initiale était que les expressions des gènes pro-fusion seraient diminuées et que celles des gènes pro-fission seraient augmentées chez les rats soumis à un REG. Nos résultats ont permis de mettre en évidence qu'un REG augmente l'expression des gènes de fusion (Mfn2) et de fission (Fis1) uniquement dans les SOL de jeunes rats, suggérant ainsi un effet muscle spécifique d'un REG sur la dynamique mitochondriale. Cependant, lorsque nous avons voulu vérifier si l'augmentation de l'ARNm de la Mfn2 se traduisait par une augmentation de son contenu protéique, nous n'avons détecté aucune différence de contenu en Mfn2 dans les SOL de jeunes rats soumis à un REG. Il est donc possible que l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale débute après 2 semaines d'un REG, mais nécessite une plus longue période pour résulter en une augmentation significative de leurs contenus protéiques.

Il serait donc intéressant pour de futures études d'évaluer les changements de la dynamique et de la morphologie mitochondriale dans le cours du développement de l'obésité (i.e. établir la cinétique des effets d'un REG sur une longue période de temps). Une étude récente a montré une diminution de l'expression des protéines de fusion et une augmentation des protéines de fission chez des souris soumises à un REG pendant 40 semaines (Liu et al., 2014). Cette étude appuie l'hypothèse que les altérations des processus de la dynamique mitochondriale surviennent après une longue période de stress métabolique.

Une autre hypothèse qui peut-être avancée pour expliquer le fait que l'augmentation de l'ARNm de Mfn2 n'a été observée que dans le SOL, est reliée au fait que la dynamique mitochondriale semble varier en fonction du type de fibre. En effet, une étude récente suggère que les fibres oxydatives auraient davantage d'activité de fusion mitochondriale (Mishra et al., 2015). Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de



modification d'ARNm des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale dans les EDL chez les rats REG comparativement au rats RC, malgré le fait que les EDL des rats REG sont en mesure d'augmenter leur respiration mitochondriale en présence de substrats lipidiques. Il est donc possible de spéculer que dans le contexte d'un REG, les changements de fonction mitochondriale soient des événements qui précèdent d'éventuels changements de dynamique / morphologie mitochondriale. Dans de futures études, il serait intéressant d'évaluer l'impact d'inhibiteurs de la fission mitochondriale, telle que Mdivi-1 (Cassidy-Stone et al., 2008), sur les effets d'un REG sur les fonctions des mitochondries et la sensibilité à l'insuline. Ce type d'étude permettrait de mieux comprendre les réels impacts des processus de fusion et fission mitochondriales sur le développement de la résistance à l'insuline.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ce mémoire a permis d'évaluer l'impact d'un régime hyperlipidique à court terme sur le métabolisme mitochondrial musculaire de jeunes rats. Nos résultats démontrent qu'un REG d'une durée de 14 jours résulte en une augmentation de la capacité d'oxydation des gras dans les muscles glycolytiques et oxydatifs. Cette augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras survient sans modification du contenu en protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative ni d'expression de Tfam (un facteur de transcription régulant l'expression de l'ADN mitochondrial ainsi que la biogenèse mitochondriale). Nos résultats mettent en évidence qu'un REG augmente l'expression de gènes impliqués dans le transport des lipides. Nos résultats indiquent également qu'un REG résulte en une augmentation de l'expression d'ARNm des protéines découplantes (UCP2 & 3), bien qu'aucun découplage de la phosphorylation oxydative n'ait été observé. Enfin, notre étude a montré qu'un REG à court terme augmente le contenu en ARNm de gènes impliqués dans la fusion, mais également dans la fission, des mitochondries de muscles oxydatifs. Cependant, aucune différence de l'expression de la protéine profusion Mfn2 a été observé chez les rats REG, suggérant donc ainsi que la dynamique mitochondriale n'est pas modifiée dans les stades précoces du développement de l'obésité. De futures études devront préciser la cinétique des effets d'un REG sur la dynamique mitochondriale et l'importance d'éventuel changement de cette dynamique dans les adaptations mitochondriales induites par un REG. En conclusion, notre étude renforce l'hypothèse selon laquelle le fonctionnement des mitochondries musculaires s'adapte rapidement aux régimes hyperlipidiques en améliorant leurs capacités d'oxydation des substrats d'origine lipidique.

### **5.1 Pertinence scientifique**

À notre connaissance, cette étude était la première à explorer simultanément l'impact d'un REG à court terme sur les fonctions et la dynamique mitochondriale sur des muscles oxydatifs et glycolytiques de jeunes rats. Cette étude pourrait avoir des implications pour plusieurs autres recherches ultérieures sur le fonctionnement des mitochondries. Il serait intéressant dans de futures études d'investiguer l'impact à plus long terme sur la respiration, la production d' $H_2O_2$ , la dynamique et la morphologie mitochondriale en utilisant différentes diètes, telles que les régimes riches en fructose. Il serait également pertinent de valider l'importance de différents types d'activité physique (eg. entraînement par intervalles) sur les fonctions et la dynamique mitochondriale des jeunes rats soumis à différentes diètes.

- Agbulut O, Noirez P, Beaumont F & Butler-Browne G. (2003). Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **95**, 399-406.
- Aguer C & Harper ME. (2012). Skeletal muscle mitochondrial energetics in obesity and type 2 diabetes mellitus: endocrine aspects. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* **26**, 805-819.
- Amengual-Cladera E, Llado I, Gianotti M & Proenza AM. (2012). Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity. *Metabolism: clinical and experimental* **61**, 1108-1117.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW, 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH & Neuffer PD. (2009). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *The Journal of clinical investigation* **119**, 573-581.
- Andreyev AY, Kushnareva YE & Starkov AA. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry Biokhimiia* **70**, 200-214.
- Anis AH, Zhang W, Bansback N, Guh DP, Amarsi Z & Birmingham CL. (2010). Obesity and overweight in Canada: an updated cost-of-illness study. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **11**, 31-40.
- Ashmore CR & Doerr L. (1971). Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Experimental neurology* **31**, 408-418.
- Asmann YW, Stump CS, Short KR, Coenen-Schimke JM, Guo Z, Bigelow ML & Nair KS. (2006). Skeletal muscle mitochondrial functions, mitochondrial DNA copy numbers, and gene transcript profiles in type 2 diabetic and nondiabetic subjects at equal levels of low or high insulin and euglycemia. *Diabetes* **55**, 3309-3319.
- Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H & Zorzano A. (2005). Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* **54**, 2685-2693.

- Bahi L, Garnier A, Fortin D, Serrurier B, Veksler V, Bigard AX & Ventura-Clapier R. (2005). Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow- and fast-twitch muscles. *Journal of cellular physiology* **203**, 589-598.
- Balaban RS, Nemoto S & Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T & Rossignol R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science* **120**, 838-848.
- Boden MJ, Brandon AE, Tid-Ang JD, Preston E, Wilks D, Stuart E, Cleasby ME, Turner N, Cooney GJ & Kraegen EW. (2012). Overexpression of manganese superoxide dismutase ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **303**, E798-805.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseau E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H & Rieusset J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of clinical investigation* **118**, 789-800.
- Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A & Bastin J. (2004). Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* **25**, 495-520.
- Bosma M, Kersten S, Hesselink MK & Schrauwen P. (2012). Re-evaluating lipotoxic triggers in skeletal muscle: relating intramyocellular lipid metabolism to insulin sensitivity. *Progress in lipid research* **51**, 36-49.
- Bottje W. (2015). Chapter 4 - Mitochondrial Physiology. In *Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition)*, ed. Scanes CG, pp. 39-51. Academic Press, San Diego.
- Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsoe R & Dela F. (2007). Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* **50**, 790-796.
- Boveris A & Chance B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal* **134**, 707-716.
- Boveris A, Oshino N & Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* **128**, 617-630.

- Brown GC & Borutaite V. (2007). Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular research* **75**, 283-290.
- Buelle Y & Hochachka PW. (2002). Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers. *J Appl Physiol (1985)* **92**, 2429-2438.
- Carnell S, Haworth CM, Plomin R & Wardle J. (2008). Genetic influence on appetite in children. *Int J Obes (Lond)* **32**, 1468-1473.
- Carnell S & Wardle J. (2008). Appetite and adiposity in children: evidence for a behavioral susceptibility theory of obesity. *Am J Clin Nutr* **88**, 22-29.
- Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingerman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR & Nunnari J. (2008). Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Developmental cell* **14**, 193-204.
- Chan DC. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 79-99.
- Chan DC. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annual review of genetics* **46**, 265-287.
- Chansemaume E, Malpuech-Brugere C, Patrac V, Bielicki G, Rousset P, Couturier K, Salles J, Renou JP, Boirie Y & Morio B. (2006). Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. *The Journal of nutrition* **136**, 2194-2200.
- Chen H, Chomyn A & Chan DC. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* **280**, 26185-26192.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL & Lesnefsky EJ. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry* **278**, 36027-36031.
- Cheng Z & Almeida FA. (2014). Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: an epigenetic link. *Cell cycle* **13**, 890-897.

- Cogswell AM, Stevens RJ & Hood DA. (1993). Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *The American journal of physiology* **264**, C383-389.
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Liverini G & Iossa S. (2014). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial responses to short-term high-fat feeding in rat skeletal muscle. *Nutrition* **30**, 75-81.
- Dee A, Kearns K, O'Neill C, Sharp L, Staines A, O'Dwyer V, Fitzgerald S & Perry IJ. (2014). The direct and indirect costs of both overweight and obesity: a systematic review. *BMC research notes* **7**, 242.
- DeFronzo RA & Tripathy D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32 Suppl 2**, S157-163.
- Dela F & Helge JW. (2013). Insulin resistance and mitochondrial function in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 11-15.
- Delp MD & Duan C. (1996). Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol (1985)* **80**, 261-270.
- Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodes-Cabau J, Bertrand OF & Poirier P. (2008). Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 1039-1049.
- Douketis JD, Paradis G, Keller H & Martineau C. (2005). Canadian guidelines for body weight classification in adults: application in clinical practice to screen for overweight and obesity and to assess disease risk. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **172**, 995-998.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **82**, 47-95.
- Dumas JF, Simard G, Flamment M, Ducluzeau PH & Ritz P. (2009). Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans? *Diabetes Metab* **35**, 159-167.
- Eaton S. (2002). Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Progress in lipid research* **41**, 197-239.

- Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, Rustin P, Gustafsson CM & Larsson NG. (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human molecular genetics* **13**, 935-944.
- Ernster L & Schatz G. (1981). Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology* **91**, 227s-255s.
- Farag YM & Gaballa MR. (2011). Diabesity: an overview of a rising epidemic. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **26**, 28-35.
- Flamment M, Rieusset J, Vidal H, Simard G, Malthiery Y, Fromenty B & Ducluzeau PH. (2012). Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a high fat diet: a longitudinal study in rats. *J Physiol Biochem* **68**, 335-344.
- Fontanesi F. (2015). Mitochondria: Structure and Role in Respiration. In *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Francis DK, Van den Broeck J, Younger N, McFarlane S, Rudder K, Gordon-Strachan G, Grant A, Johnson A, Tulloch-Reid M & Wilks R. (2009). Fast-food and sweetened beverage consumption: association with overweight and high waist circumference in adolescents. *Public health nutrition* **12**, 1106-1114.
- Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E, Chen M & Holloszy JO. (2007). Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10709-10713.
- Garver WS, Newman SB, Gonzales-Pacheco DM, Castillo JJ, Jelinek D, Heidenreich RA & Orlando RA. (2013). The genetics of childhood obesity and interaction with dietary macronutrients. *Genes & nutrition* **8**, 271-287.
- Gomes LC, Di Benedetto G & Scorrano L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology* **13**, 589-598.
- Goodpaster BH. (2013). Mitochondrial deficiency is associated with insulin resistance. *Diabetes* **62**, 1032-1035.
- Goran MI, Ball GD & Cruz ML. (2003). Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**, 1417-1427.



- Gouspillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Biran M, Deschodt-Arsac V, Miraux S, Thiaudiere E, Pasdois P, Detaille D, Franconi JM, Babot M, Trezeguet V, Arsac L & Diollez P. (2014a). Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell* **13**, 39-48.
- Gouspillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Franconi JM, Deschodt-Arsac V & Diollez P. (2010). Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 143-151.
- Gouspillou G, Rouland R, Calmettes G, Deschodt-Arsac V, Franconi JM, Bourdel-Marchasson I & Diollez P. (2011). Accurate determination of the oxidative phosphorylation affinity for ADP in isolated mitochondria. *PLoS one* **6**, e20709.
- Gouspillou G, Sgarioto N, Kapchinsky S, Purves-Smith F, Norris B, Pion CH, Barbat-Artigas S, Lemieux F, Taivassalo T, Morais JA, Aubertin-Leheudre M & Hepple RT. (2014b). Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **28**, 1621-1633.
- Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC & Holloszy JO. (2008). High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7815-7820.
- Hansford RG, Hogue BA & Mildaziene V. (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **29**, 89-95.
- Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-Behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghzal GJ, Stocker R, Van Remmen H, Kraegen EW, Cooney GJ, Richardson AR & James DE. (2009). Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17787-17792.
- Hoeks J, Briede JJ, de Vogel J, Schaart G, Nabben M, Moonen-Kornips E, Hesselink MK & Schrauwen P. (2008). Mitochondrial function, content and ROS production in rat skeletal muscle: effect of high-fat feeding. *FEBS letters* **582**, 510-516.

- Hoeks J, Wilde J, Hulshof MF, Berg SA, Schaart G, Dijk KW, Smit E & Mariman EC. (2011). High fat diet-induced changes in mouse muscle mitochondrial phospholipids do not impair mitochondrial respiration despite insulin resistance. *PLoS One* **6**, e27274.
- Holloszy JO. (2013). "Deficiency" of mitochondria in muscle does not cause insulin resistance. *Diabetes* **62**, 1036-1040.
- Holloway GP, Fajardo VA, McMeekin L & LeBlanc PJ. (2012). Unsaturation of mitochondrial membrane lipids is related to palmitate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *The Journal of membrane biology* **245**, 165-176.
- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M & Liverini G. (2002). Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **26**, 65-72.
- Jackman MR & Willis WT. (1996). Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *The American journal of physiology* **270**, C673-678.
- Jahani-Asl A, Cheung EC, Neuspiel M, MacLaurin JG, Fortin A, Park DS, McBride HM & Slack RS. (2007). Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* **282**, 23788-23798.
- Janssen I. (2013). The public health burden of obesity in Canada. *Canadian journal of diabetes* **37**, 90-96.
- Ji LL, Fu R & Mitchell EW. (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol (1985)* **73**, 1854-1859.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV & Ritov VB. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944-2950.
- Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL & Houmard JA. (2000). Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **279**, E1039-1044.
- Klip A & Paquet MR. (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* **13**, 228-243.

- Kong D, Song G, Wang C, Ma H, Ren L, Nie Q, Zhang X & Gan K. (2013). Overexpression of mitofusin 2 improves translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of highfat dietfed rats through AMPactivated protein kinase signaling. *Molecular medicine reports* **8**, 205-210.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD & Muoio DM. (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell metabolism* **7**, 45-56.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols* **3**, 965-976.
- Lanza IR, Blachnio-Zabielska A, Johnson ML, Schimke JM, Jakaitis DR, Lebrasseur NK, Jensen MD, Sreekumaran Nair K & Zabielski P. (2013). Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **304**, E1391-1403.
- Larsson L, Ansved T, Edstrom L, Gorza L & Schiaffino S. (1991). Effects of age on physiological, immunohistochemical and biochemical properties of fast-twitch single motor units in the rat. *The Journal of physiology* **443**, 257-275.
- Leduc-Gaudet JP, Picard M, St-Jean Pelletier F, Sgarioto N, Auger MJ, Vallee J, Robitaille R, St-Pierre DH & Gouspillou G. (2015). Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget* **6**, 17923-17937.
- Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M & Ji LL. (1997). Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *The American journal of physiology* **272**, R363-369.
- Lemire B. (2005). Mitochondrial genetics. *WormBook : the online review of C elegans biology*, 1-10.
- Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, D'Andrea E, Ferraro M, Bianco F, Liverini G & Iossa S. (2007). Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int J Obes (Lond)* **31**, 1596-1604.

- Liu R, Jin P, Yu L, Wang Y, Han L, Shi T & Li X. (2014). Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One* **9**, e92810.
- Lowell BB & Shulman GI. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* **307**, 384-387.
- Luquet S, Marsollier N, Cruciani-Guglielmacci C & Magnan C. (2008). Signals regulating eating behavior. *Obésité* **3**, 167-176.
- Marklund SL. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *The Biochemical journal* **222**, 649-655.
- Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R & Hirabara SM. (2012). Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in health and disease* **11**, 30.
- Masek J & Fabry P. (1959). High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia* **15**, 444-445.
- McCord JM & Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* **244**, 6049-6055.
- Miao L & St Clair DK. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine* **47**, 344-356.
- Mingrone G, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Naon D & Zorzano A. (2005). Could the low level of expression of the gene encoding skeletal muscle mitofusin-2 account for the metabolic inflexibility of obesity? *Diabetologia* **48**, 2108-2114.
- Mishra P, Varuzhanyan G, Pham AH & Chan DC. (2015). Mitochondrial Dynamics Is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization. *Cell metabolism* **22**, 1033-1044.
- Mitchell P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.
- Mitchell P & Moyle J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* **213**, 137-139.

- Mogensen M & Sahlin K. (2005). Mitochondrial efficiency in rat skeletal muscle: influence of respiration rate, substrate and muscle type. *Acta physiologica Scandinavica* **185**, 229-236.
- Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, Glintborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H & Hojlund K. (2007). Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **56**, 1592-1599.
- Montgomery MK & Turner N. (2014). Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine connections*.
- Nair KS, Bigelow ML, Asmann YW, Chow LS, Coenen-Schimke JM, Klaus KA, Guo ZK, Sreekumar R & Irving BA. (2008). Asian Indians have enhanced skeletal muscle mitochondrial capacity to produce ATP in association with severe insulin resistance. *Diabetes* **57**, 1166-1175.
- Ogata T & Yamasaki Y. (1997). Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *The Anatomical Record* **248**, 214-223.
- Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM & Hausenloy DJ. (2010). Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **121**, 2012-2022.
- Phielix E, Schrauwen-Hinderling VB, Mensink M, Lenaers E, Meex R, Hoeks J, Kooi ME, Moonen-Kornips E, Sels JP, Hesselink MK & Schrauwen P. (2008). Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes* **57**, 2943-2949.
- Picard M, Hepple RT & Burelle Y. (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *American journal of physiology Cell physiology* **302**, C629-641.
- Picard M, Ritchie D, Thomas MM, Wright KJ & Hepple RT. (2011a). Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell* **10**, 1047-1055.
- Picard M, Ritchie D, Wright KJ, Romestaing C, Thomas MM, Rowan SL, Taivassalo T & Hepple RT. (2010). Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging Cell* **9**, 1032-1046.

- Picard M, Taivassalo T, Gousspillou G & Hepple RT. (2011b). Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of physiology* **589**, 4413-4421.
- Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C & Hepple RT. (2011c). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS One* **6**, e18317.
- Ponsot E, Zoll J, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Richard R, Veksler V, Ventura-Clapier R & Mettauer B. (2005). Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *Journal of cellular physiology* **203**, 479-486.
- Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A & Lupien PJ. (1994). Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *The American journal of cardiology* **73**, 460-468.
- Punkt K, Naupert A & Asmussen G. (2004). Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. *Acta histochemica* **106**, 145-154.
- Putti R, Sica R, Migliaccio V & Lionetti L. (2015). Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Frontiers in physiology* **6**, 109.
- Rabol R, Larsen S, Hojberg PM, Almdal T, Boushel R, Haugaard SB, Andersen JL, Madsbad S & Dela F. (2010). Regional anatomic differences in skeletal muscle mitochondrial respiration in type 2 diabetes and obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **95**, 857-863.
- Ray PD, Huang BW & Tsuji Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* **24**, 981-990.
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH & Kelley DE. (2005). Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 8-14.
- Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F & Kunz WS. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Molecular and cellular biochemistry* **184**, 81-100.

- Samuel VT & Shulman GI. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**, 852-871.
- Scarpulla RC. (2002). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286**, 81-89.
- Scarpulla RC, Vega RB & Kelly DP. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**, 459-466.
- Sebastian D, Hernandez-Alvarez MI, Segales J, Sorianello E, Munoz JP, Sala D, Waget A, Liesa M, Paz JC, Gopalacharyulu P, Oresic M, Pich S, Burcelin R, Palacin M & Zorzano A. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5523-5528.
- Sen C. (1998). Glutathione: a key role in skeletal muscle metabolism. In *Oxidative Stress in Skeletal Muscle*, pp. 127-139. Springer.
- Shadel GS & Horvath TL. (2015). Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* **163**, 560-569.
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP & Kelley DE. (1999). Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 2051-2060.
- Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, Savoye M, Rieger V, Taksali S, Barbetta G, Sherwin RS & Caprio S. (2002). Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *The New England journal of medicine* **346**, 802-810.
- Skovbro M, Boushel R, Hansen CN, Helge JW & Dela F. (2011). High-fat feeding inhibits exercise-induced increase in mitochondrial respiratory flux in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* **110**, 1607-1614.
- So M, Gaidhu MP, Maghdoori B & Ceddia RB. (2011). Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids in health and disease* **10**, 99.

- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA & Smith SR. (2005). A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* **54**, 1926-1933.
- Summers SA. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in lipid research* **45**, 42-72.
- Szendroedi J, Phielix E & Roden M. (2012). The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology* **8**, 92-103.
- Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T & Sakai J. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15924-15929.
- Thomas MM, Trajcevski KE, Coleman SK, Jiang M, Di Michele J, O'Neill HM, Lally JS, Steinberg GR & Hawke TJ. (2014). Early oxidative shifts in mouse skeletal muscle morphology with high-fat diet consumption do not lead to functional improvements. *Physiological reports* **2**.
- Trajcevski KE, O'Neill HM, Wang DC, Thomas MM, Al-Sajee D, Steinberg GR, Ceddia RB & Hawke TJ. (2013). Enhanced lipid oxidation and maintenance of muscle insulin sensitivity despite glucose intolerance in a diet-induced obesity mouse model. *PLoS One* **8**, e71747.
- Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS & Cooney GJ. (2007). Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* **56**, 2085-2092.
- van den Broek NM, Ciapaite J, De Feyter HM, Houten SM, Wanders RJ, Jeneson JA, Nicolay K & Prompers JJ. (2010). Increased mitochondrial content rescues in vivo muscle oxidative capacity in long-term high-fat-diet-fed rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 1354-1364.
- Vondra K, Rath R, Bass A, Slabochova Z, Teisinger J & Vitek V. (1977). Enzyme activities in quadriceps femoris muscle of obese diabetic male patients. *Diabetologia* **13**, 527-529.



- Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL & Brown M. (2011). Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* **378**, 815-825.
- Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS & Caprio S. (2004). Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *The New England journal of medicine* **350**, 2362-2374.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124.
- Yamada T, Ida T, Yamaoka Y, Ozawa K, Takasan H & Honjo I. (1975). Two distinct patterns of glucose intolerance in icteric rats and rabbits. Relationship to impaired liver mitochondria function. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **86**, 38-45.
- Yu T, Sheu SS, Robotham JL & Yoon Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular research* **79**, 341-351.