

Relations entre fonctionnement mitochondrial et types contractiles des fibres musculaires

N. GUEGUEN¹, L. LEFAUCHEUR¹, P. HERPIN²

¹ INRA, Agrocampus, UMR1079 Systèmes d'élevage, Nutrition animale et humaine, F-35590 Saint-Gilles, France

² INRA, Direction Scientifique Adjointe Animal et Produits Animaux, F-35590 Saint-Gilles, France

Courriel : oillic.stephane@wanadoo.fr

Un bon fonctionnement musculaire nécessite une adéquation entre la production d'ATP et son utilisation par les myofibrilles. La régulation du fonctionnement mitochondrial et les transferts d'énergie entre les mitochondries et les myosines montrent effectivement une haute spécificité en fonction du type contractile des fibres.

La musculature des animaux destinés à la production de viande représente 35 à 60 % de leur masse corporelle. Le muscle est un tissu composite comprenant en majeure partie des fibres musculaires associées à du tissu conjonctif, vasculaire, nerveux et adipeux. Ces fibres musculaires constituent une population très hétérogène aux caractéristiques contractiles et métaboliques variées, et il existe une grande variabilité dans la composition en fibres entre muscles. Traditionnellement, la détermination du type métabolique est basée sur la révélation de l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique, ce qui permet de distinguer trois types de fibres : oxydatives, glycolytiques et oxydo-glycolytiques. Au niveau contractile, les fibres sont classées sur la base de leur contenu en chaînes lourdes de myosines (MyHC), ce qui permet de distinguer quatre types de fibres, I, IIA, IIX et IIB, ces quatre isoformes de MyHC étant associées à des vitesses de contraction et des activités ATPasiques croissantes (Schiaffino et Reggiani 1996, Pette et Staron 1997, Pellegrino *et al* 2003).

De nombreuses études menées à l'INRA ont démontré que les différentes composantes de la qualité de la viande (organoleptique, technologique, nutritionnelle) sont en grande partie déterminées par les caractéristiques du tissu musculaire au moment de la mort de l'animal, et notamment par les caractéristiques des fibres musculaires (Lefaucheur 2001). Ainsi, plusieurs défauts majeurs de qualité de viande

sont liés à la mutation de gènes impliqués dans le métabolisme musculaire, tels que les gènes HAL (Fuji *et al* 1991) et RN (Monin et Sellier 1985, Naveau 1986). Outre ces anomalies génétiques, le métabolisme et le type contractile des fibres musculaires influencent fortement la flaveur et l'évolution post-mortem du pH de la viande. Le pH affecte aussi la couleur, la capacité de rétention d'eau, la jutosité et la tendreté de la viande. Toutefois, bien que les relations entre caractéristiques musculaires et qualité de la viande soient de mieux en mieux comprises, il est encore difficile actuellement d'énoncer clairement les relations exactes entre qualité de la viande et types métaboliques et contractiles des fibres (Talmant *et al* 1986, Lebret *et al* 1999, Hocquette *et al* 2000).

Un des facteurs limitant dans l'analyse de ces relations peut se situer au niveau du typage, notamment métabolique, des fibres. En effet, si le typage contractile, basé sur le contenu en MyHC des fibres, a largement progressé ces dernières années (Lefaucheur *et al* 1998, 2002), la détermination précise du type métabolique reste imparfaite : celle-ci reste basée sur la révélation d'activités d'enzymes mitochondriales (Succinate Déshydrogénase, Citrate Synthase, Cytochrome c Oxydase...) et ces différents critères ne semblent pas répondre nécessairement de façon uniforme à un stimulus donné (Hocquette *et al* 2000). Ainsi, des muscles semblables en terme de composition en type contractile de fibres peuvent présenter

des activités mitochondriales différentes, et inversement. En fait, le typage métabolique des fibres, et donc notre compréhension des relations entre type de fibres et qualité de la viande, sont à l'heure actuelle limités par notre manque de connaissances du métabolisme énergétique oxydatif dans les différents types de fibres. Il est par exemple encore très difficile de savoir si des muscles de types métaboliques différents présentent uniquement des différences de quantité de mitochondries ou bien si le fonctionnement intrinsèque des mitochondries diffère en fonction du type métabolique et contractile (Schwerzmann *et al* 1989, Jackman et Willis 1996, Leary *et al* 2003). Une meilleure identification des caractéristiques musculaires favorables aux différentes composantes de la qualité de la viande nécessite donc une description plus précise des caractéristiques métaboliques des fibres, notamment du fonctionnement et de la régulation des mitochondries musculaires dans les différents types contractiles de fibres.

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans le métabolisme énergétique musculaire : la synthèse d'ATP (Adénosine TriPhosphate) repose essentiellement sur la mitochondrie dans les fibres de type I lentes. Dans les fibres rapides de type IIX et IIB, les mitochondries interviennent surtout dans le métabolisme basal et de récupération, tandis que les fibres de type IIA possèdent un métabolisme intermédiaire, leur renouvellement en ATP repo-

sant autant sur la mitochondrie que sur la glycolyse anaérobie (Moyes *et al* 1992, Leary *et al* 2003). Un bon fonctionnement musculaire nécessite à priori une adéquation entre les besoins et la production d'énergie, c'est-à-dire une régulation conjointe du type métabolique et contractile des fibres. L'implication des mitochondries dans la fourniture en énergie différant entre les divers types de fibre, ceci suggère une régulation spécifique du fonctionnement des mitochondries au sein des différentes fibres. La question des relations entre type de fibres, fonctionnement mitochondrial et propriétés contractiles abordée dans cet article fait encore débat actuellement et est au cœur des interrogations actuelles sur la physiologie et la bioénergétique musculaires.

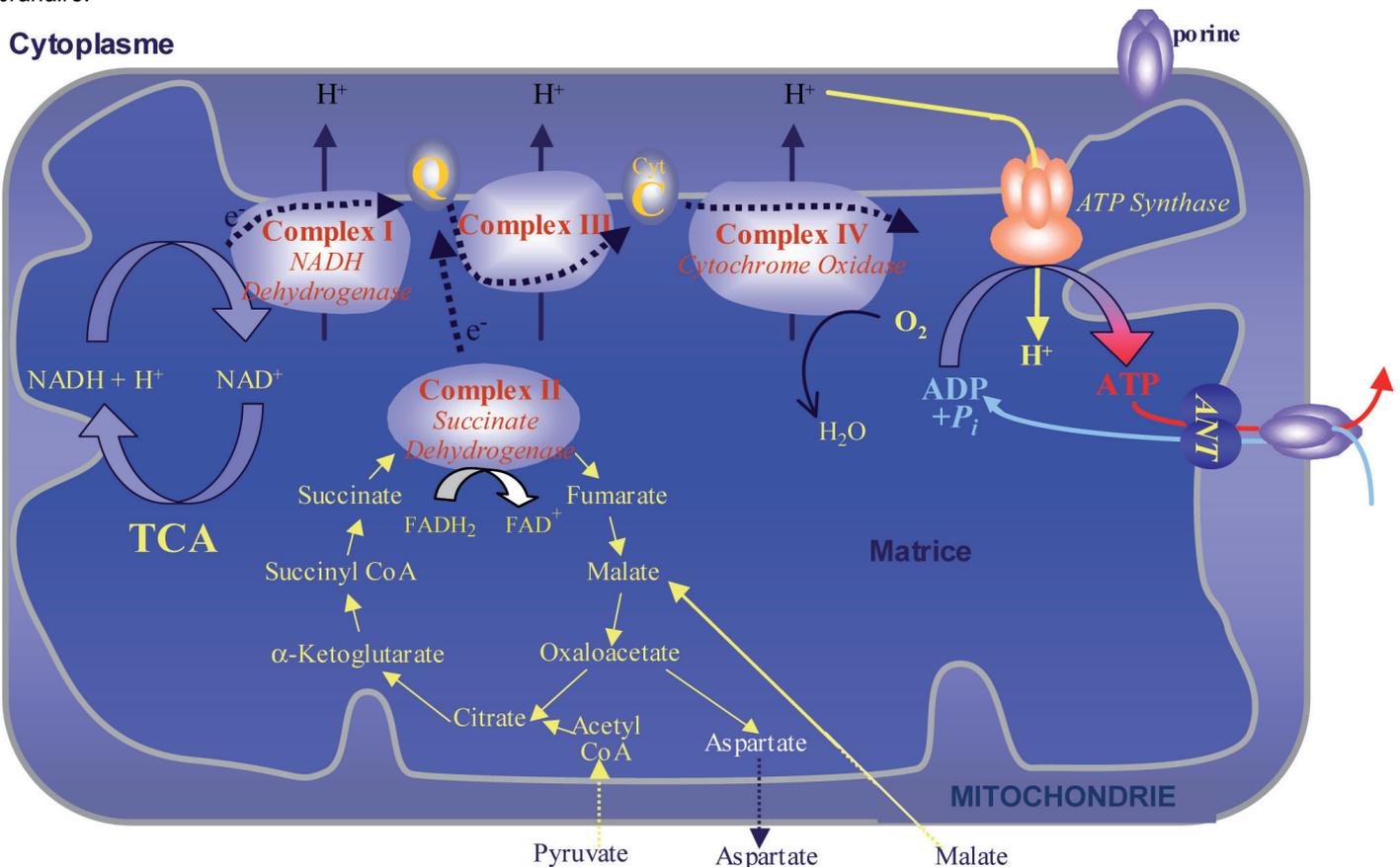
1 / Les fibres musculaires : type contractile et type métabolique

Les fibres musculaires ou myofibrilles occupent 90 % du volume musculaire. Ce sont des cellules excitables capables de se contracter sous l'effet d'une stimulation nerveuse. Dans chaque fibre, les éléments contractiles se trouvent au niveau des myofibrilles composées de groupes de myofilaments, parmi lesquels se trouvent les **myosines**. Ces myosines **portent une activité ATPasique** qui permet l'hydrolyse de l'ATP (énergie) en ADP (Acide DésoxyriboNucléique) et P_i , fournissant l'énergie nécessaire à la contraction. Les caractéristiques contractiles des fibres, telles que la vitesse de contraction ou l'activité ATPasique des

myosines dépendent largement des isoformes de MyHC exprimées au sein de ces fibres (Reggiani 2000). Chez le mammifère adulte, il existe quatre isoformes de MyHC : I, IIa, IIx et IIb. En fonction des isoformes de MyHC présentes au sein des fibres, deux grandes catégories se distinguent : les unes à **contractions lentes**, ou fibres de **type I**, les autres à **contractions rapides**, ou fibres de **type II**. Ces dernières peuvent se subdiviser en trois sous-types : **IIA, IIX et IIB**, présentant des vitesses de contraction et des activités ATPasiques croissantes dans cet ordre.

Entre les myofibrilles et à la périphérie des cellules musculaires se trouvent respectivement les **mitochondries** intermyofibrillaires et subsarcolemmales. La régénération de l'ATP hydrolysé lors de la contraction est assurée par le catabolisme de substrats énergé-

Figure 1. Schéma d'une mitochondrie, avec ses deux membranes, une externe et une interne, séparées par un espace intermembranaire.



La membrane externe contient un pore aqueux, la porine, qui constitue la principale voie de passage des petits métabolites tels que l'ADP et l'ATP. La membrane interne contient les complexes enzymatiques I, II, III et IV de la **chaîne respiratoire** et le complexe enzymatique formant la **F₀F₁ ATPsynthase**, responsable de la synthèse d'ATP grâce à la **phosphorylation** de l'ADP. Elle contient également l'ANT ou **adénine nucléotide translocase** qui assure l'entrée de l'ADP vers la matrice et la sortie conjointe de l'ATP vers l'espace intermembranaire. La matrice, compartiment soluble, est notamment le site du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) qui fournit les substrats de la chaîne respiratoire tel que le NADH. Les complexes enzymatiques de la **chaîne respiratoire** assurent le transport des électrons fournis par l'**oxydation des substrats** NADH et FADH jusqu'à l'oxygène (respiration) ; les complexes I, III, et IV couplent le flux d'électrons avec un pompage des protons H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire, aboutissant en la création d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. En traversant la F₀-F₁-ATPsynthase pour regagner la matrice, cette force protomotrice permet à la F₀-F₁-ATPsynthase de synthétiser l'ATP à partir de l'ADP.

tiques tels que le glucose, le glycogène (la forme de réserve du glucose), ou les lipides, *via* la voie anaérobie (glycolyse) et/ou aérobie impliquant les **mitochondries**. Les mitochondries jouent un rôle majeur dans le métabolisme énergétique musculaire : elles assurent la synthèse de l'ATP tant lors de la contraction que lors des phases de récupération qui s'en suivent.

Toutes les cellules eucaryotes possèdent des mitochondries, générateurs d'énergie extrêmement efficaces. Support de la respiration, ces organites interviennent dans la phase finale de l'oxydation des substrats glucidiques ou lipidiques.

La mitochondrie comporte une double membrane, une externe et une interne, séparées par un espace intermembranaire (figure 1). La membrane externe contient une protéine majeure formant un pore aqueux, la porine, qui constitue la principale voie de passage des petits métabolites tels que l'ADP et l'ATP. L'espace intermembranaire contient notamment diverses kinases telles la Créatine Kinase (CK) ou l'Adénylate Kinase (AK), ancrées aux membranes ou labiles. La membrane interne délimite un compartiment soluble appelé matrice, dans laquelle a lieu le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs ou TCA) et la β -oxydation des acides gras. Cette membrane interne contient des enzymes assurant trois principales fonctions : (1) des protéines de transport telles que l'**adénine nucléotide translocase** (ANT) qui assure l'entrée de l'ADP vers la matrice et la sortie conjointe de l'ATP vers l'espace intermembranaire ; (2) les complexes enzymatiques I, II, III et IV de la **chaîne respiratoire**, complexes qui assurent le transport des électrons fourni par l'**oxydation des substrats** NADH et FADH jusqu'à l'oxygène (respiration) ; (3) le complexe enzymatique formant la **F0-F1 ATPsynthase**, responsable de la synthèse d'ATP grâce à la phosphorylation de l'ADP.

Chacun des quatre complexes, hormis le complexe II, couple le flux d'électrons avec un pompage des protons H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne (figure 1). En traversant la F0-F1-ATPsynthase pour regagner la matrice, cette force protomotrice permet à la F0-F1-ATPsynthase de synthétiser l'ATP à partir de l'ADP. Ainsi, la chaîne respiratoire et l'ATPsynthase fonctionnent de façon couplée, les

protons pompés par les enzymes de la chaîne respiratoire lors de l'oxydation permettant la phosphorylation de l'ADP + Pi en ATP par l'ATPsynthase. Ce phénomène est nommé phosphorylation oxydative.

De nombreuses études ont montré une corrélation forte entre les propriétés contractile et métabolique (Lowry *et al* 1978, Delp et Duan 1996, Rivero *et al* 1998, 1999, Quiroz-Rothe et Rivero 2001). En effet, l'importance relative des deux voies de régénération de l'ATP, la glycolyse et la phosphorylation oxydative mitochondriale, varie entre les types de fibres selon leurs caractéristiques contractiles. Les fibres lentes de type I sont équipées pour soutenir une contraction modérée mais de longue durée (forte résistance à la fatigue), en association avec une synthèse d'ATP reposant essentiellement sur la phosphorylation oxydative assurée par la mitochondrie. Les fibres rapides de type IIX et IIB, peu résistantes à la fatigue, sont adaptées à de brèves mais intenses contractions grâce à la disponibilité immédiate d'importantes réserves énergétiques cytosoliques, telles que la phosphocréatine et le glycogène, et une synthèse rapide d'ATP *via* le métabolisme glycolytique, les mitochondries intervenant alors surtout dans le métabolisme basal et de récupération (Moyes *et al* 1992, Leary *et al* 2003). Les fibres de type IIA présentent une activité contractile mais surtout un métabolisme intermédiaires : comme les fibres IIB ou IIX, elles possèdent une activité ATPasique élevée et une vitesse de contraction rapide (bien que plus lente que ces deux types), mais leur renouvellement en ATP repose autant sur la mitochondrie que sur la glycolyse anaérobie, ce qui les apparente également aux fibres de type I.

Aussi, en raison des différences de demande énergétique et d'implication des mitochondries dans la fourniture en énergie au sein des divers types de fibres, un fonctionnement spécifique des mitochondries et une régulation adaptée de la respiration mitochondriale peuvent être attendus dans les différents types contractiles de fibres.

2 / Relations entre caractéristiques contractiles des fibres et fonction mitochondriale

Dans les fibres des muscles striés, le volume mitochondrial peut occuper de

1 à 45 % du volume cellulaire (Moyes et Hood 2003). En liaison avec leur demande énergétique, il est bien connu que les différents types de fibres présentent des différences de quantité de mitochondries. Les fibres de type I et IIA possèdent la plus grande densité mitochondriale, qui diminue ensuite dans les fibres de type IIX puis IIB (Schwerzmann *et al* 1989, Hoppeler *et al* 1987, Lefaucheur *et al* 2002). Cependant, la capacité oxydative totale des fibres musculaires pourrait également être liée à des différences de qualité des mitochondries (*i.e.* de fonctionnement intrinsèque). L'existence de telles différences n'est pourtant pas claire : certaines études rapportent une respiration maximale et un couplage entre oxydation et phosphorylation plus importants dans les muscles lents par rapport aux rapides (Jackman *et al* 1996, Schmidt et Herpin 1997), et des différences d'activité des enzymes de la chaîne respiratoire (Jackman *et al* 1996), alors que d'autres ne trouvent aucune différence fonctionnelle entre mitochondries isolées à partir de muscles lents et rapides (Pande et Blancher 1971, Hoppeler 1986, Schwerzmann *et al* 1989). Ces disparités pourraient s'expliquer par des différences entre les espèces ou les muscles étudiés, voire entre les techniques utilisées, ainsi que par une caractérisation incomplète du fonctionnement mitochondrial. Aussi avons nous caractérisé le fonctionnement mitochondrial à la fois *in vitro* (mitochondries isolées) et *in situ* (au sein de fibres perméabilisées) dans différents types contractiles de muscles squelettiques chez deux espèces d'intérêt agronomique : le porc et le lapin.

In vitro, chez le porc, les mitochondries du muscle lent *rhomboïdeus* (70 % MyHC I) démontrent une capacité oxydative intrinsèque plus élevée que celle des mitochondries du muscle rapide *longissimus* (90 % MyHC II), et un couplage entre oxydation et phosphorylation qui semble plus efficace. En effet, les vitesses de respiration maximale des mitochondries du *rhomboïdeus* sont de 20 % supérieures à celle des mitochondries du *longissimus*, en présence tant des substrats des complexes I, II ou encore du complexe IV. De plus, la synthèse d'ATP et le RCR (*respiratory control ratio*, *i.e.* rapport de la vitesse de respiration maximale stimulée par l'ADP sur la respiration basale), un indicateur du couplage oxydation-phosphorylation, sont également plus importants (+ 30 %) dans les mitochondries du *rhomboïdeus*

(Gueguen *et al* 2005a). Les différences de fonctionnement mitochondrial entre fibres lentes et rapides sont confirmées sur fibres perméabilisées chez le lapin. Ces derniers résultats mettent également en évidence des différences au sein des fibres rapides : la capacité oxydative (vitesse de respiration maximale) des mitochondries et le couplage entre oxydation et phosphorylation (RCR) sont plus importants dans les fibres de type IIA que dans les fibres de types IIX et IIB. Les mitochondries des fibres IIX et IIB ne semblent pas présenter de différences fonctionnelles (Gueguen *et al* 2005b). Aussi, nos résultats indiquent une augmentation des capacités oxydatives mitochondriales et du couplage entre oxydation et phosphorylation lorsque la demande énergétique des fibres est soutenue et dépendante d'une production mitochondriale d'ATP pour y répondre.

Les paramètres analysés dans nos études ne nous permettent pas de conclure clairement quant aux mécanismes impliqués dans les différences de fonctionnement observées. Toutefois, la plus forte activité des complexes de la chaîne respiratoire au sein des mitochondries des muscles lents chez le porc (cytochrome c oxydase, Gueguen *et al* 2005a) et le lapin (complexe I et II, Jackman et Willis 1996), suggère une augmentation de la capacité d'oxydation des substrats par la chaîne respiratoire dans les mitochondries de ces muscles. La capacité de phosphorylation, mesurée par l'activité de la F₀-F₁ ATPsynthase, semble quant à elle inchangée.

Dans les fibres lentes, la contraction soutenue dans le temps repose sur une production mitochondriale d'ATP efficace. Les fibres rapides IIA ont également un renouvellement en ATP partiellement assuré par les mitochondries pendant la contraction (Staron *et al* 1984, Schiaffino et Reggiani 1996, Reggiani *et al* 2000). Dans les fibres I, et dans une moindre mesure IIA, la capacité oxydative est donc un paramètre crucial dans la conversion des substrats carbonés en énergie (ATP) pour la contraction musculaire, une conversion moins efficace pouvant réduire la capacité des mitochondries à satisfaire la demande énergétique et donc être défavorable au bon fonctionnement de ces fibres. Cependant, une simple augmentation de la capacité oxydative totale ne pourrait expliquer à elle seule l'adéquation entre la consommation en ATP par les myosine-ATPases et sa synthèse par les mitochondries, et des

paramètres tels que la régulation de la respiration mitochondriale sont également à prendre en considération.

3 / Relations entre caractéristiques contractiles des fibres et régulation de la respiration mitochondriale

De tous les tissus des mammifères, le muscle squelettique est celui qui subit les plus grandes variations de travail et de demande en énergie. Les fibres musculaires sont capables de soutenir une augmentation jusqu'à 100 fois des vitesses de turnover en ATP. Ceci implique une régulation particulièrement fine du métabolisme énergétique, et donc de la phosphorylation oxydative.

3.1 / Type de fibres et régulation de la respiration par les adénines nucléotides

Les premiers travaux sur mitochondries isolées (Lardy et Wellman 1952, Chance et Williams 1955) ont montré que la vitesse de respiration des mitochondries était fortement augmentée en présence d'ADP, substrat final de la phosphorylation oxydative. Ces observations aboutirent à la notion de «contrôle respiratoire» (Chance et Williams 1956), défini comme le contrôle de la vitesse de respiration par la concentration cytosolique en ADP. Sur la base de ces observations, il fut donc proposé une régulation de la respiration dans le muscle par l'ADP cytosolique : l'hydrolyse de l'ATP en ADP par les myosine-ATPases entraînerait une augmentation de la concentration cytosolique en ADP, laquelle résulterait, par diffusion de l'ADP dans la mitochondrie, en une stimulation de la vitesse de respiration, et donc de la synthèse d'ATP.

Cependant, cette hypothèse implique l'existence de variations importantes de la concentration cytosolique en ADP et en ATP, d'une part, et d'autre part, une affinité importante des mitochondries pour l'ADP cytosolique (c'est-à-dire des mitochondries très sensibles à ces variations de concentrations en ADP et ATP). Or les muscles lents *in vivo* bénéficient d'une remarquable homéostasie en ADP et ATP (Matthews 1982, Katz 1988, 1989, Kushmerick *et al* 1992a, Allen *et al* 1997) malgré de fortes variations de la demande en énergie au niveau des myosine-ATPases.

De plus, une faible sensibilité mitochondriale pour l'ADP a été mise en évidence dans le muscle lent *in vivo* (Kushmerick *et al* 1992a) et *in situ*. L'existence d'une faible affinité mitochondriale pour l'ADP (K_m : 200-300 μ M) *in situ* a tout d'abord été démontrée sur les fibres du muscle cardiaque (Saks *et al* 1991), puis Veksler *et al* (1995) ont montré que la régulation de la respiration mitochondriale différait entre muscles rapides et lents, les muscles lents présentant, contrairement aux rapides, une affinité réduite pour l'ADP (K_m : 200 vs 10 μ M). Ceci indique un contrôle muscle-spécifique de la respiration mitochondriale (Kuznetsov *et al* 1996, Kay *et al* 1997), et suggère que la régulation de la respiration mitochondriale pourrait être spécifique du type de fibres (Tonkonogi *et al* 1998). Nous avons entrepris une analyse de la régulation de la respiration mitochondriale en fonction des différents types contractiles au sein des fibres rapides afin de vérifier cette hypothèse.

En accord avec les études précédentes, nous montrons chez le lapin, *in situ*, une affinité mitochondriale pour l'ADP environ 20 fois plus faible dans les fibres de type I (K_m^{ADP} de l'ordre de 200 μ M) que dans les fibres rapides (K_m^{ADP} de l'ordre de 10 μ M dans les fibres IIX). Cependant, nos résultats indiquent également une différence d'affinité des mitochondries pour l'ADP au sein des fibres de type II. En effet, si les mitochondries des fibres de type IIB semblent, tout comme celles des fibres IIX, présenter une affinité mitochondriale pour l'ADP élevée, nos résultats indiquent pour la première fois une affinité pour l'ADP réduite dans les fibres IIA (K_m^{ADP} de l'ordre de 75 μ M) (Gueguen *et al* 2005b, 2005c). L'affinité réduite des mitochondries des fibres de type I, et dans une moindre mesure IIA, semble due à une régulation des porines de la membrane mitochondriale externe par une protéine cytoplasmique X de 27,5 kDa, non exprimée dans les fibres rapides glycolytiques, et vraisemblablement liée au cytosquelette. La liaison des porines avec cette protéine X, encore non identifiée, entraînerait une diminution de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe à l'ADP, lequel entre dans la mitochondrie *via* ces porines (Saks *et al* 1993, Kuznetsov *et al* 1996, Kay *et al* 1997, Appaix *et al* 2003).

Nous observons également une forte inhibition de la respiration par l'ATP dans les mitochondries du muscle rapi-

de *longissimus* comparée au muscle lent *rhomboideus* (Gueguen *et al* 2005a) : la respiration est inhibée de 80 % en présence de 6 mM ATP dans le muscle rapide (contre seulement 50 % dans le muscle lent), ce qui correspond en moyenne à sa concentration cytosolique au repos (Walliman *et al* 1992, Kushmerick *et al* 1992b, Conjard *et al* 1998). Par contre, l'inhibition n'est plus que de 15 % en présence de 0.8 mM ATP, concentration en ATP observée dans les fibres après de fortes contractions (Sant'Ana Peireira *et al* 1996, Essen-Gustavsson *et al* 1997, Karatzaferi *et al* 2001a, 2001b). Dans les fibres lentes I et également IIA, les mitochondries interviennent continuellement dans la fourniture en énergie. Par contre, de nombreuses études indiquent que les mitochondries du muscle rapide glycolytique ne sont activées que lors de l'étape de récupération suivant l'exercice, et participent alors à la restauration des réserves énergétiques (Moyes *et al* 1992, Kushmerick *et al* 1992a). Dans ce cadre, la forte sensibilité des mitochondries du muscle rapide à l'inhibition de la respiration par l'ATP prend tout son sens : elle expliquerait la faible activité des mitochondries dans les fibres rapides glycolytiques au repos et lors de la contraction. La déplétion en ATP suite aux contractions lèverait progressivement cette inhibition. Ceci permettrait alors la stimulation de la respiration par l'ADP lors de la phase de récupération post-exercice, les mitochondries de ces fibres présentant une forte affinité pour l'ADP. Par contre, la faible affinité mitochondriale pour l'ADP et la forte stabilité des concentrations en ADP et ATP dans les fibres reposant essentiellement (type I) ou fortement (type IIA) sur les mitochondries pour leur fourniture en énergie sont difficilement compatibles avec la théorie d'un contrôle de la phosphorylation oxydative par les adénines nucléotides dans ces fibres. Les hypothèses de fonctionnement des différents types de fibres sont schématisées dans la figure 2.

3.2 / Types de fibres et systèmes de transfert énergétique

Puisque les mitochondries des fibres de type I et IIA présentent une affinité réduite pour l'ADP, un transfert énergétique par simple échange diffusionnel de l'ADP/ATP serait clairement inefficace ; d'autres mécanismes doivent donc permettre la régulation de la respiration mitochondriale et le transfert de l'énergie de la mitochondrie vers ses sites de consommation. Aussi,

un nouveau rôle a été proposé pour le réseau intracellulaire enzymatique du muscle : la signalisation métabolique, à travers un réseau d'enzymes proches de l'équilibre, contribuerait à une communication énergétique intracellulaire efficace (système «navette»). En effet, les fibres musculaires sont des cellules parfaitement structurées dans lesquelles les réactions enzymatiques sont organisées en complexes multienzymatiques. L'efficacité de ces complexes provient de ce que les produits et substrats des réactions sont directement canalisés vers la réaction suivante, sans dilution dans le milieu cellulaire (Saks *et al* 1994, Dzeja *et al* 2000, Neumann *et al* 2003). Un tel système enzymatique de conduction des substrats permet une propagation des métabolites beaucoup plus rapide que la simple diffusion (Dzeja et Terzic 2003). De nombreux systèmes, ou «navettes», ont été proposés pour relier les sites de synthèse d'ATP aux sites de consommation (dont les myosine-ATPases). Dans le muscle, la créatine kinase mitochondriale (mi-CK) et ses substrat et produit, créatine et phosphocréatine, constituent des candidats potentiels.

a) Le système créatine kinase

La créatine kinase catalyse le transfert réversible d'une liaison riche en énergie de la phosphocréatine (PCr) à l'ADP selon la réaction : $ADP + PCr + H^+ \rightleftharpoons ATP + \text{créatine (Cr)}$. La PCr n'est le substrat d'aucune autre enzyme et ne peut transférer son énergie que sur l'ADP.

Dans le muscle squelettique mature, deux isoenzymes de CK sont exprimées : la MM-CK et la mi-CK (Wallimann *et al* 1992). Dans de nombreux tissus, dont le muscle, les isoenzymes de CK sont compartimentées au niveau subcellulaire, c'est-à-dire qu'elles sont liées à des structures cellulaires précises. Ainsi, la mi-CK n'est présente que dans les mitochondries, fixée sur la face externe de la membrane interne, à proximité de l'adénine nucléotide translocase (ANT) qui importe l'ADP dans la matrice mitochondriale et exporte l'ATP dans l'espace intermembranaire. Pour la MM-CK, compartimentée au niveau du cytosol, deux localisations existent : une fraction des MM-CK, dite MM-CKc, est strictement cytosolique, tandis que l'autre, dite MM-CKa, est liée au niveau de la bande M, c'est-à-dire en contact avec les myosine-ATPases (Wallimann *et al* 1989, 1998, Eppenberger *et al* 1983).

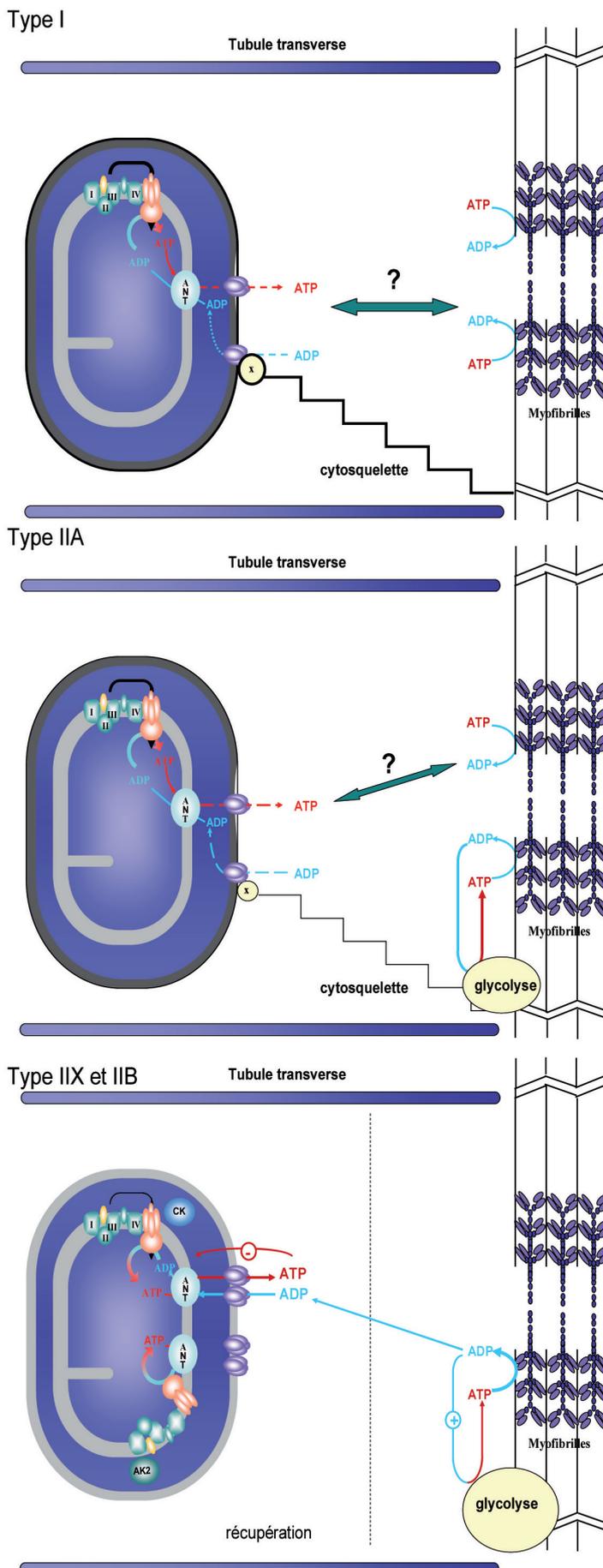
Si les créatines kinases sont habituellement connues comme réservoir tampon de phosphates à haute énergie, divers travaux ont démontré un couplage fonctionnel entre la mi-CK et la phosphorylation oxydative : en présence de créatine, l'ATP transporté par l'ANT déplace l'équilibre de la réaction et la mi-CK catalyse le transfert du phosphate de l'ATP nouvellement synthétisé sur la créatine, en échange de l'ADP qui sera repris par l'ANT et stimulera de nouveau la respiration (figure 3, Wallimann *et al* 1992, 1998). Ce couplage se traduit sur le plan cinétique par une diminution du K_m apparent de la respiration pour l'ADP cytosolique en présence de créatine (Saks *et al* 1993). Créatine kinase, ANT et ATP synthase, en fonctionnant en interaction, créent à leur voisinage une compartimentation permettant de maintenir un rapport ATP/ADP constant et favorable à la phosphorylation oxydative.

Un tel couplage a également été démontré entre la MM-CKa et les myosine-ATPases (Wallimann *et al* 1978, 1983). En effet, la MM-CKa, fixée à proximité du site actif des myosines, est capable d'assurer la rephosphorylation rapide de l'ADP en ATP, en présence de PCr, permettant ainsi une activité contractile optimale.

Au vu de la localisation subcellulaire des isoformes de CK, et de leur couplage fonctionnel avec les sites de consommation et de production d'énergie, de nombreux auteurs ont proposé que le système créatine kinase, composé des créatine kinases et de leurs substrats, la créatine et la phosphocréatine, puisse remplir un rôle de navette entre ces sites cellulaires, c'est-à-dire un rôle de transfert des liaisons riches en énergie (sous forme de PCr), des mitochondries aux sites d'utilisation et, en retour, le transfert du signal (sous forme de Cr) depuis les sites d'utilisation vers les mitochondries au travers des kinases cytosoliques, permettant ainsi une intégration efficace entre production et utilisation de l'énergie (Figure 4a, Wallimann *et al* 1992, 1998, Joubert *et al* 2002).

Toutefois, du fait des différences entre les types de fibres des besoins en ATP et des voies métaboliques qui le régénèrent, il est fort probable que le système CK ne revête pas la même importance dans tous les types de fibres, et/ou ne couple pas les mêmes sites intracellulaires. Ainsi, Kay *et al* (2000) ont montré que chez le rat, la mi-CK était effectivement fonctionnel-

Figure 2. Modèle de régulation de la respiration mitochondriale par les adénines nucléotides dans les différents types contractiles de fibres.

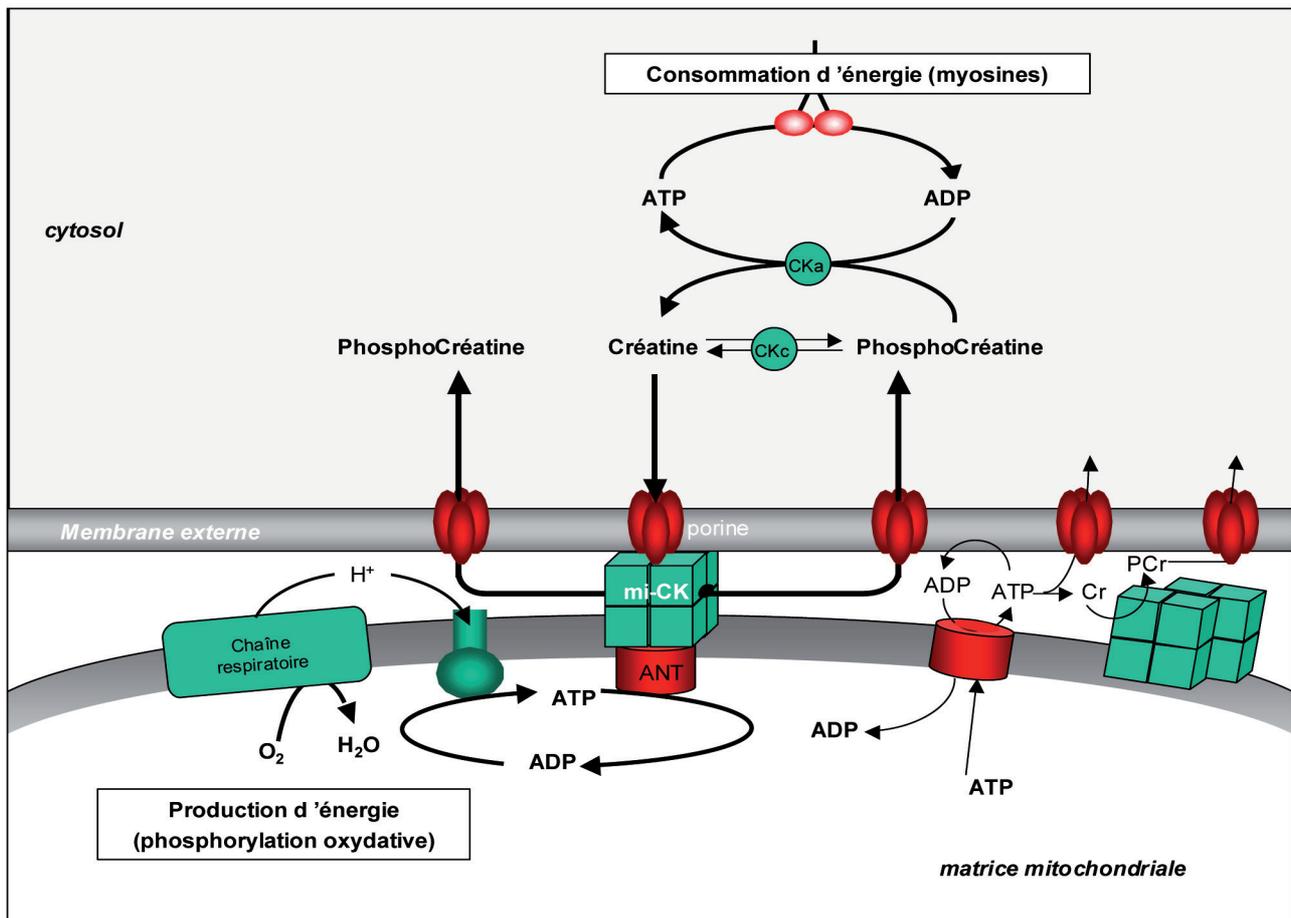


Les mitochondries des fibres de type I présentent une faible affinité pour l'ADP ($K_m \approx 200 \mu M$), vraisemblablement liée à une restriction de la perméabilité des porines mitochondriales à l'ADP via une régulation par une protéine de 27,5 kDa (protéine x). La faible sensibilité mitochondriale à l'ADP semble exclure une régulation de la respiration par l'ADP.

Les mitochondries des fibres de type IIA possèdent également une affinité réduite pour l'ADP ($K_m \approx 75 \mu M$), mais dans une moindre mesure que dans le type I, ce qui pourrait s'expliquer par une expression plus faible de la protéine x.

Les mitochondries des fibres de type IIX et IIB ne présentent pas de régulation spécifique de leur affinité pour l'ADP ($K_m \approx 10 \mu M$). Leur forte sensibilité à l'ATP permettrait l'inhibition de la respiration en phase de repos. La déplétion de l'ATP cellulaire suite à la contraction, accompagnée d'une augmentation de la concentration en ADP, entraînerait la levée de cette inhibition et la stimulation par l'ADP de la respiration mitochondriale, permettant ainsi la restauration des stocks énergétiques.

Figure 3. Couplage fonctionnel de la créatine kinase mitochondriale (mi-CK) avec la phosphorylation oxydative, via la formation dynamique de complexes porine-mi-CK-Adénine Nucléotide Translocase (ANT). Cette formation est médiée par l'association de 4 dimères en un octamère symétrique présentant un canal central orienté dans l'axe porine-ANT. Selon ce modèle, l'ADP et l'ATP ne sont plus échangés avec le cytosol, mais restent compartimentés dans la matrice mitochondriale, permettant une stimulation directe de la phosphorylation oxydative (Wallimann 2003).



lement couplée à la phosphorylation oxydative dans les fibres de muscle de type I, mais qu'un tel couplage ne se retrouvait pas dans les fibres de muscle de type II. En accord avec la littérature, nous observons chez le lapin une augmentation de l'affinité mitochondriale pour l'ADP dans les fibres de type I en présence de créatine, signe d'un couplage fonctionnel entre la mi-CK et la phosphorylation oxydative, tandis qu'un tel couplage ne se retrouve pas dans les fibres rapides glycolytiques IIX et vraisemblablement IIB. Nos résultats révèlent également une augmentation de l'affinité mitochondriale pour l'ADP en présence de créatine dans les faisceaux contenant des fibres IIA, ce qui indique l'existence d'un couplage fonctionnel entre la mi-CK et la phosphorylation oxydative dans les fibres IIA, bien que celles-ci soient classées dans le type rapide (Gueguen *et al* 2005b, 2005c).

D'autre part, certaines études montrent qu'il existe d'autres systèmes de transfert d'énergie constitués de kinases cytosoliques et mitochondriales,

parmi lesquels le système adénylate kinase (Dzeja *et al* 1999).

b) Le système adénylate kinase

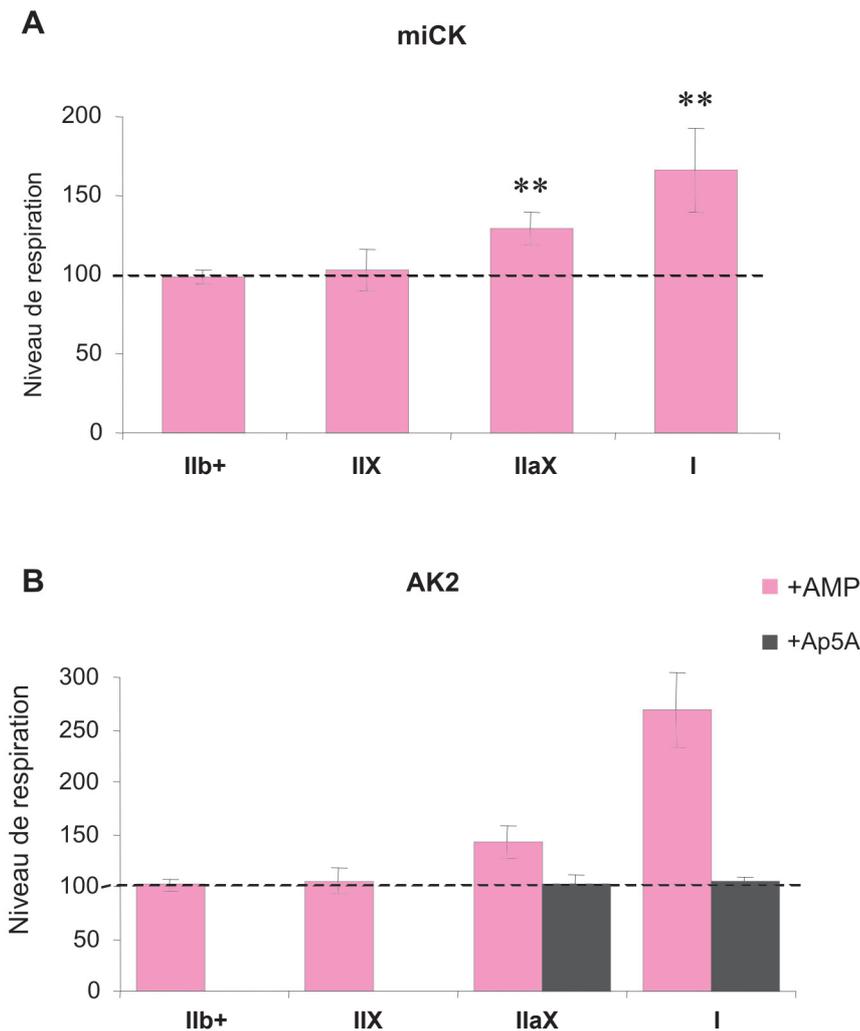
Cette enzyme catalyse la réaction réversible : $ADP + ADP \rightarrow AMP + ATP$. Dans le muscle, deux isoenzymes principales sont exprimées, l'une basique et cytosolique (AK1), l'autre acide et située dans l'espace intermembranaire mitochondrial (AK2) (Watanabe *et al* 1979, Walker et Dow 1982, Hamada *et al* 1987). Tout comme la MM-CK, il a été montré qu'une fraction de l'AK1 pouvait être localisée au contact des myosine-ATPases (Wegmann *et al* 1992), et un couplage fonctionnel entre AK1 et ATPases myofibrillaires a été observé par Savabi *et al* (1986). Dans le muscle cardiaque, l'AK2 a été impliquée dans le contrôle de la phosphorylation oxydative (Dzeja *et al* 1983, Clark *et al* 1997), et dans l'export des phosphoryles à haute énergie hors de la mitochondrie (Dzeja *et al* 1985). Il a donc été suggéré que le système AK permettait le transfert de deux phosphoryles riches en énergie (*i.e.* β et

γ) en une molécule d'ATP de son site de synthèse vers son site d'utilisation.

A notre connaissance, le système AK n'avait été que peu étudié dans le muscle squelettique, et n'avait pas été analysé dans différents types de fibres (Zeleznikar *et al* 1990, 1995, Dzeja *et al* 1996). Dans notre étude, nous observons une stimulation de la respiration mitochondriale en présence d'AMP (figure 4), le substrat de l'AK2, stimulation qui disparaît lorsque l'AK2 est inhibée par son inhibiteur spécifique (Ap5A), dans les fibres de type I et également les faisceaux contenant des fibres IIA. Par contre, aucune stimulation n'est observée dans les faisceaux de fibres de type IIX et IIB. Dans les fibres de type I et IIA, la phosphorylation oxydative est donc non seulement couplée à la mi-CK, mais également à l'AK2.

Le couplage fonctionnel entre la mi-CK, l'AK2 et la phosphorylation oxydative observé dans les fibres de type I et IIA, en même temps que l'affinité réduite pour l'ADP cytosolique des

Figure 4. Effet de l'activation de la créatine kinase mitochondriale mi-CK (par 20 mM créatine, A) et de l'adénylate kinase AK2 (par 1 mM AMP, B) sur la respiration stimulée par l'ADP dans les faisceaux de fibres majoritairement IIb (IIb+), IIX, IIa + IIX (IIaX) et I.



L'effet de ces stimulations est rapporté à la vitesse de respiration mitochondriale avant l'addition des substrats (*i.e.* une valeur de 100 correspond à la vitesse de respiration avant stimulation des kinases). Les valeurs sont présentées en moyennes \pm S.E. ($n = 6$). Effet du traitement : ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$.

mitochondries de ces fibres, suggère fortement un contrôle de la respiration mitochondriale par ces kinases. En liaison avec les isoformes cytosoliques correspondantes MM-CK et AK1 qui interagissent de façon structurelle et fonctionnelle avec l'ATPase de la myosine, ces résultats plaident pour un fonctionnement des systèmes CK et AK de type «navette» dans les fibres de type I et IIA. Ceci signifie un transfert de l'énergie des mitochondries aux myosines *via* ces systèmes et leurs substrats (figure 6, p. 274). Un tel type de transfert expliquerait l'homéostasie en adénines nucléotides observée notamment dans les fibres lentes, et permettrait une intégration efficace entre production et utilisation de l'énergie. Par contre, l'absence de couplage de l'AK2 et de la mi-CK avec la phosphorylation oxydative dans nos faisceaux de fibres

IIX et majoritairement IIB et la forte présence des isoformes cytosoliques MM-CK et AK1 libres dans ces fibres (Yamashita et Yoshioka 1991) suggère plutôt un fonctionnement des systèmes AK et CK de type «tampon» : dans ces fibres, la fonction de tampon spatio-temporel du système CK répondrait à la demande intense et rapide de la contraction musculaire. La fonction navette du système CK ne fonctionne pas, la respiration mitochondriale étant sous la dépendance de l'ADP cytosolique et non de celui produit localement par la créatine kinase. Le modèle de fonctionnement proposé est schématisé en figure 6. Dans les fibres musculaires, les systèmes créatine kinase et adénylate kinase, formés des isoformes libres, liées et de leurs substrats, remplissent donc des rôles différents : dans les fibres rapides glycolytiques, ils

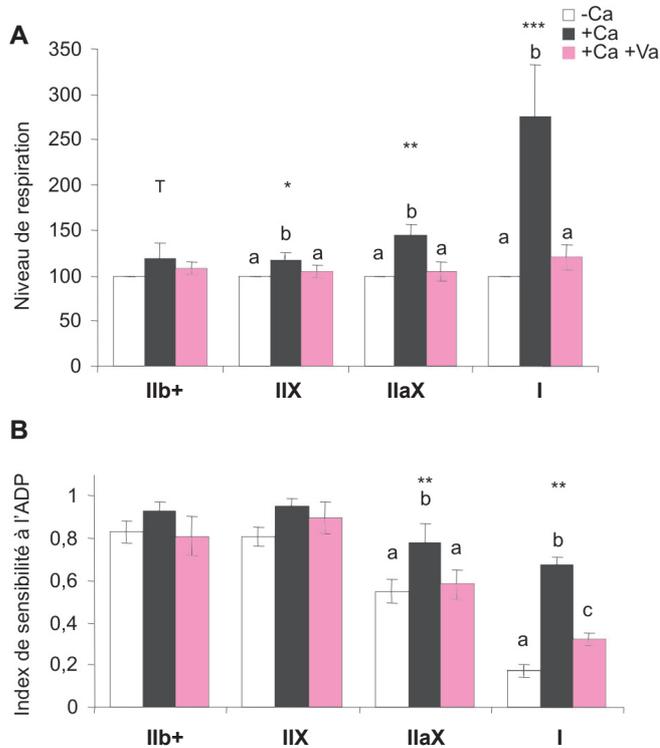
maintiennent de fortes réserves énergétiques, rapidement mobilisables ; dans les fibres lentes I et rapides IIA, ces systèmes assureraient essentiellement le transfert énergétique et la communication entre lieux de production et lieux d'utilisation de l'énergie pendant la contraction. Si l'importance relative d'un système par rapport à l'autre dans les fibres de type I et IIA reste à déterminer, l'implication de tels systèmes dans le maintien du bon fonctionnement des fibres est illustré par le fait que ceux-ci sont altérés lors de pathologies musculaires telles que les cardiomyopathies (Veksler *et al* 1988, 1991) ou le diabète (Ovide-Bordeaux *et al* 2005).

3.3 / L'activation des myosine-ATPases par le calcium modifie la régulation de la respiration mitochondriale dans les fibres de types I et IIA.

Les résultats discutés ci-dessus ont été obtenus dans des conditions de repos, c'est-à-dire avec une concentration en calcium dans les milieux d'étude de $0,1 \mu\text{M}$ ($p\text{Ca} = 7$). Cependant le calcium est un activateur majeur des myosine-ATPases et par là même, augmente les besoins énergétiques cellulaires. Aussi, l'activation des myosine-ATPases et de la contraction par le calcium pourrait modifier les mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale et/ou de transfert énergétique.

En présence d'une dose physiologique de calcium ($0,4 \mu\text{M}$, Bers 2001), suffisante et optimale pour l'activation des myosine-ATPases (Kümmel 1988), nous observons en effet une augmentation de l'affinité mitochondriale pour l'ADP, importante dans les fibres I et un peu moindre dans les fibres IIA, tandis que la sensibilité à l'ADP n'est pas modifiée dans les fibres de types IIX et IIB (figure 5). De plus, l'addition de créatine ou d'AMP n'a plus d'effet cinétique sur la respiration, indiquant que les enzymes mi-CK et AK ne facilitent plus le re-transfert de l'ADP vers la F₀-F₁-ATPase. Cette modulation de la régulation de la respiration mitochondriale est vraisemblablement liée à l'activation des myosine-ATPases puisque leur inhibition par le vanadate abolit les effets du calcium (Gueguen *et al* 2005c). Kunz *et al* (1993) et Khuchua *et al* (1994) concluent également de leurs études sur fibres perméabilisées du muscle cardiaque que la respiration mitochondriale est régulée par les ions Ca^{2+} *via* une modification de l'activité des Ca, MgATPases des myofibrilles.

Figure 5. Effet du calcium ($0.4 \mu\text{M Ca}^{2+}$ libre), en absence ou en présence de 0.6 mM vanadate (un inhibiteur de l'activité ATPasique des myosines), (A) sur la respiration stimulée par l'ADP et (B) sur l'affinité mitochondriale pour l'ADP déterminée par le calcul de l'index de sensibilité à l'ADP ($\text{VO}_2 (\text{ADP } 0.1 \text{ mM}) / \text{VO}_2 (\text{ADP } 1 \text{ mM})$), dans les faisceaux de fibres majoritairement IIB (IIB+), IIX, IIA + IIX (IIAX) et I. (A) L'effet de ces stimulations est rapporté à la vitesse de respiration mitochondriale avant l'addition des substrats (i.e. une valeur de 100 correspond à la vitesse de respiration avant stimulation des kinases). Les valeurs sont présentées en moyennes \pm S.E. ($n = 6$). Effet du traitement : ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$.



Bien que nos seuls résultats ne nous permettent pas d'élucider le mécanisme impliqué dans cette régulation différentielle de la respiration mitochondriale en présence de calcium, deux hypothèses peuvent être émises. (1) Cette différence de régulation pourrait être d'origine structurelle. Ainsi, Andrienko *et al* (2003) ont suggéré que la contraction provoquée par l'activation des myosine-ATPases induirait, à travers les liens entre myofibrilles et mitochondries *via* le cytosquelette, une « ouverture » des porines mitochondriales. Cette modification de conformation augmenterait alors la perméabilité des porines à l'ADP cytosolique. (2) La différence de régulation mitochondriale pourrait également avoir une origine plus fonctionnelle. Elle pourrait s'expliquer par une plus forte affinité des mitochondries pour l'ADP rapidement produit, et de façon accrue, par les myosine-ATPases suite à leur activation par le calcium, c'est-à-dire un transfert direct des adénines nucléotides entre mitochondries et myosines. En effet, Kummel (1988) et Seppet *et al* (2001) ont observé sur fibres perméabilisées de muscle cardiaque une préférence des mitochondries

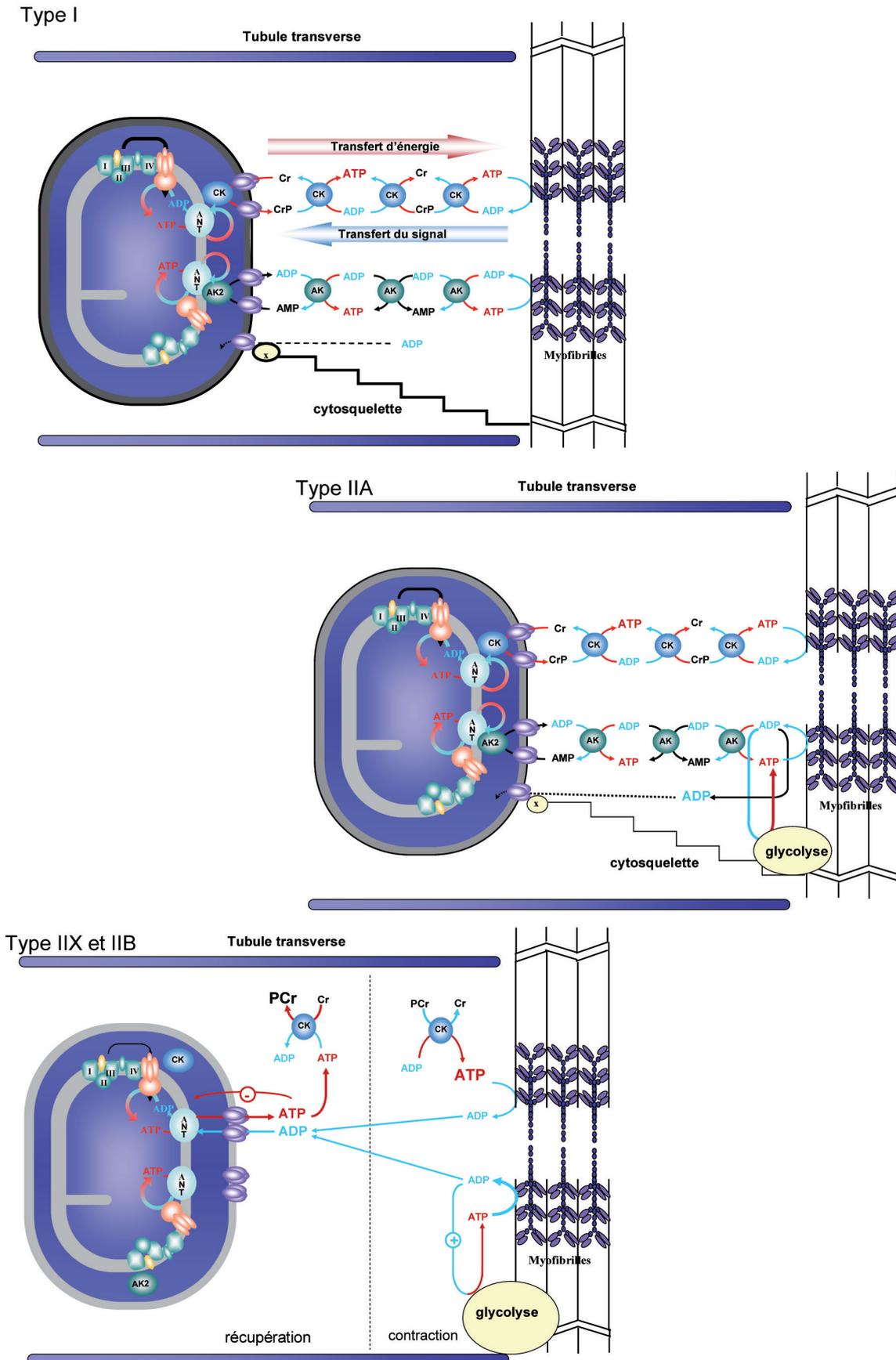
pour l'ADP produit de façon endogène par les $\text{Ca}_m\text{MgATPases}$ cellulaires par rapport à l'ADP exogène (cytosolique), se manifestant par une affinité plus élevée pour l'ADP endogène (K_m apparent : $45 \mu\text{M}$) qu'exogène ($200 \mu\text{M}$). De plus, les résultats de Seppet *et al* (2001) indiquaient la possibilité d'un transfert direct des adénines nucléotides des myosines vers les mitochondries. Dans ce cas, ce transfert direct réduirait l'importance des systèmes CK et AK, ce qui expliquerait l'absence d'effets cinétiques de la mi-CK et de l'AK2 sur la respiration en présence de calcium. En accord avec le modèle décrit par Seppet *et al* (2001) nous proposons que les mitochondries, consommant de l'ADP et produisant de l'ATP, et les myosine-ATPases, consommatrices d'ATP et productrices d'ADP, soient « connectées » fonctionnellement par un réseau enzymatique composé des créatine et adénylate kinases, mais également par transfert direct des myosines vers les mitochondries (figure 7). L'importance de chaque système (réseaux enzymatiques AK ou CK, transfert direct) serait graduellement modulée en fonction des besoins cellulaires

en ATP, afin de permettre l'adéquation entre demande énergétique au niveau des myofibrilles et sa synthèse au niveau des mitochondries, tout en maintenant l'homéostasie en adénines nucléotides et ainsi préservant les autres fonctions cellulaires (maintien des gradients ioniques, synthèse protéique ou transmission de signaux). L'existence de plusieurs voies de transfert parallèles permettrait également la compensation d'un dysfonctionnement d'une des voies par une autre, tel que cela semble se produire dans les expériences d'inactivation des gènes des créatines ou adénylate kinases (Veksler *et al* 1995, Steeghs *et al* 1997, Saupé *et al* 1998, Bruton *et al* 2003). Toutefois, ce modèle reste hypothétique et sa validation nécessiterait de plus amples données expérimentales.

Conclusion

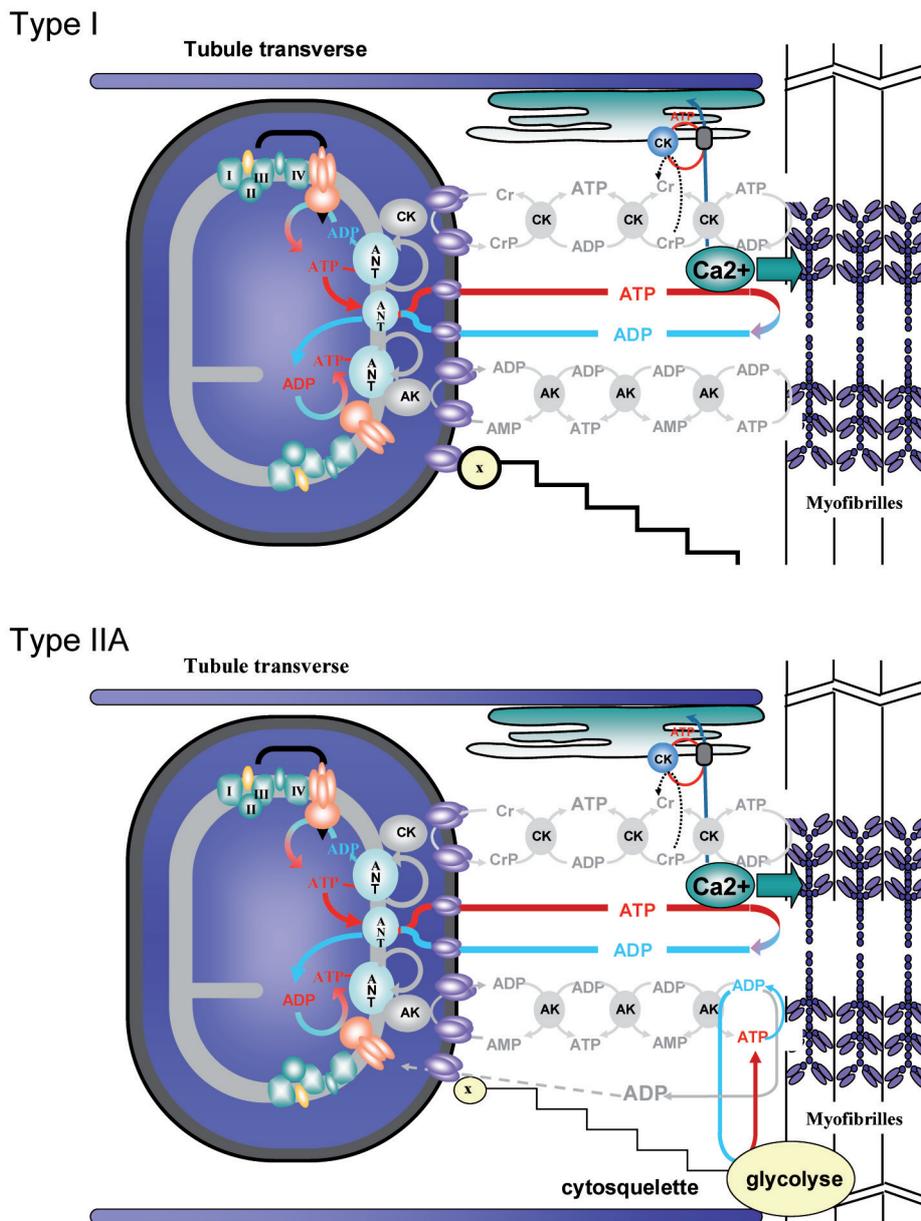
Nos travaux indiquent que, contrairement aux fibres rapides de types IIX et IIB, la régulation de la respiration mitochondriale dans les fibres de type I est hautement spécialisée avec une optimisation de l'efficacité des mitochondries (couplage entre oxydation et phosphorylation, capacité oxydative maximale), une restriction de la perméabilité à l'ADP et un couplage fonctionnel entre les kinases mitochondriales et la production d'ATP, ces deux mécanismes assurant un transfert efficace de l'énergie produite vers les myosines. L'optimisation de l'efficacité et de la régulation des mitochondries, et du transfert énergétique fait partie des mécanismes permettant l'adéquation entre la demande en énergie et sa synthèse. De plus, le fonctionnement des mitochondries des fibres de type IIA apparaît beaucoup plus proche de celui des fibres de type I, de par l'existence d'une capacité oxydative élevée, d'une restriction de la perméabilité à l'ADP et d'un couplage fonctionnel entre la mi-CK, l'AK2 et la phosphorylation oxydative, que de celui des fibres de types IIX et IIB. Le fonctionnement des mitochondries des fibres IIX et IIB ne paraît pas présenter de différence majeure. Cependant, nous n'avons pu obtenir de fibres de type pur IIB. Aussi, ne nous pouvons exclure que de subtiles différences de fonctionnement aient pu être masquées par la présence d'autres types de fibres dans les faisceaux de fibres majoritairement IIB. Ce doute révèle les limites de la technique d'analyse sur faisceaux de fibres, mais en l'état actuel des moyens techniques disponibles il ne semble pas possible de

Figure 6. Modèle de régulation de la respiration mitochondriale par les systèmes créatine et adénylate kinases.



Dans les fibres de types I et IIA, les systèmes CK et AK ont un fonctionnement de type «navette», permettant le transfert de l'énergie des sites de synthèse aux sites d'utilisation ; tandis que dans les fibres IIX et IIB, ces systèmes auraient un fonctionnement de type «tampon», permettant l'hydrolyse de la Phosphocréatine (PCr) en ATP lors de la contraction (partie droite de la Figure), et le stockage de l'ATP sous forme de PCr lors des phases de récupération (partie gauche de la Figure).

Figure 7. Modèle de transferts énergétiques entre myosines et mitochondries suite à une activation des myosine-ATPases par le calcium.



Dans les fibres de type I et IIA, l'activation des myosine-ATPases par le calcium et la très forte augmentation qui s'ensuit de l'ADP produit par les myosines pourrait entraîner la mise en place d'un transfert direct des adénines nucléotides entre myosines et mitochondries. A mesure que la demande énergétique nécessaire pour satisfaire à la contraction augmente, le système de transfert direct pourrait être graduellement activé, jusqu'à supplanter les deux autres systèmes CK et AK dans le cas d'une demande énergétique particulièrement élevée.

réaliser des mesures fonctionnelles de caractérisation des mitochondries sur une seule fibre.

La régulation de la respiration mitochondriale et le rôle des systèmes créatine kinase et adénylate kinase sont donc étroitement liés au phénotype contractile des fibres musculaires. De plus, ces systèmes évoluent au cours de la mise en place des fibres en fonction des générations de myotubes primaires versus secondaires (résultats non publiés), et sont également modulables

en fonction de facteurs environnementaux connus pour modifier le type contractile des fibres, tels que l'activité musculaire (Zoll *et al* 2002). Par ailleurs, il semblerait que l'affinité mitochondriale pour l'ADP puisse également être augmentée par des paramètres internes comme l'oxydation des lipides (Toleikis *et al* 2001). Dans nos études, ce type de substrat n'a pas été testé mais mériterait d'être étudié compte tenu de l'importance des lipides intracellulaires dans la qualité de la viande (jutosité, flaveur).

A travers l'analyse des relations entre le fonctionnement mitochondrial et le type contractile des fibres, l'un des objectifs de ce travail était de proposer de nouveaux indicateurs pour caractériser plus finement le métabolisme énergétique, et en particulier le métabolisme oxydatif, des fibres musculaires. D'après nos résultats, le marqueur idéal consisterait en un paramètre intégrant la quantité de mitochondries, leur fonctionnement et les relations entre mitochondries et myosines. Dans ce cadre, les paramètres habituellement utilisés

semblent inadaptés. En effet, l'un des résultats majeur de ce travail est que le fonctionnement des mitochondries des fibres de type IIA, bien que classées comme rapides, apparaît beaucoup plus proche de celui des fibres de type I lent, que de celui des fibres de types IIX ou IIB rapides. Les marqueurs couramment utilisés, tels que l'activité de l'enzyme mitochondriale citrate synthase, ne prennent pas en compte ces paramètres. Le système créatine kinase est par contre un constituant essentiel du métabolisme énergétique des fibres qui devrait retenir davantage l'attention. Le fonctionnement de ce système, *i.e.* un fonctionnement de types navette ou tampon, est reflété par l'activité et la localisation cellulaire des différentes isoformes. Dans un fonctionnement de

type navette, l'expression et l'activité mi-CK est élevée, tandis que la MM-CK a une activité et une expression réduite ; l'inverse est observé pour un fonctionnement de type tampon, reposant sur une activité très élevée de l'isoforme cytosolique sous sa forme non liée (Wallimann *et al* 1992). La mesure du ratio des activités CK totale et MM-CK pourrait donc permettre de distinguer relativement simplement les fibres de types I, IIA et IIX+IIB, comme suggéré en d'autres circonstances par Yamashita et Yoshioka (1991). Cette mesure semble donc un marqueur intéressant de la composition du muscle en fibres musculaires et son intérêt pour l'amélioration de la qualité de la viande mériterait d'être validée par de futures études.

Remerciements

Ce travail a été financé par l'Action Transversale INRA «Fonctions Mitochondriales et Biologie Musculaire» et l'Action Transversale Concertée INRA/INSERM «Régulation des capacités oxydatives du muscle par l'exercice physique et les nutriments pendant la croissance et au cours du vieillissement : conséquences tissulaires». Naïg Gueguen était co-financée par une bourse de thèse INRA et Région Bretagne. Nous remercions vivement Martine Fillaut, Patrick Ecolan et Annie Vincent pour leur précieuse aide technique.

Références

- Allen P.S., Matheson G.O., Zhu G., Gheorgiu D., Dunlop R.S., Falconer T., Stanley C., Hochachka P.W., 1997. Simultaneous ³¹P MRS of the *soleus* and *gastrocnemius* in Shergas during graded calf muscle exercise. *Am. J. Physiol.*, 273, R999-R1007.
- Andrienko T., Kuznetsov A.V., Kaambre T., Usson Y., Orosco A., Appaix F., Tiivel T., Sikk P., Vendelin M., Margreiter R., Saks V.A., 2003. Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *J. Exp. Biol.*, 206(12), 2059-2072.
- Appaix F., Kuznetsov A.V., Usson Y., Kay L., Andrienko T., Olivares J., Kaambre T., Sikk P., Margreiter R., Saks V.A., 2003. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp. Physiol.*, 88, 175-190.
- Bers D., 2001. Excitation-contraction coupling and cardiac contraction. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Bruton J.D., Dahlsted A.J., Abbate F., Westerblad H., 2003. Mitochondrial function in intact skeletal muscle fibres of creatine kinase deficient mice. *J. Physiol.*, 552, 393-402.
- Chance B., Williams G.R., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J. Biol. Chem.*, 217(1), 429-438.
- Chance B., Williams G.R., 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, 17, 65-134.
- Clark J.F., Kuznetsov A.V., Radda G.K., 1997. ADP-regenerated enzyme systems in mitochondria of guinea pig myometrium and heart. *Am. J. Physiol.*, 272, C399-C404.
- Conjard A., Peuker H., Pette D., 1998. Energy state and myosin heavy chain isoforms in single fibres of normal and transforming rabbit muscles. *Plügers Arch.*, 436, 962-969.
- Delp M.D., 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.*, 80(1), 261-270.
- Dzeja P.P., Terzic A., 2003. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J. Exp. Biol.*, 206, 2039-2047.
- Dzeja P.P., Kalvenas A., Toleikis A., Praskevičius A., 1983. Functional coupling of creatine phosphokinase and adenylate kinase with adenine nucleotide translocase and its role in regulation of heart mitochondrial preparation. *Biokhimiia*, 48, 1471-1478.
- Dzeja P.P., Kalvenas A., Toleikis A., Praskevičius A., 1985. The effect of adenylate kinase activity on the rate and efficiency of energy transport from mitochondria to hexokinase. *Biochem. Int.*, 10, 259-65.
- Dzeja P.P., Zeleznikar R.J., Goldberg N.D., 1996. Suppression of creatine kinase-catalyzed phosphotransfer results in increased phosphoryl transfer by adenylate kinase in intact skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 271, 12847-12851.
- Dzeja P.P., Vitkevicius K.T., Redfield M.M., Burnett J.C., Terzic A., 1999. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium. Increased contribution in heart failure. *Circ. Res.*, 84, 1137-1143.
- Dzeja P.P., Pucar D., Redfield M.M., Burnett J.C., Terzic A., 2000. Reduced activity of enzymes coupling ATP-generating with ATP-consuming processes in the failing myocardium. *Mol. Cell. Biochem.*, 201(1-2), 33-40.
- Eppenberger H.M., Perriard J.C., Wallimann T., 1983. Analysis of creatine kinase isozymes during muscle differentiation. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.*, 7, 19-38.
- Essen-Gustavsson B., Roneus N., Poso A.R., 1997. Metabolic response in skeletal muscle fibres of standardbred trotters after racing. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 117(3), 431-436.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., MacLennan D.H., 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253(5018), 448-51.
- Gueguen N., Lefaucheur L., Fillaut M., Vincent A., Herpin P., 2005a. Control of skeletal muscle mitochondria respiration by adenine nucleotides: differential effect of ADP and ATP according to muscle contractile type in pigs. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 140(2), 287-297.
- Gueguen N., Lefaucheur L., Fillaut M., Herpin P., 2005b. Muscle fiber contractile type influences the regulation of mitochondrial function. *Mol. Cell. Biochem.*, 276(1-2), 15-20.
- Gueguen N., Lefaucheur L., Fillaut M., Herpin P., 2005c. Ca²⁺-activated myosin-ATPases, creatine and adenylate kinases regulate mitochondrial function according to myofibre type in rabbit. *J. Physiol.*, 564(3), 723-735.
- Hamada M., Takenada H., Fukumoto K. *et al*, 1987. Structure and function of adenylate kinase isoenzymes in normal humans and muscular dystrophy patients. In *Isoenzymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, Marckert C.L., Scandolios J.G. (Eds), Liss, New York, USA, 81-99.
- Hocquette J.F., Ortigues-Marty I., Damon M., Herpin P., Geay Y., 2000. Métabolisme énergétique des muscles squelettiques chez les animaux producteurs de viande. *INRA Prod. Anim.*, 13(3), 185-200.
- Hoppeler H., 1986. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int. J. Sports Med.*, 7(4), 187-204.
- Hoppeler H., Hudlicka O., Uhlmann E., 1987. Relationship between mitochondria and oxygen consumption in isolated cat muscles. *J. Physiol.*, 385, 661-675.
- Jackman M.R., Willis W.T., 1996. Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 270, C673-C678.
- Joubert F., Mazet J.L., Mateo P., Hoerter J.A., 2002. ³¹P NMR detection of subcellular creatine fluxes in the perfused rat heart. Contractility modifies energy transfer pathways. *J. Biol. Chem.*, 277, 18469-18476.
- Karatzafiri C., de Haan A., Ferguson R.A., van Mechelen W., Sargeant A.J., 2001a. Phosphocreatine and ATP content in human single muscle fibres before and after maximum dynamic exercise. *Plügers Arch.*, 442(3), 467-474.

- Karatzaféri C., de Haan A., van Mechelen W., Sargeant A.J., 2001b. Metabolism changes in single human fibres during brief maximal exercise. *Exp. Physiol.*, 86(3), 411-415.
- Katz A.M., 1988. Cellular mechanisms in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.*, 62(2), 3A-8A.
- Katz A.M., 1989. The myocardium in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.*, 63(2), 12A-16A.
- Kay L., Li Z., Mericskay M., Olivares J., Tranqui L., Fontaine E., Tiivel T., Sikk P., Kaambre T., Samuel J.L., Rappaport L., Usson Y., Leverve X., Paulin D., Saks V.A., 1997. Study of regulation of mitochondrial regulation *in vivo*. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta*, 1322, 41-59.
- Kay L., Nicolay K., Wierenga B., Saks V.A., Wallimann T., 2000. Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells *in situ*. *J. Biol. Chem.*, 275, 6937-6944.
- Khuchua Z., Belikova Y., Kuznetsov A.V. *et al.*, 1994. Caffeine and Ca²⁺ stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human skeletal muscle fibers due to activation of actomyosin ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1188, 373-379.
- Kummel L., 1988. Ca, Mg-ATPase activity of permeabilised rat heart cells and its functional coupling to oxidative phosphorylation of the cells. *Cardiovasc. Res.*, 22, 359-367.
- Kunz W.S., Kuznetsov A.V. and Gellerich F.N., 1993. Mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers is stimulated by caffeine. *FEBS*, 323, 188-190.
- Kushmerick M.J., Meyer R.A., Brown T.R., 1992a. Regulation of oxygen consumption in fast- and slow-twitch muscle. *Am. J. Physiol.*, 263, C598-C606.
- Kushmerick M.J., Moerland T.S., Wiseman R.W., 1992b. Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of Phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 7521-7525.
- Kuznetsov A.V., Tiivel T., Sikk P., Kaambre T., Kay L., Daneshrad Z., Rossi A., Kadaja L., Peet N., Seppet E., Saks V.A., 1996. Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles *in vivo*. *Eur. J. Biochem.*, 241, 909-915.
- Lardy H.A., Wellman H., 1952. Oxidative phosphorylations: role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J. Biol. Chem.*, 195(1), 215-224.
- Leary S.C., Lyons C.N., Rosenberger A.G., Ballantyne J.S., Stillman J., Moyes C.D., 2003. Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285, R817-R826.
- Lebreton B., Lefaucheur L., Mourot J., 1999. La qualité de la viande de porc. Influence des facteurs d'élevage non génétiques sur les caractéristiques du tissu musculaire. *INRA Prod. Anim.*, 12(1), 11-28.
- Lefaucheur L., 2001. Myofiber typing and pig meat production. *Slov. Vet. Res.*, 38(1), 5-28.
- Lefaucheur L., Hoffman R.K., Gerrard D.E., Okamura C.S., Rubinstein N., Kelly A., 1998. Evidence for three adult fast myosin heavy chain isoforms in type II skeletal muscle fibers in pigs. *J Anim Sci.*, 76(6), 1584-1593.
- Lefaucheur L., Ecolan P., Plantard L., Gueguen N., 2002. New insights into muscle fiber types in the pig. *J. Histochem. Cytochem.*, 50, 719-730.
- Lowry C.V., Kimmey J.S., Felder S., Chi M.M., Kaiser K.K., Passonneau P.N., Kirk K.A., Lowry O.H., 1978. Enzyme patterns in single human muscle fibers. *J Biol Chem.*, 253(22), 8269-8277.
- Matthews P.M., Bland J.L., Gadian D.G., Radda G.K., 1982. A 31P-NMR saturation transfer study of the regulation of creatine kinase in the rat heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 721(3), 312-320.
- Monin G., Sellier P., 1985. Pork of low technological quality with normal rate of muscle pH fall in the immediate post mortem period: the case of the Hampshire breed. *Meat Sci.*, 13, 49-63.
- Moyes C.D., Schulte P.M., Hochachka P.W., 1992. Recovery metabolism of trout white muscle: role of mitochondria. *Am. J. Physiol.*, 262(2 Pt 2), R295-R304.
- Moyes C.D., Hood D.A., 2003. Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 65, 177-201.
- Naveau J., 1986. Contribution à l'étude du déterminisme génétique de la qualité de la viande porcine. Héritabilité du rendement technologique Napole. *Journ. Rech. Porcine Fr.*, 18, 265-276.
- Neumann D., Schlattner U., Wallimann T., 2003. A molecular approach to the concerted action of kinases involved in energy homeostasis. *Biochem. Soc/ Trans.*, 31(1), 169-174.
- Ovide-Bordeaux S., Bescont-Jacquet A., Grynberg A., 2005. Cardiac mitochondrial alterations induced by insulin deficiency and hyperinsulinaemia in rats: targeting membrane homeostasis with trimetazidine. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 32(12), 1061-1070.
- Pande S.V., Blanchaer M.C., 1971. Carbohydrate and fat in energy metabolism of red and white muscle. *Am. J. Physiol.*, 220, 549-553.
- Pellegrino M.A., Canepari M., Rossi R., D'Antona G., Reggiani C., Bottinelli R., 2003. Orthologous myosin isoforms and scaling of shortening velocity with body size in mouse, rat, rabbit and human muscles. *J. Physiol.*, 546, 677-689.
- Pette D., Staron R.S., 1997. Mammalian skeletal muscle fiber types and transitions. *Int. Rev. Cytol.*, 170, 143-223.
- Quiroz-Rothe E., Rivero J.L., 2001. Co-ordinated expression of contractile and non-contractile features of control equine muscle fibre types characterised by immunostaining of myosin heavy chains. *Histochem. Cell. Biol.*, 116(4), 299-312.
- Reggiani C., Bottinelli R., Stienen G.J., 2000. Sarcomeric Myosin Isoforms: Fine Tuning of a Molecular Motor. *News Physiol. Sci.*, 15, 26-33.
- Rivero J.L., Talmadge R.J., Edgerton V.R., 1998. Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 19(7), 733-742.
- Rivero J.L., Talmadge R.J., Edgerton V.R., 1999. Interrelationships of myofibrillar ATPase activity and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochem. Cell Biol.*, 111(4), 277-287.
- Saks V.A., Belikova YuO., Kuznetsov A.V., 1991. *In vivo* regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim. Biophys. Acta*, 1074, 302-311.
- Saks V.A., Vassilyeva E.V., Belikova YuO., Kuznetsov A.V., Lyapina S.A., Petrova L., Perov N.A., 1993. Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: Possible role of outer mitochondrial membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1144, 134-148.
- Saks V.A., Khuchua Z.A., Vasilyeva E.V., Belikova YuO., Kuznetsov A.V., 1994. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in *in vivo* regulation of cellular respiration - a synthesis. *Mol. Cell. Biochem.*, 133-134, 155-192.
- Sant'Ana Pereira J.A., Sargeant A.J., Rademaker A.C., de Haan A., van Mechelen W., 1996. Myosin heavy chain isoform expression and high energy phosphate content in human muscle fibres at rest and post-exercise. *J. Physiol.*, 496 (2), 583-588.
- Saupe K.W., Spinder M., Tian R., Ingwall J.S., 1998. Impaired cardiac energetics in mice lacking muscle-specific creatine kinase. *Circ. Res.*, 82, 898-907.
- Savabi F., Geiger P.J., Bessman S.P., 1986. Myokinase and contractile function of glycerinated muscle fibers. *Biochem. Med. & Metab. Biol.*, 35, 227-238.
- Schiaffino S., Reggiani C., 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.*, 76, 371-423.
- Schmidt I., Herpin P., 1997. Postnatal changes in mitochondrial protein mass and respiration in skeletal muscle from the newborn pig. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 118, 639-647.
- Schwerzmann K., Hoppeler H., Kayar S.R., Weibel E.R., 1989. Oxidative capacity of muscle mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1583-1587.
- Seppet E.K., Kaambre T., Sikk P., Tiivel T., Vija H., Tonkonogi M., et al., 2001. Functional complexes of mitochondria with Ca, MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1504, 379-395.
- Staron R.S., Hikida R.S., Hagerman F.C., Dudley G.A., Murray T.F., 1984. Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. *J. Histochem. Cytochem.*, 32(2), 146-152.
- Steeghs K., Benders A., Oerlemans F. *et al.*, 1997. Altered Ca²⁺ responses in muscle with combined mitochondrial and cytosolic deficiencies. *Cell*, 89, 93-103.
- Talmant A., Monin G., Briand M., Dadet M., Briand Y., 1986. Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles. *Meat Sci.*, 18, 23-40.
- Tonkonogi M., Harris B., Sahlin K., 1998. Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *J. Physiol.*, 510, 279-286.
- Toleikis A., Liobikas J., Trumbeckaite S., Majiene D., 2001. Relevance of fatty acids oxidation in regulation of the outer mitochondrial membrane permeability for ADP. *FEBS Lett.*, 509, 245-249.

- Veksler V.I., Ventura-Clapier R., Lechesne P., Vassort G., 1988. Functional state of myofibrils, mitochondria and bound creatine kinase in skinned ventricular fibers of cardiomyopathic hamsters. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 20(4), 329-42.
- Veksler V.I., Murat I., Ventura-Clapier R., 1991. Creatine kinase and mechanical and mitochondrial functions in hereditary and diabetic cardiomyopathies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 69(6), 852-858.
- Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Anfous K., Mateo P., Van Deursen J., Wierenga B., Ventura-Clapier R., 1995. Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J. Biol. Chem.*, 270, 19921-19929.
- Wallimann T., Pelloni G., Turner D.C., Eppenberger H.M., 1978. Monovalent antibodies against MM-creatine kinase remove the M line from myofibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(9), 4296-4300.
- Wallimann T., Doetschman T.C., Eppenberger H.M., 1983. Novel staining pattern of skeletal muscle M-lines upon incubation with antibodies against MM-creatine kinase. *J. Cell. Biol.*, 96(6), 1772-1779.
- Wallimann T., Schnyder T., Schlegel J., Wyss M., Wegmann G., Rossi A.M., Hemmer W., Eppenberger H.M., Quest A.F., 1989. Subcellular compartmentation of creatine kinase isoenzymes, regulation of CK and octameric structure of mitochondrial CK: important aspects of the phosphoryl-creatine circuit. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 315, 159-176.
- Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H.M., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the «phosphocreatine circuit» for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, 281, 21-40.
- Wallimann T., Dolder M., Schlattner U., Eder M., Hornamann T., O'Gorman E., Rück A., Brdiczka D., 1998. Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors*, 8, 2229-2234.
- Walker E.J. and Dow J.W., 1982. Location and properties of two isoenzymes of cardiac adenylate kinase. *Biochem. J.*, 203(2), 361-369.
- Watanabe K., Itakura T., Kubo S., 1979. Distribution of adenylate kinase isoenzymes in porcine tissues and their subcellular localization. *J. Biochem.*, 85, 799-805.
- Wegmann G., Zanolla E., Eppenberger H.M., Wallimann T., 1992. *In situ* compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the acto-myosin overlap zone as a molecular sieve. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 13(4), 420-435.
- Yamashita K., Yoshioka T., 1991. Profiles of creatine kinase isoenzyme compositions in single muscle fibres of different types. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 12, 37-44.
- Zeleznikar R.J., Heyman R.A., Graeff R.M. *et al.*, 1990. Evidence for compartmentalized adenylate kinase catalysis serving a high energy phosphoryl transfer function in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 265, 300-311.
- Zoll J., Sanchez H., N'Guessan B., Riberia F., Lampert E., Bigard X., Serrurier B., Fortin D., Geny B., Veksler V., Ventura-Clapier R., Mettauer B., 2002. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J. Physiol.*, 543(1), 191-200.

Résumé

Le muscle, tissu d'importance économique majeure chez les animaux producteurs de viande, est un tissu composite comprenant en majeure partie des fibres musculaires qui constituent une population très hétérogène aux caractéristiques contractiles et métaboliques variées. Les relations entre type contractile des fibres et fonctionnement mitochondrial, un composant essentiel du métabolisme énergétique musculaire, restent mal connues. Leur compréhension est pourtant essentielle pour espérer mieux maîtriser l'impact du type de fibres sur les diverses composantes de la qualité de la viande. Une analyse fine de la composante mitochondriale du fonctionnement énergétique des fibres a donc été entreprise en relation avec leurs caractéristiques contractiles. Les résultats indiquent que, contrairement aux fibres rapides de types IIX et IIB, la régulation mitochondriale dans les fibres lentes de type I et, dans une moindre mesure, de type rapide IIA est hautement spécialisée avec une optimisation de l'efficacité des mitochondries (couplage entre oxydation et phosphorylation, capacité oxydative maximale), une restriction de leur perméabilité à l'ADP et un couplage fonctionnel entre les kinases mitochondriales et la production d'ATP, permettant un transfert efficace de l'énergie vers les myosines. De plus, la régulation mitochondriale et les transferts énergétiques sont modulés par l'activation calcium-dépendante des ATPases portées par les myosines.

Abstract

Relations between mitochondrial function and contractile types of muscle fibre

Skeletal muscle is of major economic importance in meat-producing animals. It is a composite tissue mostly composed of heterogeneous muscle fibres exhibiting various contractile and metabolic properties. The relationships between contractile fibre types and mitochondrial functioning, a central component of muscular energy metabolism, remain poorly understood. The comprehension of these relations is essential in order to control the impact of the fibre types on the various components of meat quality. A detailed analysis of mitochondrial functioning, in relation to fibre contractile types, was thus undertaken. The results indicate that, unlike fast IIX and IIB fibres, the regulation of mitochondrial respiration in slow type I fibres and, to a lesser extent, in fast type IIA, is highly specialised with an optimisation of mitochondrial efficiency (coupling between oxidation and phosphorylation, maximal oxidative capacity), a restriction of mitochondrial permeability to ADP and a functional coupling between mitochondrial kinases and ATP production, allowing an efficient energy transfer from mitochondria to myosins. Moreover, the mitochondrial regulation and energy transfers are modulated by a calcium-dependent activation of ATPase activity carried by myosins.

GUEGUEN N., LEFAUCHEUR L., HERPIN P., 2006. Relations entre fonctionnement mitochondrial et types contractiles des fibres musculaires. *INRA Prod. Anim.*, 19, 265-278.