

# Rôle des mitochondries dans le développement d'un stress oxydant dans le muscle squelettique au cours du vieillissement

F. CAPEL<sup>1</sup>, L. DEMAISON<sup>2</sup>, B. MORIO<sup>1</sup>, V. RIMBERT<sup>1</sup>, P. PATUREAU MIRAND<sup>1</sup>, L. MOSONI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, Université Clermont I, UMR1019 Nutrition Humaine, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

<sup>2</sup> INSERM, E221, Université J. Fourier, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, BP 53, F-38041 Grenoble, France

Courriel : mosoni@clermont.inra.fr

La fonte musculaire observée au cours du vieillissement est une préoccupation majeure en terme de santé publique car la population âgée ne cesse de croître dans les pays développés. Maintenir la masse musculaire est en effet un facteur clé pour permettre une vie autonome, active et en bonne santé pour les personnes âgées. L'implication du stress oxydant, en particulier d'origine mitochondrial, dans ce phénomène a été analysée.

La proportion de personnes âgées ne cesse de croître dans la population française et même mondiale. En 2000, la France comptait 16 % de personnes de plus de 65 ans, et les prévisions de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) pour les années suivantes montrent que cette proportion va augmenter et atteindre 20 % en 2020 et 35 % en 2050. Ce phénomène est lié à l'amélioration des conditions de vie (alimentation, hygiène) et aux progrès de la médecine (mortalité infantile...). Ainsi, en 1900, l'espérance de vie moyenne en France était de 47 ans. Cette espérance de vie est de nos jours de l'ordre de 78 ans (pour l'année 1998). Le vieillissement touche donc une population de plus en plus importante. Or, ce vieillissement se caractérise par une perte progressive des fonctions physiologiques et psychologiques, une réduction des capacités à maintenir l'homéostasie. On constate en particulier l'apparition de façon relativement précoce d'une réduction de la masse des protéines musculaires (sarcopénie). En moyenne, l'homme perd 11 kg de masse musculaire corporelle entre 20-29 ans et 70-79 ans (Cohn *et al* 1980). Ce déclin contribue à limiter la mobilité des personnes âgées, mais il aggrave aussi leur vulnérabilité. En effet, le muscle constitue un véritable tissu de secours dans lequel l'organisme va puiser dans des

situations d'agressions d'ordre nutritionnel, infectieux ou traumatique (Young *et al* 1989). Ceci se traduit par un état de santé de plus en plus précaire avec l'âge et par un accroissement progressif de la mortalité, générant des dépenses de santé croissantes et un mal-être pour de nombreuses personnes de plus en plus dépendantes. Il est donc important de comprendre les mécanismes de la fonte musculaire de façon à tenter de la ralentir.

Les variations de la masse des protéines musculaires dépendent essentiellement de la balance entre leur synthèse et leur dégradation continue. Au cours du vieillissement, il est possible que des altérations dans les activités de synthèse et de dégradation des protéines musculaires se produisent sous l'action des Espèces Actives de l'Oxygène (EAO). En effet, il a été montré dans de nombreux tissus et organes, dont le muscle, l'existence d'une accumulation de protéines altérées, principalement du fait d'oxydations radicalaires, mais aussi à la suite de la fixation non enzymatique de sucres (glycations), ou autres modifications post-traductionnelles. Ceci peut s'accompagner à la fois d'une altération de la fonctionnalité des protéines oxydées et d'une modification du potentiel protéolytique musculaire et jouer un rôle dans la fonte musculaire.

Le stress oxydant est ainsi considéré comme l'un des principaux facteurs responsables des perturbations métaboliques à l'origine du vieillissement. Il résulte d'un déséquilibre entre l'action souvent délétère et toxique des EAO présentes et générées au sein de l'organisme et les activités antioxydantes ou de réparation. La mitochondrie serait au cœur de ce processus car elle constitue une source importante d'EAO (Chance *et al* 1979). De plus, il a été montré que la quantité d'EAO produites par les mitochondries était inversement corrélée avec la longévité des espèces (Beckman et Ames 1998). Ces EAO peuvent induire des dommages oxydatifs au sein même des structures mitochondriales (lipides membranaires, Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial (ADNmt), protéines de la chaîne respiratoire ou enzymes de la matrice).

Une altération des structures mitochondriales contribue à perturber le fonctionnement de la chaîne respiratoire, risquant de provoquer une limitation de la production d'énergie dans la cellule et une aggravation du stress oxydant. Ces interactions entre stress oxydant et fonctionnement mitochondrial pourraient avoir des conséquences particulièrement importantes dans des tissus à faible renouvellement cellulaire comme le muscle, qui a pourtant été très peu étudié.

Ces travaux ont donc été entrepris pour déterminer si un défaut de contrôle du stress oxydant et notamment de la production mitochondriale d'EAO existe dans le muscle squelettique au cours du vieillissement. Cela devrait permettre de déterminer si ce phénomène intervient dans le développement de la sarcopénie, et quels sont les mécanismes impliqués.

## 1 / Comment évaluer l'origine, l'intensité et les conséquences du stress oxydant dans le muscle ?

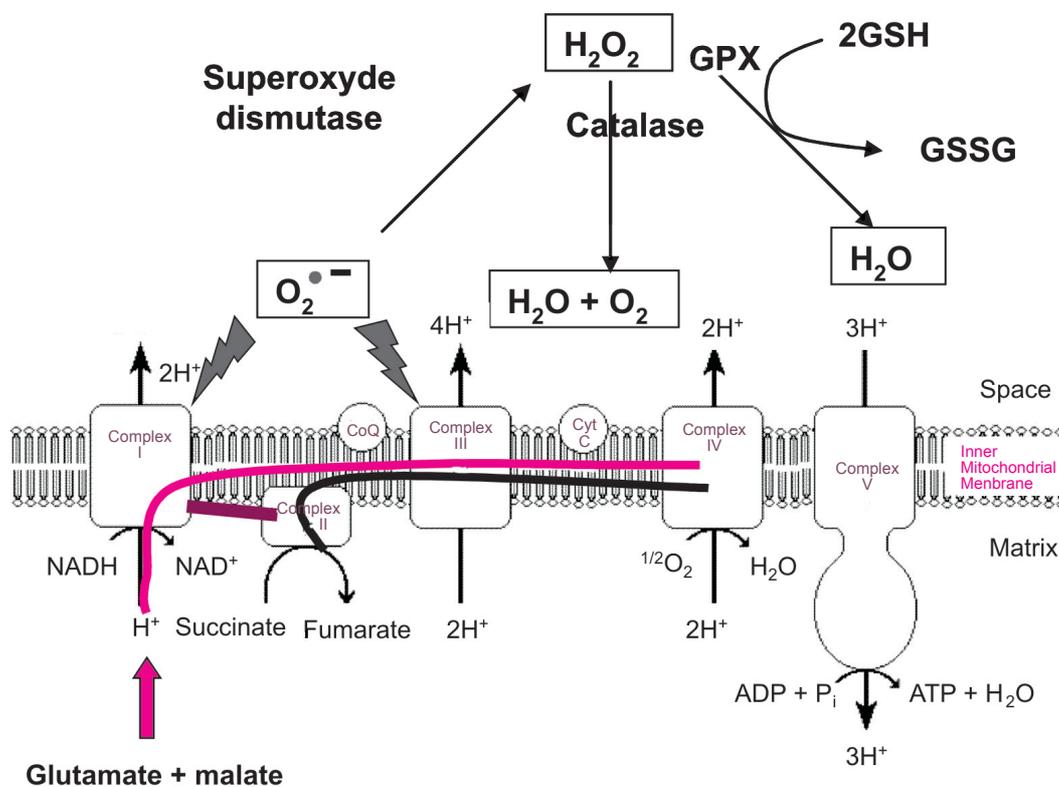
L'étude de l'effet du vieillissement sur le fonctionnement mitochondrial et le stress oxydant dans le muscle a été réalisée à la fois chez le rat et chez l'homme, en comparant des sujets expérimentaux sains, adultes ou âgés. Les mesures ont été effectuées après

biopsie du *vastus lateralis* sous anesthésie locale chez l'homme, ou sur le muscle entier chez le rat. La détermination d'une capacité de production d'EAO représentative des mitochondries intégrées dans la structure musculaire impose d'obtenir en moins de deux heures des mitochondries dont les membranes sont aussi intactes que possible. Ainsi une technique permettant d'obtenir des mitochondries présentant de très bonnes capacités respiratoires (Rasmussen *et al* 1997) a été adaptée à notre étude. Outre la respiration, nous avons analysé le fonctionnement des mitochondries isolées par la détermination d'activités enzymatiques spécifiques. Nous avons mesuré d'une part des activités enzymatiques impliquées dans le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire lors de la respiration (somme des activités des complexes II et III, activité cytochrome c oxydase - complexe IV), deux enzymes du cycle de Krebs, l'une souvent utilisée comme marqueur de la densité mitochondriale (activité citrate synthé-

se), et l'autre utilisée comme index de la teneur en calcium mitochondrial (activité isocitrate deshydrogénase).

La chaîne mitochondriale de transport d'électrons génère de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  (figure 1) qui peut être converti en  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène) grâce à l'enzyme antioxydante appelée superoxyde dismutase et présente dans la mitochondrie (forme Mn SOD) ou dans le cytosol (forme Cu-Zn SOD). A l'inverse de l' $O_2^{\bullet-}$ , l' $H_2O_2$  est plus stable et diffuse à travers les membranes mitochondriales. Nous avons mesuré la production d' $H_2O_2$  grâce à une sonde dont la fluorescence varie en fonction de son état d'oxydation après réaction avec l' $H_2O_2$  présent après addition de peroxydase. Après avoir utilisé la scopolétine dans une première étude, nous avons retenu le DCFH-DA par la suite. L'échantillon de mitochondries, source d' $H_2O_2$ , est incubé sous agitation permanente, à température constante en présence de substrats du métabolisme mitochondrial (glutamate, malate, succinate) dans un état de respi-

**Figure 1.** Représentation schématique des flux d'électrons à travers les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, de la production d'anion superoxyde, et des défenses antioxydantes cellulaires.



A partir de l'oxydation des substrats du complexe I (glutamate ou malate, —) ou du complexe II (succinate, —), les électrons parcourent les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, créant un gradient de protons. Ce gradient est utilisé pour synthétiser de l'ATP (Adénosine triphosphate) à partir d'ADP (Adénosine DiPhosphate) au niveau du complexe V. On parle de couplage entre le gradient de proton et la synthèse d'ATP. Il existe également un flux inverse d'électron du complexe II vers le complexe I —. Lors de ces transferts d'électrons, des fuites se produisent, aboutissant à la formation d'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ . Cet anion dismute spontanément ou sous l'action de la superoxyde dismutase en  $H_2O_2$ . Cette forme oxydante est alors prise en charge par la glutathion peroxydase (GPX) à l'aide de glutathion réduit (GSH) qui est alors oxydé (GSSG) ou par la catalase, et est détournée en eau.

ration basale en l'absence d'ADP (état IV), pendant lequel la production d'EAO est maximale (Barja 1999). Puisque certains couples redox interagissent avec le système de détection, nous avons choisi et adapté un protocole de mesure de l' $H_2O_2$  produit par les mitochondries après les avoir éliminées à la fin de l'incubation (Staniek et Nohl 1999). Cette technique permet de limiter les interactions non spécifiques et de détecter la libération nette d' $H_2O_2$  hors de la mitochondrie. Des gammes d'étalement de  $H_2O_2$  ont été préparées dans des conditions identiques à celles des échantillons (absence de mitochondries, mêmes tampons et substrats).

Nous avons analysé l'intensité des dommages oxydatifs présents au niveau mitochondrial en mesurant la teneur en groupements carbonyles des protéines mitochondriales à l'aide de tétrahydroborure de sodium tritié ( $NaB^3H_4$ ).

Enfin, nous avons complété notre étude du stress oxydant musculaire par la mesure des activités des enzymes antioxydantes (figure 1). Nous avons ainsi déterminé 1) les activités SOD cytosoliques (Cu-Zn SOD) et mitochondriales (Mn SOD), capables de dismuter l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  produit en  $H_2O_2$ ; 2) l'activité glutathion réductase (GRed), qui permet de réduire le glutathion oxydé et donc de restaurer l'antioxydant majeur qu'est le glutathion; 3) l'activité glutathion peroxydase (GPX) qui, en utilisant comme co-facteur le glutathion, permet de détoxifier l' $H_2O_2$  en eau; 4) l'activité catalase qui détoxifie également l' $H_2O_2$ .

## 2 / L'évolution de la production mitochondriale d' $H_2O_2$ dans les muscles oxydatifs et glycolytiques chez le rat (Capel *et al* 2004)

Lors du transfert normal des électrons au sein des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au cours de la respiration (figure 1), une fuite d'électrons se produit aux niveaux des complexes I et III (Barja 1999). Le même phénomène a lieu lors du flux inverse d'électrons qui se produit également entre les complexes II et I (Liu *et al* 2002, St-Pierre *et al* 2002). Cette fuite provoque la capture d'un électron par l'oxygène  $O_2$  qui devient ainsi une EAO :  $O_2^{\bullet-}$ . Cette forme radicalaire a une demi-vie extrêmement brève, puis-

qu'elle est convertie spontanément ou grâce à la superoxyde dismutase (SOD) en  $H_2O_2$  qui peut diffuser hors de la mitochondrie et conduire à la formation d'EAO plus néfastes (radical hydroxyle) par réaction avec d'autres molécules telles que le fer. L'évolution avec l'âge de la production mitochondriale d'EAO dans le muscle squelettique n'a été que très peu étudiée et les résultats contradictoires (Bejma et Ji 1999, Drew *et al* 2003) qui ont été rapportés, ne permettent pas de savoir quel est l'effet du vieillissement et s'il est différent en fonction du type musculaire. Cette étude a donc été entreprise pour comparer l'évolution au cours du vieillissement de la production mitochondriale d' $H_2O_2$  et de ses mécanismes en fonction du type musculaire. Ses conséquences sur diverses activités du métabolisme mitochondrial et sur le stress oxydant ont été recherchées en examinant l'évolution de la teneur en dérivés carbonyles des protéines mitochondriales et de l'activité des enzymes antioxydantes majeures (SOD, catalase, GPX et GRed). Les travaux ont été réalisés avec des rats mâles Wistar jeunes (4,5 mois) et âgés (24 mois), élevés à l'animalerie présente sur le site INRA de Theix (Unité Expérimentale de Nutrition Comparée). Les muscles étudiés étaient 2 muscles de la patte arrière ayant des propriétés métaboliques différentes : le *soleus*, un muscle oxydatif et le *tibialis anterior*, un muscle mixte à prédominance glycolytique.

La masse du *tibialis anterior* était significativement réduite avec l'âge (- 23 %), alors que celle du *soleus* était stable, confirmant l'atrophie plus importante des muscles glycolytiques au cours du vieillissement.

Les paramètres respiratoires mesurés sur les mitochondries isolées dénotaient un bon état de fonctionnement, et n'étaient pas affectés par le vieillissement. De même, aucune variation significative des rendements d'extraction (mg de protéines mitochondriales par g de tissu) n'a été constatée en fonction de l'âge ou du muscle, et l'activité cytochrome C oxydase était maintenue dans le *tibialis anterior*. En revanche, l'activité de la citrate synthase était plus faible chez les rats de 24 mois que chez ceux de 4,5 mois. Ce dernier résultat pourrait signifier que le nombre de mitochondries baisse dans le muscle avec l'âge. L'importance de cette baisse (- 16 %) n'était probablement pas suffisante pour avoir un effet détectable sur le rendement de l'isolement des mitochondries. De plus, la méthode retenue ne permet pas une extraction

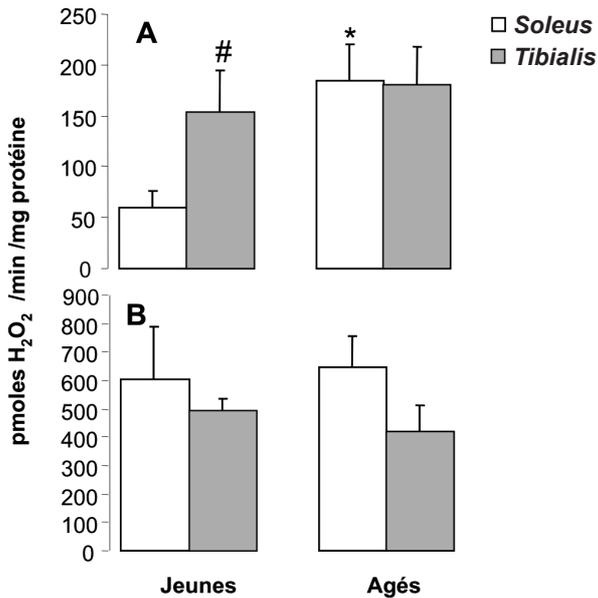
exhaustive des mitochondries musculaires malgré le traitement par la subtilisine.

Chez les rats de 4,5 mois, les mitochondries du muscle *tibialis anterior* avaient tendance à produire plus d' $H_2O_2$  que les mitochondries du muscle *soleus* (+ 155 %,  $p = 0,08$ ). Il n'y avait plus de différence à 24 mois. En effet, dans le *soleus*, la production mitochondriale d' $H_2O_2$  augmentait significativement avec l'âge (+ 208 % entre 4,5 et 24 mois) et rejoignait le niveau observé dans le *tibialis anterior* qui ne variait pas avec l'âge (figure 2A). L'addition d'antimycine A, inhibiteur du flux d'électron au niveau du complexe III stimulait la production d' $H_2O_2$ , les valeurs obtenues étant identiques chez les animaux jeunes et âgés (figure 2B). Cette stimulation par l'antimycine A est le signe d'un rôle du complexe III dans la production mitochondriale d'EAO. Ce rôle semblait inchangé avec l'âge.

Lorsque les électrons provenaient du complexe II (en présence du substrat adéquat, le succinate) et étaient orientées uniquement vers le flux normal d'électrons vers le complexe III (en présence d'un inhibiteur qui bloque le flux inverse d'électrons possible du complexe II vers le complexe I, la roténone), il n'y avait également aucun effet de l'âge sur la production mitochondriale d' $H_2O_2$  (figure 3). L'addition d'antimycine A stimulait très fortement celle-ci aux deux âges, confirmant le rôle du complexe III dans la production mitochondriale d'EAO. Nous avons également vérifié que cette production ne se situait pas au niveau du complexe II (l'ajout de TTFA, inhibiteur spécifique du complexe II induisait une diminution de la quantité d' $H_2O_2$  produite par les mitochondries en présence de succinate).

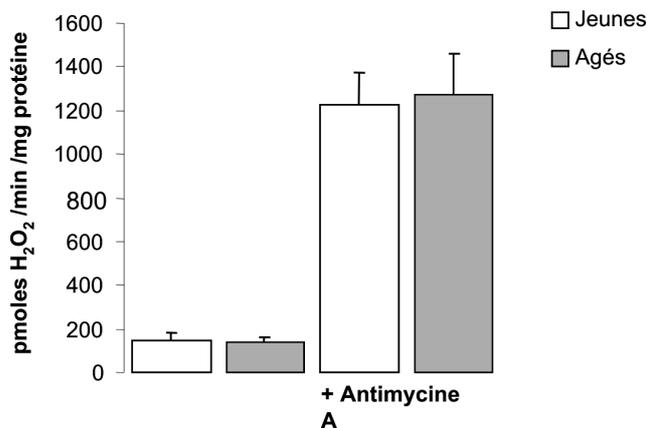
Face à cette production mitochondriale d'EAO, les taux d'oxydation des protéines mitochondriales n'étaient pas différents aux 2 âges dans les 2 muscles. En revanche, ils tendaient ( $p < 0,065$ ) à être supérieurs dans le *tibialis anterior* par rapport au *soleus*, quel que soit l'âge, indiquant donc un niveau d'oxydation de cette fraction protéique plus important dans les muscles glycolytiques que dans les muscles oxydatifs. Nous avons aussi constaté que les activités Cu-Zn SOD (forme cytosolique) et catalase étaient plus élevées dans le *tibialis anterior* des rats de 24 mois que chez ceux de 4,5 mois (figure 4). A l'inverse, chez les animaux de 24 mois, l'activité GPX était plus

**Figure 2.** Effet du type musculaire et du vieillissement chez le rat sur la production mitochondriale d' $H_2O_2$  en présence de glutamate / malate avec (B) ou sans (A) antimycine.

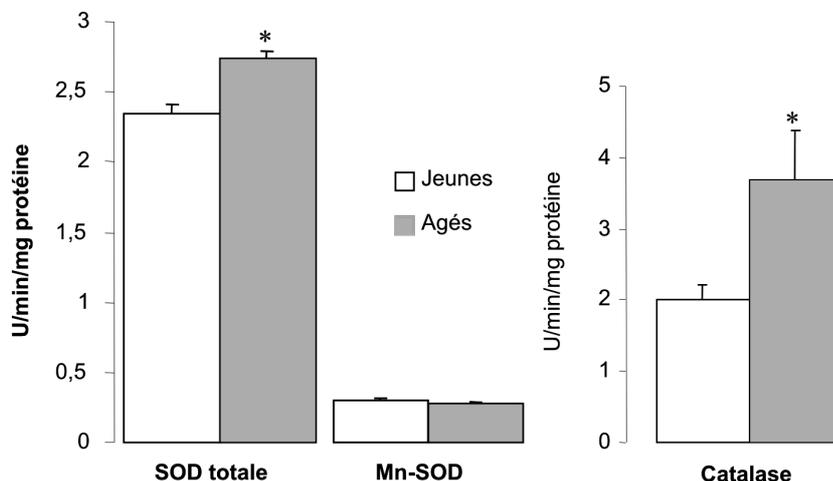


Les valeurs indiquées sont significativement différentes des valeurs obtenues dans le soleus des jeunes rats : \*  $P < 0,05$  ; #  $P = 0,08$ .

**Figure 3.** Effet du vieillissement sur la production mitochondriale d' $H_2O_2$  dans le tibialis anterior de rat en présence de succinate et de roténone, avec ou sans antimycine A.



**Figure 4.** Le vieillissement s'accompagne d'une augmentation des activités SOD totale et catalase dans le muscle tibialis anterior de rat.



\* : Valeur significativement différente de la valeur obtenue chez les jeunes rats ( $P < 0,05$ ).

faible (figure 5), tandis que l'activité de la forme mitochondriale des SOD (Mn SOD) restait stable (figure 4).

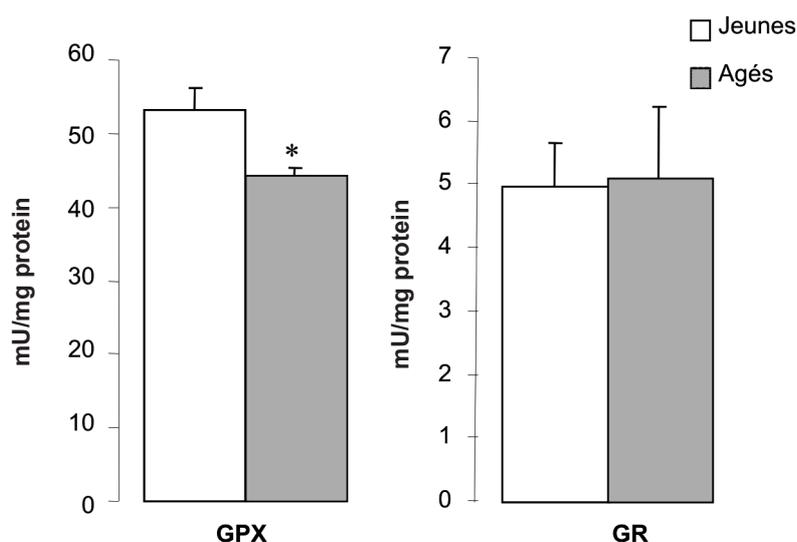
Ainsi, ce travail a permis de montrer que les muscles oxydatifs et glycolytiques sont affectés différemment par le stress oxydant au cours du vieillissement. Chez le jeune animal, les mitochondries produisent plus d' $H_2O_2$  dans les muscles glycolytiques que dans les muscles oxydatifs, ce qui est cohérent avec la tendance à observer plus de produits de l'oxydation des protéines mitochondriales dans ce type musculaire et avec la sensibilité des muscles glycolytiques à la sarcopénie. C'est également cohérent avec le fait que les muscles glycolytiques constituent un environnement chimiquement plus réduit que les muscles oxydatifs.

En revanche, même si la production d' $H_2O_2$  augmentait avec l'âge dans le muscle *soleus*, il semblerait que cela ait un impact négligeable sur la sarcopénie, puisque la masse de ce muscle n'était pas affectée entre 4,5 et 24 mois. De même, en dépit de cette augmentation de production, les produits de l'oxydation des protéines mitochondriales ne semblaient pas s'accumuler. L'absence d'accumulation de dommages oxydatifs sur les protéines suggère que les systèmes de réparation et/ou d'élimination restent efficaces avec l'âge. Néanmoins, le vieillissement pourrait affecter préférentiellement certaines protéines comme l'aconitase ou l'Adénine Nucleotide Translocator (Yan *et al* 1997, Yan et Sohal 1998).

La détermination des activités anti-oxydantes dans le muscle *soleus* permettrait de savoir si l'activité MnSOD augmente parallèlement à la production d' $H_2O_2$  et si le surplus d' $H_2O_2$  généré modifie l'activité de la GPX qui est chargée de l'éliminer. Les informations disponibles dans la littérature sur ces paramètres montrent que les activités MnSOD (Oh-Ishi *et al* 1995, Hollander *et al* 2000) et GPX (Lawler *et al* 1993, Leeuwenburgh *et al* 1994) augmentent dans ce muscle avec l'âge, ce qui est donc cohérent avec nos résultats.

Dans le *tibialis anterior*, les augmentations d'activités de la Cu-Zn SOD et de la catalase semblent indiquer que la production d'EAO par d'autres sources cellulaires est accrue avec l'âge. Par exemple, les microsomes et les peroxyosomes qui sont des sources importantes d'EAO (Chance *et al* 1979) pourraient être responsables d'une surproduction d'EAO.

**Figure 5.** Effet du vieillissement sur les activités glutathion peroxydase (GPX) et glutathion réductase (GRed) dans le muscle tibialis anterior chez le rat.



\* : Valeur significativement différente de la valeur obtenue chez les jeunes rats ( $P < 0,05$ ).

### 3 / L'augmentation avec l'âge de la production mitochondriale d' $H_2O_2$ liée au flux inverse d'électrons dans le muscle *vastus lateralis* chez l'homme

Après avoir mis au point l'étude de la production d'EAO par les mitochondries musculaires et en avoir analysé des étapes clés chez le rat, nous avons prolongé cette étude chez l'homme (Capel *et al* 2005a). Ceci implique que les mesures doivent être réalisées sur une biopsie d'un seul type musculaire et de petite taille. Nous ne pouvions donc pas utiliser de multiples combinaisons de substrats ou d'inhibiteurs. Il fallait choisir une ou deux conditions, susceptibles de fournir le maximum d'informations. En accord avec les données de la littérature, nous avons montré que le complexe III de la chaîne respiratoire est une source majeure d' $H_2O_2$  lors de la respiration mitochondriale, en particulier en présence de succinate. La littérature indique qu'un flux inverse d'électrons est également généré en présence de succinate entre les complexes II et I de la chaîne respiratoire. Dans les études chez le rat, nous avions éliminé ce flux en travaillant en présence de roténone qui bloque les transferts d'électrons au niveau du complexe I dans le sens normal ou inverse. Ce flux induit une production d'EAO au niveau du complexe I. En effet, son inhibition par la roténone induit une importante diminution de la production mitochondriale d'EAO (Barja 1998, Liu *et al*

2002) car les électrons sont alors tous dirigés vers le flux normal. A notre connaissance, l'évolution avec l'âge de la production mitochondriale d'EAO liée au flux inverse d'électrons n'a jamais été évaluée dans le muscle squelettique. Ainsi, dans le but de prendre en compte cette production d'EAO par le complexe I, et aussi d'autoriser tous les flux d'électrons et d'avoir ainsi une vision plus complète et peut-être plus physiologique de l'évolution avec l'âge de la production d'EAO par les mitochondries musculaires, nous avons choisi d'utiliser comme première condition expérimentale un mélange de substrats du complexe I (glutamate, malate) et du complexe II (succinate). Etant donnée l'importance croissante accordée au flux inverse d'électrons

dans le muscle squelettique (Liu *et al* 2002, Servais *et al* 2003), nous avons choisi comme deuxième condition expérimentale le même mélange de substrats, additionné de roténone. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, une inhibition de la production mitochondriale d'EAO par la roténone serait une indication d'une production majoritairement liée au flux inverse, une stimulation serait le signe d'une production liée au flux normal et une absence d'effet ne permettrait pas de conclure sur les mécanismes de production.

Puisque l'activité physique et l'état nutritionnel sont des paramètres qui peuvent influencer la fonction mitochondriale, les volontaires, répartis en deux groupes âgés de 23,5 ans et de 67 ans ( $n = 6$  par groupe) ont été sélectionnés de manière à ce qu'ils aient un même niveau d'activité physique quel que soit l'âge et ont reçu des conseils nutritionnels pendant les 3 jours ayant précédé l'étude. Une biopsie a été réalisée le matin à jeun, dans le muscle *vastus lateralis* et les mitochondries ont été isolées immédiatement. La production mitochondriale d' $H_2O_2$  a été évaluée en utilisant le DCFH-DA comme sonde fluorescente en présence de glutamate, malate et succinate (5/2,5/5 mM).

Si la masse maigre et la masse musculaire (des membres supérieurs et inférieurs) mesurées par absorptiométrie biphotonique n'étaient pas différentes entre les volontaires jeunes et âgés, la masse grasse était plus élevée chez les individus âgés. La  $VO_{2max}$  était significativement plus forte chez les sujets jeunes que chez les âgés, bien que les 2 groupes d'individus soient sédentaires (tableau 1).

**Tableau 1.** Caractéristiques des volontaires sains inclus dans l'expérience.

|  | Groupes    |            | Test t |
|--|------------|------------|--------|
|  | Jeunes     | Agés       |        |
| <b>Age (ans)</b>   | 23,5 ± 0,8 | 67,3 ± 0,6 | < 0,05 |
| <b>Poids (kg)</b>  | 70,6 ± 4,9 | 78,3 ± 3,1 | NS     |
| <b>IMC (kg,m<sup>-2</sup>)</b>   | 22,4 ± 1,2 | 26,7 ± 0,6 | < 0,05 |
| <b>Graisse corporelle (kg)</b>   | 11,3 ± 2,2 | 18,5 ± 1,1 | < 0,05 |
| <b>Graisse corporelle (%)</b>  | 15,6 ± 2,1 | 23,8 ± 1,3 | < 0,05 |
| <b>Masse maigre (kg)</b>   | 59,2 ± 3,3 | 59,4 ± 2,4 | NS     |
| <b>Masse musculaire (kg)</b>   | 27,2 ± 1,8 | 26,1 ± 1,0 | NS     |
| <b>Masse musculaire jambes (kg)</b>                                    | 19,8 ± 1,3 | 19,1 ± 0,7 | NS     |
| <b>Masse musculaire bras (kg)</b>                                      | 7,4 ± 0,5  | 7,1 ± 0,5  | NS     |
| <b><math>VO_{2max}</math> (ml.min<sup>-1</sup>.kg MM<sup>-1</sup>)</b> | 46,9 ± 1,6 | 34,7 ± 0,7 | < 0,05 |

Abréviations : IMC : indice de masse corporelle (poids / taille au carré) ;  $VO_{2max}$  : consommation maximale d'oxygène en mL par minute par kg de masse maigre ; NS : non significatif.

**Tableau 2.** Effet du vieillissement sur les activités enzymatiques mitochondriales musculaires chez l'homme.

|              | Groupes    |            | Test t |
|--------------|------------|------------|--------|
|              | Jeunes     | Agés       |        |
| CS           | 22,6 ± 0,8 | 18,6 ± 2,7 | NS     |
| Complexe II  | 1,1 ± 0,2  | 1,4 ± 0,1  | NS     |
| Complexe III | 3,0 ± 0,4  | 3,6 ± 0,3  | NS     |
| COX          | 5,5 ± 0,4  | 7,4 ± 1,4  | NS     |

Abréviations : CS, citrate synthase ; COX, cytochrome c oxidase ; NS, non significatif.

Le vieillissement n'affectait pas la capacité des mitochondries à oxyder les acides gras, ni les activités des complexes II à IV de la chaîne respiratoire et de la citrate synthase (tableau 2), mais il induisait une augmentation importante (+ 175 %) de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figure 6). En présence de roténone, cette production était inhibée d'environ 70 % dans les 2 groupes et il n'y avait plus de différence significative entre les 2 groupes d'âge, malgré une production qui tendait à demeurer supérieure dans le groupe de volontaires âgés (+ 130 %,  $p = 0,11$ ) (figure 6).

Ainsi, ces résultats indiquent que la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente avec l'âge dans le muscle *vastus lateralis* humain. Cette augmentation est vraisemblablement due au flux inverse d'électrons, puisque la roténone réduisait la libération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et masquait l'effet du vieillissement. En effet, il a été montré dans le muscle : 1) que la roténone inhibe la production d'EAO par des mitochondries respirant en présence de succinate (Servais *et al* 2003) grâce à l'inhibition du flux inverse d'électrons ; 2) que la production mitochondriale d'EAO en présence de substrats du complexe I est stimulée par la roténone (St-Pierre *et al* 2002). L'effet inhibiteur de la roténone est clairement prédominant par rapport à l'effet stimulateur dans nos conditions. La grande majorité de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit en l'absence de roténone était donc due au flux inverse d'électrons.

Une seule autre étude a décrit la production mitochondriale d'EAO dans le muscle chez l'homme âgé avec des substrats du complexe I. Elle n'a pas mis en évidence d'effet du vieillissement (Tonkonogi *et al* 2003). Chez l'animal, l'analyse de l'effet du vieillissement dans le muscle sur cette production a été réalisée avec des substrats des complexes I ou II (en présence de roténone). L'ensemble des travaux antérieurs ne permettait donc pas d'étudier le rôle du flux inverse. Notre étude met en évidence pour la première fois que l'im-

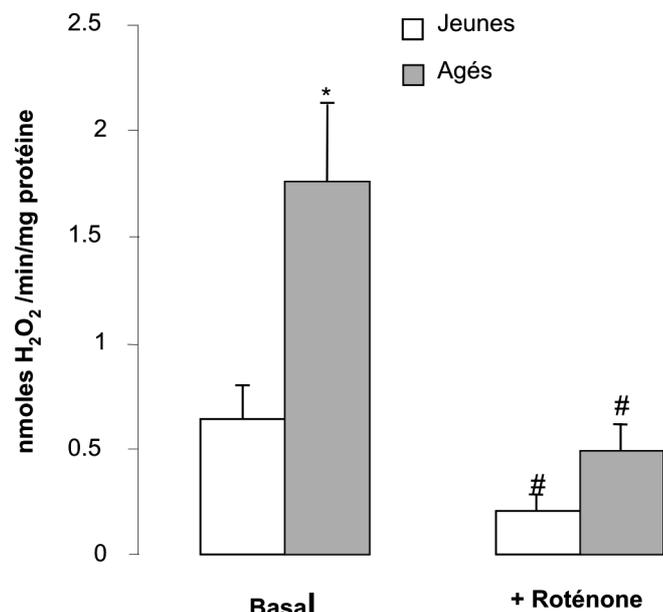
portance de ce flux est accrue avec l'âge et ne s'oppose pas aux données obtenues chez l'homme ou l'animal.

Pourtant, en accord avec d'autres études réalisées chez l'homme (Rasmussen *et al* 2003, Rimbart *et al* 2004), les capacités oxydatives musculaires semblaient préservées chez les sujets âgés. Les conséquences de la stimulation de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liée au flux inverse d'électrons restent donc à préciser. Il n'est pas évident que les mitochondries subissent des altérations significatives, malgré la proximité de la source d'EAO. Les altérations pourraient être spécifiques, touchant certains molécules particulièrement sensibles. En outre, il est possible que des effets délétères apparaissent seulement chez des individus encore plus âgés que ceux qui étaient inclus dans ces travaux. D'autres études seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Cette augmentation de la libération mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait également être un signal d'adaptation pour la cellule ou la mitochondrie. Les EAO régulent en effet plusieurs fonctions cellulaires, dont le métabolisme du calcium ou la réponse au stress.

#### 4 / La lidocaïne peut-elle interférer avec les mesures de la production d'EAO sur les biopsies humaines ?

La réalisation d'une biopsie musculaire chez l'homme nécessite une anesthésie locale. Dans notre étude, nous avons utilisé une injection sous-cutanée de lidocaïne (Capel *et al* 2005a). Or, ce produit est capable de perturber la respiration mitochondriale au même titre que les inhibiteurs que nous utilisons ; il a des propriétés découplantes (Dabadie *et al* 1987, Sztark *et al* 1998). Il est donc susceptible d'interférer avec les mesures réalisées au niveau mitochondrial. Pour tester ceci, nous avons répété chez le rat les mesures réalisées chez l'homme. Pour tester l'effet de la lidocaïne, nous avons injecté ce produit en intramusculaire au niveau du muscle *gastrocnemius* de la patte droite de l'animal (1mL d'une solution de lidocaïne 2 %), et nous avons comparé la respiration mitochondriale et la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des mitochondries isolées

**Figure 6.** Effet du vieillissement sur la production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le muscle *vastus lateralis* humain en présence de glutamate/malate/succinate avec ou sans roténone.

\* Significativement différent des jeunes ( $P < 0,05$ ).  
# Significativement différent du basal ( $P < 0,05$ ).

à partir des muscles droit (avec lidocaïne) et gauche (sans lidocaïne). Il s'agit bien sûr d'un modèle un peu extrême car le volume injecté est important, l'injection se fait en intramusculaire, alors que chez l'homme nous avons veillé à réaliser plusieurs petites injections en sous-cutané dans la zone prévue de biopsie.

Les résultats obtenus ont montré qu'en l'absence d'ADP (état IV), l'injection de lidocaïne stimulait la respiration en présence de succinate. Elle inhibait l'augmentation de la consommation mitochondriale d'oxygène normalement provoquée par la roténone en présence de succinate dans le muscle témoin. En présence d'ADP (état III), aucun effet significatif de la lidocaïne n'était détecté, à part une tendance de la consommation d'oxygène à diminuer en présence de glutamate et de malate ( $p = 0,06$ ). Cette injection provoquait également une réduction de la production d' $H_2O_2$  en présence des 3 substrats et interagissait significativement avec l'effet de la roténone : dans le groupe témoin, la roténone inhibait la production mitochondriale d' $H_2O_2$  de 48 %, alors que dans le groupe traité, elle n'avait plus d'effet significatif. Cet effet pourrait être la conséquence de l'effet découplant de la lidocaïne, capable de réduire le potentiel membranaire au niveau mitochondrial.

Ainsi, nous avons montré que la lidocaïne peut effectivement interférer avec nos mesures de production d' $H_2O_2$  en masquant l'effet inhibiteur de la roténone. Cependant, l'inhibition marquée de la production mitochondriale d' $H_2O_2$  par la roténone que nous avons obtenue lors de l'expérience réalisée chez l'homme indique bien que la lidocaïne n'a pas interféré. Cela est certainement lié aux précautions prises lors de l'injection en veillant à réaliser de multiples injections sous-cutanées. La lidocaïne est donc un élément capable d'interférer avec les mesures, mais ce problème peut être évité.

## 5 / L'augmentation avec l'âge de la production non mitochondriale d' $H_2O_2$ dans le muscle *gastrocnemius* chez le rat

Dans nos expériences précédentes, nous avons analysé l'évolution avec l'âge de la production mitochondriale d'EAO dans le cadre du vieillissement musculaire. Cette étude a été initiée

**Tableau 3.** Contribution des différents composants cellulaires à la production totale d' $H_2O_2$ , dans le foie. MAO : Monoamines oxydases (Chance et al 1979).

| Sources       | Mécanisme impliqué                     | % de contribution |
|---------------|--|-------------------|
| Microsomes    | NADPH-cyt c reductase, cytochrome P450 | 45                |
| Peroxisomes   | $\beta$ -oxydation, diverses oxydases  | 35                |
| Mitochondries | Chaîne respiratoire, MAO               | 15                |
| Cytoplasme    | Xanthine oxydase, aldehyde oxydase     | 5                 |

avec le même objectif, mais en nous intéressant cette fois-ci à la production globale musculaire d'EAO, et en particulier à celle qui n'est pas d'origine mitochondriale. Il existe très peu de données concernant la répartition de la production cellulaire d'EAO dans le muscle squelettique et l'effet du vieillissement sur cette répartition n'a jamais été étudié. Même si l'on admet couramment que les mitochondries sont la source principale d'EAO de la cellule, il est possible que cela ne soit pas vrai dans tous les tissus et/ou espèces animales. En effet, dans la principale revue bibliographique (Chance *et al* 1979) qui est généralement citée pour étayer l'affirmation selon laquelle les mitochondries sont la source principale d'EAO, il est indiqué que, dans le foie, les mitochondries représenteraient seulement 15 % de la production totale d' $H_2O_2$  (tableau 3). Les peroxysomes produisent de l' $H_2O_2$  lors de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et possèdent des oxydases comme sources potentielles. Les microsomes peuvent oxyder le NADPH grâce à la NADPH-cytochrome c reductase et possèdent des cytochromes P450, intervenant dans la détoxification des xénobiotiques. Il existe en plus des sources présentées dans ce tableau une production d'EAO occasionnelle, par exemple par des cellules phagocytaires qui sont des sources importantes d'EAO et qui peuvent s'être infiltrées dans le tissu musculaire dans certaines situations physiopathologiques. Nous avons montré précédemment que les activités de la Cu-Zn SOD et de la catalase étaient plus stimulées avec l'âge dans le muscle *tibialis anterior* chez le rat que celle de la Mn SOD mitochondriale. Ceci pourrait être la conséquence d'un accroissement au cours du vieillissement de la libération d'EAO dans le cytoplasme par d'autres organites cellulaires que les mitochondries.

Nous avons donc comparé la production d' $H_2O_2$  par un extrait musculaire total ou par un extrait appauvri en mitochondries obtenu chez des rats adultes ou âgés.

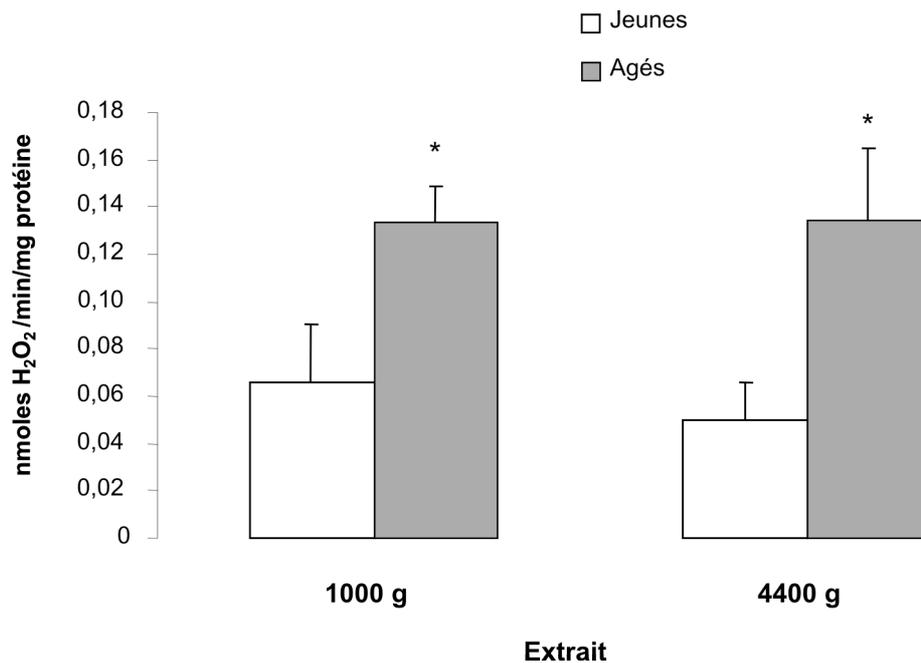
Les rats, des mâles Wistar âgés de 6 mois ou de 22 mois provenaient de l'Unité Expérimentale de Nutrition Comparée de l'INRA de Theix. Le muscle *gastrocnemius* a été prélevé et utilisé immédiatement pour les mesures de production d' $H_2O_2$ . Nous avons souhaité obtenir un extrait de muscle total, dépourvu des gros débris cellulaires et des protéines myofibrillaires et un extrait de muscle appauvri en mitochondries. Nous avons procédé comme pour l'isolement des mitochondries par centrifugation différentielle. Nous avons mesuré la production d' $H_2O_2$  par les surnageants obtenus lors des centrifugations à 1000 g (fraction totale) et 4400 g (fraction appauvrie en mitochondries). Nous avons également mesuré la teneur en groupements carbonyles des protéines dans ces surnageants 1000 g et 4400 g.

Comme précédemment, la masse des muscles *tibialis anterior* et *gastrocnemius* était significativement plus faible chez les rats de 22 mois que chez ceux de 6 mois. En revanche le poids du muscle *soleus* (métabolisme oxydatif) n'était pas significativement différent aux 2 âges.

Dans le *gastrocnemius*, la production d' $H_2O_2$  (figure 7) exprimée en nmol.  $min^{-1}$ .  $mg\ prot^{-1}$  augmentait significativement avec l'âge dans le surnageant total (+ 102 %,  $p = 0,05$ ) et dans le surnageant appauvri en mitochondries (+ 170 %,  $p < 0,05$ ). Lorsque cette production est exprimée par gramme de muscle, l'augmentation liée à l'âge restait significative pour le surnageant appauvri en mitochondries. Du fait d'une variabilité importante et d'une tendance à une baisse avec l'âge de la teneur en protéines, ce n'était plus le cas dans le surnageant total. Cela suggère que la contribution des mitochondries à l'augmentation de la production tissulaire d'EAO en fonction de l'âge est moins importante que celle des autres sources.

La teneur en dérivés carbonyles sur les protéines, marqueurs de leur oxydation, n'évoluait pas avec l'âge quelle que soit la fraction considérée.

**Figure 7.** Effet du vieillissement sur la production d' $H_2O_2$  dans un extrait musculaire (gastrocnemius) total (surnageant 1000 g) ou appauvri en mitochondries (surnageant 4400 g).



\* : Effet âge significatif à  $P < 0,05$ .

Nos résultats montrent donc que la production d' $H_2O_2$  augmente avec l'âge dans les 2 fractions étudiées. Ceci est en accord avec une étude antérieure réalisée chez le rat dans un homogénat complet du muscle *vastus lateralis* (Bejma et Ji 1999) bien que les conditions d'incubation soient différentes des nôtres. Puisque nous observons une augmentation avec l'âge de la production d' $H_2O_2$  dans le surnageant appauvri en mitochondries, et comme elle est plus marquée que dans la fraction totale, il est vraisemblable que la production d' $H_2O_2$  soit augmentée au cours du vieillissement dans les peroxysomes ou les microsomes. Ces 2 types d'organites contribuent majoritairement, avec les mitochondries, à la production cellulaire d' $H_2O_2$  dans le foie (Chance *et al* 1979). Cependant, il n'existe pas, à notre connaissance, de données dans la littérature se rapportant au muscle ou à l'effet de l'âge.

Malgré l'augmentation de la production d' $H_2O_2$ , on n'observe pas en parallèle une augmentation de la proportion de protéines carbonylées. Ces résultats sont en accord avec la stabilité au cours du vieillissement du niveau d'oxydation des protéines totales observée chez le rat (Mosoni *et al* 2004). Pourtant, d'autres études ont mis en évidence une augmentation avec l'âge du niveau d'oxydation dans la fraction soluble des protéines musculaires chez le rat (Reznick et Packer 1994). Il est possible que seulement certaines protéines

particulières soient oxydées au cours du vieillissement comme cela a été observé dans le plasma de rats et de souris (Jana *et al* 2002) ou chez la drosophile (Yan *et al* 1997).

Cette augmentation de la production non mitochondriale d' $H_2O_2$  est cohérente avec les niveaux d'activités de la Cu-Zn SOD et de la catalase plus élevés dans les muscles de rats âgés par rapport à ceux trouvés dans les muscles de jeunes adultes. Il semble donc nécessaire de prendre en compte cette observation lors des études d'intervention visant à réduire le niveau de stress oxydant dans le muscle squelettique.

Ce protocole ne permettait pas de comparer précisément les productions d' $H_2O_2$  dans les deux surnageants car leurs compositions étaient différentes. Toutefois, au vu des résultats obtenus, il semble que les mitochondries ne soient pas nécessairement la source cellulaire majoritaire d' $H_2O_2$  dans le muscle comme cela est communément admis.

## 6 / La stimulation de la production mitochondriale d' $H_2O_2$ *in vivo* par le $Ca^{2+}$ dans le muscle *gastrocnemius* chez le rat âgé

Il est important d'identifier les mécanismes pouvant relier le développe-

ment du stress oxydant dans une situation particulière comme le vieillissement et la fonte musculaire. Parmi eux, le stress calcique semble pouvoir jouer un rôle puisque des travaux indiquent que le calcium favorise la production mitochondriale d'EAO (Kowaltowski *et al* 2001). Au cours du vieillissement, les altérations rapportées au niveau des pompes SERCA du Réticulum Sarcoplasmique (RS) (Viner *et al* 1999, Carmeli *et al* 2002) pourraient favoriser l'accumulation de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme. Les mitochondries sont alors susceptibles d'accroître leur prélèvement de  $Ca^{2+}$  pour rétablir l'équilibre des concentrations en  $Ca^{2+}$  dans les différents compartiments. Ce travail a donc été réalisé pour déterminer si la relation entre les variations des concentrations mitochondriales en  $Ca^{2+}$  et leur production d'EAO existe *in vivo* dans le muscle squelettique et si une augmentation de la teneur mitochondriale en  $Ca^{2+}$  pourrait favoriser la sarcopénie avec l'âge (Capel *et al* 2005b). Pour cela, nous avons utilisé un modèle animal basé sur le traitement de rats avec un ionophore calcique, le A23187. Cette molécule permet l'entrée massive de  $Ca^{2+}$  dans les cellules et induit une entrée de  $Ca^{2+}$  dans les mitochondries.

Cette étude a été conduite en 2 parties. Dans chaque cas, 2 muscles ont été étudiés, le *gastrocnemius* (métabolisme mixte) et le *soleus* (métabolisme oxydatif).

La première partie de notre travail devait permettre de vérifier l'effet du traitement au A23187 injecté par voie intrapéritonéale chez des rats mâles Wistar âgés de 6 et 23 mois, d'une part, sur les teneurs mitochondriales en  $\text{Ca}^{2+}$  et, d'autre part, sur la masse musculaire. L'incorporation mitochondriale de  $\text{Ca}^{2+}$  a été évaluée à l'aide d'une méthode radioactive (Capel *et al* 2005b). Chez les animaux traités et par comparaison aux témoins, il s'est avéré que 48 heures après l'injection, les teneurs mitochondriales en  $\text{Ca}^{2+}$  étaient inchangées dans le muscle *gastrocnemius* chez rats de 6 mois, et tendaient à augmenter chez les rats de 23 mois. Dans le muscle *soleus*, ces teneurs étaient inchangées pour les rats de 6 mois et réduites chez les rats de 23 mois. Ainsi, une interaction significative a été détectée entre les effets de l'âge et du traitement : avec l'âge, la teneur mitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$  augmentait chez les rats témoins, mais était réduite chez les rats traités. En outre, les teneurs mitochondriales en  $\text{Ca}^{2+}$  étaient plus élevées dans le muscle *soleus* que dans le *gastrocnemius*.

En ce qui concerne l'effet du A23187, sur les masses musculaires, il a été observé que les rats de 23 mois étaient plus sensibles au traitement au A23187 que les rats de 6 mois. Le poids du muscle *gastrocnemius* (exprimé en pourcentage du poids corporel) était significativement réduit au cours du vieillissement, mais n'était pas affecté par le traitement quel que soit l'âge. À l'inverse, le *soleus* subissait une atrophie significative de 17 % sous l'effet

du A23187 chez les animaux âgés uniquement, alors que le vieillissement restait sans effet. En outre, une corrélation inverse entre la teneur mitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$  et la masse musculaire était observée pour les 2 muscles (figure 8). Ceci suggère un lien possible entre masse musculaire et teneur mitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$ .

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons reproduit le modèle chez des animaux âgés de 21 mois avec pour objectif d'analyser les effets du A23187 sur la production mitochondriale d'EAO avant l'apparition de la fonte musculaire. Pour cela, les mesures ont été effectuées 24 h après l'injection du A23187 avec une dose réduite de 20 % afin d'éviter toute mortalité. Les muscles *soleus* et *gastrocnemius* ont été prélevés, les mitochondries isolées, et leur production d'EAO a été évaluée en dosant l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit en présence de glutamate + malate comme substrats de la chaîne respiratoire. Des mesures de consommation d'oxygène par oxygraphie ont été réalisées pour contrôler les capacités respiratoires des mitochondries. Aucun effet du traitement sur le rapport de contrôle respiratoire et sur le rapport ADP/O n'a été trouvé. Il a seulement été observé que les capacités respiratoires maximales étaient plus importantes dans le *gastrocnemius*.

L'activité isocitrate déshydrogénase (ICDH) a été mesurée en guise de marqueur de l'évolution de la concentration mitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$  dans la fraction de mitochondries isolées car elle est stimulée par l'augmentation de la concen-

tration matricielle en  $\text{Ca}^{2+}$  (Denton *et al* 1978). Le dosage a été possible uniquement pour le muscle *gastrocnemius*, en raison de la trop faible quantité de mitochondries extraites du *soleus*. L'activation de 40 % de l'activité ICDH observée dans les mitochondries des animaux traités par rapport aux témoins indique que la concentration mitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$  a bien été augmentée suite à l'injection de A23187. Cette augmentation de l'activité ICDH n'était pas liée à un accroissement global du métabolisme mitochondrial car les activités citrate synthase et COX sont restées stables dans la même fraction mitochondriale.

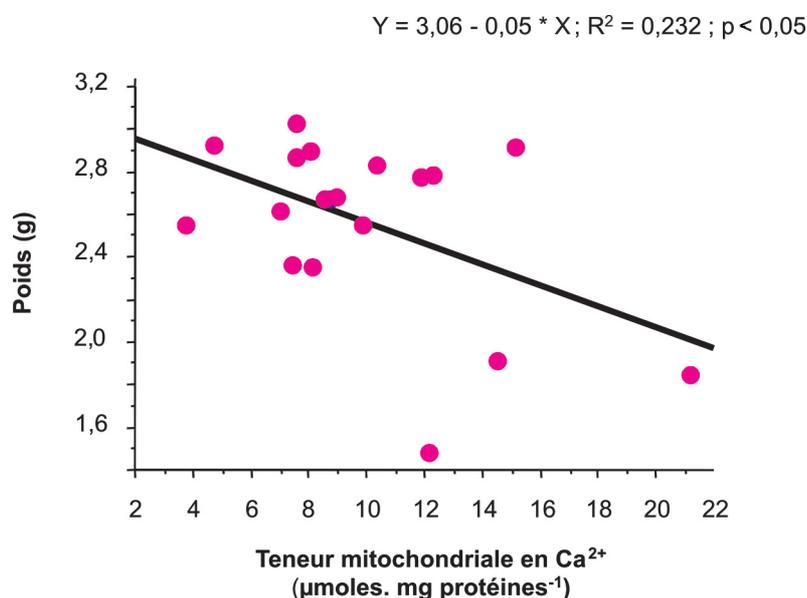
Dans les conditions fixées pour l'incubation des mitochondries isolées, la production mitochondriale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  augmentait dans le groupe traité par rapport au groupe témoin dans le *gastrocnemius* et restait stable dans le *soleus* (figure 9). Ce résultat qui a été observé en l'absence ou en présence d'antimycine A (inhibiteur du complexe III), est cohérent avec la stimulation de l'activité de la Mn SOD totale dans le *gastrocnemius*, et avec la baisse de l'activité de la GPX qui témoigne de la réduction des capacités mitochondriales à éliminer l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les activités de la catalase et de la Cu-Zn SOD étaient inchangées suite au traitement.

L'estimation des teneurs en protéines carbonylées, n'a pas mis en évidence d'influence de l'augmentation de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur le niveau d'oxydation des protéines mitochondriales.

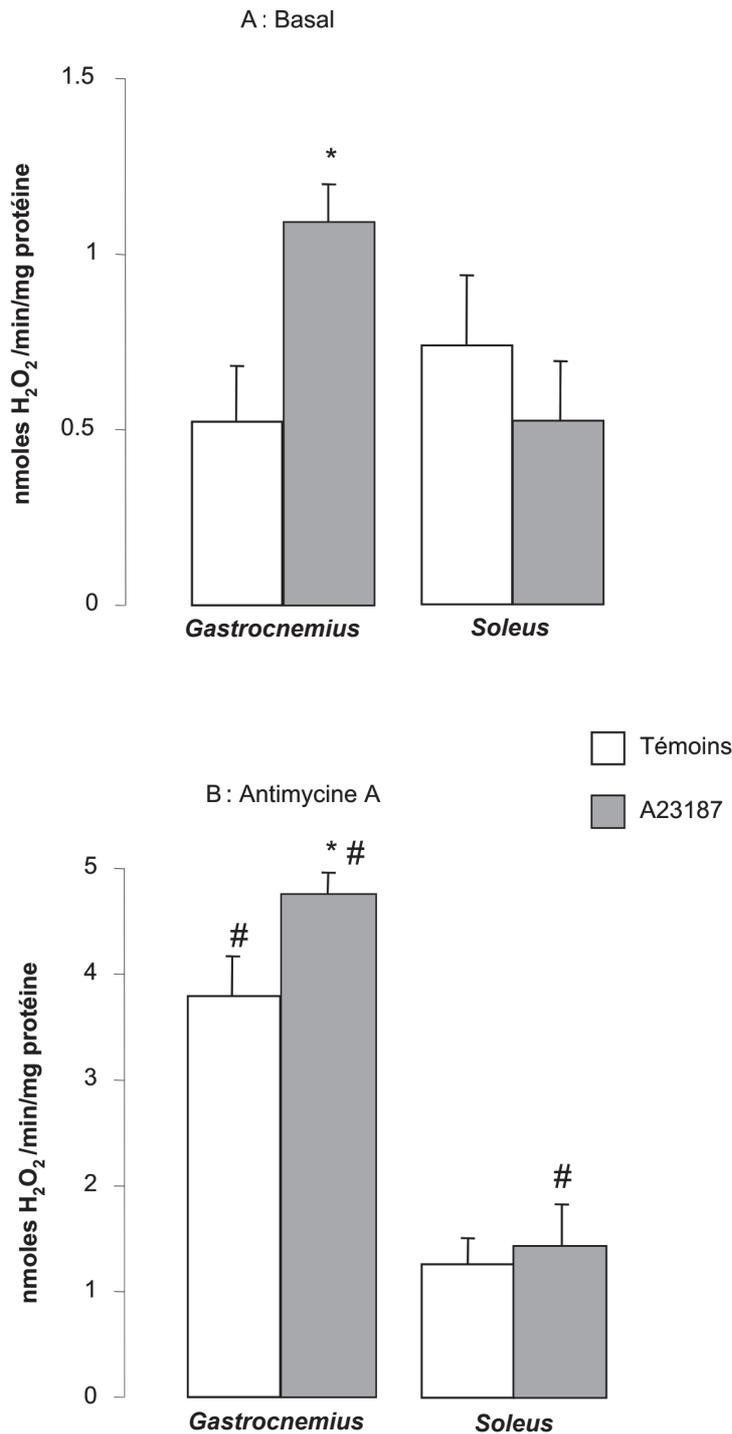
Le nombre de mitochondries a été réduit sous l'effet du traitement, puisqu'une diminution importante (- 50 %) de l'activité citrate synthase était observée dans l'homogénat musculaire utilisé pour l'extraction des mitochondries (Capel *et al* 2005b). Cette observation n'était pas confirmée par la comparaison des rendements d'extraction mitochondriale ( $2,40 \pm 0,36$  et  $2,52 \pm 0,33$  mg de protéines mitochondriales extraites par gramme de muscle dans les groupes témoins et A23187 respectivement). Ce dernier paramètre n'est cependant pas le meilleur index de la densité mitochondriale puisque moins de 50 % de la population mitochondriale est isolée par les techniques courantes d'extraction.

Plusieurs arguments bibliographiques et les données issues de cette étude suggèrent que l'augmentation de la concentration mitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$  sous l'effet du A23187 a été plus forte dans le *soleus* que dans le *gastrocnemius*.

**Figure 8.** Relation entre la teneur mitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$  et la masse du *gastrocnemius* chez le rat de 6 ou 23 mois, traité ou non avec le A23187.



**Figure 9.** Effet de l'injection *in vivo* du ionophore A23187 sur la production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les muscles soleus et gastrocnemius chez des rats âgés.



\* : Significativement différent du groupe témoin ( $P < 0,05$ ).

# Significativement différent du groupe correspondant sans antimycine A ( $P < 0,05$ ).

Nous montrons que les mitochondries du *soleus* sont plus riches en Ca<sup>2+</sup> que celles du *gastrocnemius*. En cas de surcharge calcique, la captation mitochondriale de Ca<sup>2+</sup> pourrait être plus importante dans les muscles oxydatifs que dans les muscles glycolytiques (Sembrowich *et al* 1985) à cause d'une activité de transport du Ca<sup>2+</sup> vers le RS

beaucoup plus faible (Narayanan *et al* 1996). Ce phénomène pourrait être amplifié lors du vieillissement (Carmeli *et al* 2002). Une altération de l'homéostasie calcique pourrait donc induire des perturbations plus importantes au niveau mitochondrial dans les muscles oxydatifs que dans les muscles glycolytiques. Cependant, aucune

variation de la production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'a été constatée dans le *soleus*. Une augmentation précoce de la concentration mitochondriale en Ca<sup>2+</sup> a pu initier un processus de transition de perméabilité membranaire de sorte que des événements apoptotiques ou nécrotiques ont pu survenir dans ce muscle (Lemasters *et al* 1998), éliminant ainsi les mitochondries endommagées.

Dans le *gastrocnemius*, les mitochondries sont moins riches en Ca<sup>2+</sup> et sont théoriquement moins sollicitées en cas d'une élévation du Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique grâce à l'efficacité du RS. L'élévation de la concentration du cation dans la matrice n'a vraisemblablement pas suffi pour déclencher l'apoptose, mais a pu induire l'autophagie des mitochondries les plus susceptibles au stress calcique (Lemasters *et al* 1998), ce qui tend à être confirmé par la baisse d'activité de la citrate synthase dans ce muscle. Néanmoins, elle a induit une stimulation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour toutes les mitochondries présentes. Le traitement a également provoqué une diminution de l'activité GPX, directement impliquée dans le contrôle des concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Antunes *et al* 2002). Les mécanismes expliquant cet effet restent à déterminer. Par ailleurs, l'effet de la surcharge calcique sur le stress oxydant est spécifiquement situé au niveau mitochondrial, puisque les activités antioxydantes non mitochondriales (dans le muscle) n'étaient pas modifiées par le traitement.

La première conclusion que l'on peut tirer de ce travail est que les rats âgés sont plus vulnérables au stress calcique que les rats adultes pour lesquels l'injection de A23187 n'a eu aucun effet. Nos résultats démontrent également que l'augmentation des concentrations calciques mitochondriales a la capacité de favoriser la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la chaîne respiratoire et qu'il y a une relation inverse entre la masse du muscle et la teneur mitochondriale en calcium. Ces résultats permettent de penser que des altérations de l'homéostasie calcique pourraient jouer un rôle dans le développement de la sarcopénie. Pourtant, alors que nos résultats suggèrent que les muscles oxydatifs sont plus sensibles à un stress calcique que les muscles glycolytiques, on sait que les muscles oxydatifs sont moins affectés par la sarcopénie. D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre ces relations complexes.

## 7 / Synthèse et perspectives

L'objectif de ce travail a été de déterminer si une évolution de la production mitochondriale d'EAO au cours du vieillissement pouvait provoquer un stress oxydant dans le muscle. En effet, l'analyse de la littérature montre que le stress oxydant pourrait être l'un des éléments responsables de la sarcopénie. Il est important d'en comprendre les mécanismes, car préserver la masse musculaire, c'est préserver la capacité de restauration d'un état de bonne santé de personnes âgées et favoriser leur autonomie et leur qualité de vie.

Ainsi, nous avons évalué les mécanismes et l'évolution avec l'âge de la production d' $H_2O_2$  par les mitochondries isolées de muscles oxydatifs ou glycolytiques. Lorsque cela a été possible, nous avons étudié en parallèle l'activité des principales enzymes anti-oxydantes. En effet, le stress oxydant est dépendant des taux de production d'EAO et de l'activité des systèmes antioxydants qui les neutralisent.

Chez le rat, dans un muscle glycolytique, la production mitochondriale d' $H_2O_2$  évaluée avec des substrats des complexes I ou II n'évoluait pas entre 4,5 et 24 mois. Dans un muscle oxydatif, cette production, évaluée avec des substrats du complexe I était plus élevée chez des rats âgés que chez des rats jeunes. Chez l'homme, dans le muscle *vastus lateralis* (métabolisme glycolytique), la production mitochondriale d' $H_2O_2$  déterminée en présence d'un mélange de substrats des complexes I et II augmentait avec l'âge. Nous avons montré que cette production était liée au flux inverse d'électrons entre les complexes II et I.

Ainsi, en résumé, on peut penser que dans les muscles glycolytiques, la production mitochondriale d' $H_2O_2$  induite par le flux normal d'électrons le long de la chaîne respiratoire reste stable avec l'âge. En revanche, le flux inverse du complexe II vers le complexe I semble être impliqué dans un accroissement de cette production. La réduction de l'activité de la GPX observée pourrait aggraver ce phénomène. Dans les muscles oxydatifs, la production mitochondriale d' $H_2O_2$  induite par le flux normal d'électrons augmente avec l'âge (nous n'avons pas testé le flux inverse dans ce type de muscles). Ainsi, on peut conclure que le taux de production d' $H_2O_2$  par les mitochondries augmente avec l'âge dans tous les types musculaires. Il reste à déterminer les consé-

quences réelles de ce stress oxydant d'origine mitochondriale sur le vieillissement musculaire.

L'hypothèse selon laquelle le niveau de production mitochondriale d' $H_2O_2$  peut jouer un rôle dans la fonte musculaire semble néanmoins confirmée. En effet, la production mitochondriale d' $H_2O_2$  et les niveaux d'oxydation sont plus élevés dès l'âge adulte dans les muscles glycolytiques que dans les muscles oxydatifs. Or ils sont plus affectés par la sarcopénie.

Le mécanisme exact de ce phénomène reste cependant inconnu. En effet, alors qu'une aggravation du stress oxydant d'origine mitochondriale devrait en premier lieu affecter les mitochondries, il est difficile de mettre en évidence une évolution de ces altérations en fonction de l'âge. Ainsi, ni le degré d'oxydation des protéines mitochondriales, ni l'activité des complexes de la chaîne respiratoire n'ont varié, que ce soit chez l'homme ou chez le rat.

Cette absence de parallélisme dans l'évolution de ces paramètres et de la production mitochondriale d'EAO en fonction de l'âge suggère que l'augmentation de cette dernière n'avait qu'un impact limité au moment des observations. Elle n'aurait donc pas d'effet majeur à court terme sur le vieillissement musculaire. En revanche, elle pourrait contribuer à fragiliser le tissu et se manifester plus particulièrement lors d'un stress, ou dans le grand âge (au delà de 24 mois chez le rat ou de 75 ans chez l'homme) lorsqu'elle a pu avoir une action prolongée.

Cette conclusion est cohérente avec les résultats obtenus lorsque les muscles de rat ont été soumis à un stress calcique par l'injection du ionophore A23187 car les effets qui pourraient résulter d'un stress oxydant d'origine mitochondriale ne se sont manifestés que chez les rats âgés (accroissement de la production mitochondriale d' $H_2O_2$ , de l'activité de la Mn SOD dans le muscle *gastrocnemius*, atrophie du *soleus*).

De l'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail émerge donc une réponse claire à la question initiale sur le rôle potentiel de la production mitochondriale d'EAO dans le développement de la sarcopénie associée au vieillissement. De nouvelles approches physiologiques qui viseront à prolonger l'analyse des relations entre les variations de cette production et les perturbations métaboliques qu'elles peuvent

susciter devront être mises en oeuvre. Plusieurs facteurs physiologiques ont déjà été proposés, notamment la restriction énergétique, peut être en liaison avec le statut insulémique (Lambert et Merry 2004), l'exercice, en partie en rapport avec le métabolisme calcique, l'état inflammatoire et le grand âge. Or ces facteurs sont connus pour interférer avec les phénomènes du vieillissement musculaire.

De nouvelles questions sont aussi apparues, qui concernent les mécanismes mitochondriaux impliqués, d'autres origines possibles pour le stress oxydant et ses conséquences métaboliques.

Ainsi, parmi les mécanismes de cette production mitochondriale d'EAO et de sa régulation, le rôle du flux inverse d'électrons dans l'augmentation de la production mitochondriale d'EAO en fonction de l'âge devra être précisé, notamment dans les muscles oxydatifs, chez d'autres espèces et dans diverses situations physiologiques. En effet, il a été très rarement étudié et nos observations mettent en évidence son implication dans les phénomènes associés au vieillissement.

Ce travail était focalisé sur la production d'EAO par les mitochondries, mais on sait que d'autres sources d'EAO peuvent aussi être à l'origine d'un stress oxydant dans la fibre musculaire. Un travail exploratoire original a d'ailleurs suggéré que la contribution de ces autres sources à l'augmentation de la production musculaire d'EAO au cours du vieillissement, pourrait être importante. Ce point devra être éclairci et s'il est confirmé, il conviendra de poursuivre l'analyse de l'activité de ces diverses sources et, pour chacune, de leur régulation.

Enfin, les effets sur le métabolisme protéique musculaire des variations des différentes formes de production d'EAO dans le muscle devront être précisés car il est possible que leurs cibles et/ou leur impact soient plus ou moins spécifiques, et qu'elles soient à l'origine :

- soit d'adaptations métaboliques diverses puisqu'un rôle signal a été attribué à certaines EAO ou composés résultant de leur action.

- soit de perturbations à contrôler pour en limiter les effets délétères.

Une meilleure connaissance de ces phénomènes devrait permettre de choisir les moyens (renforcement des défenses antioxydantes, réduction plus

ou moins spécifique de la production d'EAO, stimulation du turnover protéique) adaptés pour limiter la sarcopénie et permettre au muscle d'assurer ses fonctions essentielles au maintien ou à la récupération d'un état de bonne santé.

## Remerciements

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Frédéric Capel,

financée par l'Action Transversale INRA «Mitochondrie et Biologie du Muscle» (AT2M), sous la Direction de Philippe Patureau Mirand et Laurent Mosoni. Ils ont impliqué des collaborations avec Virginie Rimbart et Béatrice Morio d'une part, et Luc Demaison d'autre part. Nous adressons tous nos remerciements aux participants de l'action AT2M qui ont contribué à ce travail au cours des nombreux échanges scientifiques qui ont pu avoir lieu, et en particulier à Patrick Herpin qui a mis en

place et animé cette action. Nous remercions également Daniel Ricquier qui a bien voulu faire partie du comité de thèse, ainsi que Roland Favier et Xavier Leverve pour leurs conseils. Merci enfin à l'INRA qui a financé cette thèse à travers l'action AT2M.

## Références

- Antunes F., Han D., Cadenas E., 2002. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification *in vivo* conditions. *Free Rad. Biol. Med.*, 33, 1260-1267.
- Barja G., 1998. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann. NY Acad. Sci.*, 854, 224-238.
- Barja G., 1999. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in state 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biom.*, 31, 347-366.
- Beckman K.B., Ames B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78, 547-581.
- Bejma J., Ji L.L., 1999. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 87, 465-470.
- Capel F., Buffière C., Patureau Mirand P., Mosoni L., 2004. Differential variation of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release during aging in oxidative and glycolytic muscles in rats. *Mech. Ageing Dev.*, 125(5), 367-373.
- Capel F., Rimbart V., Lioger D., Diot A., Rousset P., Mirand P.P., Boirie Y., Morio B., Mosoni L., 2005a. Due to reverse electron transfer, mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release increases with age in human *vastus lateralis* muscle although oxidative capacity is preserved. *Mech. Ageing Dev.*, 126(4), 505-511.
- Capel F., Demaison L., Maskouri F., Diot A., Buffière C., Patureau Mirand P., Mosoni L., 2005b. Calcium overload increases oxidative stress in old rat *gastrocnemius* muscle. *J. Physiol. Pharmacol.*, 56(3), 369-380.
- Carmeli E., Coleman R., Reznick A.Z., 2002. The biochemistry of aging muscle. *Exp. Gerontol.*, 37, 477-489.
- Chance B., Sies H., Boveris A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59, 527-605.
- Cohn S.H., Vartsky D., Yasumura S., Sawitsky A., Zanzi I., Waswani A., Ellis K.J., 1980. Compartmental body composition based on total-body nitrogen, potassium, and calcium. *Am. J. Physiol.*, 239, E524-E530.
- Dabadie P., Bendriss P., Erny P., Mazat J.P., 1987. Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. *FEBS Letters*, 226, 77-82.
- Denton R.M., Richards D.A., Chin J.G., 1978. Calcium ions and the regulation of NAD<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem. J.*, 176, 899-906.
- Drew B., Phaneuf S., Dirks A., Selman C., Gredilla R., Lezza A., Barja G., Leeuwenburgh C., 2003. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in *gastrocnemius* muscle and heart. *Am. J. Physiol.*, 284, R474-R480.
- Hollander J., Bejma J., Ookawara T., Ohno H., Ji L.L., 2000. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mech. Ageing Dev.*, 116, 33-45.
- Jana C.K., Das N., Sohal R.S., 2002. Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 397, 433-439.
- Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*, 495, 12-25.
- Lambert A.J., Merry B.J., 2004. Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *Am. J. Physiol.*, 286, R71-R79.
- Lawler J.M., Powers S.K., Visser T., Van Dijk H., Kordus M.J., Ji L.L., 1993. Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes effects of fiber type and age. *Am. J. Physiol.*, 265, R1344-R1350.
- Leeuwenburgh C., Fiebig R., Chandwaney R., Ji L.L., 1994. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am. J. Physiol.*, 267, R439-R445.
- Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T., Trost L.C., Elmore S.P., Nishimura Y., Crowe R.A., Cascio W.E., Bradham C.A., Brenner D.A., Herman B., 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366, 177-196.
- Liu Y., Fiskum G., Schubert D., 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.*, 80, 780-787.
- Mosoni L., Breuillé D., Buffière C., Oblet C., Patureau Mirand P., 2004. Age-related changes in glutathione availability and skeletal muscle carbonyl content in healthy rats. *Exp. Gerontol.*, 39, 203-210.
- Narayanan N., Jones D.L., Xu A., Yu J.C., 1996. Effects of aging on sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in skeletal muscles of the rat. *Am. J. Physiol.*, 271, C1032-C1040.
- Oh-Ishi S., Kizaki T., Yamashita H., Nagata N., Suzuki K., Taniguchi N., Ohno H., 1995. Alterations of superoxide dismutase iso-enzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.*, 84, 65-76.
- Rasmussen H.N., Andersen A.J., Rasmussen U.F., 1997. Optimization of preparation of mitochondria from 25-100 mg skeletal muscle. *Anal. Biochem.*, 252, 153-159.
- Rasmussen U.F., Krstrup P., Kjaer M., Rasmussen H.N., 2003. Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging - a study of isolated human skeletal muscle mitochondria. *Exp. Gerontol.*, 38, 877-886.
- Reznick A.Z., Packer L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.*, 233, 357-363.
- Rimbart V., Boirie Y., Bedu M., Hocquette J.F., Ritz P., Morio B., 2004. Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity. *Faseb J.*, 18, 737-739.
- Sembrowich W.L., Quintinskie J.J., Li G., 1985. Calcium uptake in mitochondria from different skeletal muscle types. *J. Appl. Physiol.*, 59, 137-141.
- Servais S., Couturier K., Koubi H., Rouanet J.L., Desplanches D., Sornay-Mayet M.H., Sempore B., Lavoie J.M., Favier R., 2003. Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.*, 35, 24-32.
- St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.*, 277, 44784-44790.
- Staniek K., Nohl H., 1999. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *Bioch. Biophys. Acta*, 1413, 70-80.
- Sztark F., Malgat M., Dabadie P., Mazat J.P., 1998. Comparison of the effects of bupivacaine and ropivacaine on heart cell mitochondrial bioenergetics. *Anesthesiol.*, 88, 1340-1349.

Tonkonogi M., Fernstrom M., Walsh B., Ji L.L., Rooyackers O., Hammarqvist F., Wernerman J., Sahlin K., 2003. Reduced oxidative power but unchanged antioxidative capacity in skeletal muscle from aged humans. *Pflü. Archiv Eur. J. Physiol.*, 446, 261-269.

Viner R.I., Ferrington D.A., Williams T.D., Bigelow D.J., Schoneich C., 1999. Protein mo-

dification during biological aging: selective tyrosine nitration of the SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in skeletal muscle. *Biochem. J.*, 340, 657-669.

Yan L.J., Levine R.L., Sohal R.S., 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *P.N.A.S.*, 94, 11168-11172.

Yan L.Y., Sohal R.S., 1998. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *P.N.A.S.*, 95, 12896-12901.

Young V.R., Munro H.N., Fukagawa N., 1989. Protein and functional consequences of deficiency. *Nutrition in the Elderly*, Oxford University, New York, 65-84.

## Résumé

Le vieillissement s'accompagne d'une perte de masse musculaire qui contribue à l'affaiblissement des capacités de défenses de l'organisme, et à la réduction de la mobilité et de l'autonomie des personnes âgées. Ce travail a été entrepris pour déterminer si le stress oxydant pouvait être impliqué dans ce phénomène, et en particulier la mitochondrie, forte productrice d'espèces actives de l'oxygène.

Nous avons montré dans les muscles glycolytiques que la production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PMH) induite par le flux inverse d'électrons entre les complexes II et I augmentait avec l'âge. Dans les muscles oxydatifs, la PMH induite par un flux d'électrons à partir du complexe I augmentait également. La PMH semble donc augmenter avec l'âge dans tous les types musculaires et la réduction de l'activité de la GPX dans les muscles glycolytiques pourrait accroître les conséquences de ce phénomène. Cependant, d'autres paramètres mitochondriaux (respiration, activités des complexes II à IV) n'étaient pas modifiés. De plus, un stress calcique provoqué par l'injection d'un ionophore (A23187) n'a pas eu d'effet chez des rats jeunes, alors qu'il a induit une atrophie du muscle *soleus* et un accroissement de la PMH dans le muscle *gastrocnemius* chez les rats âgés.

L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'augmentation de la PMH au cours du vieillissement n'a pas d'effet majeur à court terme sur le vieillissement musculaire. Elle pourrait avoir un effet à long terme, notamment dans le grand âge et/ou contribuer à accentuer la fragilisation du tissu âgé, en particulier en réponse à un stress.

## Abstract

### *Role of mitochondria in the development of oxidative stress in skeletal muscle during aging*

During aging, a loss of muscle mass (sarcopenia) is observed. This phenomenon contributes to a decrease in the organism defence capacities, and lowers mobility and autonomy of elderly individuals. This work was undertaken to determine if oxidative stress could be implicated in sarcopenia, and in particular free radicals produced by mitochondria.

We showed that in glycolytic muscles, mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (MHP) derived from reverse electron flow between II and I complexes increased with age. In oxidative muscles, MHP derived from normal electron flow also increased. Thus, MHP increases with age in all muscle types, and the observed reduction of GPX activity in glycolytic muscles could aggravate the consequences of this phenomenon. However, other mitochondrial parameters remained unchanged with age (respiration, complex II to IV activities). In addition, calcium stress (induced by in vivo injection of the A23187 ionophore) had no effect in young rats, but induced muscle atrophy in the *soleus*, and an increase in MHP in the *gastrocnemius* of old rats.

These results suggest that MHP increase during healthy aging has no major effect on muscle aging on a short-term basis. It could have a significant effect in older ages, and/or contribute to a lower resistance of aged muscle to stress as observed with calcium.

CAPEL F., DEMAISON L., MORIO B., RIMBERT V., PATUREAU MIRAND P., MOSONI L., 2006. Rôle des mitochondries dans le développement d'un stress oxydant dans le muscle squelettique au cours du vieillissement. *INRA Prod. Anim.*, 19, 305-318.

