



UNIVERSITÉ DE NANTES



Université de Nantes

U.F.R. des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Laboratoire «Motricité, Interactions, Performance»

École Doctorale

« Cognition, Éducation, Interactions »

Année 2014

N° BU :

THÈSE

*En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Nantes*

Spécialité: Physiologie

*Présentée et soutenue publiquement
Par*

Rémi DELFOUR-PEYRETHON

le 30 Octobre 2014

**Effets de l'acidose métabolique mis en exergue par une alcalose
induite sur la performance et les réponses physiologiques,
cellulaires et moléculaires du muscle strié squelettique au cours
d'exercices de haute-intensité**

Direction de Thèse: Claire THOMAS-JUNIUS et Christine HANON

Codirection: Sylvain DOREL

Jury :

Président :

Laurent BOSQUET,

Professeur, Université de Poitiers

Rapporteurs :

Edith FILAIRE

Professeur, Université d'Orléans

Laurent MESSONNIER

Professeur, Université de Savoie

Examineur :

Frédéric DAUSSIN

Docteur, Université de Lille 2

Remerciements

L'ensemble des travaux de recherche présenté dans ce document a pu être réalisé grâce à l'interaction de nombreuses personnes et de conditions, ce qui m'a toujours permis de travailler dans un environnement optimal. Je tiens par conséquent à remercier sincèrement l'ensemble de celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ces études.

Tout d'abord un immense remerciement à mes deux directrices de thèse les Docteurs **Claire THOMAS-JUNIUS** et **Christine HANON**, sans qui ce projet de thèse n'aurait pu exister, progresser et aboutir. J'ai bien conscience que c'est grâce à vous que j'ai pu apprendre autant. Merci pour votre enthousiasme, votre confiance et votre disponibilité. Ce fut un réel plaisir de partager toutes ces heures à vos côtés sur des problématiques passionnantes, et j'espère en partager encore !

Je remercie le Docteur **Sylvain DOREL**, d'avoir accepté de me co-diriger et de m'avoir formé sur un des outils qui m'a été le plus utile tout au long de mes travaux : la Lode !!! Je sais que grâce à toi j'ai pu épargner pas mal de temps et éliminer au moins autant de stress!

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de participer à la soutenance de cette thèse en commençant par le Professeur **Laurent BOSQUET** pour avoir accepté de présider le jury.

Je remercie vivement le Professeur **Edith FILAIRE** ainsi que le Professeur **Laurent MESSONNIER** pour évaluer ce document en tant que rapporteurs de ce travail.

Je remercie aussi sincèrement le Docteur **Frédéric DAUSSIN** pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie le Professeur **Elisabeth ROSNET**, ex-directrice du laboratoire de la mission recherche de l'INSEP, de m'avoir accueilli, soutenu et encouragé dans le développement des différents projets de ma thèse.

Je remercie sincèrement tous les membres des différents laboratoires dans lesquels j'ai pu travailler au cours de ces années. Je pense particulièrement à l'équipe du service recherche de l'Institut National des Sports, de l'Expertise et de la Performance avec qui j'ai toujours pu

échanger et partager sur mon travail. Je pense aussi à tous mes collègues du laboratoire Institute of Sport, Exercise and Active Living de l'Université de Victoria de Melbourne. Je remerci notamment le Professeur **David BISHOP**. Merci pour ton accueil, tes conseils si constructifs et ton aide apportée pendant cette année 2011-2012. Cette partie de ma thèse restera sans aucun doute une expérience à part. Enfin, je remercie le Professeur **Jacques MERCIER** et le Docteur **Karen LAMBERT**, de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1046, pour m'avoir accueilli, formé et suivi tout au long de mes analyses réalisées à Montpellier. Je tiens aussi à remercier le Docteur **François HUG** pour son support institutionnel et sa collaboration scientifique. Merci aussi au Professeur **Stéphane PERREY** pour ses nombreux conseils scientifiques.

Je tiens aussi à remercier vivement la **Fédération Française de Cyclisme** pour leur soutien aussi bien scientifique qu'institutionnel. Merci notamment à **Florian ROUSSEAU** et **Franck DURIVAUX** qui se sont toujours rendus disponibles et ont toujours été à l'écoute lors de l'élaboration, la réalisation et les comptes rendus de nos expérimentations. Je remercie aussi le **Ministère des Sports** pour son soutien financier.

Un immense merci à toutes les personnes qui ont bien voulu prendre part à mes études, je pense aux cyclistes du Pôle France de l'INSEP, à ceux des différents clubs d'Ile-de-France et aux nombreuses personnes qui m'ont aidé dans mes pré-manip'. Sans eux, mes travaux n'auraient tout simplement pas pu voir le jour. J'adresse une mention spéciale à tous les australiens qui ont accepté de subir (avec courage) les biopsies musculaires.

Bien-sûr, merci à tous mes collègues et amis rencontrés dans les différents laboratoires. Je pense à toute la fine équipe de l'INSEP, **Rachel, Antho, Laurie-Anne, Anaël, Caro et Cyril**, avec vous je ne compte plus les bons moments passés et les nombreux échanges. Je pense aussi à mes amis du bout du monde **Cian, Rod, Cesare, Chris, James, Cédric, Brad et Jess**, merci pour tout ce que vous m'avez apporté, je ne pourrai pas résumer ici la riche année passée avec vous. Enfin, merci à **Jess, Odile et Marie**, grâce à vous les journées « 8/20h western-blots » passaient plus vite.

Je remercie aussi **Yann, Samet, Dada, PA, Jey, Zamo, Tom, Ben, Mike, YannB, Pierre, Cuc's, Kévina...** (et la liste pourrait encore s'allonger) pour votre amitié si importante depuis toutes ces années. C'est grâce à vous si je ne suis pas devenu un « doctorant-ermite ».

Un million de mercis à **mes parents** et **mon frère** dont le soutien et la confiance m'auront toujours permis d'avancer au cours de cette aventure. Vous êtes pour beaucoup dans la réalisation de ces travaux. Il y a 10 ans il n'est pas sûr que l'on ait parié sur ce genre de parcours...

Enfin, merci à toi, **Océane**, de m'avoir supporté dans les moments difficiles ainsi que pour ton soutien indéfectible. Surtout, merci d'avoir été aussi compréhensive pendant ces années, lorsque des décisions importantes à prendre s'imposaient...et d'être partie avec moi au bout du monde.

Table des matières

Liste des abréviations	12
Table des Illustrations :	14
Liste des tableaux :	18
Avant propos.	20
Partie I. Revue de Littérature.....	23
Chapitre I. Définition et caractérisation des exercices de hautes intensités	24
A. Introduction générale.....	24
1. Caractéristiques des exercices réalisés à intensité maximale.....	24
2. Réponses du métabolisme énergétique au cours d'exercices de haute intensité d'une durée inférieure ou égale à 30 sec.....	24
a) La production d'ATP.	26
b) Le métabolisme de la phosphocréatine (PCr).	26
3. Fatigue engendrée par des exercices de haute intensité.	31
a) Fatigue engendrée par des exercices de haute intensité continus d'une durée inférieure ou égale à 30 sec.	31
❖ Fatigue et perturbation de l'approvisionnement énergétique.	31
❖ Origine des protons et inhibition de la production énergétique (Stewart HDR Claire).....	32
❖ Fatigue et facteurs précédant la formation des ponts d'union ?	34
b) Fatigue engendrée par des exercices de haute intensité intermittents de courte durée.....	35
B. Conséquences physiologiques des exercices de hautes intensités.	39
Chapitre II. Mécanismes responsables de la production d'énergie au cours d'exercices de haute intensité.	40
A. Production d'énergie au cours d'exercices de haute-intensité.....	40
B. Le lactate : un intermédiaire métabolique.....	41
C. La capacité oxydative du muscle:	44
1. Fonction et fonctionnement de la mitochondrie (Figure 8)	44
2. La biogenèse mitochondriale	47
a) Généralités	47
b) Effet de l'entraînement sur la BM	50
c) Effet de l'exercice aigu sur la BM	51
3. Le lactate : un carburant de la mitochondrie et un précurseur de la BM.....	52
4. Production d'espèces oxygénées réactives (EOR) liée à l'activité mitochondriale.....	54
a) EOR et exercices en aérobie.....	55

b)	EOR et exercices en anaérobie.....	57
❖	Respiration mitochondriale et stress oxydatif.....	57
Chapitre III. Acidose métabolique et régulation de l'équilibre acido-basique		60
A.	Effets de l'acidose sur les fonctions métaboliques	60
1.	Caractéristique de l'acidose d'un point de vue métabolique	60
2.	Conséquence de l'acidose sur l'activité contractile	60
3.	Conséquence potentielles de l'acidose métabolique sur le transport O ₂	63
a)	Observation de la chute de VO ₂ au cours de l'exercice intense mené à l'épuisement.....	63
❖	Hypothèses permettant d'expliquer la chute de VO ₂	65
❖	Acidose métabolique et chute de VO ₂	65
b)	Oxygénation musculaire.....	67
c)	Influence de l'acidose métabolique sur la respiration mitochondriale.....	68
B.	Régulation de l'équilibre acido-basique.....	70
1.	L'importance de la capacité tampon.....	70
2.	La complémentarité des protéines de transports (MCT, NHE1, NBCe1). (Figure 14)	75
a)	Leur localisation.	75
❖	MonoCarboxylates Transporters (MCT).....	75
❖	Les MCT1.	75
❖	Les MCT4.	75
❖	Localisations intracellulaire des MCT1 et MCT4.....	76
❖	Les NHE.....	76
❖	Les NBC.....	77
b)	Leur fonction et mécanismes de fonctionnement	78
❖	Fonctionnement des MCTs et regulation du pH.....	79
❖	Fonctionnement des NHEs et regulation du pH	80
❖	Fonctionnement des NBCs et régulation du pH	81
c)	Leur régulation par l'exercice aigu	83
❖	MCT1 et MCT4:.....	83
d)	Possibles mécanismes impliqués dans la régulation.....	85
Chapitre IV. Manipulation de l'équilibre acido-basique par supplémentation en bicarbonate de sodium.		87
A.	Effet sur les paramètres métaboliques	88
B.	Effet sur la performance	90
C.	Effet sur la production d'énergie mitochondriale.....	93
D.	Effet sur la capacité tampon	96

E.	Effet sur les protéines de transport sarcolemmal.....	98
Partie II.	Objectifs généraux des études expérimentales.....	100
Partie III.	METHODOLOGIE GENERALE	104
Chapitre I.	Présentation des études.....	105
A.	Recrutement des participants.....	105
1.	Etude n°1.....	105
2.	Etude n°2.....	107
3.	Etude n°3.....	110
Chapitre II.	Supplémentation et nutrition (Etude n°1, 2 et 3).....	112
A.	Supplémentations	112
1.	Restrictions générales pré-tests.....	112
2.	Hydratation	112
B.	Tests des exercices musculaires réalisés sur ergocycle.....	113
1.	Echauffement pré-tests en laboratoire (Force-Vitesse, Temps limite, all-out 70 sec, test de Wingate et test de 3x30 sec) (Etude n°2 et 3)	113
2.	Echauffement pré-tests sur piste de cyclisme (3 x 500 mètres) (Etude n°1)	113
3.	Mesure de la consommation d'oxygène. (Etude n°2 et 3).....	113
4.	Test de force-vitesse. (Etude n°2 et 3).....	115
5.	Test de temps limite (T_{lim}) (Etude n°2)	116
6.	Test all-out de 70 sec. (Etude n°2)	116
7.	Test all-out de 3 x 500 mètres. (Etude n°1).....	118
8.	Test de Wingate (Etude n°3)	118
9.	Test de 3 x 30 sec. (Etude n°3)	118
C.	Test de sauts verticaux. (Etude n°1).....	120
D.	Evaluation de la perception de l'effort. (Etude n°1 et 3).....	120
E.	Prélèvements sanguins. (Etude n°1, 2 et 3).....	121
1.	Technique.....	121
2.	Analyses	121
F.	Paramètres respiratoires. (Etude n°2)	122
1.	Technique et analyses.....	122
G.	Réponses cardiaques (Etudes n°2).....	123
1.	Techniques.....	123
2.	Analyses.	123

H.	Biopsies musculaires. (Etude n°3).....	124
1.	Technique.....	124
2.	Analyses	126
a)	Western Blots (Etude n°3).....	126
b)	Quantification des protéines oxydées (kit OxyBlot S7150) (Tableau 21) (Etude n°3).....	132
c)	Quantification de la peroxydation lipidique. (AB5605, Millipore) (Etude n°3)	134
d)	Mesure de l'activité citrate synthase. (CS) (Etude n°3).....	135
e)	Mesure de la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées. (Etude n°3)	136
❖	Préparation des fibres	136
❖	Mesure de la consommation d'oxygène des fibres.....	138
f)	Mesures musculaires du pH et de la [H ⁺]. (Etude n°3)	141
g)	Mesure de la capacité tampon musculaire (in vitro). (Etude n°3)	141
Partie IV. RESULTATS DES RECHERCHES.....		143
Chapitre I. Etude n°1 : « Effets d'une supplémentation en NaHCO₃ sur les performances et les paramètres métaboliques lors de sprints répétés (3x500-m) et de squat-jumps chez les cyclistes sur piste de l'équipe de France. ».....		144
A.	Méthodologie spécifique	144
1.	Caractéristiques des participants.....	144
2.	Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.....	144
3.	Analyses statistiques.....	144
B.	Résultats.....	145
1.	Effets de l'exercice et de l'alcalose induite sur les paramètres sanguins.....	145
2.	Performances mécaniques.....	147
3.	Perception de l'effort.....	148
C.	Discussion des résultats de l'étude n°1.....	150
Chapitre II. Etude n°2 : « Etude de la VO₂, de paramètres cardio-respiratoires, de paramètres métaboliques et de la performance d'athlètes entraînés au cours d'un exercice de pédalage supramaximal : situation d'acidose versus alcalose. ».....		154
A.	Méthodologie spécifique: expérimentation A.....	155
1.	Caractéristiques des participants.....	155
2.	Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.....	155
3.	Analyse statistique.....	155
B.	Résultats.....	156

1.	Performance	156
a)	Tests de Force-Vitesse et VO_{2max}	156
b)	Tests de temps limite	156
2.	Paramètres métaboliques.....	156
a)	Effets de l'exercice sur les paramètres sanguins.....	156
b)	Effets de l'exercice sur les paramètres cardio-respiratoires	157
❖	Réponses ventilatoires	157
❖	Réponses cardiaques.....	159
3.	Relations entre la chute de VO_2 , les réponses métaboliques, respiratoires et cardiaques.	160
C.	Discussion des résultats de l'expérimentation A.....	161
1.	Pic de VO_2	161
2.	Chute de VO_2	161
3.	Données métaboliques et chute de VO_2	162
4.	Coût respiratoire et fatigue des muscles respiratoires.....	163
5.	Réponses cardio-respiratoires et chute de VO_2	164
6.	Conclusions.....	164
D.	Méthodologie spécifique: expérimentation B.....	166
1.	Caractéristiques des participants.....	166
2.	Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.....	166
3.	Analyses statistiques.....	166
E.	Résultats.....	167
1.	Exercice incrémental.....	167
2.	Réponses métaboliques sanguines.....	167
3.	Sprint de 70 sec all-out	169
4.	Réponses ventilatoires.....	170
F.	Discussion des résultats de l'expérimentation B.....	172
1.	Chute de VO_2 et acidose	172
2.	Chute de la VO_2 et chute de la VE	173
3.	Chute de la VO_2 et acidose intracellulaire.....	173
4.	Chute de VO_2 et performance.....	174
5.	Chute de VO_2 et réponses des athlètes.....	174
6.	Conclusion.....	175

Chapitre III. Etude n°3 : « Effets combinés de la réalisation de sprints répétés et de l'alcalose induite sur les protéines de transports membranaires impliquées dans la régulation du pH musculaire, et la respiration mitochondriale chez des sujets sains. »176

A. Méthodologie spécifique.....	177
1. Caractéristiques des participants.....	177
2. Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.....	177
3. Analyses statistiques.....	177
B. Résultats.....	178
1. Paramètres sanguins en réponse à l'exercice et à l'alcalose induite.....	178
2. pH et [H ⁺] musculaires en réponse à l'exercice et à l'alcalose induite.....	180
3. Performances mécaniques et perception de l'effort.....	181
a) Performance lors du test 3 x 30 sec all-out.....	181
b) Notations sur les échelles de Börg (6-20 et 1-10).....	181
4. Effets de l'exercice sur l'expression des protéines musculaires squelettiques.....	182
5. Effets de l'alcalose induite sur l'expression des protéines musculaires squelettiques.....	183
6. Effets de l'exercice et de l'alcalose induite sur le stress oxydatif d'un muscle squelettique.....	185
7. Effets de l'exercice et de l'alcalose sur l'expression de protéines liées à l'activité mitochondriale.....	185
a) Contenu en PGC1 α	185
b) Contenu en COX IV.....	185
8. Effets de l'exercice et de l'alcalose induite sur les paramètres de respiration mitochondriale.....	186
a) Dosage de la Citrate Synthase (CS).....	186
b) Mesure de la respiration mitochondriale.....	186
C. Discussion des résultats de l'étude n°3.....	187
1. Méthodologie.....	187
a) Supplémentation.....	187
b) Test des sprints répétés.....	188
2. Effets de l'exercice de haute intensité sur l'expression des protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire.....	188
c) Effets de l'exercice aigu sur les contenus en MCTs et CD147.....	188
3. Effets de l'exercice à haute intensité et de l'alcalose induite sur la régulation de l'expression de MCT1, CD147 et NHE1: effet du stress oxydatif.....	191
4. Effet de l'exercice aigu et de l'alcalose induite sur la respiration mitochondriale.....	193
5. Futures études.....	193
6. Résumé des principales conclusions.....	194
Partie V. SYNTHÈSE ET CONCLUSION.....	195
Chapitre IV. Discussion Méthodologique.....	196
A. Population.....	196
B. Supplémentation.....	196

C. Choix des tests.	196
1. Test du 3x500 m.	197
2. Test de T_{lim} et test de 70 sec.	197
3. Test de 3x30 sec.	197
D. Consommation d'oxygène.	198
E. Western blots.....	198
F. Respiration mitochondriale.	198
G. Futures recherches	199
Chapitre V. Conclusion.....	200
Partie VI. REFERENCES.....	201
Partie VII. ANNEXES.....	224
A. Annexe n° 1.....	225
B. Annexe n°2.	236
C. Annexe n°3.	262
D. Annexe n°4.	286

Liste des abréviations

[X] : Concentration	GLUT : Transporteur de glucose
ADN : Acide désoxyribonucléique	HbO₂ : Hémoglobine saturée en O ₂
ADN_{mt} : ADN mitochondrial	HCO₃⁻ : Bicarbonate
ADP : Adénosine-Diphosphate	HDAC : histone désacétylase
AMP : Adénosine-Monophosphate	HHb : Hémoglobine désaturée en O ₂
AMPK : 5' AMP-activated protein kinase	IF : Index de fatigue
ARN : Acide ribonucléique	La : Lactate
ARN_{mt} : ARN mitochondrial	LDH : Lactate déshydrogénase
ARN_{nuc} : ARN nucléaire	MCT : Transporteur des monocarboxylates
ATP : Adénosine-Triphosphate	MEF2 : Facteur de croissance des myocytes 2
BIC : Condition bicarbonate de sodium	NADH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide
β_{totale} : Capacité tampon totale	NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium
β_m : Capacité tampon musculaire	NBC : Co-transporteur Sodium/Bicarbonate
BM : Biogénèse mitochondriale	NHE : Echangeur Sodium/Hydrogène
CI (II/III/IV/V) : Complexe I(II/III/IV/V)	NRF1 : Facteur respiratoire nucléaire 1
CA : Anhydrase Carbonique	p38 MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase
CaCO₃ : Carbonate de calcium	pAMPK : AMPK phosphorylé
CaMK II : Calcium calmodulin-dependent protein kinase II	PCr : Phospho-créatine
CCO : Consommation cumulée d'oxygène	P_{Δ30%} : Puissance du T _{lim}
CD147 : Cluster de différenciation 147	PDC : Pyruvate deshydrogénase complex
COX : Cytochrome C oxydase	PETCO₂ : Pression téléexpiratoire en CO ₂
CS : Citrate Synthase	PETO₂ : Pression téléexpiratoire en O ₂
CVF : Capacité Vitale Forcée	P_{fin} : Puissance finale
DRON : Dérivés réactifs d'oxygène/de nitrogène	pH_i : pH intracellulaire
EDL : extenseur digitorum longus	P_i : Phosphate inorganique
EOR : Espèces oxygénées réactives	
FADH : Flavine adénine dinucléotide	
FC : Fréquence cardiaque	
FR : Fréquence respiratoire	

PFK: Phosphofructokinase
PGC1 α : peroxisome proliferator activator
receptor γ coactivator-1 α
PLA: Condition placebo
P_m : Puissance moyenne
P_{max} : Puissance maximale
pPCO₂ : pression partielle en CO₂
pPO₂ : pression partielle en O₂
PMA : Puissance maximale aérobie
Q_c : Débit cardiaque
Q_s : Débit systolique
RL : Radicaux libres
SO : Stress oxydatif
SOL : Soleus
TFAM : Facteur de transcription
mitochondrial A
T_{lim} : Test de temps limite
VC : Volume Courant
VCO₂ : Volume de CO₂ produit
VEF₁ : Volume Expiratoire Forcé en 1 sec
VIF : Volume Inspiratoire Forcé
VIF₁ : VIF en 1 sec
VL : Vastus Lateralis
V_{max} : Vitesse maximale
V_{opt} : Vitesse optimale
V_{s-max} : Vitesse sous-maximale
VO₂ : Volume d'oxygène consommé
VO_{2max} : Volume maximal d'oxygène
consommé

Table des Illustrations :

Figure 1 : Contribution respective des 3 filières au cours d'un exercice maximal de 90 sec. (Selon Gastin 2001)	25
Figure 2 : Schématisation des voies de transport (NAD ⁺ /NADH ₂) des protons au sein du muscle squelettique. (D'après Claire Thomas-Junius, 2012)	28
Figure 3 : Estimation de la contribution de l'énergie d'origine anaérobie et aérobie pendant différentes durées d'exercices maximaux. (Selon (Gastin, 2001)	29
Figure 4 : Cinétique du pH sanguin lors de 3min de repos après un sprint maximal de 30-sec sur tapis roulant. (Adapté de Glaister (Glaister, 2005))	33
Figure 5 : Utilisation de la phosphocréatine dans les fibres de type I et II au cours de deux séquences d'exercice maximal de 30 sec. (Selon Casey (Casey <i>et al.</i> , 1996b))	36
Figure 6 : Production d'ATP lors du 1 ^{er} et 10 ^{ème} sprint de 10 sec sur un total de 10 répétitions séparées de 30 sec de récupération. (Selon Glaister (Glaister, 2005), adapté de (Gaitanos <i>et al.</i> , 1993)	36
Figure 7 : Représentation de la navette extracellulaire du lactate (Fibre II : Fibre rapide, Fibre I : Fibre lente) (Modèle de (Brooks, 1986))	42
Figure 8: Représentation de la chaîne de respiration mitochondriale et ses différents inhibiteurs.	45
Figure 9: Schématisation des voies de l'activation de la biogénèse mitochondriale.	49
Figure 10 : Evolution de la VO ₂ au cours de tests de course de 400-m (◇), 800-m (■), et 1500-m (▲) running tests.	64
Figure 11 : Représentation des différents éléments constituant la capacité tampon totale. Données issues de Sahlin et Hultman 1980 (Hultman & Sahlin, 1980).	70
Figure 12 : Comparaison entre la [H ⁺] sortie de la cellule à l'aide du lactate et la consommation des ions H ⁺ par l'ensemble des tampons. D'après Robergs (Robergs <i>et al.</i> , 2004), adapté à partir des données de Spriet (Spriet <i>et al.</i> , 1987a, 1987b) et Sahlin (Sahlin <i>et al.</i> , 1978).	71
Figure 13 : Evolution de la capacité tampon musculaire mesurée par titration (β _{in vitro} ; mmol H ⁺ kg de muscle sec d.w.-1 pH-1) avant (■) et après (□) exercice dans le muscle entier et dans le muscle déprotéiné avant et après six semaines d'entraînement intermittent à haute intensité chez des femmes actives. * P<0.05: augmentation significative après l'entraînement. # P<0.05, différence significative entre pré- et post-exercice. D'après Bishop (Bishop <i>et al.</i> , 2009).	73
Figure 14 : Présentation récapitulative de la régulation de lactate et de protons (D'après Thomas ((Thomas <i>et al.</i> , 2012))).	79
Figure 15 : Les cinétiques des contenus en MCTs lors de la récupération après un exercice, mais est pris en compte le temps depuis le début de l'exercice jusqu'à ce que la biopsie soit réalisée. (D'après Thomas (Thomas <i>et al.</i> , 2012), avec les données de Bishop (Bishop <i>et al.</i> , 2007), Tonouchi (Tonouchi <i>et al.</i> , 2002), Eydoux (Eydoux <i>et al.</i> , 2000b, 2000a), Bickam (Bickham <i>et al.</i> , 2006) et Coles (Coles <i>et al.</i> , 2004)).	84

- Figure 16 : Respiration mitochondriale au Stade 3 dans les muscles soleus (SOL) et extensor digitorum longus (EDL) en présence des substrats pyruvate + malate (Pyr) et palmitoyl carnitine (PC) mesurées chez des rats contrôles (Con), et des rats entraînés à haute intensité préalablement supplémentés avant chaque séance en bicarbonate de sodium (Bic) ou en eau (Pla). Adapté de (Bishop *et al.*, 2010). 93
- Figure 17 : Présentation du protocole du test de 3x500-m all-out séparés de 20-min de récupération. Les prélèvements sanguins étaient pris post-échauffement, et 3 min après chaque sprint et 5 min après le dernier sprint. Avant l'échauffement, tous les participants recevaient soit une supplémentation en placebo (PLA) ou en bicarbonate de sodium (BIC). 106
- Figure 18 : Présentation du protocole de test du sprint de temps limite. Les prélèvements sanguins étaient pris post-échauffement, post-exercice, 5 et 8 min post-exercice. Les mesures de spirométrie étaient effectuées au repos ainsi que 3 min post-exercice. Lors du test les paramètres cardio-respiratoires étaient enregistrés en continu. 108
- Figure 19 : Présentation du protocole de test de 70 sec à puissance constante. Les prélèvements sanguins étaient pris avant la supplémentation en placebo (PLA) ou en bicarbonate de sodium (BIC), post-échauffement, post-exercice, 5 et 8 min post-exercice. Lors du test les paramètres cardio-respiratoires étaient enregistrés en continu. 109
- Figure 20 : Présentation du protocole du test de 3x30-s all-out séparés de 20-min de récupération. Les biopsies étaient prélevées au repos, immédiatement post-exercice, et 6 et 24 h post-exercice. Les prélèvements sanguins étaient pris au repos, et 3, 5, et 9 min après chaque sprint. Entre la première biopsie et le premier prélèvement de sang, tous les participants ont eu un petit déjeuner standardisé puis soit une supplémentation en placebo (PLA), soit en bicarbonate de sodium (BIC). 111
- Figure 21 : Schématisation du protocole du test supramaximal à puissance variable (all-out). 117
- Figure 22 : Schématisation du protocole de préparation des échantillons pour la quantification de protéines oxydées. 133
- Figure 23 : Evolution du pH (A) et de la $[HCO_3^-]$ (B) lors du test de 3x500-m all-out (moyennes \pm SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre condition ($P<0.05$) ; # démontre une différence avec la mesure au repos ($P<0.001$) ($n=6$). 146
- Figure 24 : Evolution de la $[La^-]$ lors du test de 3x500-m all-out (moyennes \pm SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre condition ($P<0.05$) ; # démontre une différence avec la mesure au repos ($P<0.001$) ($n=6$). 147
- Figure 25 : Résultats des échelles de CR10 (A) et de RPE (B) lors du test de 3x500-m, 5-min post sprints 1, 2 et 3 (Post sp. 1, Post sp. 2, Post sp.3). # démontre une différence avec la mesure post sprint 1 ($P<0.001$) ($n=6$). 149
- Figure 26 : Cinétique moyenne de la VO_2 lors du T_{lim} chez les « chuteurs » (○) et « non-chuteurs » (■) (Moyenne \pm SD). * Démontre une chute de VO_2 par rapport à VO_{2pic} ($P<0.05$) ($n=11$). 157
- Figure 27 : Amplitude des changements pour les paramètres de VO_2 , VC et Q_s lors du T_{lim} . A,B,C...K représentent les 11 sujets classés de la plus forte à la plus faible chute de VO_2 (droite vers gauche). Les valeurs des différents paramètres sont exprimées en fonction de la valeur pic mesurée lors du T_{lim} . 159

- Figure 28 : Relation entre l'amplitude de la chute du débit cardiaque (Qs) et le volume expiratoire forcé en 1 sec (VEF₁). VEF₁ est exprimé en L, Qs en % de changement par rapport à la valeur pic. Les lignes en pointillées indiquent l'intervalle de confiance de 95% (n=11). 160
- Figure 29 : Evolution du pH lors du test supramaximal de 70 sec (moyennes ± SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre condition (P<0.05) ; # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.001) (n=8). 167
- Figure 30 : Evolution de la [HCO₃⁻] lors du test supramaximal de 70 sec (moyennes ± SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre condition (P<0.05) ; # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.001) (n=8). 168
- Figure 31 : Evolution de la [La⁻] lors du test supramaximal de 70 sec (moyennes ± SE), PLA (○) et BIC (●). # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.01) (n=8). 168
- Figure 32 : Cinétique de la puissance développée lors du test de 70 sec en PLA (□) et en BIC (■). PAM : Puissance Maximal Aérobie, ** démontre une différence entre conditions (P<0.01), NS : Non significatif (P>0.05) (n=8). 169
- Figure 33 : Cinétiques des consommations d'oxygène mesurées lors du test supra-maximal de 70 sec (Moyenne ± SE), réalisé après supplémentation en placebo (PLA : ○) ou en bicarbonate de sodium (BIC : ●). * démontre une différence entre conditions (P<0.05), # et ## démontre une différence avec la valeur précédente (P<0.05 et P<0.01, respectivement) (n=8). 170
- Figure 34 : Evolution du pH (A) et de la [HCO₃⁻] (B) lors du test de 3x30 sec all-out (moyennes ± SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre conditions (P<0.05) ; ** démontre une différence entre conditions (P<0.01) ; *** démontre une différence entre conditions (P<0.01) ; # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.001) ; # démontre une différence avec la mesure post-exercice (P<0.001) (n=8). 179
- Figure 35 : Evolution du pH (A) et de la [H⁺] (B) musculaires lors du test de 3x30 sec all-out (moyennes ± SD), PLA (○) et BIC (●). # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.001) ; # démontre une différence avec la mesure post-exercice (P<0.001) (n=7). 180
- Figure 36 : Comparaison de l'évolution des concentrations protéiques (en unités arbitraires) entre les conditions BIC (■) et PLA (□), exprimées en pourcentage d'un échantillon contrôle. * démontre une différence entre conditions (P<0.01); # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.01) (n=8). 184
- Figure 37 : Comparaison de la carbonylation protéique et de la peroxydation lipidique (en unités arbitraires) entre les conditions BIC (■) et PLA (□), exprimées en pourcentage d'un échantillon contrôle. ** démontre une différence entre conditions (P < 0.01), # démontre une différence avec la mesure au repos (P < 0.01) (n=8). 185
- Figure 38 : Evolution de l'activité des complexes de la chaîne mitochondriale. # démontre un effet temps (p<0,01). 186

Image 1 : Mesures spirométriques (avant et après le T_{lim}).	122
Image 2 : Mesure des Q_s et Q_c au repos à l'aide du Physioflow.	123
Image 3 : Positions des incisions faites sous anesthésie (A), préalables aux biopsies réalisées par succion à l'aide d'une aiguille de Bergström et d'une seringue de 50mL (B).	124
Image 4 : Photo représentant les différents échantillons tels que déposés lors de l'électrophorèse.	127
Image 5 : Machine de révélation par immunofluorescence Odyssey.	128
Image 6 : Remplissage des puits sur plaque à fond plat pour la mesure de la CS.	135
Image 7 : Préparation des fibres musculaires perméabilisées.	136
Image 8 : Oxygraphes Oroboros.	138
Image 9 : Ensemble des seringues nécessaires à l'ajout des substrats dans les chambres de mesure de la respiration mitochondriale.	139

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Conséquences d'exercices réalisés à hautes intensités comparées à un exercice modéré (Hollidge-Horvat <i>et al.</i> , 2000), sur différents paramètres.	39
Tableau 2 : Présentation des études ayant utilisé une supplémentation de 0.3g.kg ⁻¹ de NaHCO ₃ vs placebo avant un exercice unique ou répété de haute intensité. <i>En noir, les études n'ayant pas rapporté d'amélioration de la performance et en rouge les études ayant rapporté une amélioration de la performance. F = femme, H = homme</i>	88
Tableau 3 : Résultats des paramètres physiologiques sanguins des études présentées dans le Tableau 2. Ne sont présentées que les études donnant le plus de valeurs des paramètres sanguins concernés. <i>Les [HCO₃⁻] et la [La⁻] sont données en mmol.L⁻¹. En noir, les études n'ayant pas rapporté d'amélioration de la performance et en rouge les études ayant rapporté une amélioration de la performance. * démontre une différence entre condition (P<0.05).</i>	89
Tableau 4 : Synthèse du protocole de détermination de la VO _{2max}	114
Tableau 5 : Synthèse du protocole de Force-Vitesse	115
Tableau 6 : Synthèse du protocole du test de 70-sec.	117
Tableau 7 : Récapitulatif du protocole du test de Wingate (et du 3 x 30 sec)	119
Tableau 8 : Synthèse du protocole des sauts verticaux	120
Tableau 9 : Liste du matériel nécessaire à la réalisation d'une biopsie.	125
Tableau 10 : Synthèse d'utilisation des différents anticorps	128
Tableau 11 : Exemples des bandes de densité de l'ensemble des protéines après révélations.	129
Tableau 12 : Récapitulatif des étapes suivies pour le dosage des protéines.	130
Tableau 13 : Préparation de la solution de tampon d'homogénéisation	131
Tableau 14 : Préparation de la solution de tampon Laemmli 4x	131
Tableau 15 : Préparation de la solution de tampon de migration	131
Tableau 16 : Préparation de la solution de tampon de transfert	131
Tableau 17 : Récapitulatif du protocole de mesure de l'activité CS	135
Tableau 18 : Préparation de la solution de BIOPS.	137
Tableau 19 : Préparation de la solution de MIR05.	137
Tableau 20 : Synthèse des étapes nécessaires à la mesure de la respiration mitochondriale	139
Tableau 21 : Protocole synthétisé (dans l'ordre des ajouts) de la mesure de respiration mitochondriale.	140
Tableau 22 : Récapitulatif des différents tests et mesures/analyses effectués lors des 3 études.	142
Tableau 23 : Présentation des vitesses individuelles (en m.s ⁻¹) pendant le test de 3x500-m sprints et des performances en SJ (en cm) pour les conditions PLA et BIC, (<i>M: male et F: female</i>). <i>* démontre une différence entre condition (P<0.05) ; # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.001) (n=6).</i>	148
Tableau 24 : Présentation des valeurs des paramètres sanguins mesurés lors du Tlim (moyenne ± SD). <i>* démontre une différence avec la valeur précédente (P<0.05) (n=11).</i>	156

Tableau 25 : Présentation des valeurs spirométriques mesurées au repos et 3 min après l'exercice (moyenne ± SD). * démontre une différence avec la valeur de repos ($P<0.05$) ($n=11$).	158
Tableau 26 : Synthèse des paramètres physiologiques mesurés lors du test de 70 sec, en condition placebo (PLA) et bicarbonate de sodium (BIC). * démontre une différence entre conditions ($P<0.05$),	171
Tableau 27 : Résultats des performances réalisées lors du test de 3x30 sec all-out, en condition BIC et PLA.	181

Avant propos.

Afin de répondre à la demande énergétique au niveau musculaire, les exercices de haute intensité ont la particularité de solliciter fortement le métabolisme du sujet en augmentant la consommation d'oxygène (VO_2), les flux glycolytiques, mais aussi la respiration mitochondriale et le métabolisme de la phosphocréatine, que ce soit au cours de sprints longs en athlétisme, en cyclisme sur piste ou encore en aviron. Différents travaux ont montré que l'exercice de haute-intensité pouvait créer des perturbations du fonctionnement physiologique de l'organisme.

Pour exemple, une forte altération de l'aptitude globale de l'organisme à éliminer le lactate (γ_2) a été dénotée par Freund *et al.* (1986, 1989) après des exercices de haute-intensité. De la même manière, Dubouchaud *et al.* (1999) ont rapporté une diminution des capacités de transport du lactate, après un exercice exhaustif, mené à l'épuisement chez le rat, tout comme Bishop *et al.* (2008) ont rapporté une baisse du contenu protéique en co-transporteurs lactate/protons (Monocarboxylate Transporters 1 et 4) chez l'homme après 45 sec de cyclisme à l'épuisement. D'autres travaux se sont focalisés sur les réponses de la fonction mitochondriale après un exercice intense. Certains d'entre eux ont mesuré des altérations au niveau des capacités oxydatives (Jubrias *et al.*, 2003). Par ailleurs, ces paramètres, la capacité de transport, le nombre de co-transporteurs lactate/proton et la capacité oxydative, sont généralement reliés avec la capacité globale de consommation maximale d'oxygène.

Or, il a aussi été rapporté dans différents travaux, une chute de VO_2 au cours d'exercices intenses, menés jusqu'à l'épuisement (Nummela & Rusko, 1995; Perrey *et al.*, 2002) au cours d'épreuves de 400 m (Hanon *et al.*, 2010), de 800 m (Thomas *et al.*, 2005a) et de 1500 m (Hanon & Thomas, 2011) réalisés sur le terrain dans les conditions de compétition. Le même phénomène a été décrit sur 1500 m, mais seulement chez des sujets présentant une baisse de vitesse en fin de course, alors que ceux capable de sprinter, n'exhibaient pas cette caractéristique (données personnelles). Ainsi, cette baisse pourrait se produire uniquement lorsque survient l'épuisement au cours de l'exercice intense.

Même s'il ne s'agit que d'une énumération, il est intéressant de remarquer l'étrange concordance de ces résultats, à partir d'une échelle cellulaire (capacités de transport du lactate et capacité maximale oxydative) jusqu'à une échelle plus macroscopique (γ_2 et VO_2max) pendant et après différents exercices menant à l'épuisement. Dans l'état actuel des

connaissances, de nombreux mécanismes métaboliques peuvent interférer sur tous ces paramètres (hypoxémie induite à l'exercice, fuite de potassium, augmentation de la concentration de phosphate inorganique, stress oxydatif induit par l'exercice, acidose intracellulaire...).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi de nous attarder en particulier sur la compréhension du rôle de l'acidose métabolique sur ces mécanismes de régulation impliqués dans ces réponses physiologiques, cellulaires et moléculaires au cours de l'exercice de haute-intensité et de sa récupération. En effet, l'ingestion de bicarbonate de sodium 90 min avant un exercice de haute-intensité permet de réduire l'acidose métabolique induite par l'exercice de haute-intensité au niveau des muscles squelettiques, du milieu interstitiel et du compartiment sanguin pendant l'exercice et la récupération. Ce type de supplémentation contre placebo permet donc d'étudier précisément le rôle de l'accumulation de protons sur les différentes situations évoquées précédemment.

Ainsi, lors d'une première étude nous nous intéresserons aux potentiels effets d'une modification de l'équilibre acido-basique par l'alcalose induite par une supplémentation aigue en bicarbonates de sodium sur la performance lors d'exercices répétés à haute-intensité, suivis de 20 min de récupération, chez des athlètes du pôle France de cyclisme sur piste. Puis, dans un second temps, nous nous attacherons à identifier l'implication d'une alcalose induite, comparé à un placebo, sur les variations de réponses ventilatoires, et notamment de chute de VO_2 , ainsi que sur la production de puissance au cours de deux types d'exercices supra-maximaux de pédalage, chez des cyclistes entraînés. Enfin, un dernier projet, portera sur les modifications de l'expression des protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire et sanguin (dont les principales sont les MCT 1 et 4), ainsi que sur la respiration mitochondriale. L'évolution de ces marqueurs a été mesurée par biopsie au niveau du *vastus lateralis*, sur une population sédentaire qui réalisait une répétition de trois sprints espacés de 20 min de repos, soit après supplémentation en bicarbonate de sodium soit après supplémentation d'un placebo.

La réalisation de ce travail de thèse est le fruit d'un travail collaboratif au sein de quatre laboratoires (la Mission recherche de l'INSEP, le laboratoire MIP de l'Université de Nantes, le laboratoire de l'ISEAL (Institute of Sport, Exercise and Active Living) de l'Université Victoria de Melbourne (Australie) et de l'Unité INSERM U1046 de Montpellier) initié par mes directrices de thèse, Mme Christine Hanon et Mme Claire Thomas (INSEP) ainsi que par mon co-encadrant M. Sylvain Dorel (laboratoire MIP). En effet, les deux premières études de ce travail ont été menées à l'INSEP. La première étude a été réalisée en collaboration avec la

Fédération Française de Cyclisme et en particulier les sujets de l'Equipe de France de Cyclisme sur piste sous la direction de l'entraîneur national Florian Rousseau. Puis, au cours de ma deuxième année de thèse, un séjour de dix mois au sein du laboratoire du Professeur David Bishop, à Melbourne m'a permis d'effectuer un protocole expérimental à partir de biopsies musculaires pour réaliser la troisième étude. Ces biopsies ont ensuite été envoyées au sein du laboratoire INSERM dirigé par le Professeur Jacques Mercier à Montpellier, où j'ai pu réaliser tous les dosages cellulaires et moléculaires lors de ma troisième année de thèse.

Ce manuscrit se présente maintenant cinq parties. La première partie de ce travail de thèse reposera sur une revue de littérature des différentes réponses physiologiques liées à la réalisation d'exercices de haute intensité. Cette revue de la littérature va donc nous permettre d'appréhender les éléments importants concernant le rôle de l'acidose et des effets de l'alcalose induite à partir de supplémentation en bicarbonate de sodium sur la production d'énergie, la régulation de l'équilibre acido-basique et de ces effets sur l'exercice. Nous aborderons ensuite la contribution personnelle de ce travail de thèse. Cette deuxième partie présentera les objectifs, la méthodologie spécifique ainsi que les principaux résultats de nos études, et sera suivie d'une synthèse. Celle-ci servira de support pour les perspectives qui peuvent être dégagées de ce travail.

Partie I. **Revue de Littérature**

Chapitre I. Définition et caractérisation des exercices de hautes intensités

A. Introduction générale

1. Caractéristiques des exercices réalisés à intensité maximale

Les exercices à hautes intensité se caractérisent par une capacité à produire la plus grande puissance possible au cours d'un exercice donnée de brève durée (3 sec à 3 min). Pour ce type d'exercice l'arrêt de l'exercice est toujours précédé d'une baisse importante de la production de puissance (en Watt) ou de travail (en kJ). Par exemple, au cours d'un exercice maximal de 30 sec, la chute de production de puissance peut atteindre généralement 40-60%. Si elle s'avère inférieure pour des exercices intenses de plus longue durée, cette chute surviendra néanmoins dans les 5 min qui suivent le début de l'exercice (Maughan & Aulin, 1997). Pour les exercices intenses répétés, on aura les sports collectifs (Bishop *et al.*, 2004b; Bishop & Claudius, 2005; Edge *et al.*, 2006a), des sports de raquettes (Montpetit, 1990; Faccini & Dai Monte, 1996) mais aussi de certains sports individuels où les athlètes enchaîneront plusieurs fois la même épreuve sur une seule journée (i.e natation, cyclisme sur piste...), la diminution de puissance se fera tout au long de la série d'exercices.

Les hauts niveaux de production de puissance nécessitant un renouvellement très rapide d'adénosine triphosphate (ATP), du fait de sa rapide utilisation sur les sites de production de force, il apparaît évident que ces exercices de haute intensité se caractérisent par une mobilisation maximale ou quasi-maximale des différentes filières énergétiques.

2. Réponses du métabolisme énergétique au cours d'exercices de haute intensité d'une durée inférieure ou égale à 30 sec.

Depuis quelques années, la vision classique des sollicitations des filières énergétiques a été délaissée au profit d'une vision plus interactive de ces contributions (Figure 1). En effet, la vision proposée au cours des années 1960 et 1970 conduisait à deux principales erreurs de conception à savoir, une vision séquentielle des contributions énergétiques qui étaient sensées se succéder dans le temps et la croyance dans le fait que le système aérobie répondait lentement aux besoins énergétiques de l'exercice.

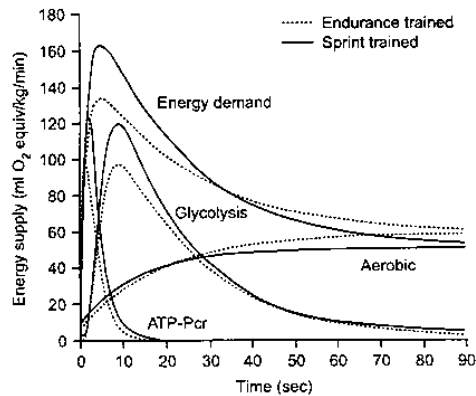


Figure 1 : Contribution respective des 3 filières au cours d'un exercice maximal de 90 sec. (Selon Gastin 2001)

La source immédiate d'énergie pour la contraction musculaire ayant pour source l'hydrolyse de l'ATP, qui existe en quantité limitée dans le muscle, trois processus étroitement liés opèrent de façon à prévenir l'entière déplétion des stocks et ainsi satisfaire au mieux aux besoins énergétiques du muscle. Le premier système implique le fractionnement de phosphagènes riches en énergie qui, de pair avec les réserves d'ATP du muscle, pourvoit aux besoins d'énergie immédiats. Le second procédé implique la dégradation des glucides (glycogène principalement) en pyruvate puis en lactate par la glycolyse. Le dernier système, aérobie, correspond à la combustion, en présence d'oxygène, des glucides (ainsi que des lipides et parfois protéines pour les exercices de très longue durée). Il est ici important de noter que ces trois systèmes fonctionnent en synergie. Les deux premiers procédés sont capables de régénérer l'ATP à haut débit (9 et $6-9 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$, respectivement (Hultman & Sjöholm, 1983) et permettent ainsi de produire d'importants niveaux de puissance musculaire. A l'inverse le troisième système se caractérise par une faible puissance mais une capacité à produire de l'ATP quasiment illimitée. Les caractéristiques très contrastées de puissance et de capacité de ces filières représentent un avantage pour interagir de façon efficace et continue à la resynthèse de l'ATP en toutes circonstances. Par ailleurs, il est difficile d'estimer précisément la contribution du système aérobie à la fourniture énergétique des exercices courts réalisés à haute-intensité du fait de problèmes méthodologique (détermination précise de la VO_2 et de la taille des muscles en activité, de la quantité d'oxygène délivré par la myoglobine et l'hémoglobine...). Cependant, il a été estimé que lors des 6 premières secondes d'un exercice de 30 sec, $1.32 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$ d'ATP était renouvelé par le système aérobie. De plus (Gastin, 2001) estiment que 6 à 27% de l'ATP

produit lors d'un effort de 30 sec provient du système aérobie (Figure 3). Ces résultats sont appuyés par ceux obtenus par Hanon *et al.* (2010) montrant que sur 400 mètres de course, 93.9 ± 3.9 % de VO_{2max} était atteint après 24.4 ± 3.2 sec.

a) La production d'ATP.

Les réserves d'ATP dans le muscle de l'homme sont d'environ $20-25 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms}$ (muscle sec), avec un pic de renouvellement, toutes filières confondues, d'environ $15 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$ au cours d'un sprint de 6 sec (Gaitanos *et al.*, 1993), et d'environ $7.5 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$ lors d'un sprint de 30 sec (Bogdanis *et al.*, 1995). Ces réserves en ATP permettent donc de maintenir un effort d'1 à 2 sec (Gaitanos *et al.*, 1993; Bogdanis *et al.*, 1998; Bishop & Claudius, 2005). Au cours de l'exercice sous-maximal à état stable, la resynthèse est effectuée grâce à la combustion oxydative des réserves de lipides et glucides, mais ce débit de fourniture d'énergie est relativement lent et ne peut compenser les besoins engendrés par les contractions musculaires intenses. En effet, le débit maximal de production aérobie d'ATP est approximativement de $2.5 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$ et, du fait du nombre et de la complexité de ses réactions, celui-ci n'est pas instantané. A l'inverse, la seule fourniture d'énergie anaérobie est quasi-instantanée et peut délivrer de l'ATP avec un débit d'environ $11 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$. Néanmoins, ce haut débit ne peut être maintenu que quelques secondes.

b) Le métabolisme de la phosphocréatine (PCr).

Le substrat principal de la contraction musculaire, lors d'exercice réalisé à haute-intensité, est la PCr dont les réserves sont d'environ $80 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms}$ (Gaitanos *et al.*, 1993; Bangsbo *et al.*, 2001) et permettent d'être très réactif afin de « tamponner » (par association), via la réaction de la créatine kinase, la rapide accumulation d'ADP qui est le premier stimulus de l'hydrolyse de la PCr. Au cours des années 1960, on a pu penser que les 10-15 premières secondes de l'exercice maximal étaient pourvues en énergie seulement par la dégradation de la PCr. Au cours d'un exercice maximal de 30 sec, l'utilisation de la PCr atteint son pic dans les 2 premières secondes de l'exercice et semble réduite de 15% après 3 sec de contraction et de 50% à partir de 10 sec (Soderlund *et al.*, 1992; Casey *et al.*, 1996a). Ensuite, dans les 10 dernières secondes d'un exercice maximal de 30 secondes, la contribution de la PCr équivaut seulement à 2% des besoins énergétiques. Il est très probable que la rapide déplétion des stocks de PCr au début de la contraction musculaire soit la cause de sa rapide utilisation (60 à 80% du contenu total initial) au niveau des ponts acto-myosines. De ce fait, quand l'exercice

maximal est maintenu plus de 20 sec, les stocks cellulaires de PCr sont presque totalement épuisés et l'on peut faire l'hypothèse que les besoins en ATP induis par ce débit d'hydrolyse de PCr ne peuvent entièrement être couverts par la production mitochondriale (Soderlund *et al.*, 1992).

On sait aujourd'hui que le métabolisme du glycogène contribue, dès les premières secondes de l'exercice, et très significativement, à la resynthèse de l'ATP (65 à 70% lors d'un exercice de 30 sec ; (Cheetham *et al.*, 1986).

La glycogénolyse correspond à l'hydrolyse du glycogène musculaire (constitué d'atomes de carbone (C), d'hydrogène (H⁺) et d'oxygène (O) (CHO)) en glucose 1-phosphate ; et la glycolyse aux réactions impliquées dans la dégradation du glucose ou du glucose 1-phosphate en pyruvate ou lactate. Ce processus de fourniture d'énergie est impliqué dès les premières secondes de l'exercice intense. L'activation de la contraction musculaire par le calcium (Ca²⁺) et l'accumulation des produits de l'hydrolyse de l'ATP et de PCr que sont ADP, AMP, IMP, NH₄⁺ et P_i stimulent la glycogénolyse. L'accumulation du P_i et de l'AMP en particulier joue un rôle majeur dans la régulation de la phosphorylase *a* et sert de lien entre la demande d'énergie imposée par la contraction musculaire et le débit d'utilisation des substrats. Ainsi, une étude montrait que l'activité de la phosphorylase *a* diminuait significativement en parallèle de l'augmentation de l'intensité de l'exercice (de 30% à 75% de VO_{2max}) (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000).

Au cours des réactions de dégradation du glycogène, des protons et des électrons sont libérés et pris en charge par un transporteur d'électrons (NAD⁺) pour ainsi former du NADH₂ (Figure 2). La poursuite de la dégradation du glycogène et du glucose ne peut donc se faire que si ce transporteur est régénéré et a libéré ses électrons et ses protons. Un premier moyen de régénération réside dans le système de navettes avec la mitochondrie qui va prendre en charge les électrons et protons du NADH₂. Un second moyen de régénération est assuré grâce à l'enzyme Lactate Déshydrogénase (LDH), déjà évoquée en formant du lactate à partir du pyruvate.

Lors de l'exercice de haute intensité, la dégradation du glycogène s'accélère fortement et engendre la formation d'une grande quantité de pyruvate qui s'accumulera dans le cytosol avant d'être converti en lactate. Les données relatives aux activités enzymatiques maximales

mesurées in vitro au niveau du quadriceps nous apprennent que pour les fibres rapides de type IIb, la vitesse maximale d'activité de l'enzyme LDH est de $486 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ et qu'elle est de $5 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ pour une des enzymes (l' α céto glutarate deshydrogénase) limitant la phosphorylation oxydative à l'intérieur de la mitochondrie. Aussi, ces résultats révèlent que la conversion du pyruvate en lactate est quasiment 100 fois plus rapide que l'utilisation du pyruvate par la mitochondrie. La formation de lactate au cours des exercices intenses n'est donc pas liée à un manque d'oxygène, mais est fonction des vitesses des réactions enzymatiques, et participe au maintien d'une production très rapide en ATP.

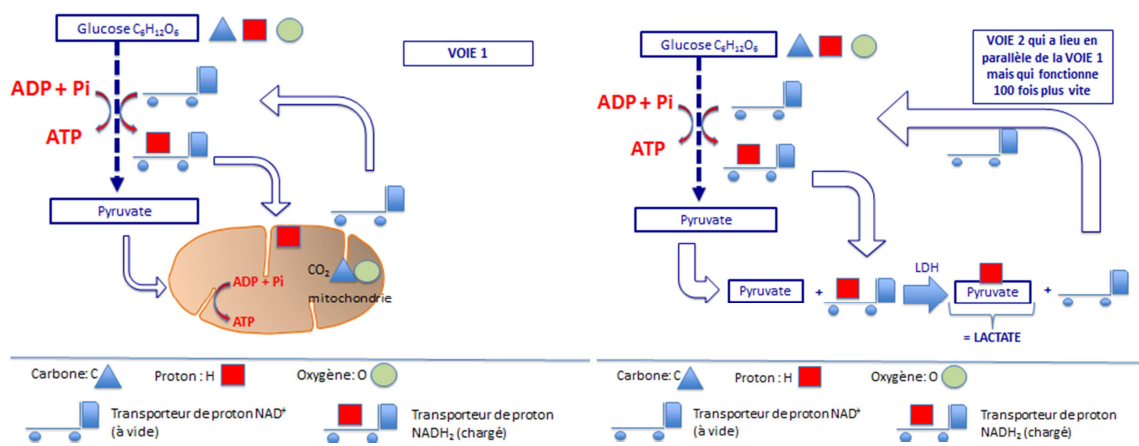


Figure 2 : Schématisation des voies de transport (NAD⁺/NADH₂) des protons au sein du muscle squelettique. (D'après Claire Thomas-Junius, 2012)

Si la glycolyse implique davantage d'étapes que l'hydrolyse de PCr, ce système s'avère néanmoins rapide en comparaison de la phosphorylation oxydative, et permet de générer de l'ATP via la phosphorylation de l'ADP dans la seconde moitié du processus. Il a cependant été montré par (Granier *et al.*, 1995) une atteinte de 99% de la $\text{VO}_{2\text{max}}$ suite à un test de Wingate (30 sec), ce qui indiquerait également une adaptation rapide de la capacité oxydative. Toujours au cours d'un exercice maximal de 30 sec, la resynthèse d'ATP par la glycolyse intervient dès les premières secondes, atteint son débit maximal après 5 sec d'exercice et peut être maintenu jusqu'à 20 sec de contraction isométrique quasi-maximale. Ainsi, au cours de ce type d'exercice, la contribution de la glycolyse à la resynthèse d'ATP sera le double de la contribution de PCr comme l'illustrent les concentrations élevées de lactate musculaire à l'issue de l'exercice ($112.7 \pm 10.3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ms}$) (Casey *et al.*, 1996a).

Si l'on considère les niveaux de puissance et délai d'inertie des filières anaérobies, on peut constater que l'utilisation immédiate de la PCr « tamponne » le délai de mise en route de la glycolyse dont la contribution à mesure que l'exercice se prolonge, augmente alors que la disponibilité en PCr diminue. Il est à noter qu'à la fin des exercices réalisés à haute intensité, ces deux filières ne permettent plus de maintenir le débit de resynthèse de l'ATP, d'où la chute de puissance déjà évoquée.

Table II. Estimates of anaerobic and aerobic energy contribution during selected periods of maximal exercise

Duration of exhaustive exercise (sec)	% Anaerobic	% Aerobic ^a
0-10	94	6
0-15	88	12
0-20	82	18
0-30	73	27
0-45	63	37
0-60	55	45
0-75	49	51
0-90	44	56
0-120	37	63
0-180	27	73
0-240	21	79

a Approximately $\pm 10\%$ at the 95% prediction level (refer table I and fig. 2).

Figure 3 : Estimation de la contribution de l'énergie d'origine anaérobie et aérobie pendant différentes durées d'exercices maximaux. (Selon (Gastin, 2001))

La Figure 3 démontre qu'au cours d'un exercice épuisant de 2-3 min, la phosphorylation oxydative contribue pour 60-80% des besoins énergétiques (Gastin, 2001 p.200). En condition de faible sollicitation aérobie (30% de VO_{2max}), le débit d'utilisation du glycogène est compris entre $45-70 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$ (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000) alors qu'il peut atteindre jusqu'à $110 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ ms.s}^{-1}$ par voie anaérobie au cours d'un sprint de 30 sec (Bogdanis *et al.*, 1995). Néanmoins, très rapidement (de l'ordre de la minute), la contribution énergétique aérobie devient supérieure à la contribution anaérobie (Figure 3).

L'essentiel :

- ▶ Il a été observé des chutes de puissance de l'ordre de 40-60% pour des exercices de 30 sec.
 - ▶ L'ensemble des filières énergétiques, fonctionnant en synergie, sont sollicitées de façon maximale ou quasi maximale :
 - ▶ Pour un sprint de 30 sec, le renouvellement de l'ATP est égale à $7.5 \text{ mmol.kg}^{-1}.\text{ms.s}^{-1}$
 - ▶ On observe une chute de la [PCr] en 20 sec d'exercice intense, pour ne représenter que 2% de la part énergétique au bout de 30 sec.
 - ▶ La resynthèse de l'ATP est majoritairement assurée par le métabolisme du glycogène.
 - ▶ Le couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$ joue un rôle primordial dans la poursuite de la production d'énergie par la glycolyse.
 - ▶ Au delà de 30 sec d'exercice intense ~40% de l'énergie provient de la phosphorylation oxydative.
 - ▶ La fatigue musculaire viendrait initialement de la diminution de la production d'ATP par les mécanismes anaérobies.
-

3. Fatigue engendrée par des exercices de haute intensité.

Selon (McCully *et al.*, 2002), la fatigue peut être définie comme « le développement d'une puissance ou d'une force inférieure à celle initialement attendue suite à une activation musculaire ». Néanmoins, la fatigue, sujet à un grand nombre de publications scientifiques, a été très largement présentée comme un phénomène complexe et multifactoriel que nous allons tenter de décrire.

a) *Fatigue engendrée par des exercices de haute intensité continus d'une durée inférieure ou égale à 30 sec.*

❖ Fatigue et perturbation de l'approvisionnement énergétique.

Les données présentées dans les lignes précédentes ont suggéré que la fatigue pouvait être causée par un déclin progressif de la production anaérobie d'ATP ou par un manque de disponibilité de PCr et une chute de l'hydrolyse du glycogène. Si l'on considère un exercice maximal isométrique de 30 sec, les taux d'utilisation de PCr sont respectivement de 3.3 et de 5.3 mmol.kg⁻¹ ms.s⁻¹ dans les fibres de type I et II pour les premières 10 sec (Soderlund *et al.*, 1992). A la fin de l'exercice, cette utilisation a chuté de 60% dans les fibres II et de 10% dans les fibres I. Dans le même temps, le débit de la glycolyse dans les fibres de type II est très rapide dans les premières 20 sec (6.3 mmol.kg⁻¹ ms.s⁻¹ comparée au même débit dans les fibres I (0.6 mmol.kg⁻¹ ms.s⁻¹). Pour les fibres de type II, ce débit diminue très largement dans les 10 dernières secondes de l'exercice. Parallèlement, la production de force totale diminue après les premières secondes initiales et atteint 60% de son niveau maximal à la fin de l'exercice et semble démontrer l'incapacité pour les fibres de type II à augmenter leur débit de resynthèse d'ATP pour compenser le déclin de ces filières énergétiques.

La disponibilité en glycogène en elle-même n'est pas couramment considérée comme responsable de la fatigue au cours de ce type d'exercices à intensités élevées, du moins tant que le niveau de glycogène avant exercice n'est pas inférieur 100 mmol.kg⁻¹ ms. Cependant la chute de pH associée à l'activité glycolytique a souvent été prise pour responsable des diminutions de performances musculaires. En effet, certaines études ont montré de fortes corrélations entre chute de pH intramusculaire et chute de puissance ou de force (Cady *et al.*, 1989; Degroot *et al.*, 1993).

❖ Origine des protons et inhibition de la production énergétique (Stewart HDR Claire)

A de hauts niveaux de fonctionnement de la glycolyse, la concentration en lactate a longtemps été désignée comme responsable de l'apparition de la fatigue au cours des exercices intenses. L'inhibition directe de la production de force de fibres musculaires animales par la concentration d'ions H^+ ou de lactate étayait cette vision. Selon les équipes de recherche, il est ainsi rapidement apparu que la fatigue musculaire était susceptible d'être causée soit par l'augmentation de la concentration de lactate, soit par celle d'ions H^+ , avec une littérature plus abondante en ce qui concerne les ions H^+ .

L'origine exacte de ces protons est aujourd'hui encore, sujet à débat dans la littérature scientifique (Bailey *et al.*, 1996; Brooks, 2000; Lamb *et al.*, 2006; Boning *et al.*, 2007; Lindinger & Heigenhauser, 2008; Sahlin, 2008), et semble difficile à déterminer du fait des différents facteurs biochimiques influençant leur production et leur élimination. Cependant, différents modèles proposés dans la littérature tentent d'expliquer que l'apparition de l'acidose coïncide avec la production de lactate pendant les contractions intenses du muscle strié squelettique (Stewart, 1981; Robergs *et al.*, 2004; Gladden, 2008). Selon le modèle de (Robergs *et al.*, 2004), la production de lactate retarde, mais ne cause pas, l'acidose, et le relargage des protons proviendrait de la réaction d'hydrolyse de l'ATP non-mitochondrial issue de la glycolyse, en ADP et Pi, lorsque l'intensité d'exercice augmente au-delà d'un état stable. Quelle que soit leur origine, la vitesse de production des protons peut excéder leur vitesse d'élimination, ce qui conduira, dans le cas d'un exercice à haute-intensité à leur accumulation intracellulaire et donc à une acidose musculaire. Ensuite, lors de la récupération, la glycolyse est momentanément diminuée (limitant donc sa production d'ions H^+), et le retour du pH à des valeurs basales se fait selon un modèle mono-exponentiel (Figure 4). Ainsi comme le montrent (Sahlin *et al.*, 1976), après un exercice dynamique intense de 6 min, le demi temps de récupération du pH musculaire est d'environ 9 min lors d'un repos passif.

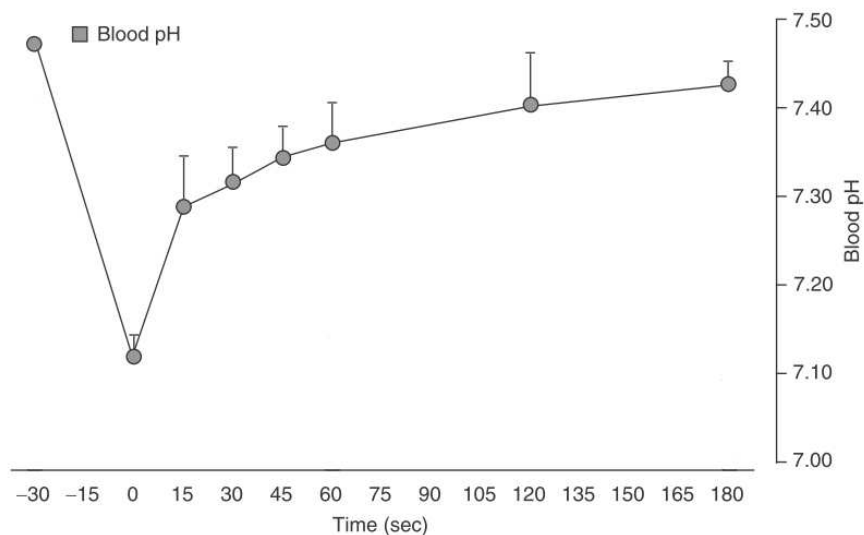


Figure 4 : Cinétique du pH sanguin lors de 3min de repos après un sprint maximal de 30-sec sur tapis roulant. (Adapté de Glaister (Glaister, 2005))

Cependant, alors que certaines études rapportent que l'implication de l'acidose dans le processus de la fatigue, pourrait être limitée (Pedersen *et al.*, 2004), l'accumulation de protons semble affecter la phosphorylation oxydative, certaines activités enzymatiques, et la régulation ionique de certains mécanismes (Spriet *et al.*, 1989; Favero *et al.*, 1995; Jubrias *et al.*, 2003). En effet, (Jubrias *et al.*, 2003) ont démontré que les flux oxydatifs les plus importants, au cours d'un exercice de 7 min, étaient enregistrés en l'absence d'acidose prononcée et que la chute de pH accompagnant l'exercice entraînait une incapacité pour les flux oxydatifs à augmenter. Ce résultat suggère donc que l'acidose inhibe l'activité mitochondriale et donc limiterait les flux oxydatifs à des niveaux sous-maximaux.

L'élimination des protons intracellulaires pendant un exercice intense se fait par la capacité tampon musculaire et par différents systèmes de transport membranaires tels que les monocarboxylates (MCT) 1 et 4 qui ont la particularité de transporter un proton pour chaque molécule de lactate échangée (Juel, 1996a, 1997). Nous détaillerons le fonctionnement de ces transporteurs dans un chapitre spécifique, mais il apparaît d'ores et déjà important de retenir que l'élimination du couple lactate/H⁺ par les MCTs excède la somme de l'élimination des protons par l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE) et le système bicarbonate-dépendant (Juel, 1995, 1997; Pilegaard & Juel, 1995; Kristensen *et al.*, 2004a). Par ailleurs, l'élimination des protons peut aussi se faire par des systèmes tampons intracellulaires (protéines et phosphates, et système tampon métabolique) (Bishop *et al.*, 2009). Il apparaît d'ailleurs que les sprinteurs (Röcker *et al.*, 1994) ainsi que les athlètes de sports collectifs ont une meilleure capacité

tampon que les spécialistes d'endurance ou les sujets sédentaires, ces athlètes sont ainsi plus capables de résister à l'accumulation des ions H^+ qu'ils produisent en grande quantité, et de produire une plus grande quantité de travail pour une intensité donnée (Edge *et al.*, 2006b).

L'évolution concomitante de ces divers métabolites (i.e H^+ , Na^+ , La^- , HCO_3^- ...) rend difficile *in vivo* de distinguer la responsabilité de chacun d'eux dans la genèse de la fatigue musculaire d'autant que la concentration de protons influence la forme soit mono- soit di-protonique du P_i , cette dernière forme du P_i semblant être la seule à être significativement corrélée au niveau de force produit par le muscle (Nosek *et al.*, 1987; Wilson *et al.*, 1998). Néanmoins, là encore, le débat subsiste puisque (Rico-Sanz, 2003) démontre que la fatigue augmente alors que l'accumulation de P_i di-protoné diminue avec les répétitions et que certains auteurs n'observent pas de corrélation entre niveau de force et pH ou P_i di-protoné chez l'animal (Adams *et al.*, 1991; Cieslar & Dobson, 2001).

❖ Fatigue et facteurs précédant la formation des ponts d'union ?

Au cours d'un exercice intense, court et épuisant, l'accumulation de potassium (K^+) dans l'espace interstitiel entraîne l'incapacité pour le sarcolemme et les tubules-T à propager efficacement le potentiel d'action dans la gamme des hautes fréquences (Sejersted & Sjøgaard, 2000), donc plus particulièrement dans les fibres de type II (Juel, 1986). D'autres mécanismes, tels que la réduction de la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (RS) (Favero, 1999), une moindre sensibilité au Ca^{2+} à la jonction neuromusculaire (Sieck & Prakash, 1995), au niveau de la troponine C (Green, 1997) ou encore une défaillance de la propagation du potentiel d'action le long des axones (Smith, 1980) peuvent expliquer la limitation du nombre de ponts acto-myosine formés.

Les réponses, telles que la libération du Ca^{2+} et la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} , sont fortement dépendantes du pH intracellulaire (Sahlin, 1992; Allen *et al.*, 2002; Westerblad *et al.*, 2002) entraînant une moindre fixation du Ca^{2+} sur la troponine C ainsi qu'une altération de l'interaction entre la tête de myosine sur l'actine ou de la $[P_i]$ perturbant la libération du Ca^{2+} au niveau du réticulum sarcoplasmique (Allen & Westerblad, 2001; Allen *et al.*, 2002). Ainsi, l'accumulation de P_i , d'ions H^+ , de Mg^{2+} , de K^+ sont les causes les plus fréquemment invoquées et débattues pouvant expliquer l'altération de la propagation du signal neuromusculaire et de la machinerie mécanique de la cellule musculaire. De nombreux points méthodologiques, tels que la température à laquelle le muscle est soumis pendant

l'expérimentation (Myburgh, 2004), l'environnement de la fibre (isolée, perméabilisé...) peuvent avoir une influence notable sur les résultats et entretenir les contradictions.

b) Fatigue engendrée par des exercices de haute intensité intermittents de courte durée.

Tout d'abord, il est important de noter que les niveaux de fatigue fluctuent en fonction de la durée (Balsom *et al.*, 1992; Ratel *et al.*, 2006; Billaut & Smith, 2010) et de la nature de la récupération (Toubekis *et al.*, 2005). En effet, (Ratel *et al.*, 2006) ont montré que la performance au cours de 10 sprints de 10 sec, sur tapis roulant non-motorisé, était diminuée de 3.5% avec un temps de récupération de 180 sec entre chaque sprints alors qu'elle était diminuée de 29.4% avec seulement 15 sec de repos. Toutefois lors des premières répétitions de brefs exercices intenses, la fatigue peut être masquée par un effet de potentiation ; comme déjà montré par (Okuno *et al.*, 2013).

Puisque, lors de sprints répétés, les stocks en énergie sont principalement maintenus par les sources anaérobies (telles que la dégradation de la PCr et la glycolyse), un manque d'ATP semblerait être directement lié à des déficiences au niveau du métabolisme anaérobie. Quand les exercices intenses sont répétés et séparés de brèves périodes de récupération, les débits d'hydrolyse de PCr diminuent progressivement et substantiellement au cours des répétitions (Dawson *et al.*, 1997). Ainsi, (Mendez-Villanueva *et al.*, 2012) ont montré que la récupération de la quantité de travail produite, au cours de 10x6 sec de sprints, suivait la même pente de resynthèse de la PCr. Ce résultat, associé aux travaux de (Bogdanis *et al.*, 1996), semble directement prouver qu'il existe une relation forte entre la resynthèse de PCr et la performance. Par ailleurs, l'examen de l'influence du type de fibres montre que l'hydrolyse de PCr est supérieure de 35% dans les fibres de type II comparée aux fibres I pendant la première répétition mais que PCr n'est pas entièrement restaurée au bout de 4 min dans ce même type de fibre (déficit de 33% dans la seconde répétition) alors que la resynthèse est complète dans les fibres de type I ([Figure 5](#)).

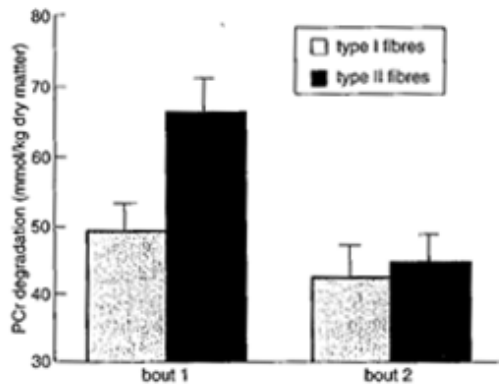


Figure 5 : Utilisation de la phosphocréatine dans les fibres de type I et II au cours de deux séquences d'exercice maximal de 30 sec. (Selon Casey (Casey *et al.*, 1996b))

Cependant, comme la production d'ATP anaérobie est régulée par un ensemble complexe de facteurs, les modifications progressives de l'environnement métabolique peuvent conduire à une inhibition de la glycolyse, lors de sprints répétés. Ainsi, Gaitanos *et al.* (1993) ont mis en évidence que 44% de la production d'ATP anaérobie lors du premier sprint de 10 sec (sur une série de 10) était de source glycolytique mais que ce pourcentage tombait à 16 lors du dernier sprint (Figure 6).

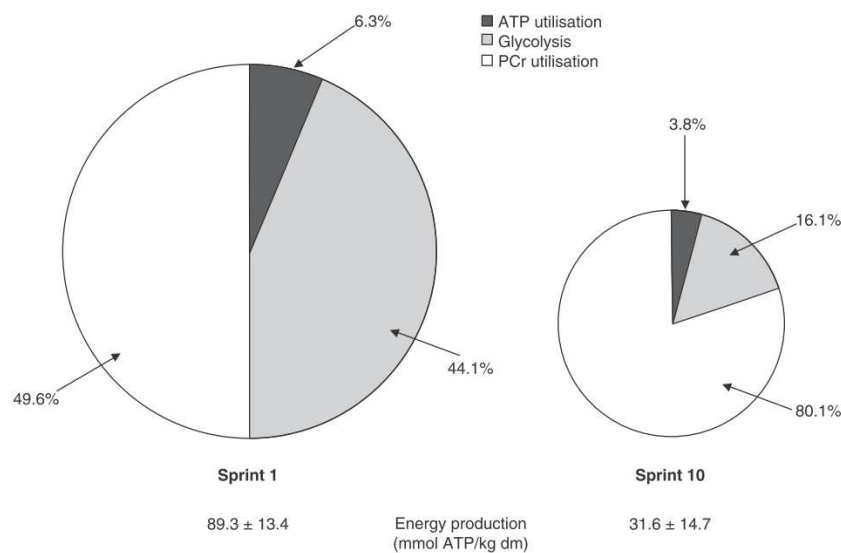


Figure 6 : Production d'ATP lors du 1^{er} et 10^{ème} sprint de 10 sec sur un total de 10 répétitions séparées de 30 sec de récupération. (Selon Glaister (Glaister, 2005), adapté de (Gaitanos *et al.*, 1993))

Plusieurs hypothèses ont émergé afin d'expliquer cette inhibition de la glycolyse, mais avec environ 300 mmol.kg^{-1} ms de glycogène disponible, l'idée d'une apparition de la fatigue concomitante à la déplétion des stocks (et donc à une diminution de production d'ATP) semble exclue. Une autre hypothèse avancée serait, comme précédemment expliqué pour des exercices uniques, la diminution importante de pH. En effet, l'augmentation de la concentration en ions H^+ est connue pour altérer la phosphorylase et la phosphofructokinase (PFK), enzymes régulatrices clés de la glycolyse et glycogénolyse. Toutefois, certaines études ont montré que la PFK n'était pas significativement impactée par le pH en condition physiologique normale (i.e $\text{pH} > 6.3$) (Dobson *et al.*, 1986; Spriet *et al.*, 1987a), et le serait plus par une accumulation de citrate dans le cytosol (Boscá *et al.*, 1985). Il a ainsi été publié que 6 min après un sprint en course de 30 sec (Bogdanis *et al.*, 1995), la récupération de la puissance n'était aucunement corrélée avec la récupération des valeurs de pH.

Enfin, l'augmentation de la durée de récupération entre les exercices semble avoir pour effet de ralentir l'accumulation de lactate, alors que l'accumulation des métabolites est diminuée. L'hypothèse d'une contribution accrue du débit du pyruvate par l'intermédiaire de PDC (pyruvate deshydrogenase complex) au fil des répétitions pourrait expliquer cette diminution de production de lactate (Greenhaff & Timmons, 1998). Au cours d'une répétition de 3 exercices maximaux de 30 sec espacés de 4 min de récupération, la contribution de PDC à la production totale d'ATP évoluerait au fil des répétitions de 29 à 33 puis 63% ce que confirme l'augmentation progressive de $\text{VO}_{2\text{max}}$ dans le même type de séance.

L'essentiel :

- ▶ L'acidose trouve son origine dans l'accumulation d'ions H^+ .
 - ▶ L'accumulation de protons altérerait la phosphorylation oxydative.
 - ▶ L'acidose associée à l'activité glycolytique peut initier la fatigue lors d'exercices intenses continus.
 - ▶ Il existe différents moyens de régulation de la $[H^+]$ dont les principaux sont la capacité tampon et les systèmes de transports sarcolemmaux.
 - ▶ Il existe des différences de capacités de régulation en fonction des niveaux d'entraînement.
 - ▶ La sensibilité au Ca de la troponine C semble diminuée par l'acidose.
 - ▶ L'accumulation d' H^+ jouerait négativement sur la formation de ponts acto-myosine.
 - ▶ La quantité de travail produite lors d'une répétition de sprints suit la pente d'évolution de la [PCr].
-

B. Conséquences physiologiques des exercices de hautes intensités.

Il ressort des paragraphes détaillés ci-dessus, que l'exercice et notamment l'exercice de haute intensité entraîne des perturbations métaboliques importantes qui, toutes prises ensemble, peuvent expliquer l'apparition de la fatigue. Voici donc de présenter dans le Tableau 1 les résultats des principales études ayant observées des modifications physiologiques, liées au métabolisme énergétique, imputables à l'exercice de haute intensité.

Tableau 1 : Conséquences d'exercices réalisés à hautes intensités comparées à un exercice modéré (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000), sur différents paramètres.

	Hollidge-Horvat		Bogdanis 1995		Bishop 2004		Gaitanos 1993		Gibala 2009	
	75% VO _{2max}		30s sprint		5x6s sprints (R=30s)		10x6s sprints (R=30s)		4x30s sprints (R=4min)	
	8 hommes actifs		14 hommes entraînés		10 femmes entraînées		8 hommes actifs		6 hommes actifs	
	Pre-	Post-	Pre-	Post-	Pre-	Post-	Pre-	Post-	Pre-	Post-
PCr <i>mmol.kg⁻¹ ms</i>	87.4±4.5	23±5.5*	77.1±2.4	15.1±1*	-	-	76.5±7.2	12.2±3.7*	82±4	22±6*
Glycogen <i>mmol.kg⁻¹ ms</i>	459±36	148±27*	321.5±18.2	211.6±18.5*	-	-	316.8±74.8	201.4±90.1*	431±74	300±78*
ATP <i>mmol.kg⁻¹ ms</i>	25.3±0.8	24.5±0.5	25.6±0.4	18.1±1.7*	-	-	24±2.7	16.4±3.9*	30±1	18±2*
[La] _s <i>mmol.L⁻¹</i>	0.75±0.06	6.51±0.6*	0.7±0.1	16.9±0.4*	0.8±0.02	~9*	0.6±0.1	12.6±1.5*	15±3	104±9**
[HCO ₃] _s <i>mmol.L⁻¹</i>	26.4±0.5	24.4±0.6*	-	-	23.6±1.1	~15*	-	-	-	-
[H ⁺] _s <i>mmol.L⁻¹</i>	-	-	-	-	37.2±0.5	~55*	-	-	-	-
β _{totale}	-	-	-	-	~180	~150	-	-	-	-
pH _{sanguin}	7.37±0.01	7.22±0.01*	7.38±0.01	7.08±0.03*	7.42±0.02	~7.20*	7.37±0.03	7.10±0.03*	-	-
pH _{musculaire}	7.21±0	6.82±0.04*	~7.05	6.72±0.06*	7.12	6.89*	-	-	-	-
P _{max} <i>watts</i>	-	-	1360±58		<i>Post-sprint 1</i>	<i>Post-sprint 5</i>	<i>Post-sprint 1</i>	<i>Post-sprint 10</i>	<i>Post-sprint 1</i>	<i>Post-sprint 4</i>
					~797	~695	1253.3±334.8	~835	944±91	742±32

*= différent de la valeur de repos (P<0.05) ; ~ = valeur estimée à partir d'un graphique car non précisée dans le texte par l'auteur ; * = concentration en mmol.kg⁻¹ ms

Chapitre II. Mécanismes responsables de la production d'énergie au cours d'exercices de haute intensité.

A. Production d'énergie au cours d'exercices de haute-intensité.

La demande en ATP varie à la fois selon la durée, l'intensité et le volume totale de l'exercice physique. Ainsi, pour répondre à ces besoins énergétiques, les différentes voies de production d'ATP (*voir Chapitre I*) vont être impliquées de manière plus ou moins importante comme nous venons de le voir (*Chapitre I*).

Si l'on s'intéresse maintenant aux exercices de haute intensité, mode d'exercice central de ce document, il apparaît que les fibres musculaires glycolytiques et oxydatives sollicitées augmentent leur métabolisme énergétique, c'est-à-dire élèvent leur consommation d'oxygène (VO_2), leurs flux métaboliques (oxydatif et glycolytique), et donc l'oxydation de substrats énergétiques afin de produire de l'ATP. Ainsi, pour satisfaire la demande en ATP, les débits oxydatif, d'une part, ainsi que glycolytique, d'autre part, de production d'ATP vont s'accroître. Tout d'abord, pour subvenir aux besoins des muscles squelettiques en oxygène, la fréquence et l'amplitude respiratoires, ainsi que la fréquence cardiaque et le volume d'éjection systolique s'élèvent à l'exercice, accélérant le transport de l'oxygène. Puisque la vitesse d'ajustement du métabolisme oxydatif est lente, comparativement au flux glycolytique, la cinétique de la consommation d'oxygène peuvent être décrite par un modèle mathématique exponentiel (Linnarsson, 1974; Wasserman & Whipp, 1975). Par ailleurs, tandis que les fibres musculaires glycolytiques et oxydatives commencent à accroître leur consommation d'oxygène dès le début de l'exercice de haute intensité, elles dégradent immédiatement leur réserve en glycogène, qui est une réserve de glucose. Le glucose est ensuite dégradé en pyruvate par la voie de la glycolyse, permettant alors la formation de deux molécules d'ATP. Ce pyruvate va alors connaître deux destinées : 1/ soit il va rentrer dans la mitochondrie pour y être transformé en énergie et donc aboutir à la formation de 38 molécules d'ATP par le mécanisme de la phosphorylation oxydative (consommation d'oxygène). C'est ce qu'on appelle classiquement la voie aérobie. 2/ soit il va être converti en lactate par l'enzyme LDH.

B. Le lactate : un intermédiaire métabolique

Après production du lactate dans les fibres contractiles son devenir peut se décliner en deux possibilités : 1/ métabolisation du lactate produit par des fibres avoisinantes faisant partie du même tissu ou d'un tissu différent (Brooks, 1998) (Figure 7), 2/ métabolisation du lactate par la fibre d'origine (Figure 7).

Les échanges de lactate se font donc entre fibres rouges oxydatives et fibres blanches glycolytiques d'un même muscle mais aussi entre deux muscles distincts en activité, sans oublier les échanges avec le cœur, le foie et le cerveau. Pour illustrer la seconde hypothèse, nous parlerons de l'utilisation du lactate par les mitochondries à l'intérieur d'une même cellule par la mise en évidence de transporteurs spécifiques au lactate sur les membranes mitochondriales (McClelland *et al.*, 2003). Ainsi nous pouvons résumer que le lactate est échangé à la fois de façon intra- et extracellulaire.

Historiquement les échanges de lactate entre différentes cellules ont été démontrés par l'équipe de recherche dirigée par (Brooks, 1985) (chez le rat), avant que l'hypothèse d'échanges intracellulaire soit émise. Cette hypothèse a évolué avec les moyens techniques. En effet, en 1985, seule l'utilisation de traceurs isotopiques permettait de mettre en évidence les flux lactiques. A partir de 1999, Bergman *et al.* (Bergman *et al.*, 1999) conjuguèrent les traceurs avec des analyses directes d'échanges grâce à des biopsies musculaires. Chez l'Homme, l'utilisation de lactate par d'autres cellules est responsable d'environ 50% du total du lactate produit au repos (Mazzeo *et al.*, 1986; Brooks, 1991). Cette part augmentant à 75-80% pour un exercice aérobie réalisé entre 50 et 75% de VO_{2max} . Le niveau d'entraînement influence également le métabolisme lactique, puisque des sujets entraînés présentent une clairance du lactate plus élevée que des sujets sédentaires. Cependant les deux populations ont des taux de production du lactate similaire pour une même puissance donnée (Bergman *et al.*, 1999). Ceci soulignant l'importance du devenir du lactate au cours de l'exercice. Les équipes de recherche ont alors orienté leurs travaux sur l'existence d'un potentiel transporteur spécifique au lactate et ont découvert l'existence des MCT (Roth & Brooks, 1990). Il a par la suite été montré que la quantité de transporteurs évoluée en fonction du niveau d'entraînement, ce qui peut expliquer les différences de niveaux de clairance précédemment observées (Dubouchaud *et al.*, 1999; Bergman *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2008).

Toutefois, toute la quantité de lactate produite n'est pas immédiatement ré-oxydée et passe dans la circulation sanguine générale augmentant donc les concentrations artérielles de

lactate. Il a donc ainsi été démontré que les muscles en activité permettaient de subvenir à une partie des besoins en substrats du cœur (Gertz *et al.*, 1988) ainsi que de servir de précurseur néo-glycogénique (Friedlander *et al.*, 1998; Bergman *et al.*, 2000).

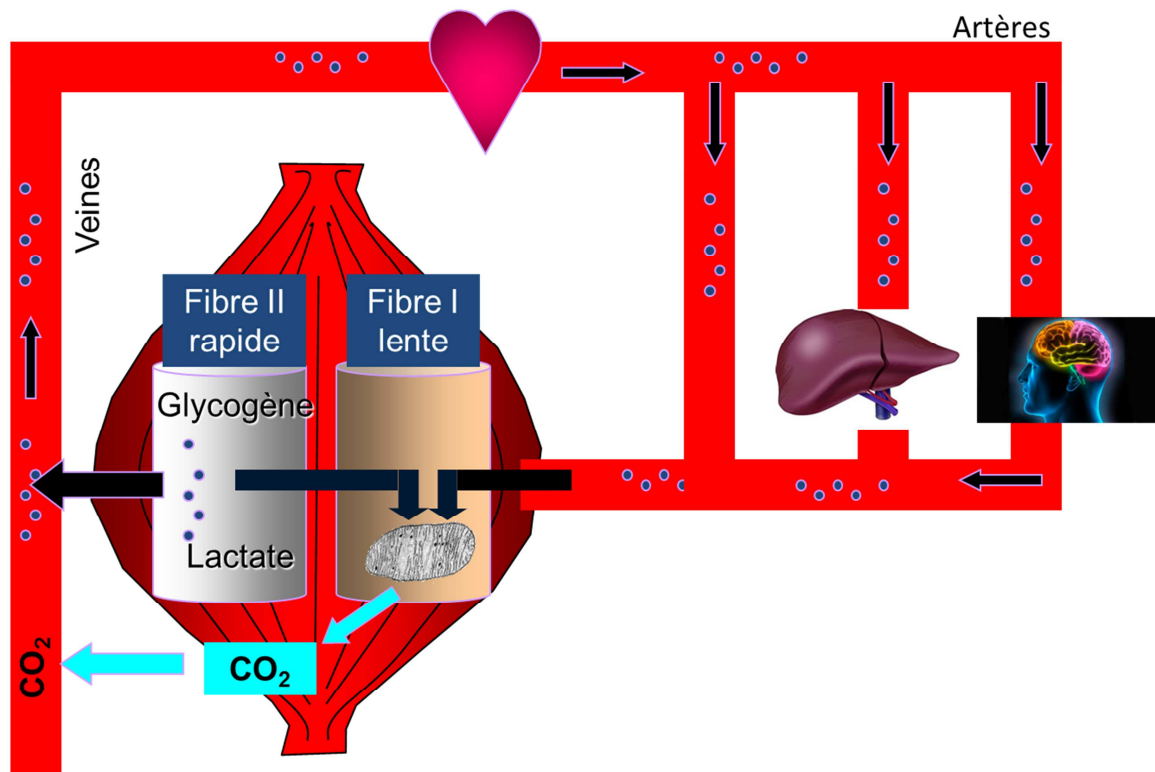


Figure 7 : Représentation de la navette extracellulaire du lactate (Fibre II : Fibre rapide, Fibre I : Fibre lente) (Modèle de (Brooks, 1986))

Concernant la seconde hypothèse et la ré-utilisation du lactate à l'intérieur même de la cellule productrice par la mitochondrie, il est important de noter que ce processus est rendu possible par la présence des MCT mais aussi de LDH dans les mitochondries, comme mis en évidence par (Pagliarini *et al.*, 2008) ainsi que par Hashimoto *et al.* (Hashimoto *et al.*, 2005, 2006; Hashimoto & Brooks, 2008). Du fait que les concentrations, et donc les gradients, de protons soient primordiaux pour permettre les flux de lactate par diffusion facilitée, couplé au principe de la clairance du lactate par oxydation et néoglucogénèse (Passarella *et al.*, 2008), des mitochondries actives sont absolument nécessaire pour permettre le bon fonctionnement des navettes de lactate. En effet, les MCT agissent conjointement avec la LDH mitochondriale afin de permettre l'oxydation du lactate à l'intérieure des cellules, participant de pair au maintien d'un gradient de concentration autorisant les flux « passifs » de lactate. Soulignons toutefois, que (Yoshida *et al.*, 2007) ont conclu dans leur étude que la quantité de lactate réoxydé par les mitochondries intra-myofibrillaires et sous-sarcolemmales était négligeable

du fait de la faible concentration de LDH au sein de la mitochondrie. Ce sujet fait toujours débat.

Ce mode de « recyclage » du lactate met donc en évidence que les muscles squelettiques à la fois produisent et utilisent comme substrat cette molécule, avec une production principalement située dans les fibres glycolytiques et une oxydation dans les fibres oxydatives adjacentes.

L'essentiel :

- ▶ Modèle de Brooks, 1986 : le La^- est soit réutilisé par la cellule de production, soit il est utilisé par un tissu ou une cellule différentes.
 - ▶ Les différences de clairance de La^- entre différentes populations ont amené l'hypothèse de l'existence d'un transporteur spécifique (MCT découvert en 1990).
 - ▶ Les gradients de protons sont d'importance dans le transport actif et/ou par diffusion du La^- vers la mitochondrie, ce qui permettra son oxydation.
-

C. La capacité oxydative du muscle:

1. Fonction et fonctionnement de la mitochondrie (Figure 8)

La mitochondrie est un organite membraneux qui constitue la source d'énergie principale de la cellule en produisant la plus grande partie de l'ATP. La densité mitochondriale va ainsi tendre à être plus importante dans les cellules où l'activité métabolique est la plus intense. On peut citer parmi ces tissus le foie, les reins ou encore le muscle strié squelettique. Les mitochondries contiennent leur propre ADN (ADN_{mt}) et ARN (ARN_{mt}). Elles sont capables, pour répondre à une demande croissante d'énergie, de se diviser (augmentation de la densité) et/ou d'augmenter leur nombre de « crêtes » sur leur membrane interne (augmentation de l'activité). En effet, la chaîne de transport d'électrons (ou chaîne d'oxydo-réduction), qui a pour fonction de créer l'énergie par réactions cataboliques, se situe sur la membrane interne de la mitochondrie. Cette chaîne est composée de plusieurs protéines (pouvant être de compositions très variées) et enzymes formant des couples redox ou complexes enzymatiques. L'ordre de ces complexes dépend essentiellement de leur potentiel d'oxydo-réduction, ou autrement dit de leur affinité avec les électrons. La chaîne respiratoire assure ainsi l'acheminement des électrons fournis par les équivalents réduits (NADH et FADH₂) jusqu'à l'accepteur final d'électrons, à savoir l'oxygène.

L'apport des électrons à la chaîne respiratoire se fait 1/ au niveau du complexe I (CI) ou NADH/ubiquinone réductase: par le NADH produit par la pyruvate déshydrogénase ou les déshydrogénases appartenant au cycle de Krebs ou à la β -oxydation, 2/ au niveau du complexe II (CII) ou succinate/ubiquinone réductase: par le succinate et 3/ au niveau de l'ubiquinone ou coenzyme Q: par le FADH₂ produit par les déshydrogénases de la navette glycérol-3-phosphate et certaines enzymes de la β -oxydation. Ensuite, les électrons sont acheminés vers l'oxygène moléculaire par le complexe III (CIII) (aussi appelé ubiquinol/cytochrome c réductase ou complexe cytochrome bc1) et par le complexe IV (CIV) (ou cytochrome c oxydase ou cytochrome a₃). L'énergie libérée progressivement le long de la chaîne respiratoire est en partie récupérée pour générer de l'ATP par phosphorylation oxydative. En effet, CI, CIII et CIV agissent comme des pompes à protons (ions hydrogènes, H⁺) alimentées par le transfert des électrons (théorie de Mitchell (MITCHELL, 1961)). L'expulsion des protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire génère un double gradient, électrique (négatif dans la matrice et positif dans l'espace intermembranaire) d'une part et de concentration d'autre part. Ces deux phénomènes s'additionnent pour attirer fortement les ions H⁺ en direction de la matrice. La

dissipation de ce gradient de protons va pouvoir libérer de l'énergie grâce au canal de l'ATP synthétase (complexe V ; CV ; de la chaîne respiratoire) qui constitue une voie diffusionnelle pour les protons. En empruntant ce canal, les protons créent un courant électrique permettant de catalyser la formation d'ATP par la liaison d'un phosphate à un ADP (adénosine diphosphate). Le retour des protons vers la matrice est accompagné de la formation de molécules d'eau à partir de l'oxygène activé par les électrons qui lui sont transférés. Cette formation d'eau contribue à prévenir la diminution du gradient de protons et permet la poursuite de la phosphorylation oxydative.

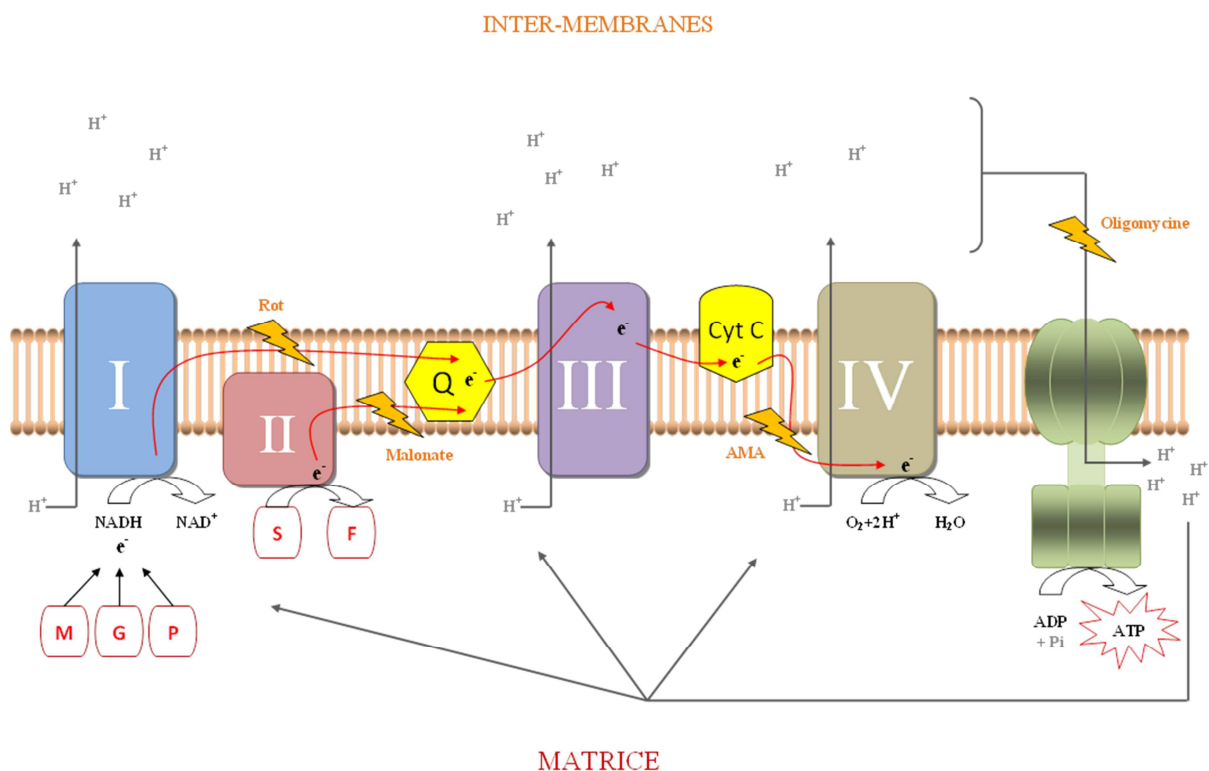


Figure 8: Représentation de la chaîne de respiration mitochondriale et ses différents inhibiteurs.

L'altération des fonctions et de la densité mitochondriale n'affecte pas seulement les performances physiques mais, en premier lieu, la santé. En effet, peuvent apparaître à la suite d'une inactivité prolongée, par exemple, une atrophie musculaire (Romanello *et al.*, 2010), du diabète (Lowell & Shulman, 2005; Schrauwen-Hinderling *et al.*, 2007) ou encore un vieillissement prématuré (Dufour & Larsson, 2004; Figueiredo *et al.*, 2008). Dans ce sens, l'augmentation du pool de mitochondries va contribuer à maintenir les fonctions musculaires ainsi que l'homéostasie métabolique générale du corps.

L'essentiel :

- ▶ La mitochondrie peut répondre à une augmentation de demande en énergie soit par augmentation de taille ou de densité soit par augmentation d'activité.
 - ▶ La mitochondrie peut oxyder du malate, du glutamate, du pyruvate ou du succinate comme substrat.
 - ▶ C'est la dissipation du gradient de proton (H^+) à travers le complexe V qui va entraîner la production d'ATP.
 - ▶ Le bon fonctionnement des mitochondries semble directement impliqué dans la performance de haute intensité.
-

2. La biogenèse mitochondriale

Après avoir abordé le fonctionnement de la mitochondrie, nous allons maintenant nous intéresser à la régulation de la biogénèse mitochondriale.

a) *Généralités*

La biogénèse mitochondriale (BM), aussi appelée « activation de l'expression protéique mitochondriale », se définit comme l'ensemble des processus menant à la formation de nouvelles mitochondries. La BM nécessite l'interaction des génomes nucléaires (ARN_{nuc}) et mitochondriaux (ARN_{mt}), car comme le fait remarquer Hoppeler (Hoppeler & Fluck, 2003) différentes protéines constituant les membranes internes et externes de la mitochondrie sont impliquées dans la bêta-oxydation, le cycle de Krebs ou encore la chaîne de respiration mitochondriale. Or, seulement quelques une de ces protéines sont codées dans l' ARN_{mt} alors que la plupart sont codées dans l' ARN_{nuc} . En effet l' ARN_{mt} n'est constitué que de 16 659 nucléotides (contre environ 3 milliards pour l' ARN_{nuc}) codant notamment pour 13 ARN messagers, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiques essentiels pour la fonction mitochondriale. Toutefois, l'ensemble des protéines codées dans le génome nucléaire ainsi que les phospholipides constituant la membrane vont être intégrés à leur emplacement propre (après avoir été synthétisés dans le cytosol) afin que la BM puisse avoir lieu. Pour exemple, une étude de Little et al. (Little *et al.*, 2010) a mis en évidence qu'au repos la majorité de PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), un des régulateurs clé de la BM, était concentré dans le cytosol mais qu'après 90 min de pédalage à 65% de VO_{2max} le contenu protéique nucléaire de PGC1 α avait augmenté de 54% sans que le contenu total (cytosol+noyau) n'ait été modifié. Ce résultat démontre bien que les protéines cytosoliques sont importées et non pas produites à l'intérieur de la mitochondrie. Par ailleurs, de nombreuses études (Liang & Ward, 2006; Gibala *et al.*, 2009; Serpiello *et al.*, 2012) ont mis en exergue que l'expression de ce gène était contrôlée par d'autres facteurs comme p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), AMPK (5' AMP-activated protein kinase), CaMK II (Calcium calmodulin-dependent protein kinase II) qui eux-mêmes étaient activés par la contraction musculaire (Figure 9). En effet, l'interaction coordonnée de ces molécules de signal, ainsi que des facteurs d'activation ou d'inhibition de transcriptions permettent à la BM d'être initiée. Ainsi PGC1 α agit par exemple sur des facteurs de transcriptions clés tels que TFAM (mitochondrial transcription factor A), NRF1 (nuclear respiratory factor 1) ou encore MEF2 (myocyte enhancer factor 2). Aussi, HDAC (histone deacetylase) influe sur la BM en pouvant inhiber l'activation de certains co-activateurs et/ou facteurs de transcriptions.

Il existe de nombreux stimuli pouvant initier la BM comme le stress cellulaire ou diverses sollicitations environnementales. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons uniquement à l'un des stimuli les plus importants : l'exercice physique / la contraction musculaire (qui ne peut être dissocié de l'apparition du SO).

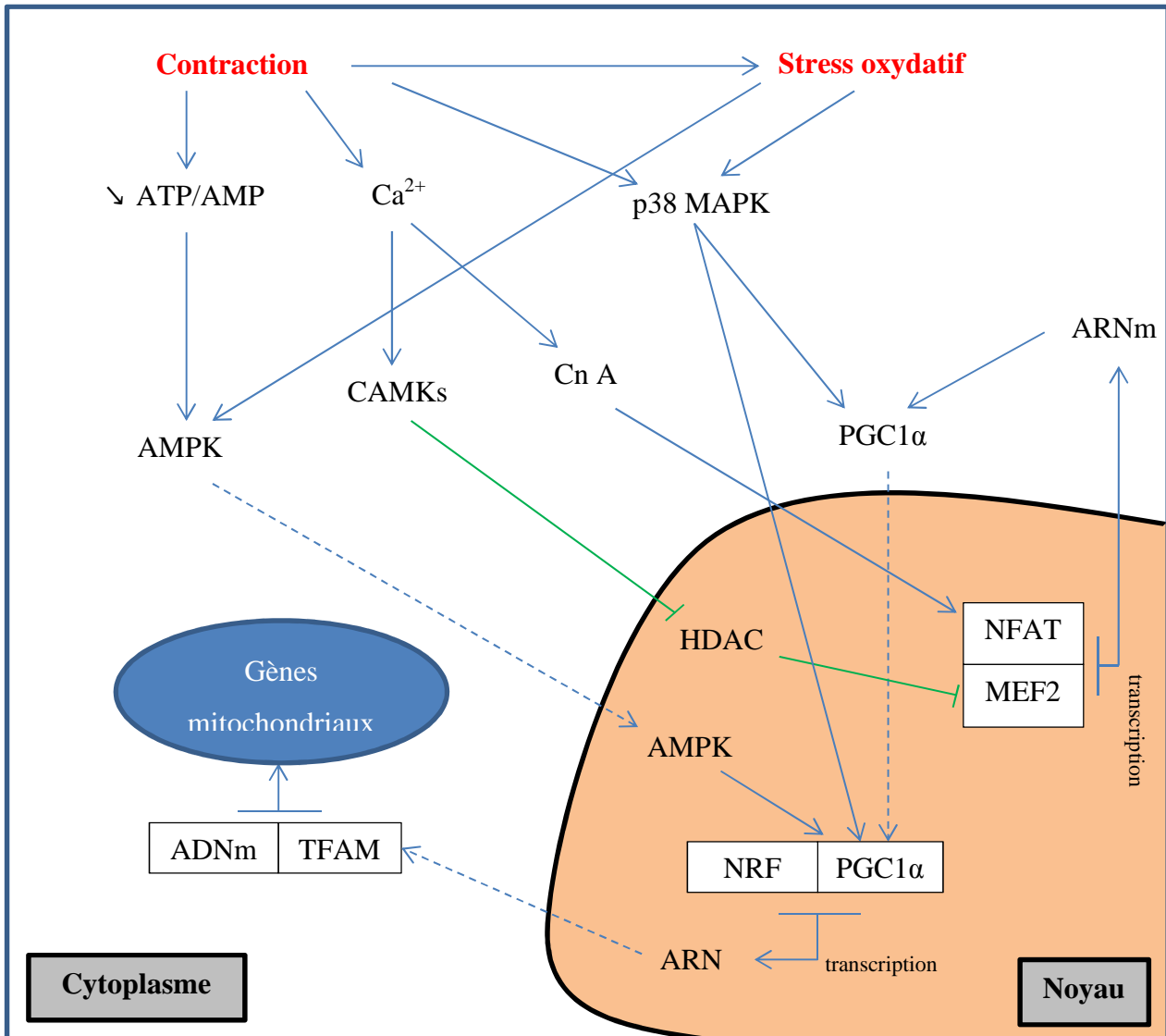


Figure 9: Schématisation des voies de l'activation de la biogénèse mitochondriale.

b) Effet de l'entraînement sur la BM

En 1967, Holloszy (1967) fut le premier à montrer que l'entraînement en endurance permettait l'activation de la BM dans le muscle strié squelettique. Depuis d'autres études récentes ont apporté la preuve que l'interval-training (4x30 sec séparés par 4 min de récupération) (Burgomaster *et al.*, 2008; Gibala *et al.*, 2009) ou l'entraînement en endurance de force (Balakrishnan *et al.*, 2010) pouvaient aussi initier la BM dans ce même tissu. Ces deux formes d'entraînement peuvent ainsi augmenter jusqu'à 50% le volume mitochondrial chez des hommes non-entraînés et augmenter en parallèle l'oxydation des lipides. Depuis, plusieurs travaux ont montré que la contraction musculaire par stimulation électrique in vitro (Xia *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 2001) et in vivo (Essig, 1996; Hood, 2001) conduisait à la BM. A l'inverse, d'autres auteurs ont mis en évidence que la dénervation ou une activité musculaire diminuée, par immobilisation ou exposition à la microgravité, entraînait une diminution importante de la densité mitochondriale (Wicks & Hood, 1991; Ferretti *et al.*, 1997).

Longtemps, les mécanismes pouvant expliquer pourquoi l'entraînement en endurance pouvait augmenter la capacité oxydative du muscle sont restés flous. Ainsi Gollnick en 1969 (Gollnick & King, 1969) et Kiessling en 1971 (Kiessling *et al.*, 1971) ont respectivement fait état d'une augmentation du nombre de mitochondrie et de leur taille après l'entraînement sans toutefois pouvoir aller plus loin dans leurs analyses de résultats du fait du manque de moyens techniques. Plus récemment, une étude basée sur 10 sujets sédentaires s'entraînant 5 fois 30 min par semaine pendant 6 semaines a montré une augmentation de 40% du volume total mitochondrial du *vastus lateralis* (Hoppeler *et al.*, 1985). Cette augmentation importante ne s'accompagna que de seulement 14% d'amélioration de la VO_{2max} . Ceci peut toutefois facilement s'expliquer car les adaptations dues à l'exercice ne s'observent que majoritairement dans les muscles spécifiques de la tâche (i.e *vastus lateralis* pour exercice de pédalage). Les 40% d'augmentation du volume en mitochondries sont donc à relativiser par le désentraînement des muscles statiques en cyclisme (bras). Ainsi Rösler *et al.* (1985) montra une chute de 20% de la densité mitochondriale dans le deltoïde après 8 semaines d'entraînement sur ergocycle.

Enfin, des études utilisant différentes techniques ont montré que l'entraînement en endurance augmentait en majorité le contenu en mitochondries sous-sarcolemmales (SS) plutôt que le contenu en mitochondries inter-myofibrilles (Hoppeler *et al.*, 1985; Bizeau *et al.*, 1998; Chilibeck *et al.*, 1998; Roussel *et al.*, 2000).

c) Effet de l'exercice aigu sur la BM

Bien que peu d'études soient disponibles sur les effets potentiels de l'exercice aigu d'intensité modérée à maximale sur la BM, certains auteurs ont toutefois explorées différentes voies de signalisation. Ainsi Gibala *et al.* (2009) ont montré qu'immédiatement après la 4ème répétition de 30 sec de pédalage maximal, entrecoupées de 4 min de récupération, la forme phosphorylée d'AMPK (p-AMPK) et p38MAPK étaient significativement augmentées comparativement aux valeurs de repos. De plus 3 h post-exercice, l'ARN_{mt} de PGC1 α était approximativement multiplié par 2 par rapport au repos. Cependant, cette augmentation ne s'est pas traduite en parallèle par une augmentation du contenu protéique en PGC1 α , comme précédemment montré dans deux autres études effectuées chez l'homme mais cette fois pour des intensités modérées de respectivement 1 h et 3 h d'exercice (Watt *et al.*, 2004; Coffey *et al.*, 2007). Une autre étude (Little *et al.*, 2011) a aussi mis en évidence que le même protocole utilisé par Gibala *et al.* (4 x 30 secondes de sprints maximaux séparés de 4 min de repos) (Gibala *et al.*, 2009) permettait une augmentation concomitante de l'ARN_{mt} ainsi que du contenu protéique nucléaire de PGC1 α 3 h post-exercice. De plus, cette augmentation de PGC1 α c'est accompagnée de l'augmentation des ARN_m de COX II, COX IV (cytochrome c oxydase II et IV) et de CS (citrate synthase), puis de l'augmentation du contenu protéique de ces mêmes enzymes. Cependant, bien qu'une augmentation nucléaire de PGC1 α ait été observée, le contenu protéique dans l'ensemble de la cellule n'a pas changé. Ainsi la modification de la concentration en PGC1 α pourrait principalement être due au temps nécessaire pour synthétiser la protéine, soit comme déjà étudié chez l'homme, au bout de 24 h de récupération (Perry *et al.*, 2010). A l'inverse les résultats du travail de (De Filippis *et al.*, 2008) ont permis de voir une augmentation de respectivement 20 et 40% du contenu en protéines de PGC1 α , respectivement 30 min et 5 h après 4 exercices de pédalage d'intensité modérée. (Gibala *et al.*, 2009) avancent l'hypothèse que ces différences de résultats pourraient être dues à un volume et temps de travail bien plus important dans l'étude de De Filippis (rapport de 1/20) (De Filippis *et al.*, 2008).

Cette hypothèse pourrait être validée par les résultats obtenus par des chercheurs (Serpello *et al.*, 2012) ayant comparés le même type d'exercice une première fois en session unique puis en répétition pendant 4 semaines). En effet, ils ont trouvé, en aigu, une augmentation seule de l'ARN_{mt} de PGC1 α , puis une augmentation de l'ARN_{mt} et du contenu en protéine. Ainsi la charge de travail (volume et temps) pourrait effectivement être un facteur pouvant modifier le temps nécessaire pour synthétiser PGC1 α .

3. Le lactate : un carburant de la mitochondrie et un précurseur de la BM

Comme précédemment expliqué, le lactate produit au cours d'un exercice peut être directement réutilisé par la cellule au niveau des mitochondries. Ce processus est notamment rendu possible grâce à la présence de LDH mitochondriale et de transporteurs spécifiques au lactate (i.e MCT), l'expression de ces MCT étant rendu possible par la présence de leur protéine chaperonne (CD147) au sein de la mitochondrie (Hashimoto *et al.*, 2005, 2007). L'utilisation de lactate dans la mitochondrie permet de régénérer du NAD^+ (Figure 2) et ainsi d'assurer la continuité de la production d'énergie par la voie glycolytique.

Cependant, il a aussi été montré qu'une exposition de cellules musculaires au lactate pouvait stimuler la biogénèse mitochondriale, principalement par l'activation de $\text{PGC1}\alpha$. En effet, il a été montré que dans des cellules L6 incubées durant 6h dans 10 et 20 mM de lactate, la quantité d' ARN_{mt} codant pour $\text{PGC1}\alpha$ avait significativement augmenté (multiplié par 1.8) comparé à des cellules non-incubées avec du lactate (Hashimoto *et al.*, 2007). Selon la même étude, la quantité de protéine de COX (i.e un indicateur de la masse mitochondriale) avait été multipliée par 2 et 2.5 après 6 h d'incubation dans respectivement 10 et 20 mM de lactate. Cependant, 48 h plus tard, uniquement une concentration de 20 mM de lactate avait permis de maintenir une quantité de COX deux fois supérieure à celle observée dans des cellules non-incubées. Ce résultat suggère l'existence d'un seuil pour l'activation des adaptations sur une plus grand période de temps. L'augmentation de la masse mitochondriale, ainsi que de la quantité de LDH (multipliée par 1.39 et 1.33 après 6 et 48 h d'incubation dans 20 mM de lactate), semble attester une augmentation de la capacité du muscle squelettique à oxyder du lactate. Ceci permettant de la même façon la production d'importants niveaux de puissance par un meilleur rendement glycolytique tout en minimisant l'augmentation de l'acidose musculaire et sanguine.

Enfin, il est intéressant de noter qu'Hashimoto *et al.* (2007) ont mis en évidence que l'exposition à 20 mM de lactate entraînait en parallèle une augmentation significative de la production d' H_2O_2 . Ce résultat indique que l'exposition au lactate, comme on peut l'avoir au sein d'un muscle en activité, initie la production d'espèce oxygénée réactives supposées avoir un rôle clé dans la biogénèse mitochondriale.

L'essentiel :

- ▶ La biogénèse mitochondriale nécessite l'interaction de l'ARN_{nuc} et l'ARN_{mt}.
 - ▶ PGC1 α est un régulateur clé de la BM
 - ▶ La contraction musculaire et le stress oxydatif sont deux stimuli importants de la BM.
 - ▶ L'entraînement en endurance augmente à la fois la taille et le nombre de mitochondries.
 - ▶ Très peu d'études sur les effets d'exercices répétés en séance aigue sur la BM.
 - ▶ On note une augmentation de la concentration en protéines mitochondriales après des exercices très intenses uniques.
 - ▶ L'exposition d'un muscle au lactate entraîne la BM, notamment par l'activation de PGC1 α .
- ▶ En résumé, l'augmentation en parallèle des protéines mitochondriales (AMPK, p38 MAPK, PGC1 α ..) et de l'activité enzymatique (COX et CS) spécifique tendrait à prouver une adaptation rapide de la capacité oxydative ainsi que l'activation de la BM. Le volume d'exercice jouant probablement un rôle moins important que l'intensité.*
-

4. Production d'espèces oxygénées réactives (EOR) liée à l'activité mitochondriale

Le stress oxydatif représente l'action de certaines molécules instables (du fait de leur électron non apparié), appelé radicaux libres (RL), qui vont alors oxyder d'autres molécules telles que les protéines, les lipides ou encore l'ADN, afin de se stabiliser. Les protéines sont cependant les cibles principales de ces RL, du fait de leur présence importante dans l'ensemble du corps, et vont ainsi catalyser jusqu'à 75% des « attaques » de RL (Davies & Truscott, 2001). Bien qu'il existe une multitude de RL (atomes d'hydrogènes, ions métalliques, radicaux à base de carbone...), la majorité sont, soit dérivés de l'oxygène (O), et/ou du nitrogène (N) (Bogdan *et al.*, 2000). La production ou formation de RL est en premier lieu initiée par la consommation d'oxygène moléculaire, qui du fait de sa structure est lui-même un radical libre.

L'ensemble des espèces radicales et non radicales sont regroupées sous le terme de « dérivés réactifs d'oxygène/de nitrogène » (DRON). On retrouve notamment dans cette catégorie de DRON, des ions oxygénés ainsi que des peroxydes. Les DRON sont essentiels pour maintenir l'homéostasie du corps humain de par leur fonction de régulation. Par exemple, ils peuvent être de puissants signaux de stimulation pour l'expression de certains gènes codant pour des facteurs de transcription ou de différenciation, et peuvent aussi être impliqués dans les voies de signalisation (i.e respiration mitochondriale, (Wright *et al.*, 2007; Radak *et al.*, 2013), la régulation de la circulation sanguine ou encore l'augmentation des antioxydants (Sen, 2001). Ainsi, comme nous le verrons plus tard, il a été montré que les DRON produits pendant l'exercice ont un rôle essentiel à jouer dans les adaptations musculaires (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009; Bottinelli & Westerblad, 2011; Lamb & Westerblad, 2011).

Toutefois une concentration trop importante de RL pouvant avoir des effets délétères. L'organisme possède de nombreux mécanismes antioxydants (de nature endogène ou exogène) qui permet de lutter efficacement contre l'accumulation des radicaux libres et DRON. Le SO apparait donc lorsque la quantité d'actifs oxydants va surpasser le potentiel de « défense » du corps (les antioxydants), et a été mis en avant dans l'explication de l'apparition de certaines pathologies telles que l'obésité, les maladies cardio-pulmonaires ou encore le vieillissement (Chow *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2011). Les principales sources de formation de DRON sont l'exposition a des polluants environnementaux (Halliwell, 1991), une nutrition

déséquilibrée et/ou trop importante (Sies *et al.*, 2005), et enfin l'exercice physique (Vollaard *et al.*, 2005).

Il apparaît donc justifié de s'intéresser aux mécanismes par lesquels les DRON peuvent initier certaines adaptations métaboliques au sein du muscle strié squelettique, et notamment sur la respiration mitochondriale, lors de l'exercice.

Les NO (oxyde nitrique ou monoxyde d'azote) et les O^{•-} (ions super-oxydes) sont deux radicaux libres produits à des niveaux très faibles au repos dans le muscle strié squelettique. Mais, lorsque la demande en oxygène augmente au niveau des muscles lors d'exercices, la consommation est aussi augmentée et en parallèle les DRON. Cela peut s'expliquer, pendant l'exercice, de différentes façons, mais notamment par l'augmentation de la respiration mitochondriale et donc de la fuite d'électrons lors de leur transport tout au long de la chaîne de respiration. De plus, lors de la récupération, alors que le muscle peut présenter certains dommages, les mécanismes immunitaires, dont l'inflammation est un marqueur notoire, vont aussi contribuer à l'augmentation des DRON.

Bien qu'il existe, toutefois, peu de preuves directes de la production de DRON dans le muscle pendant l'exercice, notamment à cause de lacunes techniques, il existe dans la littérature certaines preuves indirectes montrant l'augmentation du SO lors d'exercices aigus réalisés en anaérobique et en aérobie.

a) EOR et exercices en aérobie

Bien que le sujet de cette thèse ne soit pas principalement orienté vers les exercices d'aérobies « classiques » (i.e sollicitations importantes de VO_{2max}), nous étudierons toutefois de la chaîne de transport de l'oxygène. Il paraît donc important d'expliquer succinctement les avancées de la littérature au cours ces dernières années à propos des effets de telles sollicitations sur la production de DRON. En effet, selon Fisher-Wellman (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009), plus de 160 études ont jusqu'alors été référencées sur ces seuls types d'exercices. Nous regarderons ensuite les résultats et connaissances développées pour des exercices aigus brefs et intenses.

La durée de la majorité des exercices rentrant dans la catégorie d'exercices aérobies de longue durée, est égale ou supérieur à 2 h. Ces études portent principalement sur des épreuves telles que le marathon (Tsai *et al.*, 2001; Radák *et al.*, 2003a), l'ultra-marathon (Mastaloudis *et al.*, 2001; Radák *et al.*, 2003b), le triathlon (Nieman *et al.*, 2004), ainsi que les courses de cyclisme (Tauler *et al.*, 2006; McAnulty *et al.*, 2007) ou à pied (Dawson *et al.*, 1998; McAnulty *et al.*, 2003) de longues durées. Enfin, certains auteurs se sont intéressés aux effets

du surentraînement sur la production de DRON (Poulsen *et al.*, 1996; Palazzetti *et al.*, 2003). D'une manière générale l'ensemble des résultats de ces études n'aboutit pas sur un consensus. En effet, alors que certains protocoles ont mis en exergue une augmentation de la peroxydation lipidique (Mastaloudis *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2001; McAnulty *et al.*, 2003; Nieman *et al.*, 2004), de l'oxydation des protéines (Tauler *et al.*, 2006), ainsi que des dommages au niveau de l'ADN (Radák *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2001), d'autres n'ont trouvé aucune modification de ces mêmes paramètres (Poulsen *et al.*, 1996; Nieman *et al.*, 2004). De la même façon, les résultats concernant les défenses anti-oxydantes ne sont pas tous similaires, avec certaines études montrant une augmentation (Ginsburg *et al.*, 1996; Mastaloudis *et al.*, 2001; Tauler *et al.*, 2006) et d'autres une diminution (Ginsburg *et al.*, 1996; Tauler *et al.*, 2006).

La divergence de ces résultats peut être liée au niveau des participants (très entraînés, de 20 à 30 h d'entraînement hebdomadaire), à l'intensité des exercices, aux marqueurs de stress oxydant utilisés et aux différents délais de prélèvements des tissus (Knez *et al.*, 2006). Ainsi le niveau d'entraînement pourrait, selon certains auteurs (Margaritis *et al.*, 1997; Knez *et al.*, 2006), avoir induit chez les participants une baisse chronique du niveau de production de DRON parallèlement à une augmentation des défenses en antioxydants. De plus, Margaritis *et al.* (1997) ont suggéré que même si la durée des protocoles expérimentaux était suffisante pour induire une production de DRON, l'intensité pouvait être trop faible (justement pour atteindre la durée d'exercice). De ce fait, les participants étant entraînés à la présence d'importants niveaux de DRON pouvaient posséder des défenses anti-oxydantes suffisantes pour contrecarrer l'accumulation des DRON et donc les rendre indétectables lors des analyses. Enfin, comme l'ont fait remarquer (Knez *et al.*, 2006) à propos d'exercices d'ultra-endurance, les marqueurs du stress oxydatif peuvent ne pas être remarqués lors de l'analyse des tissus si les prélèvements n'ont pas été effectués à des moments opportuns (selon le type de protocole) pendant et après l'exercice. En effet, il a été montré (Mastaloudis *et al.*, 2001) lors d'un 50 km de course, que le taux de lipides peroxydés, par rapport au repos, était significativement augmenté à mi-course, immédiatement et 1 h post-exercice, avant de revenir à un niveau basal 24 h post-exercice.

Pour conclure, malgré le grand nombre de travaux réalisés jusqu'à présent, il n'est toujours pas évident de trancher si oui ou non les dommages induits par la production de DRON lors d'exercices de longues durées sont un stimulus nécessaire ou néfaste aux potentielles adaptations physiologiques.

b) EOR et exercices en anaérobie

Bien qu'« anaérobie » signifie « sans oxygène », certains exercices tels que les sprints répétés ou uniques supérieurs à quelques secondes résultent en une augmentation de la consommation d'O₂ (Bloomer *et al.*, 2005). Il a déjà été mis en évidence qu'un seul exercice bref et intense suffisait à augmenter la concentration en DRON (Bailey *et al.*, 2004, 2007). Selon les revues de littérature de (Bloomer & Goldfarb, 2004) ainsi que celle de (McArdle & Jackson, 2000), la respiration mitochondriale ne serait pas le seul facteur responsable de l'augmentation des DRON. Ainsi, le stress oxydatif pourrait aussi être initié suite aux brèves périodes d'ischémie/re-perfusion, au stress mécanique et dommages musculaires dus à l'importance des contractions. Ces différents facteurs activeraient notamment des enzymes, telles que la xanthine ou la NADPH, générant des radicaux libres mais aussi pourraient initier la migration des cellules inflammatoires vers les zones affectées par la contraction musculaire.

Bien qu'il existe un certain nombre de travaux sur l'effet des exercices anaérobies sur le stress oxydatif, nous nous intéresserons ici qu'aux seuls protocoles de sprint, que ce soit en course, cyclisme ou encore natation. D'une manière générale les résultats des études sont assez contradictoires. En effet, il existe un nombre égal de travaux montrant une augmentation de la peroxydation lipidique (Marzatico *et al.*, 1997; Groussard *et al.*, 2003; Lwow *et al.*, 2007), de l'oxydation des protéines (Bloomer *et al.*, 2007), des dommages sur l'ADN (Schiffl *et al.*, 1997), que de travaux ne montrant aucun effet sur ces mêmes paramètres (respectivement : (Svensson *et al.*, 1999; Bloomer *et al.*, 2006, 2007).

Ces divergences pourraient s'expliquer par le fait que le volume d'exercice et/ou la résistance appliquée au cyclo-ergomètre soient insuffisants pour stimuler le stress oxydatif. En effet, (Baker *et al.*, 2004) ont montré que, par exemple, la peroxydation lipidique mesurée immédiatement post-exercice était fonction de la résistance lors de sprints de 30 sec en cyclisme.

❖ Respiration mitochondriale et stress oxydatif

Nous avons vu que la production de DRON augmente lors de l'exercice. Cependant les causes de cette augmentation restent relativement floues et ce malgré un nombre important de travaux traitants de la question. Différents mécanismes ont toutefois été identifiés (i.e augmentation de la consommation d'O₂, ischémie/re-perfusion, inflammation due aux dommages musculaires...) mais leur part respective dans l'augmentation du stress oxydatif est peu documentée. Il semble que plusieurs de ces mécanismes pourraient agir en synergie

mais que cela dépende du type d'exercice (durée, intensité, volume) mais aussi du mode de contraction (excentrique, concentrique, isométrique).

Pourtant, les différentes équipes de recherche travaillant sur le stress oxydatif s'accordent à dire qu'une des sources principale de radicaux libres, au repos et à l'exercice, résulte d'une « fuite » d'électrons au niveau de la chaîne de respiration située sur la membrane interne de la mitochondrie (Vollaard *et al.*, 2005). Ainsi, au repos ces « fuites » peuvent représenter jusqu'à 2% du total de l'oxygène consommé et transformé en super-oxydes (Boveris & Chance, 1973). Ce résultat permettrait donc de penser que, lors de l'exercice, la production de DRON va effectivement augmenter, puisque la consommation d'oxygène peut être multipliée par 100 à l'exercice par rapport au repos.

Bien que les groupes redox des quatre complexes formant la chaîne de respiration mitochondriale peuvent être oxydés (et donc former des radicaux super-oxydes), l'oxygène apparaît être le plus « consommé » par le cytochrome c oxydase du complexe IV (COX IV). Toutefois, les « fuites » ne sont observées que pour des dysfonctionnements des accepteurs d'électrons des complexes II et III de la chaîne de respiration. Récemment, il a notamment été montré chez le rat que la production de DRON d'un groupe réalisant un unique exercice maximale jusqu'à épuisement (56 min) augmentait de 187% pour le complexe I et de 138% pour le complexe III, comparativement à un groupe sédentaire (Saborido *et al.*, 2011). Aussi, d'après (Xu & Arriaga, 2009) le complexe I larguerait ses anions super-oxydes uniquement dans la matrice mitochondriale, alors que selon les travaux de (Muller *et al.*, 2004) les anions super-oxydes du complexes III seraient largués à la fois dans la matrice et en dehors de la membrane intérieure mitochondriale. De plus, (Vasilaki *et al.*, 2006) ont identifié dans des mitochondries isolées à partir de muscles striés squelettiques de souris adultes, après 15 min de contractions isométriques, une augmentation significative de la production de peroxyde d'hydrogène, comparé à des valeurs de souris sédentaires. Malgré les résultats de l'étude précédente, il existe toutefois peu de preuves directes quant à l'augmentation des anions super-oxydes d'origine mitochondriale lors de l'exercice, chez l'Homme ou chez l'animal.

Le stress oxydatif a, par ailleurs, été suspecté être l'un des signaux initiateurs de la BM, ce qui serait ainsi un mécanisme efficace de diminution de la production des DRON à l'exercice par le réseau mitochondrial (Davies *et al.*, 1982). En effet, pour la même quantité d'ATP produite, plus de mitochondries pourraient fonctionner à des niveaux plus faibles et ainsi limiter la « fuite » au niveau des complexes I, II et III. Ainsi, la BM agirait en parallèle des défenses anti-oxydantes. Ajouté à cela qu'il a déjà été prouvé que l'augmentation de

l'expression de PGC1 α (régulateur clé de la BM) via l'exercice chronique ou aigu, pouvait stimuler un large panel de défenses anti-oxydantes telles que Mn-SOD, Cu-SOD, Zn-SOD (manganese-coper-zinc superoxide dismutase), GPX (glutathione peroxidase), catalase ainsi qu'UCP2 et UCP3 (uncoupling proteins2/3) (St-Pierre *et al.*, 2006; Hitomi *et al.*, 2008; Ji, 2008; Gomez-Cabrera *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces études tendrait à prouver que l'augmentation significative de DRON à l'exercice ne serait pas la seule conséquence de l'augmentation du flux d'oxygène dans la mitochondrie.

L'essentiel :

- ▶ La majorité des RL sont dérivés de l'oxygène et/ou du nitrogène.
- ▶ 75% des attaques radicalaires dirigées vers les protéines.
- ▶ L'exercice physique est une des principales sources de DRON, notamment de par l'activité mitochondriale (fuite d'électrons).
- ▶ Il est prouvé une augmentation du SO lors d'exercices aigus réalisés en anaérobie.
- ▶ Il existe de grandes variations de la quantité de SO produit lors d'exercices de type aérobie (niveau et statut antioxydant des participants, durée et intensité d'exercice).
- ▶ Malgré un grand nombre d'études, pas de consensus sur les effets du SO sur les voies de signalisation.
- ▶ Les fuites d'électrons se font essentiellement au niveau des CI, CII et CIII.

Après avoir détaillé le rôle du stress oxydatif dans la dynamique des adaptations physiologiques à l'exercice, nous allons maintenant nous intéresser aux effets de l'acidose et de la régulation acido-basique au cours de l'exercice.

Chapitre III. Acidose métabolique et régulation de l'équilibre acido-basique

A. Effets de l'acidose sur les fonctions métaboliques

1. Caractéristique de l'acidose d'un point de vue métabolique

L'acidose métabolique apparaît suite à une accumulation importante d'ions H^+ , au niveau sanguin et/ou intracellulaire. L'augmentation de la $[H^+]$ est due à plusieurs facteurs. Tout d'abord on retrouve le catabolisme des acides aminés et des phospholipides, ensuite la dégradation anaérobie du glucose, puis la lipolyse des triglycérides et enfin la conversion de l'acide carbonique en bicarbonate et hydrogène pour pouvoir être transporté dans le plasma ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$). Cette accumulation se caractérise en premier lieu par une diminution de la $[HCO_3^-]$ (chute en dessous d' $\sim 22 \text{ mmol.L}^{-1}$) et d'une chute du pH ($pH = -\log [H^+]$). Le pH peut être maintenu à des valeurs neutres (~ 7.4 au niveau sanguin, ~ 7.35 dans le milieu interstitiel et ~ 7.10 dans le cytosol) grâce à plusieurs niveaux de régulation : 1/ les tampons chimiques, 2/ la ventilation et 3/ les mécanismes rénaux. La différence de ces trois niveaux de régulation se trouve dans leur délai de mise en action (de quelques secondes pour le premier à quelques heures pour le dernier) et leur puissance.

2. Conséquence de l'acidose sur l'activité contractile

Au repos le pH intramusculaire (pH_i) est égal à environ 7.05, et il a été observé, à la suite d'un exercice intense, que le pH_i pouvait atteindre des valeurs proches de 6.5 (Sahlin *et al.*, 1976; Spriet *et al.*, 1989). Il a aussi été montré chez le rat qu'une faible acidose musculaire ($pH = 6.9$) obtenue suite à des stimulations électriques s'accompagnait d'une chute de 60% de la force.

Au début d'un exercice, il est tout d'abord possible d'observer une légère augmentation du pH_i (+0.1), comme mis en évidence par deux équipes de recherche (Westerblad & Allen, 1992; Hogan *et al.*, 1999). Ce mécanisme pourrait s'expliquer par la consommation d'ions H^+ lors de la rupture de la PCr, et à l'inverse à l'arrêt de l'exercice le pH peu légèrement diminuer (-0.1) lors de la resynthèse de PCr (Metzger & Fitts, 1987; Sahlin & Ren, 1989). Il est aussi important de noter que, lorsque le pH_i descend à de très faibles valeurs après un exercice, la récupération de force se fait plus rapidement que le retour du pH à des valeurs basales (Sahlin & Ren, 1989; Cady *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1993). Ce résultat indiquerait donc qu'un pH acide ne serait pas le seul facteur responsable de toute la perte de force consécutive à la réalisation d'un exercice. Toutefois, il a auparavant été

reporté une corrélation entre chute de pH_i et dysfonctionnement de la fonction contractile chez le rat (Ranatunga, 1987). De plus, chez le chat et la souris, il a été démontré qu'à un pH_i de 6.30 et 6.67, respectivement, la force maximale enregistrée dans le *soleus* était diminuée de 10% (Allen *et al.*, 2008).

Une autre voie d'exploration par laquelle l'acidose pourrait altérer le rendement de l'appareil contractile concerne l'activité du Ca^{2+} . En effet, sans l'action de cet ion la troponine C ne permettra pas à la tropomyosine de libérer les sites de liaison acto-myosine, et donc de permettre la contraction musculaire.

Si l'on regarde dans un premier temps la capacité de largage depuis le réticulum sarcoplasmique, on s'aperçoit que peu de résultats sont disponibles, mais il a quand même été montré que l'acidose pouvait réduire l'activation des canaux libérant du calcium (RyR) (Williams & Ward, 1992; Launikonis *et al.*, 2006). Cependant, cet aspect semble affecter de manière très minime la production de force (Westerblad & Allen, 1993; Baker *et al.*, 1995; Westerblad *et al.*, 1997a; Radzyukevich & Edman, 2004).

Ensuite, il est acquis que l'acidose influence négativement le dégagement des sites de liaisons, grâce à l'action combinée du calcium et de la troponine C. En effet, les ions H^+ peuvent apparemment aussi se fixer à la troponine C et donc empêcher la formation des ponts d'acto-myosine (Fabiato & Fabiato, 1978; Donaldson *et al.*, 1978). En parallèle, il faut tout de même souligner que des valeurs basses de pH_i interfèrent aussi sur la capacité des pompes Serca à recapter le calcium (jusqu'à 5 fois moins d'affinité pour un pH_i passant de 7.03 à 6.3) (Wolosker *et al.*, 1997). Ainsi, ce ne serait pas la disponibilité des ions calcium qui va altérer la contraction musculaire (puisque non recaptés et donc toujours présent dans le sarcoplasme) mais bien la concurrence qui existe avec les ions H^+ pour la fixation sur la troponine C. De plus, ces mécanismes semblent directement impliqués dans le ralentissement de la vitesse de relaxation de l'appareil contractile chez la grenouille *Xenopus* (Westerblad *et al.*, 1997b). Les mêmes expérimentations n'ont toujours pas été effectuées sur muscles humains *in vivo*, mais *in vitro* il a été observé une forte corrélation entre le nombre de ponts d'acto-myosine formés et la vitesse de relâchement de fibres musculaires fatiguées. Ce qui implique directement une limitation de la performance lors d'exercice dynamique où un rapide « turnover » au niveau des sites de liaison est nécessaire (Allen *et al.*, 1995).

Enfin, il a été identifié que l'acidose pouvait avoir un effet bénéfique sur la contraction musculaire. En effet, (Pedersen *et al.*, 2004) mettent en avant, sur fibres musculaire

dépolarisées, le fait que l'acidose intracellulaire augmente l'excitabilité du système des Tubules-T, limitant ainsi l'apparition de la fatigue lors de contractions répétées. Ce résultat s'expliquerait par une imperméabilité membranaire au chlore (Cl^-) plus importante en acidose, réduisant d'autant la quantité de Na^+ nécessaire à la propagation d'un potentiel d'action. De cette façon, l'excitabilité des Tubules-T sera protégée plus longtemps au cours d'un exercice.

L'essentiel :

- ▶ Les paramètres physiologiques sanguins et musculaires peuvent être fortement perturbés par l'acidose métabolique.
 - ▶ Bien que multi-factorielle, la baisse de contractilité musculaire pourrait être influencée par l'acidose métabolique.
 - ▶ Cependant, les résultats ne sont pas tous concordants.
-

Nous venons de préciser les effets de l'acidose sur l'activité contractile du muscle et nous allons maintenant nous intéresser aux potentiels effets de l'acidose sur les paramètres physiologiques, à savoir la chaîne de transport de l'oxygène.

3. Conséquence potentielles de l'acidose métabolique sur le transport O₂.

a) *Observation de la chute de VO₂ au cours de l'exercice intense mené à l'épuisement.*

Différents travaux dans la littérature se sont intéressés à l'évolution de la consommation d'oxygène (VO₂) au cours d'exercices supramaximaux menés à l'épuisement. Certains travaux ont montré que la valeur maximale de VO₂ (VO_{2max}) peut être sollicitée pendant ce type d'épreuve (Astrand & Saltin, 1961; Granier *et al.*, 1995; Gatin *et al.*, 1995; Zamparo *et al.*, 1999; Billat *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2005a; Hanon *et al.*, 2008) alors que d'autres ont indiqué l'atteinte de valeurs sous maximales de VO₂ (Medbø & Tabata, 1989; Yamamoto & Kanehisa, 1995). Le type d'ergomètre utilisé (ergocycle, tapis roulant, épreuve sur piste, kayak...) et donc la masse musculaire impliquée, le protocole d'exercice choisi (all-out, puissance constante, compétition...), ainsi que le niveau d'expertise des sujets (sédentaire, actif, confirmé ou haut niveau), sont différents paramètres qui peuvent contribuer à expliquer les divergences au sein de la littérature en ce qui concerne l'atteinte ou non de VO_{2max} au cours d'exercices supra-maximaux menés jusqu'à l'épuisement. Jusqu'à très récemment, il était couramment admis qu'une fois atteint, l'état stable d'une valeur de VO₂ sous-maximale ou maximale se maintenait jusqu'à la fin de l'exercice si l'intensité le permettait (Astrand & Saltin, 1961), ce qui en réalité n'est pas toujours le cas.

De récentes études ont mis en exergue, que suite à un état stable, une diminution de VO₂ pouvait se produire à la fin d'épreuves exhaustives d'intensité sévère à supramaximale. Cette diminution de VO₂ en fin d'exercice a été mise en évidence au cours d'épreuves courues selon une stratégie de compétition : chez tous les athlètes au cours d'un 800m (Thomas *et al.*, 2005a), chez 8 athlètes sur 12 lors d'un 1500 m (Hanon *et al.*, 2008) et chez tous les athlètes sprinteurs sur 400m (Hanon *et al.*, 2010).

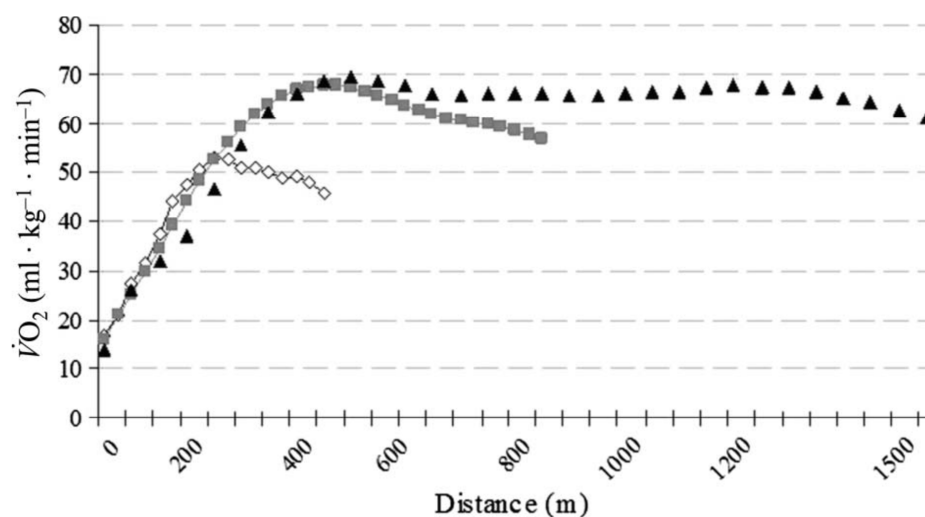


Figure 10 : Evolution de la VO₂ au cours de tests de course de 400-m (◇), 800-m (■), et 1500-m (▲) running tests.

Ainsi, une chute de VO₂ correspondant à 15 % de la valeur de VO₂ pic a été observée dans le dernier 100 m du 400 m pour tous les athlètes (Figure 3), confirmant en cela les résultats préalables déjà observés au cours d'exercices de course épuisants réalisés à puissance constante (Nummela & Rusko, 1995; Perrey *et al.*, 2002) et sur le terrain (Thomas *et al.*, 2005a; Hanon *et al.*, 2008). Par ailleurs, bien que non discuté par les auteurs respectifs, ce phénomène apparaît sur les figures d'autres études réalisées sur le terrain en kayak ou en cyclisme (Yamamoto & Kanehisa, 1995; Zamparo *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2002). Néanmoins, les études antérieures réalisées sur 400 m n'observaient pas de chute de VO₂. Cette fois encore, ceci peut être expliqué par le choix des fenêtres d'échantillonnage utilisées par les auteurs (200 m (Duffield *et al.*, 2005) et 30 sec (James *et al.*, 2007)) qui ne permettent pas d'observer ce phénomène au cours d'un exercice aussi court. Nummela *et al.* (Nummela & Rusko, 1995) qui avaient observé une chute de VO₂ à la fin d'un exercice maximal de 50 sec sur tapis roulant utilisaient également un moyennage sur 5 sec.

Par ailleurs, l'analyse attentive des figures présentées dans les articles princeps d'Astrand & Saltin (1961), de (Gastin & Lawson, 1994), de (Yamamoto & Kanehisa, 1995), de (Zamparo *et al.*, 1999) et de (Bishop *et al.*, 2002) fait apparaître, semble-t-il, le même phénomène, que ce soit sur bicyclette ergométrique ou kayak. La particularité de toutes ces études repose sur la stratégie de gestion de l'effort au cours de l'épreuve, avec à savoir un départ très rapide suivi inexorablement d'une chute de vitesse (ou de puissance) jusqu'à la fin de l'exercice, mais qui se maintient toujours à un niveau de vitesse (ou de puissance) supérieur à la vitesse maximale aérobie. On peut s'interroger sur le fait que la chute de VO₂

pourrait être liée à la chute de vitesse, mais différentes études menées sur un exercice exhaustif à puissance constante ont relaté aussi ce phénomène de chute de VO_2 . Ainsi, Perrey *et al.* (2002) ont mis en évidence lors d'une épreuve sous maximale effectuée à 95 % de $\text{VO}_{2\text{max}}$ et conduite jusqu'à l'épuisement, une décroissance de VO_2 ($P < 0.01$) lors de la dernière phase de sa cinétique chez 7 sujets d'endurance entraînés sur 13. De même, (Nummela & Rusko, 1995) ont décrit au cours d'un 400m, réalisé sur tapis roulant et mené jusqu'à l'épuisement, une baisse significative de VO_2 ($P < 0.05$) en fin d'exercice, chez 13 sujets sur 14.

❖ Hypothèses permettant d'expliquer la chute de VO_2

Aussi, quelle que soit la répartition de l'effort, il ressort que le point commun de ces études est l'épuisement volontaire des sujets alors que les intensités, et donc les durées d'effort, sont différentes. La chute de VO_2 peut donc être un des facteurs interférant avec la chute de vitesse, mais ceci n'est pas systématique. D'un point de vue physiologique, nous pouvons émettre différentes hypothèses sur les facteurs susceptibles de contribuer à la chute de VO_2 , bien que les causes théoriques de cette chute de VO_2 aient été peu examinées. Néanmoins, Perrey *et al.* (2002) avancent plusieurs hypothèses non exclusives : une chute du débit cardiaque et/ ou de la différence artério-veineuse en O_2 imputable à une vasoconstriction dans les muscles actifs, une diminution de la saturation artérielle en O_2 et/ou une inhibition des phosphorylations oxydatives. De plus, une fatigue des muscles respiratoires a pu être démontrée lors d'exercices épuisants (Johnson *et al.*, 1993). La chute du volume courant qui peut selon (Gallagher *et al.*, 1985) témoigner d'une réduction de la force des muscles inspiratoires, a par ailleurs été mise en évidence dans les précédentes études où une chute de VO_2 avait été observée (Perrey *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2005a; Hanon *et al.*, 2008).

❖ Acidose métabolique et chute de VO_2

Il a par ailleurs été démontré que l'acidose métabolique induite à l'exercice pouvait provoquer différentes perturbations physiologiques dans la chaîne de transport de l'oxygène (Dempsey *et al.*, 1982). Or récemment, il a été observé, dans le dernier 100 m de la course de 400 m, une diminution significative du pH (de 7.18 après 300 m de course à 7.00 après 400 m de course, soit une augmentation de près de 60 % du nombre de protons) et une diminution significative de la $[\text{HCO}_3^-]$ (de 10.7 après 300 m de course à 4.9 mmol.l^{-1} après 400 m de

course, soit une diminution de l'ordre de 54 %) (Hanon *et al.*, 2010). Il ressort de ces résultats une forte relation inverse entre la chute de VO_2 dans le dernier 100 mètres d'une course de 400 m et l'acidose sanguine à 300 m de course ($r = -0.76$, $P < 0.05$), d'une part et la déplétion en ions bicarbonates ($r = -0.67$, $P < 0.05$), d'autre part (Hanon *et al.*, 2010). Cette « aggravation » de l'état métabolique observée à la fin du 400 m, est conforme aux valeurs de bicarbonates relevées dans le sang après une compétition d'aviron (Nielsen, 1999) ainsi qu'aux valeurs de capacité tampon musculaire que nous avons observées à la fin d'un exercice épuisant de 45 sec (Bishop *et al.*, 2007). De plus, la baisse de VO_2 était inversement corrélée à la valeur de saturation artérielle en oxygène (SaO_2) mesurée à la première minute de récupération ($r = -0.73$, $P < 0.05$). Une relative désaturation artérielle est susceptible de s'installer à l'exercice à des intensités voisines de VO_{2max} (Dempsey *et al.*, 1984), et pourrait provoquer sa chute avant l'épuisement total de l'athlète (Dempsey & Wagner, 1999). De leur côté, (Nielsen *et al.*, 2002) ont montré qu'une supplémentation en bicarbonate au cours d'une épreuve maximale de 2000 m en aviron, atténuait l'acidose métabolique et consécutivement la désaturation artérielle, ce qui nous laisse spéculer sur une possible atténuation de la baisse de VO_2 lorsque l'acidose est compensée. Enfin, (Jubrias *et al.*, 2003) ont démontré que l'acidose pouvait inhiber les mécanismes de phosphorylations oxydatives au cours de l'activité musculaire, et donc conduire potentiellement à une baisse de VO_2 . Ceci irait dans le sens des travaux de (Hirvonen *et al.*, 1992) qui ont observé une chute significative de la concentration en ATP musculaire dans le dernier 100 m d'une épreuve de 400 m, pouvant témoigner d'un moins bon rendement oxydatif lié aux perturbations métaboliques.

De plus, (Dempsey *et al.*, 1982) ont préalablement démontré que l'accumulation des ions H^+ pouvait induire des perturbations physiologiques dans le système de transport d' O_2 . De fait, pendant les courses de 400, 800 et 1500 m, les participants présentent des valeurs de fréquence respiratoire et de volume courant particulièrement élevées. Ces résultats peuvent indiquer que les coureurs hyperventilent dans le but de partiellement compenser l'acidose métabolique et de maintenir une pression alvéolaire partielle en O_2 optimale (Juel, 1996a). Il est à noter que la ventilation continue d'augmenter alors que VO_{2max} a déjà été atteint (Dempsey *et al.*, 1982). De plus, une fatigue des muscles respiratoires et une diminution du volume courant ont déjà été démontrées au cours d'exercices épuisants (Gallagher *et al.*, 1985), ce qui pourrait indiquer une réduction de la force des muscles inspiratoires. Au cours d'exercices maximaux sollicitant l'ensemble du corps, la combinaison d'un pH très bas et d'une faible capacité vitale (non mesurée dans cette étude) comme démontré par Nielsen *et al.*

(1999) pourrait devenir critique pour la pression artérielle en oxygène (PaO_2) et par conséquent pour VO_2 (Dempsey *et al.*, 1982).

b) Oxygénation musculaire.

Comme vu précédemment lors d'exercices dépassant les quelques secondes, les mitochondries augmentent significativement leur rendement énergétique, modifiant ainsi le profil d'oxygénation musculaire. Cette oxygénation, pouvant être mesurée par la Near Infrared Spectroscopy (NIRS), peut donc être utilisée pour déterminer l'équilibre entre l'oxygène délivré (QO_2) et l'oxygène consommé (VO_2) au niveau musculaire (mesuré par les modifications de désoxyhémoglobine (HHb)).

Comme dit précédemment, l'hémoglobine transporte la très grande majorité de l'oxygène, c'est pourquoi la mesure de la saturation se fera essentiellement à partir de cette molécule. Chaque molécule d'hémoglobine peut transporter jusqu'à 4 molécules d' O_2 . Ainsi, la saturation en O_2 fait référence au ratio entre la quantité d' O_2 fixée à l'hémoglobine et sa capacité de transport totale. Le principe de la saturation est basé sur la pression partielle en O_2 (pPO_2) à laquelle est exposée l'hémoglobine (Hall *et al.*, 1996). De cette façon, l' O_2 se fixera facilement à l'hémoglobine au niveau des alvéoles pulmonaires, où la pPO_2 est élevée, avant d'être transporté vers les tissus périphériques et y être libéré, où la pPO_2 est plus faible. De plus, la HHb aura une affinité accrue pour le CO_2 pour permettre une évacuation vers les poumons (effet Haldane).

Ce principe d'association/dissociation est illustré par une courbe sigmoïdale représentant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène au fur et à mesure que la pPO_2 augmente. Ainsi, pour une pPO_2 de 100 mmHg la saturation en oxygène sera d'environ 97% (Hall *et al.*, 1996). Cette courbe de dissociation est affectée par plusieurs facteurs dont le pH est l'un des principaux avec la température, la pPO_2 , la pPCO_2 et le 2-3 disphosphoglycerate (2-3 DPG), qui est un métabolite provenant de la glycolyse anaérobie (Dickson 1995). A l'exercice, la courbe peut être déplacée vers la droite (faible affinité pour l' O_2) du fait de la combinaison de ces éléments : baisse du pH, baisse de la pPO_2 , augmentation de la pPCO_2 , de la température et de la [2-3 DPG] (Riggs *et al.*, 1973). Ceci a pour effet de favoriser le "largage" de l' O_2 au niveau musculaire notamment et ainsi d'augmenter la production d'énergie mitochondriale. Toutefois, l'acidose sanguine pouvant intervenir au niveau des complexes alvéoles pulmonaires-capillaires, la saturation en oxygène pourra être diminuée

dès le début du cycle de transport, limitant par la même occasion la quantité d'O₂ finalement délivrée au niveau tissulaire.

Il a été mis en évidence que lors d'exercices brefs de haute intensité, impliquant donc le métabolisme anaérobie, l'accumulation d'ion H⁺ allait entraîner une augmentation de la pPCO₂ (McArdle *et al.*, 2010), ce qui va avoir pour effet de stimuler la respiration. En effet, les ions H⁺ tamponnés en premier lieu par les ions HCO₃⁻ vont amener la formation d'eau et de CO₂ ($H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2O + CO_2$), CO₂ qui devra alors être expiré afin de ne pas renforcer la désaturation de l'hémoglobine.

c) Influence de l'acidose métabolique sur la respiration mitochondriale

Plusieurs études ont rapporté une modification de la respiration maximale mesurée à partir de mitochondries isolées en condition d'acidose aigüe. Ainsi, lorsque le pH est réduit dans une gamme physiologique (de 7.0 à 6.5), certaines études montrent une diminution de la fonction mitochondriale (Hansford, 1972; Mitchelson & Hird, 1973) alors que d'autres considèrent l'effet de l'acidose comme négligeable (Pilegaard *et al.*, 1994; Tonkonogi *et al.*, 1999). Cependant, il a été démontré que, toujours pour des mitochondries isolées, l'acidose réduit la capacité oxydative maximale quand elle est induite avant la stimulation des mitochondries par l'ADP (Tonkonogi & Sahlin, 1999). En revanche, si l'acidose est induite alors que les mitochondries sont déjà activées par l'ADP, il n'y a pas de réduction de la capacité maximale oxydative. Ce résultat démontre que la respiration mitochondriale présente une sensibilité différente à l'acidose en fonction de son statut d'activation, et que celle-ci s'avère plus forte pour des mitochondries isolées comparées à des mitochondries étudiées *in situ* (i.e., fibres perméabilisées) (Walsh *et al.*, 2002). Par ailleurs, (Jubrias *et al.*, 2003) ont détecté une diminution de la capacité oxydative lors d'une acidose intracellulaire.

L'ensemble de ces résultats est toutefois en adéquation avec un effet potentiellement inhibiteur de l'acidose sur la respiration mitochondriale maximale et non un effet amplificateur comme décrit par (Tonkonogi *et al.*, 1997; Leek *et al.*, 2001).

L'essentiel :

- ▶ La chute de VO_2 observée en fin d'exercice intense pourrait être consécutive à l'apparition de l'acidose métabolique pouvant inhiber la phosphorylation oxydative.
 - ▶ L'accumulation d'ions H^+ perturbe le système respiratoire par une hyperventilation destinée à lutter contre l'acidose métabolique.
 - ▶ Plus la chute de VO_2 sera importante en fin d'exercice intense, plus la $[\text{HCO}_3^-]$ sera faible.
 - ▶ L'alcalose induite peut atténuer la désaturation artérielle en O_2 .
 - ▶ La diminution de pH favorise le largage de l' O_2 au niveau capillaire, mais peut diminuer la saturation en oxygène au niveau pulmonaire.
-

B. Régulation de l'équilibre acido-basique

1. L'importance de la capacité tampon

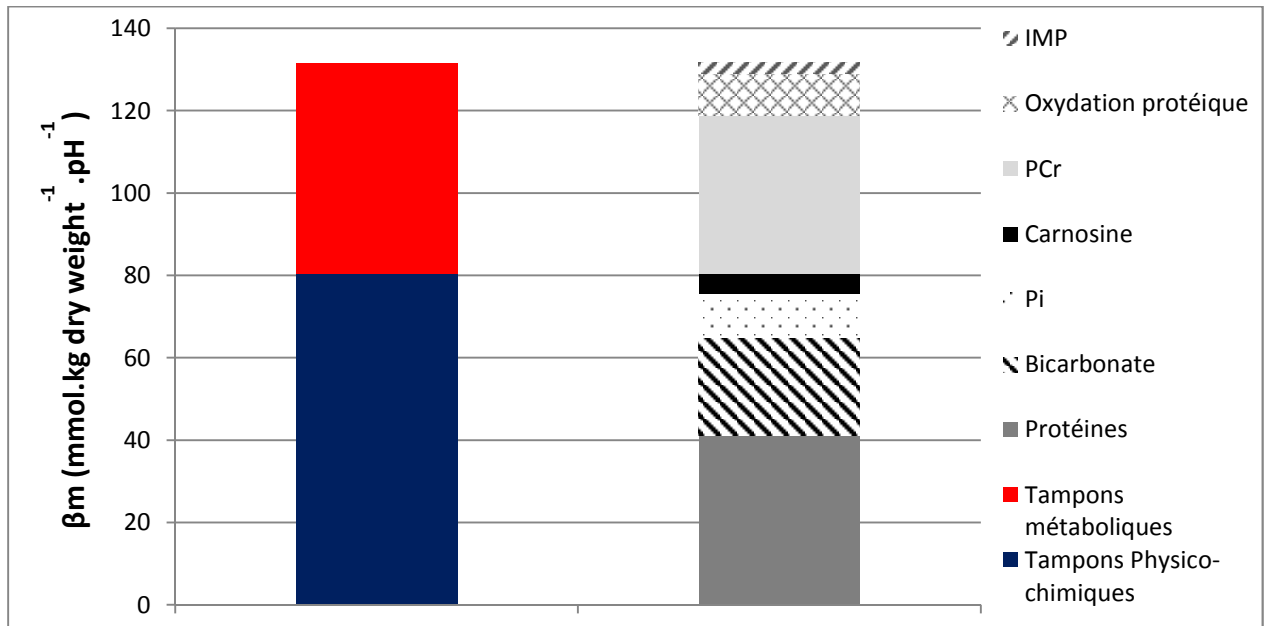


Figure 11 : Représentation des différents éléments constituant la capacité tampon totale. Données issues de Sahlin et Hultman 1980 (Hultman & Sahlin, 1980).

Au début d'un exercice, le pH ne chute pas immédiatement grâce à l'action de plusieurs composants musculaires et sanguins. Le système tampon intracellulaire, incluant le phosphate inorganique (P_i), des acides aminés, l'oxydation des protéines, l'hydrolyse de la PCr, la $[HCO_3^-]$, permet de lier ou de consommer les ions H^+ afin de protéger la cellule contre une augmentation trop importante de protons. Nous pouvons ici souligner le double rôle du lactate en tant que tampon, qui n'était pas identifié par Sahlin et Hultman en 1980 (Figure 11). Cependant il peut à la fois fixer des ions H^+ et participer à leur élimination du milieu intracellulaire en leur faisant passer la barrière membranaire (Figure 12) (Robergs *et al.*, 2004). De plus, vont faire partie de cette capacité tampon l'activité mitochondriale et toutes les protéines membranaires jouant un rôle dans le transport et/ou l'échange de protons.

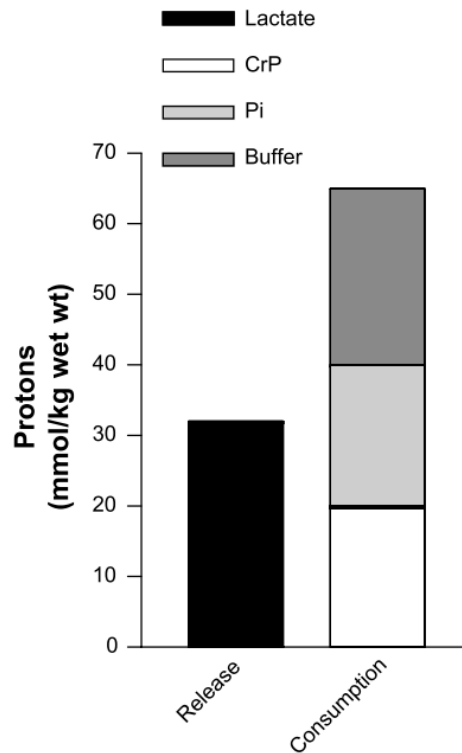


Figure 12 : Comparaison entre la $[H^+]$ sortie de la cellule à l'aide du lactate et la consommation des ions H^+ par l'ensemble des tampons. D'après Robergs (Robergs *et al.*, 2004), adapté à partir des données de Spriet (Spriet *et al.*, 1987a, 1987b) et Sahlin (Sahlin *et al.*, 1978).

La capacité tampon du muscle strié squelettique (β_m *in vitro*) est estimée classiquement par titration d'un homogénat musculaire avec un acide fixe (c'est-à-dire que l'on broie le muscle dans une solution contenant du fluorure de sodium) et la mesure de la capacité tampon musculaire déprotéinée se fait à partir d'un homogénat identique où l'on ajoute de l'acide sulfosalicylique avant centrifugation à 1000 g pendant 10 min pour détruire les protéines (Parkhouse *et al.*, 1985). Ensuite, on mesure le pH à l'aide d'une microélectrode à pH connectée à un pH-mètre. Après cette mesure initiale, on ajuste le pH de l'homogénat à 7,2 avec de l'hydroxyde de sodium, puis on titre jusqu'à un pH de 6,2, c'est-à-dire que l'on ajoute successivement 2 μ l d'acide chlorhydrique à 10 mM, puis on détermine la capacité tampon à l'aide de la quantité d'acide que l'on a ajouté. Plus on a ajouté d'acide pour atteindre la valeur de pH de 6,2, plus la capacité tampon du muscle est importante puisque le muscle résiste à l'acidose induite. On peut ainsi évaluer la contribution des tampons physicochimiques, tels que des résidus histidine liés à des protéines, des dipeptides contenant des noyaux imidazoles et des phosphates à l'intérieur du muscle. Cependant, cette technique d'estimation de β_m ne prend pas en compte les tampons métaboliques « dynamiques » tels que la re-phosphorylation de l'ADP en PCr.

En 1998, (Pilegaard & Asp, 1998) ont étonnamment observé une baisse de la capacité tampon musculaire juste après un exercice excentrique intense chez le rat. Il a aussi été mis en évidence qu'un exercice de haute intensité de 45 sec était associé à une diminution aiguë de βm post-exercice chez des femmes modérément entraînées (Bishop 2007). Les résultats de cette première étude chez l'homme nécessitaient d'être confirmés, et nous devons déterminer si cette réponse était une réponse typique à l'issue de différents types d'exercices de haute-intensité, et si elle était observée chez tous les sujets (homme et femme, entraînés et non entraînés). En effet, les réponses métaboliques diffèrent entre les hommes et les femmes (Esbjörnsson-Liljedahl *et al.*, 1999) et entre les sujets entraînés et non-entraînés (Harmer *et al.*, 2000). Aussi, il se pourrait que les variations de βm diffèrent alors en fonction des populations étudiées et du niveau d'entraînement (Edge *et al.*, 2006b). (Bishop *et al.*, 2009) se sont par ailleurs intéressés à déterminer lequel ou lesquels des tampons physico-chimiques mesurés par la technique de titration pouva(i)en)t subir une diminution post-exercice intenses : c'est-à-dire les phosphates intramusculaires, les dipeptides et les résidus histidine des protéines, notamment de la carnosine (N- β -alanyl-histidine). Dans ce contexte, la capacité tampon du muscle a été évaluée avant et immédiatement après différents types d'exercice de haute intensité : exercice réalisé à 120% de VO_{2max} et exercice de sprints répétés (6 x 4 sec de sprint all-out entrecoupés de 21 sec de récupération), ainsi qu'avant et après un entraînement intermittent de six semaines à haute intensité pour déterminer s'il existait un effet protecteur avec l'entraînement.

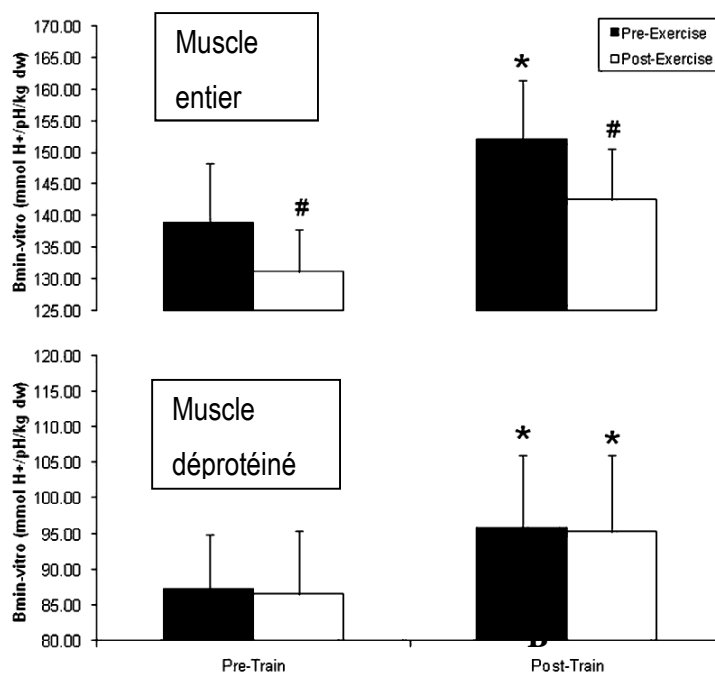


Figure 13 : Evolution de la capacité tampon musculaire mesurée par titration ($\beta_{\text{min vitro}}$; mmol H^+ / pH / kg de muscle sec d.w.-1 pH-1) avant (■) et après (□) exercice dans le muscle entier et dans le muscle déprotéiné avant et après six semaines d'entraînement intermittent à haute intensité chez des femmes actives. * $P < 0.05$: augmentation significative après l'entraînement. # $P < 0.05$, différence significative entre pré- et post-exercice. D'après Bishop (Bishop *et al.*, 2009).

D'après la Figure 13, il apparaît que la β_m du muscle diminue après un exercice de haute intensité chez tous les sujets (A), alors que la capacité tampon non-protéique ne varie pas (B), et ce avant et après entraînement en sprints. Aussi, pour des valeurs de pH musculaire comprises entre 6,61 et 6,78 post-exercice (Bishop *et al.*, 2009), nous pouvons conclure que la diminution de β_m totale est liée à la diminution de la part protéique, et donc mettre en cause l'histidine, seul acide aminé à exercer une fonction tampon dans la gamme physiologique de pH intracellulaire (Hultman *et al.*, 1985). Sa diminution pourrait relever d'un ou plusieurs facteurs, à savoir 1/ une perte de protéines musculaires au niveau du muscle, et/ou 2/ un relargage de résidus histidine à partir de protéines, et/ou 3/ des modifications chimiques du noyau imidazole appartenant à l'histidine.

Par ailleurs, si l'entraînement ne protège pas des effets délétères de l'exercice aigu, certains résultats montreraient qu'il augmente la β_m totale musculaire, résultant à la fois d'une augmentation de la part protéique et de la part non-protéique de la capacité tampon (Bishop *et al.*, 2009). Ceci ne semble pas résulter d'une modification de la concentration de phosphate intracellulaire après entraînement (Harmer *et al.*, 2000), mais pourrait être expliqué en partie par une augmentation de la carnosine déjà observée après entraînement (Parkhouse &

McKenzie, 1984; Sahlin & Henriksson, 1984; Suzuki *et al.*, 2004). De plus, la baisse de βm totale post-effort est positivement corrélée à la βm totale mesurée au repos, cette dernière étant donc un facteur plus important que le type d'exercice réalisé (continu ou répété). Ces résultats signifient aussi que les athlètes entraînés, pouvant produire de fortes acidoses métaboliques, connaissent une variation plus importante de leur capacité tampon au cours de l'exercice intense comparativement à des sujets peu ou pas entraînés.

L'ensemble des résultats ici présentés mettent en évidence que des exercices de haute intensité (sprint seul et sprints répétés) provoquent une baisse significative de la capacité tampon musculaire. Diminution qui pourrait s'expliquer par une baisse de la part protéique de la capacité tampon, en particulier par une diminution des résidus histidine. De plus, la baisse de βm est en relation avec le niveau initial de repos, ce dernier étant augmenté par l'entraînement. En revanche, l'entraînement à haute intensité ne protège pas des effets délétères de l'exercice sur la diminution de la βm après un exercice intense.

L'essentiel :

- ▶ La principale « défense » contre la chute de pH se fait par les différents systèmes tampon.
 - ▶ Le lactate joue comme tampon principalement en permettant aux ions H^+ de traverser la membrane cellulaire.
 - ▶ Suite à un exercice de haute intensité la capacité tampon musculaire est diminuée.
 - ▶ L'entraînement permet d'augmenter la βm totale de repos, et permet ensuite de retarder la baisse de pH à l'exercice.
-

Si la βm permet de limiter l'acidose intracellulaire, différents transporteurs sarcolemmaux peuvent également jouer un rôle dans la régulation du pH intracellulaire lors de l'exercice. Il s'agit notamment des MCT1 et 4, NHE1 et NBCe1 donc nous allons maintenant aborder les propriétés.

2. La complémentarité des protéines de transports (MCT, NHE1, NBCe1). (Figure 14)

a) *Leur localisation.*

❖ *MonoCarboxylates Transporters (MCT).*

Dans différents tissus, dont le muscle est le principal concerné, le transport actif de molécules riches en énergie telles que le lactate et le pyruvate, ainsi que d'autres acides mono-carboxyliques, est assuré par différents isoformes de MCT (Monocarboxylate Transporters). Chez les mammifères au moins 14 isoformes ont d'ores et déjà été trouvées (Halestrap & Meredith, 2004). Dans le muscle strié squelettique, les isoformes 1, 2 et 4 sont les principales représentantes des MCTs, et assurent donc la plus grande partie du transport de lactate et d'ions H⁺ de façon bidirectionnelle (i.e. milieu cellulaire vers milieu extracellulaire ou vis-versa) et ceci sans consommation d'énergie.

Pour rappel, les MCT peuvent être révélés par la technique du Western Blot (que nous détaillerons ultérieurement), et apparaissent chez l'homme à un poids moléculaire de 45 kDa.

❖ *Les MCT1.*

Cette isoforme a été identifiée dans l'ensemble des muscles squelettiques humains et, du fait de la présence d'un promoteur universel au sein de son gène, semble être ubiquitaire. (Pilegaard *et al.*, 1999b) mettaient en évidence par immunofluorescence la présence de MCT1 principalement au sein des fibres de type I ($r= 0.66$; $P<0.01$), ainsi qu'une corrélation négative entre le pourcentage de fibres musculaires de type IIx d'un muscle et l'expression protéique de MCT 1 ($r= -0.73$; $P<0.01$). Ainsi, il apparaît qu'un muscle composé uniquement de fibres de type IIa et IIx ne présentera seulement 40% du contenu en MCT 1 d'un muscle purement oxydatif.

❖ *Les MCT4.*

Cette isoforme, relativement proche de MCT1 (43% d'homologie séquentielle), a été détectée à la fois dans le rein, le placenta et dans tous les muscles striés squelettiques analysés par (Pilegaard *et al.*, 1999b) (vaste externe, triceps brachial et soléaire). Cependant, sa distribution est substantiellement différente de celle de MCT1. En effet, dans le muscle humain la densité en MCT4 est indépendante du type de fibres et est, de plus, sujette à une

grande variabilité interindividuelle (Pilegaard *et al.*, 1999b). Cette distribution s'oppose à celle observée dans le muscle de rat où MCT4 apparaît positivement corrélé avec les fibres musculaires glycolitiques (Wilson *et al.*, 1998; Juel & Halestrap, 1999).

❖ Localisations intracellulaire des MCT1 et MCT4

Si l'on s'intéresse maintenant à la localisation cellulaire, (Bonen, 2000) démontrent, qu'indépendamment du type de muscle, la plus forte concentration en MCT1 et MCT4 se situe au niveau de la membrane plasmique. Ensuite, les auteurs ont pu normaliser la concentration de ces deux isoformes au sein de la cellule musculaire selon les concentrations plasmiques. Ainsi, il apparaît que MCT4 est plus concentré que MCT1 dans les tubules-T (35 vs 14%), au niveau du réticulum sarcoplasmique (43 vs 15%) et au niveau des triades (66.5 vs 32%). De plus, alors qu'une quantité négligeable de MCT1 (1.7%) est présente au niveau des membranes intracellulaires, la présence de MCT4 est beaucoup plus prononcée (24%).

Il semble intéressant de noter les similitudes apparentes entre les MCTs et une autre famille de protéines transmembranaires que sont les GLUT. Ces transporteurs en charge du transport du glucose se divisent aussi en deux isoformes principales que sont GLUT1 et GLUT4. La première isoforme se retrouve majoritairement dans la membrane plasmique, alors que l'isoforme GLUT4 est majoritairement présente dans le pool intracellulaire (Thorens & Mueckler, 2010) les tubules T et les triades (Roy *et al.*, 1997). Si l'on fait le parallèle avec les isoformes de MCT1 et 4, on s'aperçoit que seule l'isoforme MCT4 est présente dans le pool intracellulaire, ce qui soulignerait une différence fonctionnelle entre MCT1 et MCT4. En effet, à l'image de GLUT4, (Bonen, 2000) avancent l'hypothèse d'un recrutement du pool intracellulaire de MCT4 afin de faciliter l'extrusion du lactate lors d'exercices musculaire. Toutefois, cette hypothèse n'a toujours pas été vérifiée.

❖ Les NHE.

Les NHE (pour « sodium proton exchanger » ou « Na⁺/H⁺ exchanger ») forment une grande famille de protéines de transport ubiquitaires, situées uniquement sur les parois membranaires (Kemp *et al.*, 2008), que l'on retrouve dans tous les organismes vivants (bactéries, plantes, mammifères...). La protéine est détectable par Western Blots à hauteur d'un poids moléculaire de 100 kDa. Ce système d'échange Na⁺/H⁺ a pour la première fois été mis en évidence en 1977 par (Aickin & Thomas, 1977), comme étant un système de

régulation du pH_i . Depuis, neuf isoformes de NHE ont été découvertes chez l'homme. Les isoformes NHE1 et NHE2 sont présentes dans le muscle strié squelettique et semblent être activées lorsque le pH_i atteint de faibles valeurs. NHE3 se retrouve principalement dans les parois intestinales et le rein (Amemiya *et al.*, 1995), NHE4 dans l'estomac et le rein (Orlowski *et al.*, 1992), NHE5 se situe spécifiquement dans le cerveau (Baird *et al.*, 1999). Enfin les isoformes 6 à 9, qui sont de loin les moins connues, semblent être localisées dans les compartiments intracellulaires pour y moduler très finement le pH (Nakamura *et al.*, 2005).

❖ Les NBC.

Les co-transporteurs sodium/bicarbonate ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$) ont été classifiés en quatre isoformes distincts par (Soleimani & Burnham, 2001). Seules les isoformes NBCe1 et NBC4 ont pu être détectés, au niveau protéique (150 kDa et 200 kDa respectivement), dans le muscle strié squelettique humain (Kristensen *et al.*, 2004a). L'isoforme NBC3 a quant-à elle été identifiée au niveau de l'ARN_{mt} dans le cœur et le tissu musculaire humain (Pushkin *et al.*, 1999).

Contrairement au muscle de rat où le contenu en NBCe1 était uniformément réparti entre les muscles rapides et lents, et NBC4 positivement corrélé avec la densité en fibres musculaires oxydatives ; chez l'homme ces deux isoformes sont négativement corrélées à la portion de fibres oxydatives. Il est toutefois important de noter ici aussi de grandes variations interindividuelles. Par ailleurs chez l'homme, l'analyse par immunohistochimie de muscles squelettiques révèle la présence de NBCe1 et 4 à la fois dans la membrane du sarcolemme et dans des structures intracellulaire (Tubules-T principalement) (Kristensen *et al.*, 2004a).

L'essentiel :

- ▶ MCT1, 2 et 4 sont les plus présentes dans le muscle.
 - ▶ MCT1 se retrouve plutôt dans les FM de type I, et l'expression des MCT4 semble affranchie du type de FM malgré une grande variabilité interindividuelle.
 - ▶ MCT1/4, NHE1 et NBCe1 sont présentent sur la membrane cellulaire, de plus MCT4 et NBCe1 formeraient aussi un pool intracellulaire.
 - ▶ NBCe1 se trouve à la fois dans les fibres oxydatives et glycolitiques.
-

b) Leur fonction et mécanismes de fonctionnement

Le pH_i dans les muscles squelettiques est régulé par l'activité coordonnée de plusieurs transporteurs. Dans le muscle au repos, la production cellulaire de protons ainsi que le potentiel de membrane négatif permettent l'accumulation d'ions H^+ à l'intérieur même de la cellule. Toutefois, cette tendance à l'accumulation peut être compensée par un système de transporteurs intra-membranaires, comme ceux présentés précédemment, permettant le maintien de l'homéostasie.

Alors que les contractions musculaires sont associées à une augmentation importante de lactate et d'ions H^+ notamment, les exercices de haute intensité nécessitent une élimination efficace de ces produits soit par les différents systèmes de transports soit par la capacité tampon (détaillée ensuite, (Edge *et al.*, 2006b; Bishop *et al.*, 2009)). Ainsi, la majeure partie de ces efflux est assurée par les MCTs (Juel *et al.*, 1994; Juel, 1996a, 1997; Messonnier *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2012). En effet, pendant l'exercice, l'élimination du couple lactate/ H^+ par les MCTs excède la somme de l'élimination des protons par l'échangeur Na^+/H^+ et le système bicarbonate-dépendant (Juel, 1995, 1997; Pilegaard & Juel, 1995). Les MCTs sont responsables de la diffusion couplée et facilitée d'un lactate pour un proton (1 :1) (Juel, 1996a), dans le sens du gradient de concentration. L'élimination des protons est aussi complétée par les échangeurs Na^+/H^+ , qui sont cependant plus actifs au repos qu'à l'exercice (Aickin & Thomas, 1977; Juel, 1998, 2000; Mohr *et al.*, 2007), ainsi que par des systèmes impliquant le bicarbonate tels que les NBCe1 (Kristensen *et al.*, 2004a).

De plus, il a été mis en évidence que l'action combinée de certaines protéines permettait d'augmenter la capacité de régulation du pH, comme par exemple la CAII et IV (pour « Carbonic anhydrase isoform II/IV») (Becker *et al.*, 2011; Klier *et al.*, 2014) et NBCe1 quand associées à MCT1 (Becker *et al.*, 2004). Enfin, il a été démontré que les MCTs doivent être correctement localisés sur la membrane cellulaire par l'action de leur protéine chaperonne CD147 (ou Basignin / EMMPRIN) afin d'être pleinement efficaces (Kirk *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2005).

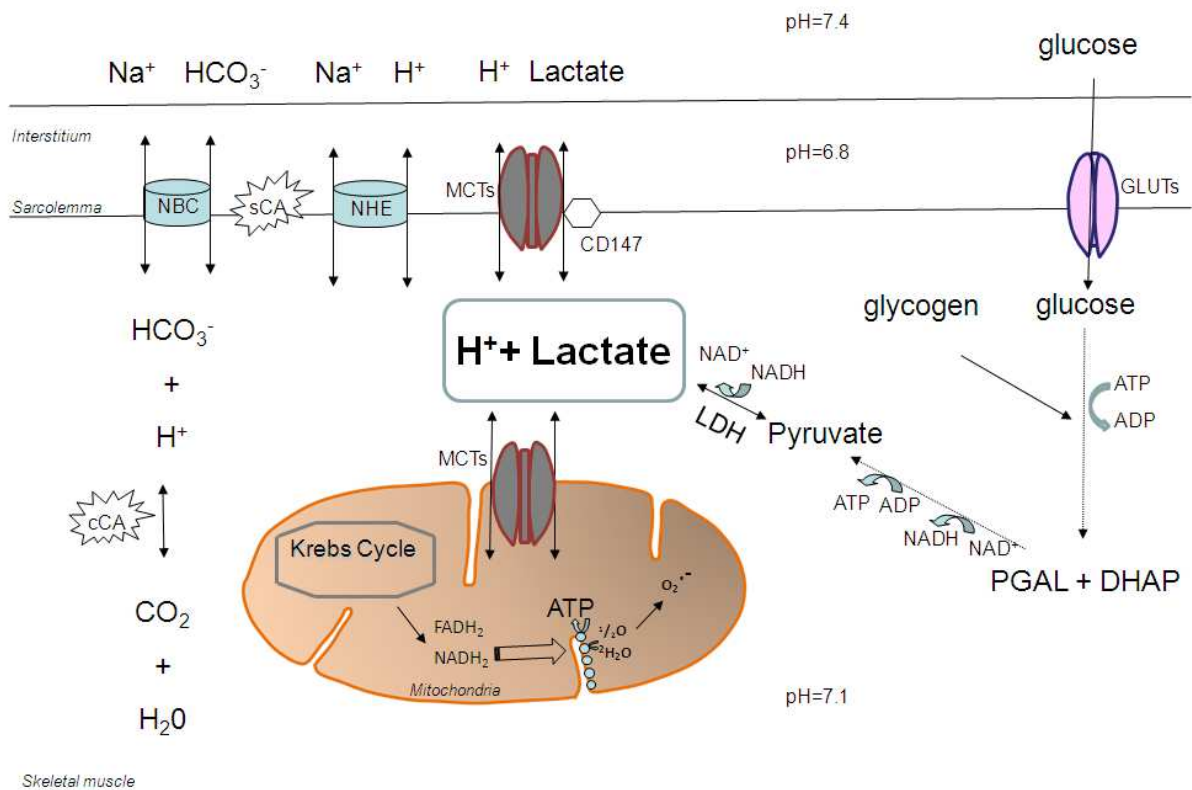


Figure 14 : Présentation récapitulative de la régulation de lactate et de protons (D'après Thomas ((Thomas *et al.*, 2012)).

Carbonic Anhydrase (CA) represent cytosolic (cCA) and membrane-bound (sCA) CA isoforms. **NBCe1**: Sodium-Bicarbonate Co-transporter. **NHE**: Na^+ - H^+ Exchanger. **MCTs**: MonoCarboxylate Transporters (lactate-proton co-transporter). **GLUTs**: Glucose Transporters. **CD147**: Cluster of Differentiation 147. **PGAL**: Phosphoglyceraldehyde. **DHAP** : Dihydroxyacetonephosphate. **LDH**: Lactate Dehydrogenase. Valeurs de pH au repos dans le plasma, le milieu interstitiel et le muscle squelettique.

❖ Fonctionnement des MCTs et regulation du pH

Tout d'abord, il est important de noter la forte affinité des MCT 1 pour le lactate (K_m compris entre 3.5 et 8.3mM ;(Lin *et al.*, 1998; Broer *et al.*, 1999; Dimmer *et al.*, 2000), ce qui lui confère un rôle important de captage dans les muscles oxydatifs, et donc dans l'ensemble du métabolisme oxydatif. A l'inverse, l'affinité de MCT4 pour le lactate est sensiblement plus faible que celle de MCT1 avec un K_m compris entre 25 et 31 mM (Broer *et al.*, 1999; Dimmer *et al.*, 2000). Il semblerait donc qu'avec une faible affinité mais une grande capacité de transport, MCT4 joue principalement un rôle dans l'extrusion du lactate (Wilson *et al.*, 1998).

Ces co-transporteurs jouent donc un rôle important dans la régulation du pH intramusculaire pendant l'exercice de haute-intensité en permettant l'échange d'un proton

pour un lactate (Pilegaard *et al.*, 1999a; Juel & Halestrap, 1999), et ce en fonction de l'importance des gradients de concentration et du pH (Juel, 1996a, 1996b). Les MCTs étant bidirectionnels, cela signifie qu'ils peuvent faciliter les flux de lactate et d'ions H^+ à la fois vers l'intérieur du muscle ou vers l'extérieur (Juel, 1991, 1997; McDermott & Bonen, 1994; Brown & Brooks, 1994). Ce principe de navette du lactate de cellule à cellule (« cell-to-cell lactate shuttle ») (Brooks, 2000) fournit la toile de fond quant à la compréhension du métabolisme et des échanges du lactate. Ainsi, le rôle primordial des MCTs dans l'augmentation de la capacité des tissus à échanger du lactate est souligné. Sans ces co-transporteurs, le lactate (en parallèle du transport des ions H^+) ne pourrait pas être rapidement mis à disposition pour d'autres tissus tels que le foie, le cerveau et d'autres fibres musculaires proches (Dimmer *et al.*, 2000; Halestrap & Meredith, 2004; Burgomaster *et al.*, 2007), et l'acidification du milieu interstitiel (par accumulation d'ions H^+) et du sang serait beaucoup moins contrôlé.

Bien que le ratio entre le lactate produit et le lactate éliminé varie selon les études, un consensus est maintenant établi sur l'élimination importante d'ions H^+ et de lactate à la fois pendant et après l'exercice. Ainsi, même lors d'exercices brefs et intenses, approximativement 1/3 de la quantité totale de lactate et de protons produits est éliminé à l'exercice alors que la fraction restante est éliminée lors de la récupération afin de revenir à un pH physiologique neutre (Juel *et al.*, 1990; Bangsbo *et al.*, 1993). De cette façon l'existence des MCTs, va à la fois permettre de réduire l'accumulation de lactate et de H^+ pendant toute la durée de l'exercice, mais aussi de diminuer la phase de retour à l'homéostasie.

Comme le transport facilité de lactate s'accompagne forcément d'un proton, chaque changement de flux ou de concentration en lactate va entraîner une modification de pH. Ainsi, il est acquis que dans le muscle squelettique les variations de pH sont définies par le rapport entre la quantité d'ions H^+ produite et celle éliminée, et que cette balance est grandement liée aux transporteurs membranaires (Pilegaard & Juel, 1995; Juel & Pilegaard, 1998). L'importance des MCTs pour ce mode de fonctionnement, a été soulignée chez le rat par leur capacité supérieure à assurer le transport de H^+ à l'exercice, par rapport aux systèmes d'échange sodium dépendants (NHE) (Juel, 1995).

❖ Fonctionnement des NHEs et régulation du pH

Bien que peu étudiées, les premiers travaux portant sur ces protéines se sont attachés à déterminer la topologie membranaire de l'isofomre NHE1 afin de pouvoir en comprendre les

mécanismes d'activation et d'inhibition (Kemp *et al.*, 2008). Aussi, il a été mis en évidence que sa structure lui permettait de faire passer des molécules hydrophiles à travers la membrane plasmique hydrophobe (Kyte & Doolittle, 1982). Enfin, lié à leur conformation spatiale bien que leurs séquençages génomiques varient (25 à 65%), l'ensemble des isoformes de la famille des NHEs ont des propriétés proches.

Ainsi chez l'homme, la fonction physiologique la plus importante est de permettre la sortie des protons intracellulaire en échange de sodium (Na^+) ou de lithium extracellulaire (ratio de 1:1). Du fait de sa fonction de base qu'est la régulation du pH, l'isoforme 1 influe sur une multitude de tâches spécifiques comme la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et enfin l'apoptose.

❖ Fonctionnement des NBCs et régulation du pH

A ce jour, les mécanismes par lesquels le contenu en NBCe1 est régulé dans le muscle strié squelettique ne sont toujours pas connus. Cependant, les deux isoformes clairement identifiées dans le muscle squelettique semblent être électrogéniques avec un ratio de 2:1 à 3:1 ($\text{HCO}_3^- : \text{Na}^+$) (Soleimani & Burnham, 2001; Virkki *et al.*, 2002) et donc transportent une charge nette négative. Cette électrogénéité permet aux NBCs d'être sensibles aux changements de potentiels de membrane, ce qui est non sans importance pour l'activation de ces transporteurs à l'exercice, du fait de la dépolarisation sarcolemmale. De plus, à l'épuisement la concentration extracellulaire de K^+ (potassium) peut doubler, ce qui va entraîner une dépolarisation encore plus marquée de la membrane d'environ 20 mV (d'environ -70 mV to -50 mV) (Juel, 1986; McKenna *et al.*, 2008). Une telle diminution de gradient électrochimique au sein du muscle peut ainsi être un stimulus supplémentaire dans l'augmentation de l'activité des co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ à l'exercice, en effet les nécessités de régulation du pH seront bien plus importantes qu'au repos.

Pour conclure sur l'interaction de ces différents transporteurs membranaires, nous pouvons dire que les systèmes n'impliquant pas le lactate sont plus aptes à ajuster finement le pH ainsi que réguler le pH au repos, lorsque le gradient de lactate est faible ou absent, alors que durant l'exercice intense lorsque la production de lactate devient très importante, les MCTs seront beaucoup plus efficaces pour s'occuper des ions H^+ produits.

L'essentiel :

- ▶ NHE1 est principalement actif au repos alors que les MCTs et NBCe1 le sont bien plus à l'exercice.
 - ▶ Certaines protéines peuvent augmenter la capacité de régulations des protéines de transport.
 - ▶ L'affinité au lactate des MCT1 est bien plus importante que celle des MCT4.
 - ▶ Les MCTs, NHE1 et NBCe1 permettent, ensemble, un échange bidirectionnel du lactate, des protons et du bicarbonate.
 - ▶ Leur degré d'activité est médiée par les gradients de concentrations en ions H^+ , lactate et HCO_3^- principalement, de même que par les variations de pH intra et extracellulaire.
-

c) Leur régulation par l'exercice aigu

Du fait qu'un certain nombre d'études ont été menées sur le sujet, il est maintenant connu que l'exercice aigu induit des modifications de gradient de lactate et d'ions H^+ de part et d'autre de la membrane plasmique, changements régulés par l'action coordonnée de plusieurs protéines dont les MCTs, NHE1 et NBCe1. Toutefois, il n'est pas encore établi de façon certaine la relation qui semble exister entre l'intensité d'exercice et l'évolution des capacités de transport transmembranaire. De plus, parmi les études traitant de la question, peu ont été conduites sur du muscle strié squelettique humain.

❖ MCT1 et MCT4:

Malgré le peu de travaux traitant de la régulation du contenu en MCTs, il semble qu'à la fois les isoformes 1 et 4 appartiennent à une catégorie de protéines qui peuvent rapidement être affectées par l'exercice aigu. Il a ainsi été rapporté qu'un exercice de 5 à 6 h de pédalage à 60% de VO_{2max} augmentait temporairement (pendant 6 jours) le contenu en MCTs chez une population d'hommes non-entraînés (Green *et al.*, 2002). De la même manière, (Green *et al.*, 2008) ont mis en évidence que 6 min d'exercice à 90% de VO_{2max} réalisés toutes les heures pendant 16 h, chez des sujets non-entraînés, permettaient une augmentation rapide en MCT4 (+24%), sans changements observés pour MCT1. A l'inverse, deux heures de pédalage à 110% de la vitesse minimale à laquelle VO_{2max} est atteint (vVO_{2max}) chez des sujets moyennement entraînés, a mis en avant une augmentation de MCT1 et pas de modification pour MCT4 (Bickham *et al.*, 2006). Plus récemment, chez des femmes non-entraînées, il a été noté une diminution significative du contenu protéique des MCT1 (-24%) et MCT4 (-26%) immédiatement après un exercice de 45 sec à 200% de VO_{2max} (Bishop *et al.*, 2007 p.2007). Ces données correspondent aux résultats de (Tonouchi *et al.*, 2002) obtenus chez le rat après 10 min de stimulation électrique (MCT1 : -10% ; MCT4 : -25%). Il est possible d'expliquer les différences observées dans les études précitées par plusieurs facteurs tels que le type d'exercice (durée, intensité, intermittent vs continu) et le type de sujets (sexe, niveau d'entraînement, homme vs rats).

Si nous nous intéressons maintenant au *timing* séparant le début d'exercice et les biopsies permettant l'analyse musculaire, nous pouvons voir (Figure 15) une rapide diminution en MCT1 et MCT4 (-20 à -25%) entre 45 sec (Bishop *et al.*, 2007) et 10 min (Tonouchi *et al.*, 2002), suivi d'un plateau entre la 30^{ème} et la 80^{ème} minute (Eydoux *et al.*, 2000b, 2000a), et enfin une augmentation des deux isoformes 2 h après le début de l'exercice (Coles *et al.*,

2004; Bickham *et al.*, 2006). Par ailleurs, le contenu en MCT1 reste à un niveau élevé 7, 12 et 26 h après le début de l'exercice à la fois dans le *red gastrocnemius*, le *white gastrocnemius* et le *soleus* de rats (Coles *et al.*, 2004). De plus, à l'inverse de ce qui a pu être vu chez l'Homme (Bickham *et al.*, 2006), dans cette étude le contenu en MCT4 a augmenté 2 h après le début de l'exercice, avec un pic apparent à 12 h et une forte concentration protéique toujours enregistrée 26 h plus tard (Coles *et al.*, 2004). Ainsi, il semble qu'après une rapide et faible diminution, le contenu en MCTs chez le rat augmente dans les 5 à 24 h suivant le départ d'un exercice.

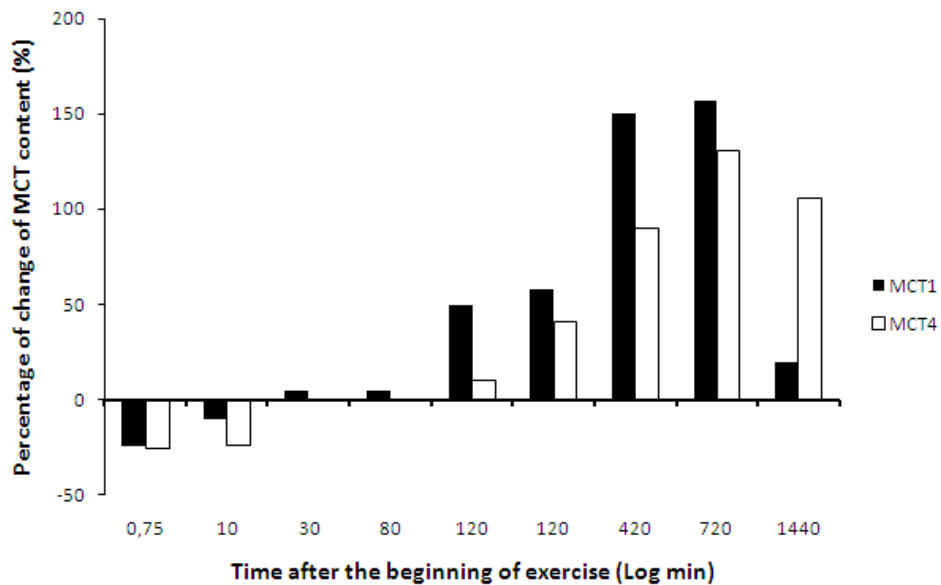


Figure 15 : Les cinétiques des contenus en MCTs lors de la récupération après un exercice, mais est pris en compte le temps depuis le début de l'exercice jusqu'à ce que la biopsie soit réalisée. (D'après Thomas (Thomas *et al.*, 2012), avec les données de Bishop (Bishop *et al.*, 2007), Tonouchi (Tonouchi *et al.*, 2002), Eydoux (Eydoux *et al.*, 2000b, 2000a), Bickam (Bickham *et al.*, 2006) et Coles (Coles *et al.*, 2004)).

Concernant NHE1 et NBCe1, aucune étude ne semble avoir porté sur les effets d'un exercice aigu sur leur régulation. Toutefois, il a été reporté une corrélation positive entre le contenu relatif en MCT1 et NBCe1 ($r = 0.50$, $P < 0.01$) dans des muscles oxydatifs de rat après 5 semaines d'entraînement à haute-intensité (Thomas *et al.*, 2007). Ce résultat peut alors laisser penser que NBCe1 a été régulé de la même manière que MCT1 par l'exercice. Enfin, il est important de souligner le rôle que joue la CAII dans la régulation de toutes ces protéines de transports (présente dans le compartiment intra- et extracellulaire). En effet, il a été mis en évidence, seulement de façon *in vitro*, qu'en se liant aux protéines telles que NHE1 (Li 2002, 2006), NBCe1 (Pushkin *et al.*, 2004; Becker & Deitmer, 2007; Schueler *et al.*, 2011), MCT1 et MCT4 (Becker *et al.*, 2005, 2010, 2011; Becker & Deitmer, 2008; Almquist *et al.*, 2010;

Stridh *et al.*, 2012), la CAII augmentait l'activité de tous ces transporteurs membranaires. (Becker *et al.*, 2010, 2011), émettent l'hypothèse selon laquelle cette augmentation d'activité pourrait être due à une dissipation des protons intracellulaires via une navette intramoléculaire, en d'autres termes cela augmenterait l'affinité des deux isoformes de MCTs (Deitmer & Becker, 2013). Pour illustrer cela, il a été montré chez l'homme que l'inhibition de la CAII extra- et intracellulaire était associée avec une concentration plasmatique en lactate plus faible au cours d'un exercice incrémental, certainement dû à une moindre élimination du lactate musculaire par les MCTs.

d) Possibles mécanismes impliqués dans la régulation

Les diminutions de concentration en MCTs (isoformes 1 et 4), immédiatement après l'exercice, précédemment reportées (Tonouchi *et al.*, 2002; Bishop *et al.*, 2007) peuvent être dues à différents facteurs nécessitant leur pleine compréhension, parmi lesquels nous pouvons citer : 1/ la peroxydation lipidique qui peut entraîner la perméabilité membranaire et donc des fuites de protéines (Davies *et al.*, 1982), 2/ la translocation intracellulaire ainsi que 3/ l'oxydation de protéines amenant à des dysfonctionnements au niveau des transporteurs (Barreiro & Hussain, 2010). Une autre hypothèse, émise par (Tonouchi *et al.*, 2002) concerne la translocation des transporteurs vers un pool intracellulaire. Ces pools ont déjà pu être observés dans des cardio-myocytes de rat après hypertrophie (Johannsson *et al.*, 2001) mais les mêmes résultats nécessitent d'être validés dans le muscle strié squelettique humain.

En parallèle des hypothèses précédentes, il est vraisemblable qu'une synthèse protéique a lieu, ce qui expliquerait les variations de concentrations notées sur la [Figure 15](#) où l'on observe, après une baisse initiale, un plateau puis une augmentation dans le contenu en MCTs. De plus, bien qu'une seule étude l'ait montré chez l'homme, il apparaît qu'un exercice de temps limite réalisé à 110 % de $v\text{VO}_{2\text{max}}$ entraînant 2 h plus tard une augmentation en MCT1 au niveau protéique, ne s'accompagne pas d'une augmentation en ARN_m (Bickham *et al.*, 2006). Ceci suggérerait que l'expression en MCTs peut être régulée en premier lieu par des mécanismes post-transcriptionnels, ou par une combinaison de ces mécanismes avec une régulation pré-translationnelle au niveau du muscle (Bonen *et al.*, 2000a, 2000b; Bickham *et al.*, 2006). Il est toutefois évident que d'autres travaux devront être menés afin de répondre à ces premières hypothèses.

L'essentiel :

- ▶ Très peu de travaux ont étudié les effets de l'exercice aigu sur l'expression et l'activité des transporteurs sarcolemmaux.
 - ▶ Les contenus en MCTs semblent diminuer immédiatement après le début de l'exercice avant d'augmenter pendant les 24h suivantes chez l'animal.
 - ▶ La CAII permet d'augmenter l'activité des MCT1 et 4, NBCe1 et NHE1.
 - ▶ La chute initiale en contenus protéiques pourrait s'expliquer par un SO plus important et/ou une translocation intracellulaire.
 - ▶ L'augmentation post-exercice des MCTs pourrait venir d'une combinaison entre mécanismes pré et post-transcriptionnels.
-

Chapitre IV. Manipulation de l'équilibre acido-basique par supplémentation en bicarbonate de sodium.

Le bicarbonate de sodium qui rentre dans la catégorie des produits ergogéniques (donc non dopant), s'inscrit dans une longue histoire de l'utilisation de tels produits. L'utilisation de produits dans le but d'améliorer la performance lors de défis physique remonterait à l'antiquité lorsque des soldats et des athlètes consommaient certaines parties du corps d'un animal afin d'en assimiler les attributs physiques associés (vitesse, force, vue...) (Applegate & Grivetti, 1997). De la même façon, lors des Jeux Olympiques de l'antiquité, les lutteurs enduisaient leur corps d'huile afin de limiter la préhension des adversaires et suivaient un régime alimentaire spécifique, qui relevait plus de croyances et d'habitudes superstitieuses, sensé leur garantir la victoire. Au début du XX^{ème} siècle, une meilleure compréhension du fonctionnement de la machine du corps humain grâce à des approches mécaniques, physiologiques et biochimiques a permis d'identifier les rôles spécifiques des macronutriments dans la production de force ainsi que l'utilisation de l'énergie au repos et à l'exercice. Ceci permis alors de rationaliser l'utilisation d'ergogènes tels que la caféine, certains sels alcalins et les protéines (Brown *et al.*, 2006; McArdle *et al.*, 2010). Depuis ces dix dernières années, le marché des aides ergogéniques et autres suppléments nutritionnels représentent des milliards d'euros (Burke, 2004) et font partie intégrante des stratégies nutritionnelles de nombreux athlètes, depuis le sportif occasionnel à l'athlète de haut-niveau. Ces derniers, estimant les aides ergogènes aussi essentielles que les prédispositions génétiques et l'entraînement dans l'amélioration des performances.

Toutefois, la justification scientifique de leur utilisation est sujette à différentes conditions comme l'expérience du pratiquant, l'avis de l'entraîneur, et surtout le protocole d'ingestion établi en fonction de l'exercice à venir. Une chose certaine étant que l'orientation dans un sens ou dans l'autre de l'équilibre acido-basique va influencer de façon plus ou moins importante certains paramètres.

A. Effet sur les paramètres métaboliques

Un certain nombre d'études portant sur les effets de l'alcalose induite avant et après un exercice réalisé à haute intensité permettent de faire le point sur les différents résultats et donc d'améliorer les méthodologies d'investigation notamment grâce à une comparaison du statut acido-basique musculaire et sanguin. De manière générale, les auteurs rapportent une diminution de l'acidose sanguine après supplémentation en bicarbonate de sodium, diminution qui perdure lors de la récupération. Toutefois, cette altération de la balance acido-basique ne conduit pas forcément à une amélioration de la performance (Tableau 2), et les résultats sanguins peuvent sensiblement varier d'une étude à l'autre (

Tableau 3).

Tableau 2 : Présentation des études ayant utilisé une supplémentation de 0.3g.kg⁻¹ de NaHCO₃ vs placebo avant un exercice unique ou répété de haute intensité. En noir, les études n'ayant pas rapporté d'amélioration de la performance et en rouge les études ayant rapporté une amélioration de la performance. F = femme, H = homme

Auteurs	Année	Population	Exercice
Gaitanos <i>et al.</i>	1991	7H non-entraînés	10x6 sec cyclisme all-out
Kozak-Collins <i>et al.</i>	1994	7H entraînés	maximum de répétition de 1 min à 95% VO _{2max}
Tiryaki <i>et al.</i>	1995	15F entraînés	600 m course all-out
Douroudos <i>et al.</i>	2006	24H non-entraînés	Wingate
Matsuura <i>et al.</i>	2007	8H non-entraînés	10x10 sec cyclisme all-out
Pruscino <i>et al.</i>	2008	6H nageurs élités	2x200 m nage libre all-out
Cameron <i>et al.</i>	2010	25H entraînés rugby	10x40 m course all-out
Price <i>et al.</i>	2010	8H non-entraînés	20x24 sec course (100% vVO _{2max})
Vanhatalo <i>et al.</i>	2010	8H non-entraînés	3 min cyclisme (Δ 50% Seuil ventilatoire / VO _{2max})
Zabala <i>et al.</i>	2011	10H élités BMX	3x30 sec Wingate
Kupcis <i>et al.</i>	2012	7H niveau national	200 m aviron all-out
Peart <i>et al.</i>	2012	7H actifs	10x15 sec cyclisme all-out
Wilkes <i>et al.</i>	1983	6H entraînés	800 m course all-out
Nielsen <i>et al.</i>	2002	5H entraînés	2Km aviron all-out
Bishop <i>et al.</i>	2004	10F actives	5x6 sec cyclisme all-out
Lindh <i>et al.</i>	2008	9H entraînés	200 m nage libre all-out
Siegler <i>et al.</i> (a)	2010	10H entraînés boxe	4x3' de boxe
Siegler <i>et al.</i> (b)	2010	14(6H+8F) entraînés	8x25 m nage libre all-out
Siegler <i>et al.</i> (c)	2010	9H actifs	3x30 sec course all-out
Higgins <i>et al.</i>	2013	10H non-entraînés	T _{lim} cyclisme (110% VO _{2max})

Tableau 3 : Résultats des paramètres physiologiques sanguins des études présentées dans le Tableau 2. Ne sont présentées que les études donnant le plus de valeurs des paramètres sanguins concernés. Les $[HCO_3^-]$ et la $[La^-]$ sont données en $mmol.L^{-1}$. En noir, les études n'ayant pas rapporté d'amélioration de la performance et en rouge les études ayant rapporté une amélioration de la performance. * démontre une différence entre condition ($P<0.05$).

Auteurs	pH post-ingestion		pH post-test		$[HCO_3^-]$ post-ingestion		$[HCO_3^-]$ post-test		$[La^-]$ post-ingestion		$[La^-]$ post-test	
	PLA	BIC	PLA	BIC	PLA	BIC	PLA	BIC	PLA	BIC	PLA	BIC
Gaitanos <i>et al.</i>	7.38	7.43*	7.09	7.15*					1.6	1.9*	13.6	15.3*
Kozak-Collins <i>et al.</i>	7.40	7.47*	7.23	7.32*	~18	~23*	~10	~14*				
Tiryaki <i>et al.</i>	7.40	? *	7.13	7.14	27.1	? *	16.6	17.9	2.3	2.2	11	11.8
Douroudos <i>et al.</i>	7.4	7.45*	7.20	7.27*	25.7	29.8*	13.1	17.5*	~1	~1	10.3	12.3*
Matsuura <i>et al.</i>	7.45	7.52*	7.21	7.28*	28.1	35.3*	11.5	14.6*	0.9	0.9	14.1	16.5
Pruscino <i>et al.</i>	7.37	7.49*	7.17	7.24*	~24	~33*	~14	~17*	~2	~2	10.9	15.3*
Cameron <i>et al.</i>	7.39	7.47*	7.19	7.25*	24	30.3*	12.4	14.9*	2.5	2.8	16.1	19.2*
Price <i>et al.</i>	7.40	7.45*	7.29	7.37*	25	32*	16	21*	3.4	3.5	6.8	8.3*
Vanhatalo <i>et al.</i>	7.40	7.46*	7.08	7.16*	21.9	29*	~13	~14.5	0.9	0.9	10.5	12.3*
Zabala <i>et al.</i>	7.41	7.47*	7.10	7.20*	22.9	29.1*	~7	~10	~1.9	~1.9	17.6	17.8
Kupcis <i>et al.</i>	7.41	7.48*	7.13	7.18*	23.9	29.1*	9.4	11.6*	2.6	3.3*	14.4	16.7*
Peart <i>et al.</i>	7.41	7.46*	7.15	7.24*	25.3	29.3*	11.9	15.1*	1.54	1.53	16.7	17.5
Wilkes <i>et al.</i>	7.40	7.49*	7.09	7.18*	26.2	33.5*	11	14.3*	1.23	1.31	13.3	14.3*
Goldfinch <i>et al.</i>	7.38	7.46*	7.07	7.15*								
Nielsen <i>et al.</i>	7.42		7.07	7.34*	~25	~26	~10.5	~25*	1	0.9	16.2	25.7*
Bishop <i>et al.</i>	7.42	7.50*	7.24	7.35*	21.4	28.9*	18.3	28.7*	~1.4	~1.5	2.7	3.4*
Lindh <i>et al.</i>	7.42	7.54*	7.15	7.20*	~25	~33*	~10	~14*	~2	~2	~14	~17
Siegler <i>et al.</i> (a)	7.37	7.43*	7.17	7.22*	24	29*	13.3	14.8*				
Siegler <i>et al.</i> (b)	7.41	7.48*	7.20	7.26*	24.7	30.6*	13.8	16*	~2	~2	~15	~18*
Siegler <i>et al.</i> (c)	7.39	7.46*	7.01	7.07*	23.2	28.8*	~7.8	~9*				
Higgins <i>et al.</i>	7.39	7.47*	7.23	7.31*	24.5	31.8*	13.3	17*			11.9	14.1*

A l'inverse des études s'étant intéressées aux réponses sanguines suite à une supplémentation en $NaHCO_3$, très peu de chercheurs ont rapporté des réponses métaboliques intracellulaires. Il ressort toutefois que le sarcolemme semble être imperméable au bicarbonate puisque certains auteurs n'ont pas trouvé de différence significative entre les pH mesurés post-ingestion en condition PLA et en condition BIC (Stephens *et al.*, 2002; Bishop *et al.*, 2004a)(Bishop, stephens linnossier).

B. Effet sur la performance

De manière générale, il n'existe toujours pas à nos jours de consensus sur les effets du NaHCO_3 sur la performance. En effet, ces effets varient en fonction d'un grand nombre de facteurs tels que le volume ingéré, le mode, le temps séparant la prise et l'exercice, l'exercice lui-même.

Pour les exercices brefs (moins de 2 min) et uniques réalisés à haute intensité des résultats contradictoires ont été reportés. (McNaughton, 1992) a observé une amélioration de la performance lors d'un exercice de 60 sec de pédalage maximal. Cette amélioration, suite à une ingestion de $0.3\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, c'est traduite par l'atteinte d'une puissance maximale et d'un travail total significativement plus élevés en BIC qu'en PLA. De la même façon, (Goldfinch *et al.*, 1988), ont mis en évidence que la supplémentation en NaHCO_3 permettait de courir plus rapidement un 400 m (-1.52 sec) pour des athlètes modérément entraînés. Quant à eux, (Van Montfoort *et al.*, 2004) montraient que le délai avant l'apparition de la fatigue chez 15 hommes entraînés était retardé lors d'exercices de course de temps limite. Aussi, en natation, Lindh *et al.* (2008) montraient une amélioration significative de la performance sur 200 mètres après ingestion de NaHCO_3 . L'hypothèse apportée pour justifier ces résultats étant la possible facilitation de l'élimination des ions H^+ du compartiment musculaire, retardant ainsi l'apparition de la fatigue.

Cependant, même si la grande majorité des recherches basées sur une supplémentation en NaHCO_3 montrent un état d'alcalose induite, cela ne se traduit pas systématiquement par une amélioration des performances. En effet, lors d'un sprint de 2 min réalisé sur ergocycle la quantité totale de travail produite en BIC n'était pas significativement supérieure à celle produite en situation contrôle. Le même résultat a été obtenu chez des hommes non-entraînés après un exercice maximal de 90 sec de pédalage (Marx *et al.*, 2002). Enfin, suite à une course maximale de 600 m, Tiryaki *et al.* (Tiryaki & Atterbom, 1995) n'établissaient aucune différence de temps entre les conditions BIC et PLA chez 15 femmes entraînés. Le manque de résultats significatifs dans certaines des études présentées pourrait alors s'expliquer par la taille de la population, les niveaux d'entraînement des participants, le choix de l'intensité et de la durée des exercices, les modalités de supplémentation...

Les résultats d'études portant sur la répétition d'exercices de haute intensité n'aboutissent pas non plus sur une ligne directrice majeure. De nombreux travaux se sont attachés à décrire les effets du NaHCO_3 sur ce type d'exercice. Ces exercices de haute

intensité sont plus proches de ce que l'on peut identifier dans nombre de sports collectifs ou même de sports individuels, où une compétition peut induire la répétition d'une même épreuve en fonction des phases qualificatives.

D'après les résultats de (Lavender & Bird, 1989), l'ingestion de NaHCO_3 résultait sur une amélioration significative de la performance au cours de deux séries de 10 x 10 sec de sprints sur vélo (repos= 50 sec) chez des personnes non-entraînées. Ceci concorde avec les résultats obtenus avec des femmes non-entraînées aussi lors de 5 sprints de 6 sec espacés de 24 sec de récupération (Bishop *et al.*, 2004a). A l'inverse, sur des protocoles quasiment similaires, deux équipes de recherche n'ont pu observer aucune amélioration de la performance en BIC comparé à un placebo au cours d'une série de 10 x 6 et 10 x 10 sec (repos = 30 sec) chez des hommes non-entraînés (Gaitanos *et al.*, 1991; Matsuura *et al.*, 2007), respectivement). Les hypothèses avancées pour tenter d'expliquer ces résultats diamétralement opposés reposent sur deux facteurs principaux. En premier lieu, il est intéressant de noter que les différences de pH post-ingestion sont nettement supérieures dans l'étude de Bishop *et al.* (7.42 – 7.50) (Bishop *et al.*, 2004a) par rapport à Gaitanos *et al.* (7.38 – 7.43) (Gaitanos *et al.*, 1991). Ceci pourrait être dû à un temps d'absorption supérieure pour la seconde étude (150 min contre 90 pour Bishop *et al.*), favorisant l'élimination de la $[\text{HCO}_3^-]$ au niveau rénal avant que l'exercice n'est commencé. Cependant, la nature de l'exercice (pédalage *vs* course), ne semble pas pouvoir être mis en cause pour expliquer ces différences de résultat du fait que les tests de pédalage et de courses répétés sont définis comme de même fiabilité et inter-comparables (Fitzsimmons *et al.*, 1993). Les résultats diffèrent aussi pour des exercices répétés de type Wingate test (30 sec à 0.75g.kg⁻¹). Alors que lors de deux études conduites séparément sur des pratiquants de BMX élite (Zabala *et al.*, 2008, 2011), aucune différence de performance n'était identifiée en BIC comparé à une condition placebo, une autre équipe (Artioli *et al.*, 2007) mettait en évidence l'amélioration de performance au cours de 4 répétitions de Wingate sur les membres supérieurs suite à l'ingestion de NaHCO_3 . Le niveau de pratique des sujets étant similaires (athlètes élite), l'explication de ces différences résideraient plutôt dans la masse musculaire engagée et donc la quantité d'ions hydrogène produits (supérieure en cyclisme *vs* membres supérieurs). Ceci se traduit par une baisse plus importante du pH dans les études (Zabala *et al.*, 2008, 2011) et favoriserait donc l'apparition de la fatigue. Enfin, et cette observation serait valable pour une majorité des études ayant comparé une situation d'alcalose contre une situation d'acidose, la glycolyse et/ou glycogénolyse ne fonctionnerait pas plus efficacement en condition BIC que PLA. Des

concentrations plus importantes de $[La^-]$ à la fois dans des études montrant une amélioration de la performance et des études ne montrant pas d'amélioration tendraient à appuyer cette remarque.

Ainsi, et de manière générale, les études ayant mis en évidence une amélioration significative de la performance suite à une supplémentation en $NaHCO_3$ sont celles ayant induit une importante perturbation de l'équilibre acido-basique (McNaughton *et al.*, 2008), sans toutefois s'expliquer directement par un meilleur rendement énergétique.

L'essentiel :

- ▶ La prise de substances ergogéniques remonte à l'antiquité.
 - ▶ Il n'existe pas de consensus sur les résultats de performance obtenus suite à une alcalose induite.
 - ▶ L'alcalose induite semble principalement affecter le statut acido-basique sanguin.
 - ▶ Les principales raisons avancées pour expliquer ces divergences sont le niveau des participants, l'intensité de l'exercice ou encore le protocole de supplémentation.
 - ▶ Le mécanisme majeur avancé, pour expliquer une amélioration de la performance, est lié à un retard d'accumulation d' H^+ , retardant ainsi l'apparition de la fatigue.
-

C. Effet sur la production d'énergie mitochondriale

Jusqu'à présent, peu d'études ont été réalisées dans le but d'investiguer les différences de production d'énergie mitochondriale en fonction du statut acido-basique musculaire. Toutefois, (Bishop *et al.*, 2010) ont effectué un travail de recherche sur cette problématique en supplémentant par cathéter œsophagien des rats en bicarbonate de sodium ($0,05 \text{ g.kg}^{-1}$ poids de corps) (BIC) ou en eau pour le placebo (PLA), avant chaque séance d'entraînement intermittent. Les séances duraient de 7 à 12 fois deux minutes à 80% de leur vitesse maximale, les répétitions étaient séparées par une minute de récupération. Le but était ici de tester les effets de l'acidose sur le développement de l'activité mitochondriale après cinq semaines d'entraînement. La capacité maximale oxydative était évaluée en présence de pyruvate + malate et palmitate + malate comme substrats chez les deux groupes de rats entraînés (BIC et PLA), et chez un groupe contrôle apparié en poids, au niveau des muscles oxydatif (*soleus* : SOL) et glycolytique (*extenseur digitorum longus* : EDL).

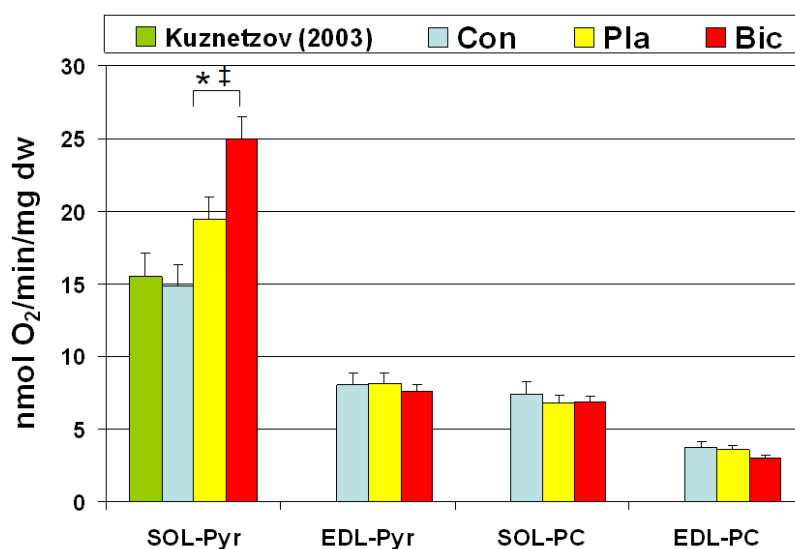


Figure 16 : Respiration mitochondriale au Stade 3 dans les muscles soleus (SOL) et extenseur digitorum longus (EDL) en présence des substrats pyruvate + malate (Pyr) et palmitoyl carnitine (PC) mesurées chez des rats contrôles (Con), et des rats entraînés à haute intensité préalablement supplémentés avant chaque séance en bicarbonate de sodium (Bic) ou en eau (Pla). Adapté de (Bishop *et al.*, 2010).

Les résultats, synthétisés graphiquement dans la [Figure 16](#), suggèrent que l'entraînement provoque une augmentation de la respiration mitochondriale dans le muscle oxydatif (SOL) sans affecter les capacités oxydatives de l'EDL, et que l'alcalose induite avant l'exercice permet d'accroître les effets de l'entraînement sur le métabolisme oxydatif (+74% pour le groupe BIC versus +39% pour le groupe PLA). Ainsi, il semblerait que réduire

l'accumulation de protons générés par l'activité contractile intense permet d'améliorer la respiration mitochondriale du muscle squelettique oxydatif de rat. Il est ainsi possible de penser que l'alcalose induite permettrait une moindre dégradation protéique dans le groupe BIC et/ou une moindre diminution de la synthèse protéique induite par l'acidose. En effet, les protéines mitochondriales sont continuellement dégradées et remplacées par de nouvelles protéines (Chapitre 2), et il a été montré qu'une acidose aigue ponctuelle pouvait inhiber la synthèse (Caso *et al.*, 2004) et augmenter la dégradation (Reaich *et al.*, 1992) de protéines musculaires chez le rat. Enfin, il est aussi possible que l'activité mitochondriale en situation d'alcalose soit renforcée par rapport à l'activité observée en acidose, et ce indépendamment du nombre de mitochondrie. Ainsi, l'amélioration de la capacité oxydative mise en exergue par (Bishop *et al.*, 2010) pourrait être la résultante, d'à la fois une moindre dégradation protéique (ou meilleure resynthèse) et d'un meilleur rendement.

Par ailleurs, le niveau d'acidose pendant l'activité contractile répétée chroniquement pourrait aussi affecter l'expression de protéines impliquées dans des voies de signalisation moléculaire, et en conséquence, la transcription de gènes qui régulent la biogenèse mitochondriale. A ce jour, il a été montré que l'acidose pouvait affecter la phosphorylation de la protéine kinase B (Akt) (Bailey *et al.*, 2006), et augmenter le niveau d'ARN_{mt} codant pour l'ubiquitine et des sous-unités du protéasome (Bailey *et al.*, 1996; Isozaki *et al.*, 1996) qui sont des éléments intervenant dans la dégradation protéique. De plus, il a été montré récemment que l'alcalose chronique induite par une supplémentation en NaHCO₃ favorisait la surexpression de PGC-1 α et de ses cibles en aval (COX II, COX IV, et cytochrome c) dans des myotubes en culture C2C12 (Perez-Schindler *et al.*, 2009). Enfin, Bishop *et al.* (2008, Abstract congrès MSSE) ont démontré que l'acidose métabolique réduisait la surexpression de PGC-1 α induite par l'activité contractile. Ainsi, ces dernières données suggèrent que la moindre élévation de la respiration mitochondriale après l'entraînement en situation d'acidose (comparée à la situation d'alcalose) pourrait être expliquée en partie par les effets de l'acidose métabolique sur la régulation des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale.

L'essentiel :

- ▶ Il n'existe pas d'étude portant sur les effets d'une alcalose induite et d'un exercice unique et intense sur la respiration mitochondriale.
 - ▶ La réduction d'accumulation d' H^+ permettrait d'améliorer l'activité mitochondriale suite à une alcalose induite pré-entraînement.
 - ▶ Une supplémentation en $NaHCO_3$ peut augmenter l'expression de PGC1 α et COXIV.
-

D. Effet sur la capacité tampon

Les effets rapportés d'une supplémentation en NaHCO_3 sur la capacité tampon (βm) semblent varier d'une étude à l'autre.

Tout d'abord, suite à une alcalose induite chroniquement chez 16 femmes modérément actives ainsi que chez le rat (Edge *et al.*, 2006c; Thomas *et al.*, 2007), il n'apparaît aucune amélioration de la βm supérieure à celle observée dans une condition contrôle. En effet, dans l'étude d'(Edge *et al.*, 2006c), alors que les deux groupes (alcalin et contrôle) présentent une amélioration respective de +19 et +9% de leur βm suite à huit semaines d'entraînement à haute-intensité, aucune différence significative n'apparaît entre les groupes. Ceci suggérerait que l'intensité de l'exercice, plus que l'accumulation d'ions H^+ durant l'entraînement, serait un facteur d'importance dans l'amélioration de la βm . Toutefois il n'est pas possible d'exclure l'éventualité que les améliorations observées de façon similaire pour les deux conditions soient due à une augmentation de la $[\text{H}^+]$ intracellulaire au-dessus d'une sorte de « seuil ». En effet le pH_i n'ayant pas été affecté par l'alcalose induite au début des exercices (1 à 5 min), l'accumulation de H^+ dans le muscle au début de l'exercice aurait pu se faire de façon identique entre conditions et ainsi contribuer à des adaptations égales au cours de l'entraînement. De plus, les auteurs ont montré une corrélation entre le niveau initial de βm et le pourcentage d'amélioration de cette valeur (les niveaux initialement les plus bas ont significativement plus augmentés après l'entraînement ; $P < 0.05$), suggérant ainsi que même de faibles différences de niveau entre participants pouvaient influencer sur les résultats (Edge *et al.*, 2006c).

D'après la littérature, une seule étude a été menée chez l'Homme afin d'évaluer les effets de l'alcalose induite et de l'exercice aigu sur la βm (in vivo) (Bishop *et al.*, 2004a). Il a été montré, chez 10 femmes actives, qu'après un exercice de 5x6 sec de sprints séparés par 24 sec de repos, la βm (in vivo) était significativement plus importante (mais pas la βm in vitro) lorsqu'une alcalose était induite avant l'exercice comparé à une condition placebo ($P < 0.05$). Ce résultat pourrait avoir contribué à avoir retardé la chute de pH et, de fait ses, effets néfastes sur la glycogénolyse et/ou la glycolyse. De plus, l'augmentation de la $[\text{H}^+]$ semble avoir été retardée par la supplémentation en NaHCO_3 comme en atteste le fait que les $[\text{H}^+]$ finales étaient les mêmes d'une condition à l'autre malgré un travail total produit supérieur en condition d'alcalose.

Les différences de résultats observés entre les deux études (Bishop *et al.*, 2004a; Edge *et al.*, 2006c) pourraient s'expliquer de par la différence de protocole d'exercice mais aussi

par le niveau général des participants. De plus, les mesures de capacité tampon n'étaient pas strictement identiques (βm in vitro vs βm in vivo). Ainsi, il est possible que la βm in vivo ait été significativement supérieure en alcalose induite dans l'étude (Edge *et al.*, 2006c) malgré l'absence d'effet sur la βm in vitro, comme l'a mis en évidence (Bishop *et al.*, 2004a).

L'essentiel :

- ▶ L'amélioration de la βm à l'entraînement passerait d'abord par l'intensité de l'exercice que par la $[H^+]$.
 - ▶ Une seule étude a montré une amélioration de la βm in vivo suite à un exercice aigu très intense et une alcalose induite.
-

E. Effet sur les protéines de transport sarcolemmal

Il existe à l'heure actuelle un nombre très restreint de travaux portant sur l'étude des effets de l'alcalose sur l'expression et/ou l'activité des transporteurs sarcolemmaux lactate/proton/bicarbonate (Kristensen *et al.*, 2004a; Thomas *et al.*, 2007; Messonnier *et al.*, 2007). Cependant, comme vu précédemment, nous savons que l'ensemble de ces transporteurs joue un rôle primordial dans la régulation du pH et ce à des degrés variables, en fonction de l'état d'activité (i.e repos vs exercice) mais aussi du niveau des sujets étudiés (sédentaires vs entraînés). Ces différences étant notamment dues à la production d'ions H^+ , plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse qu'un plus grand gradient de ces protons (du muscle vers le sang), suite à une alcalose induite, serait responsable d'une augmentation de l'activité des systèmes de transports impliqués dans le transport des H^+ et du HCO_3^- (Juel, 1998; Street *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2012). Il a, par exemple été montré, dans des vésicules géantes issues de muscles de rat, qu'une augmentation de la $[HCO_3^-]$ augmentait directement l'activité du cotransporteur Na^+ / HCO_3^- (NBC) (Kristensen *et al.*, 2004a). De plus, cette diminution d'activité a été démontrée, par les auteurs, comme responsable d'une augmentation de moitié du temps de récupération du pH, et souligne donc l'importance des flux HCO_3^- dans la régulation de ce paramètre.

Par ailleurs, une seule étude s'est intéressée aux effets combinés de l'exercice et d'une alcalose induite sur les transporteurs sarcolemmaux. Elle a cependant été menée sur le rat et lors d'un entraînement de 5 semaines à raison de 5 séances par semaine (Thomas *et al.*, 2007). Les auteurs mettent en évidence qu'après l'entraînement les contenus en MCT1, NBCe1 et, de manière plus surprenante, MCT4 étaient significativement supérieurs en condition d'alcalose induite qu'en placebo, dans le muscle *soleus* (constitué principalement de fibres musculaires de type I). A l'inverse, pour ce mêmes protéines, aucune différences ne sont apparues pour le muscle *EDL* (constitué principalement de fibres musculaires de type II).

Enfin, une équipe de chercheurs (Messonnier *et al.*, 2007) a mis en évidence qu'avec une alcalose induite réalisée lors d'un exercice de haute intensité, les participants les plus aptes à améliorer leur performance étaient ceux ayant un contenu initial en protéines (MCT1, MCT4) faible.

Malgré l'étude de (Messonnier *et al.*, 2007) ayant été conduite sur un exercice aigu, aucune étude n'a jusqu'alors porté sur les effets d'une répétition d'exercices supra-maximaux et d'une alcalose induite sur les transporteurs sarcolemmaux impliqués dans la régulation du pH.

L'essentiel :

- ▶ L'alcalose induite, couplée à l'entraînement de haute intensité, augmente l'expression de MCT4 dans un muscle oxydatif chez le rat.
 - ▶ Aucune étude chez l'homme, en combinant exercice très intense et alcalose induite, n'est recensée sur l'expression de NHE1, NBCe1, MCT1 et 4, CAII...
-

Partie II. Objectifs généraux des études expérimentales

Comme nous venons de le voir, les exercices de sprint de haute intensité provoquent d'importants changements de concentration en métabolites et en ions au sein du muscle squelettique et du compartiment sanguin, en particulier des ions H^+ .

Nous avons aussi rapporté d'après la littérature, une corrélation significative entre les valeurs métaboliques à 300 m (pH et $[HCO_3^-]$ sanguin) et la chute subséquente de la vitesse de course. Ceci suggère que la capacité des athlètes à finir vite, dépend de la gestion du niveau d'acidose à l'approche de la ligne d'arrivée. En effet, les protons affectent à la fois les processus métaboliques et contractiles, et peuvent donc jouer un rôle dans le développement de la fatigue, et affecter ainsi la performance lors d'exercice à haute intensité.

Il a également été montré que suite à un état stable, une diminution de VO_2 pouvait se produire à la fin d'épreuves exhaustives d'intensité sévère à supramaximale, possiblement due à l'évolution de la puissance et de l'acidose métabolique.

Ensuite, nous avons pu recenser que l'accumulation de lactate et de protons dans le compartiment cytosolique du muscle actif à l'exercice intense peut être limitée grâce à de nombreuses adaptations intramusculaires jouant un rôle dans le développement de la fatigue, mais aussi de la capacité à produire de l'énergie, par une amélioration des voies glycolytique et oxydative. Par exemple, une capacité tampon et de transport élevée de ces ions au travers de la membrane sarcolemmale pourrait permettre de lutter contre les effets négatifs de l'acidose cellulaire.

Enfin, nous avons vu que les adaptations mitochondriales en réponse à l'exercice varient en fonction de l'intensité mais aussi du niveau d'entraînement des participants, et que la biogénèse mitochondriale pouvait notamment être activée par la contraction musculaire et le stress oxydatif.

Plusieurs questions se posent :

- L'alcalose induite conduit-elle systématiquement à une amélioration de la performance, comparée à une situation d'acidose classique ? Quel serait l'impact du niveau d'entraînement des athlètes sur d'éventuelles différences ?

- Quels sont les mécanismes potentiels sous-jacents à la chute de VO_2 observée au cours d'un exercice supra-maximal ? Plus particulièrement, quel est le rôle de l'acidose ?

- Est-ce qu'une session d'exercices répétés, et en particulier la fatigue musculaire engendrée ainsi que l'acidose, peuvent provoquer des modifications dans l'expression des protéines de régulation du pH ?

- Comment s'adapte la production d'énergie mitochondriale en fonction d'une session d'exercices répétés combinée à une alcalose induite ? Quel est le rôle du stress oxydatif dans ces adaptations ?

Répondre à l'ensemble de ces questions nécessite une démarche en plusieurs étapes :

2/ Le premier objectif sera de déterminer, les effets d'une alcalose induite sur la performance spécifique au cyclisme sur piste sur une population de très haut niveau. Lors de cette étude de terrain réalisée sur piste à l'INSEP, une supplémentation aigüe en bicarbonates de sodium contre placebo nous permettra de nouveau de contrecarrer l'acidose pendant une répétition d'exercices intenses réalisée par des cyclistes sur piste élités et donc de mettre en exergue ses effets sur les mécanismes physiologiques sanguins (pH, $[\text{HCO}_3^-]$ et $[\text{La}^-]$) et sur la performance. La performance sera évaluée à la fois sur le plan général (tâche de cyclisme) et sur le plan local (test de sauts verticaux).

1/ Le second objectif sera de déterminer les effets de l'acidose sur les perturbations cardio-respiratoires (FC, Q_s , Q_c , VO_2 ...), ventilatoires (VEF, VIF...) et sanguines (pH, $[\text{HCO}_3^-]$ et $[\text{La}^-]$) impliquées dans les chutes de VO_2 précédemment observées. Ainsi nous nous proposons de comparer les réponses métaboliques, des indices de fatigue et de performance au cours d'un test de temps limite (expérimentation A) et d'un test de 70 sec (expérimentation B). Une supplémentation en bicarbonate contre placebo (expérimentation B) doit nous permettre de contrecarrer l'acidose pendant l'exercice et donc de mettre en évidence ses effets sur les mécanismes physiologiques et sur la performance si certaines perturbations devaient ne plus se produire en présence d'alcalose. Les différentes étapes du transport de l'oxygène étant potentiellement impliquées, notre but sera d'étudier cette chaîne de transport au cours d'un test physique induisant un état de fatigue extrême conduisant à de fortes perturbations physiologiques de l'organisme (et donc une forte acidose) comme c'est le cas en compétition. Cette étude sera conduite en laboratoire sur ergocycle à l'INSEP avec une population de cycliste de niveau inter-régional à national.

3/ Le dernier objectif sera de déterminer les cinétiques d'évolution des régulateurs musculaires de pH tels que des protéines sarcolemmales (MCT1/4, NHE et NBCe1) mais aussi la fonction mitochondriale afin de mieux comprendre les adaptations musculaires chez l'Homme suite à une répétition de sprints à haute intensité réalisée selon deux conditions (placebo et bicarbonate).

Cette dernière étude réalisée en partenariat avec l'Institute of Sport, Exercise and Active Living (ISEAL) de Melbourne permettrait d'aller plus loin dans la compréhension de ces mécanismes physiologiques grâce à la possibilité de réaliser des biopsies musculaires de repos et à l'arrêt de l'exercice qui nous permettrait d'observer l'environnement cellulaire afin de mieux comprendre l'évolution de la performance selon deux conditions expérimentales (placebo et bicarbonate). En effet, la législation française ne nous permettant pas de procéder à des biopsies à l'arrêt de l'exercice, a motivé notre collaboration avec le Professeur David Bishop. Les prélèvements réalisés à Melbourne avec des cyclistes sub-elites ont ensuite été envoyés par UPS au Laboratoire INSERM U1046 dirigé par le Professeur Jacques Mercier à Montpellier afin d'être analysés.

Ainsi de la description novatrice des particularités physiologiques de ces épreuves sportives en cyclisme telles que réalisées en compétition, à la compréhension de l'implication de l'acidose et l'intérêt d'une prise de bicarbonate avant ou en cours d'épreuves, aurions-nous la satisfaction d'avoir exploré avec cohérence un type d'épreuves encore peu étudié. Surtout ce travail qui peut être qualifié de « fondamental » dans sa partie « adaptations musculaires » serait en mesure d'apporter des informations concrètes sur les relations entre le développement du système dit anaérobie et celui de VO_{2max} , mais aussi sur les effets de l'acidose sur ces adaptations.

L'intégralité des articles rédigés (soumis ou publiés) sont joints en annexe.

**Partie III. METHODOLOGIE
GENERALE**

Chapitre I. Présentation des études.

A. Recrutement des participants.

Pour l'ensemble des études, les individus recrutés devaient systématiquement présenter un certificat médical de non contre-indication à la pratique sportive ainsi qu'une autorisation parentale dans le cas de personnes mineures. De plus, durant l'ensemble des expérimentations un médecin était à proximité pour répondre à toute urgence. Enfin chaque étude a été réalisée après approbation d'un comité d'éthique local.

1. Etude n°1

- Titre :

« Effets d'une supplémentation en NaHCO_3 sur les performances et les paramètres métaboliques lors de sprints répétés (3x500-m) et de squat-jumps chez les cyclistes sur piste de l'équipe de France. »

- Participants :

La population de cette étude était uniquement constituée de membres de l'équipe de France de cyclisme sur piste (junior et sénior) ayant bien voulu se porter volontaire. La présentation des tenants et aboutissants de l'étude s'est faite en plusieurs étapes avec la présence du médecin de la Fédération Française de Cyclisme, des entraîneurs nationaux et du responsable du pôle recherche de la FFC.

- Design expérimental:

L'objectif de ce travail était d'étudier les performances en cyclisme sur piste et en squat-jump suite à une alcalose induite ou lors d'une acidose induite par l'exercice. Huit athlètes de niveau mondial ont été recrutés. Après une session de familiarisation, les participants ont réalisé deux sessions de tests à une semaine d'intervalle. De façon randomisée et en double aveugle, les athlètes ont ingéré en 15 min soit du bicarbonate de sodium (0.3 g.kg^{-1}) ou un placebo de carbonate de calcium (0.2 g.kg^{-1}), 90 min avant le début de l'exercice. Les poudres de supplémentation étaient conditionnées dans 20 à 27 capsules de gélatine et prises avec de l'eau à volonté. La quantité d'eau consommée était mesurée pour pouvoir être dupliquée lors de la supplémentation de la seconde session. Les deux supplémentations ont bien été tolérées par l'ensemble des participants, sans qu'aucun problème gastro-intestinal ne

soit rapporté. Du fait que deux participants n'ont pu terminer la seconde session de test, 6 athlètes ont pu être inclus pour les analyses.

Chaque session de tests comprenait trois 500-m de sprints de cyclisme sur piste à intensité maximale séparés par 20 min de récupération passive. Immédiatement avant et 2.5 min après la session de sprint, les participants devaient réaliser un test de squat-jump pour mesurer les effets du BIC et de l'exercice sur la force explosive des membres inférieurs (Figure 17). Tous les tests se sont déroulés sur une piste intérieure ventilée de cyclisme sur piste de 166-m, maintenue à 20-22°C.

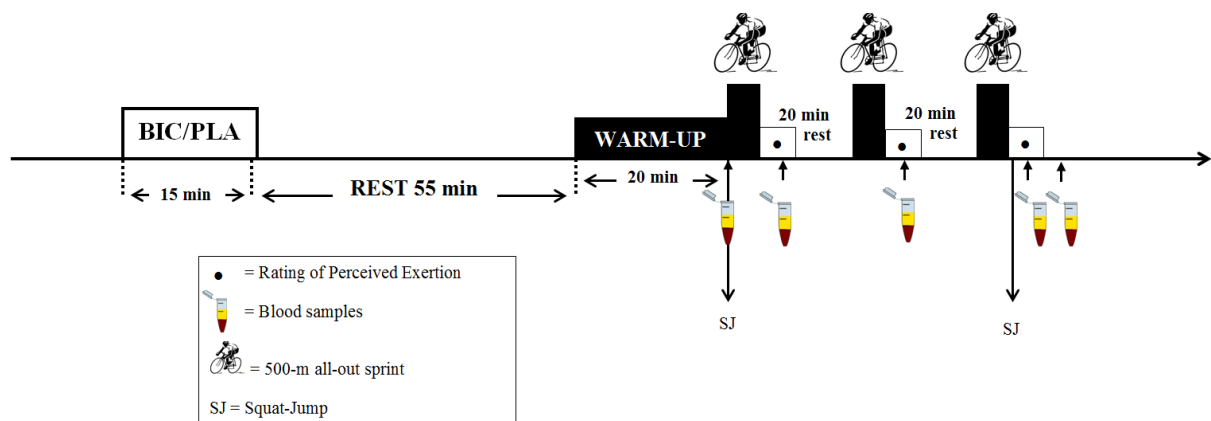


Figure 17 : Présentation du protocole du test de 3x500-m all-out séparés de 20-min de récupération. Les prélèvements sanguins étaient pris post-échauffement, et 3 min après chaque sprint et 5 min après le dernier sprint. Avant l'échauffement, tous les participants recevaient soit une supplémentation en placebo (PLA) ou en bicarbonate de sodium (BIC).

2. Etude n°2

- Titre :

« Etude de la VO_2 , de paramètres cardio-respiratoires, de paramètres métaboliques et de la performance d'athlètes entraînés au cours d'un exercice de pédalage supramaximal : situation d'acidose *versus* alcalose. »

- Participants :

Pour recruter les participants de cette étude, une partie importante des clubs de cyclisme sur route, sur piste et de BMX de la région parisienne a été contactée par téléphone afin de donner les premiers éléments d'information aux adhérents. Les échanges suivants se sont effectués par mail avant les premiers entretiens de familiarisation.

- Design expérimental:

o Expérimentation A:

Les sessions de tests se sont toutes déroulées dans un laboratoire ventilé maintenu à une température constante, comprise entre 20-22°C. Le test de force-vitesse, le test incrémental et le test de temps limite étaient réalisés sur un cycloergomètre, dont les positions verticales et horizontales de la selle et du guidon étaient fixées de sorte à rendre la position de pédalage la plus confortable possible. L'ensemble du protocole s'est déroulé lors de deux sessions distinctes séparées par deux jours. La première session consistait à effectuer les mesures anthropométriques, les mesures spirométriques, les tests de force-vitesse ainsi que le test incrémental. La seconde session a permis de réaliser le test à puissance constante, supra-maximale, jusqu'à épuisement. Lors d'une étude pilote, nous avons observé que la température corporelle n'augmentait pas de plus d'1°C.

Lors de la première session, après que les données anthropométriques soient prises, les participants étaient familiarisés avec les tests spirométriques qui devaient être réalisés aussi lors de la seconde session. Ensuite, après un échauffement les athlètes devaient réaliser 3 sprints maximaux afin d'établir leur relation de force-vitesse pour pouvoir définir leur puissance maximale ainsi que leur vitesse maximale.

Suite à une période de 20 min de repos, les participants réalisaient un test incrémental afin de déterminer leur VO_{2max} ainsi que leur puissance maximale aérobie. Ils devaient maintenir leur cadence optimale choisie aussi longtemps que possible, et ils étaient

encouragés verbalement tout au long de leur effort. Lors de ce test les réponses cardiaques et respiratoires étaient enregistrées en continu.

Lors de la deuxième session, les participants devaient réaliser un test de temps limite (Figure 18), 10 min après avoir eu un échauffement standardisé de 15 min. La résistance du test étant constante, cette dernière était établie en fonction de la puissance maximale, réalisée lors du test de force-vitesse, et la puissance maximale aérobie établie lors du test incrémental. Tout le long du test les athlètes devaient maintenir une fréquence de pédalage égale à leur vitesse optimale moins 10%. Aucune information relative à la durée du test n'était donnée et le test se terminait lorsque les participants étaient complètement épuisés. Les réponses cardiaques et respiratoires étaient enregistrées en continu aussi lors de cette deuxième session. Des prélèvements sanguins étaient pris avant le départ du test de temps limite, à l'arrêt puis 5 et 8 min post-test.

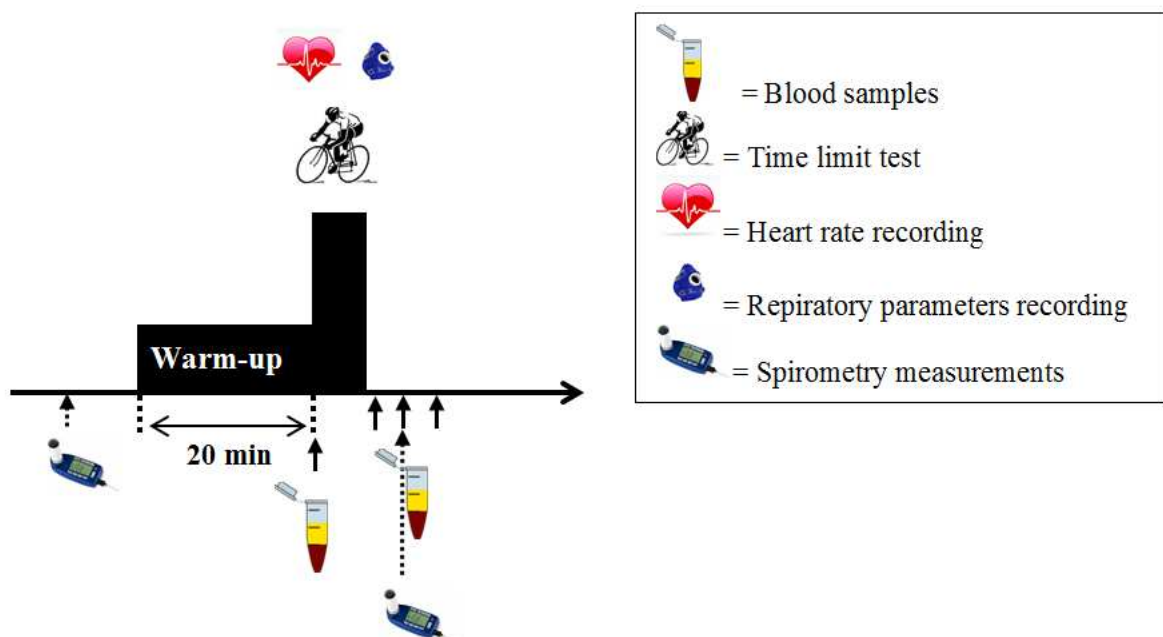


Figure 18 : Présentation du protocole de test du sprint de temps limite. Les prélèvements sanguins étaient pris post-échauffement, post-exercice, 5 et 8 min post-exercice. Les mesures de spirométrie étaient effectuées au repos ainsi que 3 min post-exercice. Lors du test les paramètres cardio-respiratoires étaient enregistrés en continu.

○ Expérimentation B:

L'ensemble des tests ont eu lieu dans le même laboratoire, sous les mêmes conditions que pour l'expérimentation A.

En plus d'une session de familiarisation, le test principal (test de 70 sec) requérait que les athlètes soient testés lors de trois occasions distinctes en deux semaines, avec un minimum de 72 h de récupération entre chaque test. Tous les exercices étaient réalisés sur un cycloergomètre (identique à celui de l'expérimentation A), avec les mêmes réglages individualisés pour la selle et le guidon.

La visite initiale au laboratoire servait à récupérer les données anthropométriques des participants ainsi qu'à procéder à une familiarisation avec les différents tests. Lors de la seconde visite, les participants devaient réaliser un test de force-vitesse afin de déterminer la puissance maximale et leur vitesse maximale, un test incrémental de mesure de la VO_2 et de leur puissance maximale aérobie. Au moins 72 h plus tard, les athlètes réalisaient un test supra-maximal de 70 sec, 90 min après avoir ingéré soit du $NaHCO_3$ soit un placebo (carbonate de calcium) (Figure 19). Une semaine après avoir réalisé le test de 70 sec sous l'une des deux conditions, les participants revenaient au laboratoire afin de faire le test sous la seconde condition. Les deux tests de 70 sec étaient réalisés au même moment de la journée. Ils étaient encouragés verbalement tout le long du test de 70 sec.

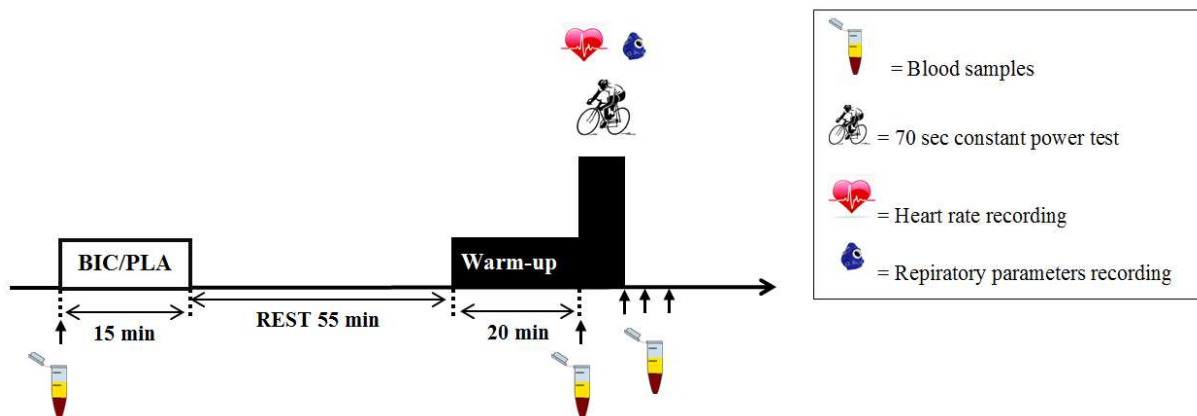


Figure 19 : Présentation du protocole de test de 70 sec à puissance constante. Les prélèvements sanguins étaient pris avant la supplémentation en placebo (PLA) ou en bicarbonate de sodium (BIC), post-échauffement, post-exercice, 5 et 8 min post-exercice. Lors du test les paramètres cardio-respiratoires étaient enregistrés en continu.

Pour les deux expérimentations (A et B), il était demandé à chacun des participants de ne pas consommer d'alcool, de tabac et de ne pas réaliser d'exercice durant les 24 h précédentes les sessions de test.

3. Etude n°3

- Titre :

« Effets combinés de la réalisation de sprints répétés et de l'alcalose induite sur les protéines de transports membranaires impliquées dans la régulation du pH musculaire, et la respiration mitochondriale chez des participants sains. »

- Participants :

Pour cette dernière étude, réalisée en Australie, les conditions de recrutement ont été plus spécifiques. En effet, du fait de prélèvements par biopsies musculaires, les participants devaient impérativement avoir un entretien avec un médecin, en plus d'un certificat médical, avant d'être acceptés dans la suite du projet. L'ensemble des individus a été recruté sur le site de l'Université de Victoria (Melbourne).

- Design expérimental:

Après s'être rendu une première fois dans le laboratoire afin de signer leur accord volontaire de participation à l'étude et d'enregistrer leurs caractéristiques anthropométriques, les participants sont revenus une seconde fois dans le but de se familiariser avec le matériel. Lors de cette session (Session 1), un test individuel de détermination de la consommation maximale d'O₂ a été réalisé ainsi qu'un test de familiarisation au test supra-maximal (3x30 secondes). Au minimum 48 h plus tard, sans avoir pratiqué une quelconque activité sportive intense, les participants sont revenus au laboratoire pour réaliser la seconde session d'exercice (Session 2A, [Figure 20](#)). Après une première biopsie musculaire réalisée au repos et une supplémentation de BIC ou de PLA, les participants ont effectué 3 sprints de 30 sec séparés de 20 min de repos passifs. Immédiatement après l'exercice ainsi que 6 h plus tard, deux nouvelles biopsies musculaires étaient prélevées. Ensuite, 24 h après l'arrêt de l'exercice, tous les participants revenaient au laboratoire pour la dernière biopsie. Après qu'une semaine se soit écoulée, les participants revenaient (le même jour et à la même heure que lors de la première biopsie) pour réaliser exactement la même session de test (3x30 sec all-out) avec la supplémentation alternative (Session 2B, [Figure 20](#)). Tous les tests ont été effectués dans un laboratoire où la température était contrôlée à 22°C. De plus, afin de minimiser toutes possibles variations dans les mesures induites par l'exercice et/ou l'alimentation, il était demandé aux participants de supprimer toute activité sportive et l'ingestion de caféine, d'alcool ou d'autres drogues dans les 48 h qui précédaient les deux sessions de test. Lors des

deux jours de test, le petit-déjeuner et le déjeuner étaient fournis aux participants afin que la prise alimentaire soit similaire pour l'ensemble de la population testée.

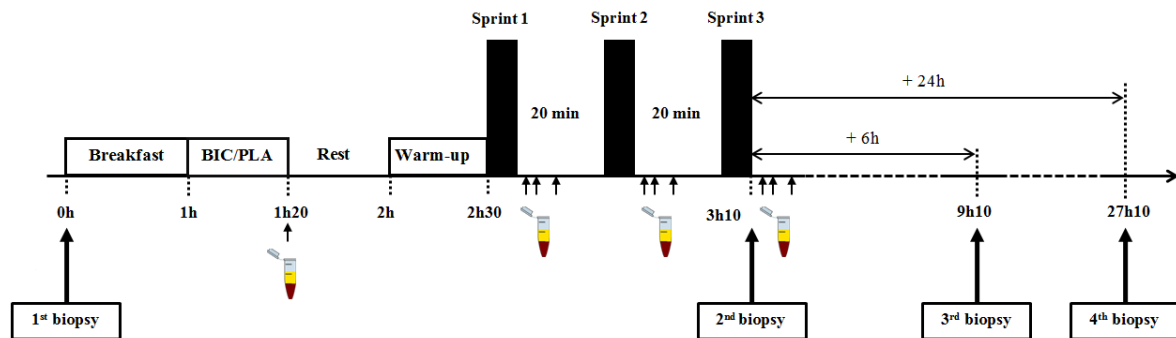


Figure 20 : Présentation du protocole du test de 3x30-s all-out séparés de 20-min de récupération. Les biopsies étaient prélevées au repos, immédiatement post-exercice, et 6 et 24 h post-exercice. Les prélèvements sanguins étaient pris au repos, et 3, 5, et 9 min après chaque sprint. Entre la première biopsie et le premier prélèvement de sang, tous les participants ont eu un petit déjeuner standardisé puis soit une supplémentation en placebo (PLA), soit en bicarbonate de sodium (BIC).

Chapitre II. Supplémentation et nutrition (*Etude n°1, 2 et 3*)

A. Supplémentations

Pour l'ensemble des tests réalisés en acidose et en alcalose, le protocole de supplémentation était le même.

90 min avant le début du test les participants, selon leur groupe d'assignation, ingéraient l'équivalent de 0.3g.kg^{-1} de NaHCO_3 ou 0.2g.kg^{-1} de carbonate de calcium (CaCO_3), contenu dans des gélules. L'ingestion se faisait en 15 min avec consommation d'eau à volonté, la seule autre consigne pour les participants était de devoir consommer le même volume d'eau lors de la supplémentation suivante. Comme chaque participant était assigné à chacune des deux supplémentations, l'ordre était établi arbitrairement et la supplémentation se faisait en double aveugle. Pendant la période d'attente (i.e entre la fin de l'ingestion des gélules et le début de l'exercice, les participants étaient isolés et au repos et recevaient les dernières instructions relatives au protocole.

1. Restrictions générales pré-tests

Avant chaque test il était demandé aux participants de ne pas consommer d'alcool (48 h précédentes) ainsi que de limiter leur consommation de caféine (24 h précédentes). De la même façon il était demandé à chaque participant de supprimer toute activité physique de leur emploi du temps de la veille et du jour d'un test. Les participants ne devaient pas non plus modifier leurs habitudes alimentaires lors des deux repas précédents immédiatement un test. Concernant les sujets devant se faire prélever des biopsies musculaires, le petit déjeuner et le repas du midi étaient pris en charge afin qu'ils soient identiques d'une condition expérimentale à l'autre et d'un individu à l'autre. Aussi, tous les participants recrutés pour les études présentées dans ce document étaient non-fumeurs. Enfin, l'ensemble des participants devaient passer un entretien de pré-inclusion avec un médecin afin de s'assurer qu'ils ne présentaient pas de risques majeurs pour eux-mêmes (malaises, problèmes cardiaques ou pulmonaires...) mais aussi pour l'équipe de recherche devant manipuler les échantillons de sang et de muscle le cas échéant.

2. Hydratation

Que ce soit avant, pendant ou après l'exercice, tous les participants étaient encouragés à boire autant d'eau qu'ils le souhaitaient. Seules les boissons énergétiques ou isotoniques étaient proscrites afin de ne pas interférer avec la supplémentation et donc impacter les

analyses biologiques subséquentes. De plus il était demandé à l'ensemble des participants de consommer exactement les mêmes quantités d'eau d'une condition à l'autre.

B. Tests des exercices musculaires réalisés sur ergocycle.

1. Echauffement pré-tests en laboratoire (Force-Vitesse, Temps limite, all-out 70 sec, test de Wingate et test de 3x30 sec) (Etude n°2 et 3)

L'échauffement débutait par 10 min à faible intensité (8 min à 150 W enchaînées avec 2 min à 260 W). Après 2 min de récupération il s'ensuivait trois sprints départs arrêtés en position assise entrecoupés de 1 min 30 de récupération. Les 3 sprints étaient réalisés progressivement en termes de résistance (ex: 300, 400 et 500W pour des participants entraînés). Le premier sprint durait 10 sec et l'on demandait au sujet de monter progressivement en fréquence pour être à fréquence maximale sur les 3 dernières secondes. Les deux autres sprints se faisaient sur 5 sec à fréquence maximale. Il est à noter que les résistances des sprints étaient ajustées en fonction du niveau des sujets. Une fois cet échauffement terminé et avant le début du test de temps limite, une récupération de 10 min était observée.

2. Echauffement pré-tests sur piste de cyclisme (3 x 500 mètres) (Etude n°1)

Cet échauffement durait 20 min au total et était entièrement pris en charge par l'entraîneur national de cyclisme sur piste. Les athlètes évoluaient autour de la piste intérieur en accélérant progressivement leur allure jusqu'à terminer par 5 min de sprints intermittent. Chacun des athlètes passait à tout de rôle en tête de peloton afin de mener deux tours de sprint. Suite à ces sprints, plusieurs tours de décélération/récupération étaient effectués avant de s'arrêter et de passer aux étirements.

3. Mesure de la consommation d'oxygène. (Etude n°2 et 3)

Cette épreuve consistait en une succession de paliers d'1 min après un échauffement de 6 min à 100 Watts. Les incréments de puissance à chaque palier étaient de 20 Watts. Tout au long du test les sujets devaient choisir une fréquence de pédalage et la respecter (tolérance de +/- 2 rotations par minute). Lorsque le sujet n'était plus capable de maintenir le rythme et que les critères d'atteinte du volume d'oxygène maximum consommé (VO_{2max}) étaient respectés (atteinte de FC_{max} ainsi que l'apparition d'un plateau dans la courbe de VO_2), l'épreuve était

interrompue. La valeur du VO_{2max} (moyennée sur 20 sec) au cours de ce test est désignée par le terme « VO_{2max} » et la dernière puissance maintenue sur plus d'une minute par le terme de « puissance maximale aérobie » ou « PMA ». De plus, lors de ce test étaient mesurés : la VE, la VCO_2 , la FR, le VC, la $PETO_2$ et la $PETCO_2$, la SaO_2 (Cosmed, Roma, Italy), ainsi que la FC (S810i and T61 electrode belt, Polar Electro, Kempele, Finland).

Cette épreuve d'exercice maximal était conduite selon les recommandations de la société française de médecine sous la responsabilité d'un médecin (consensus SFMS Sciences & Sports 2002; 7 : 48-50). Dans ce cadre, au repos et tout au long de l'épreuve, l'électrocardiogramme était suivi en continu pour nous permettre d'arrêter l'épreuve au moindre signe anormal. Ce type de test permet de détecter, avant la suite du protocole, toute contre-indication à l'exercice et aussi de mesurer la consommation maximale d'oxygène, index de la puissance aérobie du sujet.

Tableau 4 : Synthèse du protocole de détermination de la VO_{2max}

• Allumer l'analyseur de gaz (Quarck ou Moxus) au moins 45 min avant le début du test
• Allumer l'ordinateur associé
• Calibrer le système à l'aide des bonbonnes de gaz et la seringue de 3L
• Vérifier les valeurs d' O_2 et de CO_2 (~20.8 et ~0.04, respectivement)
• Sauvegarder la calibration (mais systématiquement refaite en cas de problème)
• Créer le dossier de sauvegarde (sur l'analyseur de gaz et le logiciel de l'ergomètre)
• Vérifier la stabilité de la chambre d'analyse ainsi que l'étanchéité du système (tuyaux)
• Mettre à disposition du sujet un ventilateur pendant l'épreuve
• Calibrer l'ergomètre à l'aide du logiciel de contrôle
• Régler les paramètres de l'ergomètre (hauteur et profondeur : selle + guidon / pédalier)
• Convenir d'un code pour la durée de l'épreuve avec le sujet pour éviter toute parole
• Fixer le masque adapté à l'aide des sangles crânienne et vérifier l'acquisition des données
• Charger le protocole adéquat de test sur le logiciel de contrôle de l'ergocycle
• Lancer une période de 2 min d'enregistrement au repos avant le début du test
• Lancer le protocole de mesure de la VO_{2max} (analyseur gaz + protocole ergomètre)
<i>L'ensemble des étapes liées au protocole étaient marquées pendant l'enregistrement</i>
• Fin du test : sauvegarder et vérifier le fonctionnement du fichier de sauvegarde
• Nettoyer les parties «usagées» à l'aide d'un détergeant et d'un antibactérien
• Rincer et mettre à sécher pour les tests suivants.

4. Test de force-vitesse. (Etude n°2 et 3)

Tous les sujets ont effectué un test de force – vitesse. Le but de ces tests était de déterminer la puissance maximale (P_{max}) ainsi que la vitesse optimale (V_{opt}). La P_{max} correspond à la moyenne des 3 tours de pédalier les plus puissants et la V_{opt} correspond à la vitesse à laquelle P_{max} est atteinte. Ces données devaient servir par la suite à individualiser l'intensité des tests supramaximaux.

La résistance donnée lors des 3 tests de force-vitesse était calculée en fonction du poids (Nm/kg). Chaque participant, selon son niveau d'expertise, devait donc faire un test à charge élevée (1.8 ou 1 Nm/kg), un à charge moyenne (1.4 ou 0.7 Nm/kg) et un à charge faible (1 ou 0.4 Nm/kg). L'ordre des tests se faisait au hasard.

Tableau 5 : Synthèse du protocole de Force-Vitesse

• Allumer l'ergomètre et l'ordinateur associé
• Calibrer l'ergomètre à l'aide du logiciel de contrôle
• Créer un dossier de sauvegarde
• Régler les paramètres de l'ergomètre (hauteur et profondeur : selle + guidon / pédalier)
• Double vérification de la tenue des pédales automatiques ou des cale-pieds
• Tirer au sort l'ordre de réalisation des 3 sprints
• Charger le protocole adéquat de test
• Vérifier la position de départ pour chaque sprint (assise) puis lancer le test
• Modifier la résistance du test d'un sprint à l'autre
• Sauvegarder et exporter les résultats entre chaque sprints
• Fin du protocole : sauvegarder et vérifier le fichier de sauvegarde global
• Nettoyer l'ergomètre et éteindre l'ensemble du système

5. Test de temps limite (T_{lim}) (Etude n°2)

Dix minutes après leur échauffement standard, les participants devaient réaliser un exercice de pédalage supra-maximal à charge constante ($P_{\Delta 30\%}$) aussi longtemps que possible jusqu'à l'épuisement total. La résistance du test ($P_{\Delta 30\%}$) était définie comme l'intensité supérieure à la puissance maximale aérobie, ce qui correspondait à une augmentation de 30% de la différence de puissance entre P_{max} (estimée à partir du test Force-Vitesse) et PMA :

$$P_{\Delta 30\%} = PMA + [0.3 \times (P_{max} - PMA)].$$

Les athlètes devaient maintenir une fréquence de pédalage constante (correspondant à $V_{opt} - 10\%$). Aucune information de temps relative à la durée du test ne leur était donnée et le test continuait jusqu'à l'épuisement complet. Soit les cyclistes stoppaient volontairement leur effort soit ils étaient arrêtés lorsqu'ils n'étaient plus capable de maintenir leur cadence de pédalage initiale (+/- 3rpm), ce qui était considéré comme un échec à maintenir la puissance cible à une fréquence précise.

De plus, lors de ce test étaient mesurés : la ventilation (VE), le volume de CO_2 (V_{CO_2}), la fréquence respiratoire (FR), le volume courant (VC), la pression téléexpiratoire en O_2 (P_{ETO_2}) et en CO_2 (P_{ETCO_2}), la saturation en O_2 (SaO_2) (Cosmed, Roma, Italy), ainsi que la fréquence cardiaque (FC) (S810i and T61 electrode belt, Polar Electro, Kempele, Finland).

6. Test all-out de 70 sec. (Etude n°2)

Pour ce test le participant devait pédaler à $V_{opt} - 10\%$ durant les 20 premières secondes (le pédalier était lancé manuellement à la valeur de $V_{opt}-10\%$ pour que le sujet soit directement à sa vitesse cible). Pendant ces 20 sec la puissance était imposée, ainsi pour tous les participants la puissance des 20 premières secondes représentait : $(P_{max} + PMA)/2$.

Une fois les 20 sec terminées, le protocole était conçu de telle sorte que la puissance de l'ergocycle s'adapte automatiquement à la vitesse de pédalage ($V_{opt} - 10\%$). Ainsi la seule consigne donnée au sujet était de pédaler au maximum de ses capacités pendant les 50 dernières secondes.

Tableau 6 : Synthèse du protocole du test de 70-sec.

• Allumer l'ergomètre et l'ordinateur associé
• Calibrer l'ergomètre à l'aide du logiciel de contrôle et définir la résistance du test
• Créer un dossier de sauvegarde
• Régler les paramètres de l'ergomètre (hauteur et profondeur : selle + guidon / pédalier)
• Double vérification de la tenue des pédales automatiques ou des cale-pieds
• Charger le protocole adéquat de test
• Lancer le test, donner des infos sur la fréquence de pédalage lors des 20 premières secondes
• Sauvegarder et vérifier le fichier de sauvegarde à la fin du test, puis exporter
• Nettoyer l'ergocycle et éteindre le système

La puissance moyenne (P_m), puissance maximale (P_{max}) et la puissance de fin (P_{fin}) étaient déterminées pour l'ensemble des sprints et pour chaque individu. L'index de fatigue (IF) était alors calculé comme étant le pourcentage de diminution entre P_{max} et P_{fin} , et servait à évaluer la performance au cours du test, selon la formule suivante : $[(P_{max} - P_{fin}) / P_{max}] \times 100$, soit en condition d'acidose (placebo), soit en condition d'alcalose (prise de $NaHCO_3$) (Figure 21).

De plus, lors de ce test étaient mesurés : la VE, la VCO_2 , la FR, le VC, la $PETO_2$ et la $PETCO_2$, la SaO_2 (Cosmed, Roma, Italy), ainsi que la FC (S810i and T61 electrode belt, Polar Electro, Kempele, Finland).

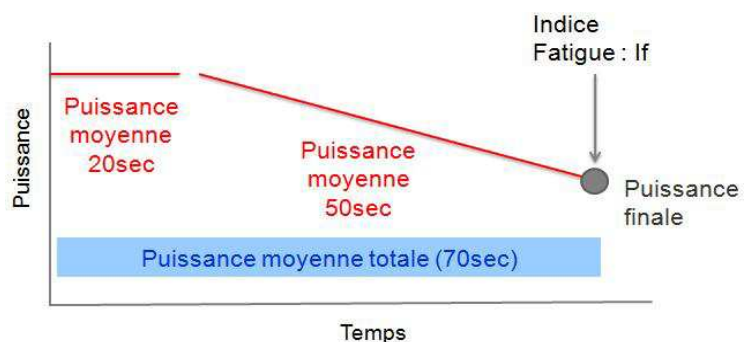


Figure 21 : Schématisation du protocole du test supramaximal à puissance variable (all-out).

7. Test all-out de 3 x 500 mètres. (Etude n°1)

Ce test était réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que le test de 4 x 100 mètres. Après un échauffement sur piste et juste avant le départ de chacun des sprints les participants ont réalisé trois tours de piste afin d'atteindre leur vitesse optimale de pédalage. Il leur était demandé de pédaler le plus vite possible pour éviter toute possible stratégie de course. Les temps de chaque demi-tour et chaque tour complet étaient enregistrés électroniquement (REI2, Microgate, Bolzano, Italy). Aussi, des encouragements verbaux étaient donnés pour tous les participants durant les sprints.

8. Test de Wingate (Etude n°3)

Ce test, réalisé à la fois comme familiarisation et aussi afin d'établir les intensités d'exercice du test suivant (i.e 3 x 30 sec de sprints), consistait à la réalisation de 30 sec de pédalage à intensité maximale contre une charge préétablie à 0.075 Nm.kg^{-1} . Avant de débiter le test, les participants s'échauffaient 10 min (selon les modalités détaillées en 2).a)) sur l'ergomètre (Lode Excalibur Sport V2.0; Groningen, The Netherlands) et se reposaient ensuite pendant 5 min. Tous les participants devaient pédaler, en position assise, le plus rapidement possible du début à la fin des 30 sec d'exercice et étaient verbalement encouragés à maintenir leur cadence maximale de pédalage. Des informations de temps étaient données sous forme de compte à rebours à partir de 15 sec d'exercice, avec un décompte complet pour les 5 dernières secondes.

9. Test de 3 x 30 sec. (Etude n°3)

Ce test était réalisé à la fois en condition après supplémentation en placebo et en bicarbonate de sodium lors de la troisième étude. Les deux sessions de test étaient séparées d'une semaine pour tous les participants.

Il était demandé aux participants de se tenir en position assise du début à la fin de chaque test. Pour chacun des sprints, et de façon individuelle, une V_{opt} de pédalage était établie, à l'aide du test de Wingate, pour le départ des trois sprints. Un membre de l'équipe de recherche lançait donc manuellement la roue de l'ergomètre jusqu'à la V_{opt} du participant testé puis le sprint débutait dès que le participant avait pu placer ses pieds dans les deux cale-pieds. Pour la suite du test la cadence n'était pas contrôlée, ce qui signifie que les participants devaient pédaler le plus vite possible durant les 30 sec. Comme pour le test de Wingate, la résistance était préétablie à 0.075 Nm.kg^{-1} . Des encouragements verbaux et un compte à

rebours à partir de 15 sec étaient donnés pour chaque sprint. P_m , P_{max} et P_{fin} étaient déterminées pour l'ensemble des sprints et pour chaque individu. L'IF était aussi calculé comme étant le pourcentage de diminution entre P_{max} et P_{fin} selon la formule suivante :

$$[(P_{max} - P_{fin}) / P_{max}] \times 100.$$

Tableau 7 : Récapitulatif du protocole du test de Wingate (et du 3 x 30 sec)

• Allumer l'ergomètre et l'ordinateur associé
• Calibrer l'ergomètre à l'aide du logiciel de contrôle et définir la résistance (0.075 kg.kg^{-1})
• Créer un dossier de sauvegarde
• Régler les paramètres de l'ergomètre (hauteur et profondeur : selle + guidon / pédalier)
• Double vérification de la tenue des pédales automatiques ou des cale-pieds
• Charger le protocole adéquat de test
• Lancer le test, donner des infos de temps lors des 15 dernières secondes
• Sauvegarder et vérifier le fichier de sauvegarde à la fin du test, puis exporter
• Nettoyer l'ergocycle et éteindre le système

C. Test de sauts verticaux. (Etude n°1)

Post-échauffement et environ 2 min 30 après le 3 x 500 mètres all-out, les participants devaient réaliser deux sessions de 3 sauts verticaux (aussi appelé « Squat-jump test ») (Optojump, Microgate, Bolzano-Bozen, Italy). Le test était réalisé avec les mains sur les hanches et l'angle du genou était fixé à 90° au moment de l'impulsion. Les participants, lorsque leur position était adéquate et stabilisée, devaient sauter au signal des expérimentateurs. La consigne était de sauter le plus haut possible. Pour les sauts pré- et post-tests, la moyenne des deux meilleurs sauts était faite afin de déterminer la performance.

Tableau 8 : Synthèse du protocole des sauts verticaux

• Installation du matériel au plus proche de la zone de décélération
• Vérifier la communication entre le système et l'ordinateur associé, puis calibrer
• Créer un dossier de sauvegarde
• Vérifier les positions de départ pour chacun des 3 sauts
• Vérifier les positions lors du saut et de la réception
• Sauvegarder chacun des sauts puis l'ensemble des sauts avant d'exporter les résultats
• Eteindre, nettoyer si nécessaire et ranger le matériel

D. Evaluation de la perception de l'effort. (Etude n°1 et 3)

Pour l'ensemble des études, immédiatement après chaque exercice ou sprint, les participants devaient fournir une évaluation de leur fatigue ressentie (ou RPE pour « rating of perceived exertion ») à l'aide de deux échelles distinctes. La première est une échelle en 15 niveaux (de 6 à 20) utilisée pour estimer la fatigue ressentie au niveau cardio-respiratoire, le numéro 6 reflète un exercice très, très facile et le numéro 20 correspond un exercice maximal (Borg). La seconde échelle (CR-10, Borg) est divisée en 11 points (0 à 10), où 0 reflète l'absence de douleurs et 10 une douleur maximale. L'échelle CR-10 sert, quant à elle, à évaluer la douleur musculaire ressentie.

La signification de chaque niveau et de chaque terme, si besoin, était donnée par un membre de l'équipe de recherche à chaque participant avant de démarrer un test.

E. Prélèvements sanguins. (Etude n°1, 2 et 3)

1. Technique

Les prélèvements de sang étaient réalisés soit au niveau de la pulpe des doigts soit au niveau du lobe inférieur de l'oreille. Ces échantillons étaient obtenus au repos après l'échauffement, puis immédiatement post-exercice, 3, 5 et 9 min post-exercice (sauf pour le T_{lim} : uniquement au repos, post-exercice, 5 et 8 min post-exercice). Dans le cas de répétition d'exercice (type 3 x 30 sec) les prises de sang étaient faites après chaque sprint.

2. Analyses

Les échantillons de sang ainsi obtenus étaient immédiatement analysés ou maintenus dans la glace au maximum 10 min avant qu'un analyseur soit disponible.

Alors que pour la première étude l'ensemble des mesures (pH, $[La^-]$ et $[HCO_3^-]$) était réalisé sur une seule et même machine (I-stat, Abbott, Les Ulis, France) à l'aide d'un échantillon de 85 μ L contenu dans un capillaire, les prélèvements pour les deux autres études ont dû être réalisés par différents analyseurs du fait de contraintes. Ainsi pour l'étude n°2 le pH, la $[HCO_3^-]$, la paO_2 et la $paCO_2$ étaient mesurés par un I-stat (Abbott, Les Ulis, France) et la $[La^-]$ par un Biosen (20 μ L nécessaires) (C-line analyser, EKF Industrie, Elektronik GmbH, Barleben, Germany). De la même manière, lors de la dernière étude le pH et la $[HCO_3^-]$ étaient mesurés par un analyseur Rapidpoint 405 (100 μ L nécessaires) (Siemens Healthcare, Melbourne, Australia) et la $[La^-]$ par un analyseur 2300 STAT Plus (20 μ L nécessaires) (YSI Inc., Yellow Springs, OH). L'ensemble de ces analyseurs a déjà été validé par de précédents travaux.

F. Paramètres respiratoires. (Etude n°2)

1. Technique et analyses.

Le volume courant (VC), la capacité vitale forcée (CVF = inspiration + expiration forcées lentes et profondes), le volume expiratoire forcé en 1 sec (VEF_1), le volume inspiratoire forcé (VIF) ainsi que le volume inspiratoire forcé en 1 sec (VIF_1) étaient mesurés par un spiromètre électronique (Spirobank II, Rome, Italie) avant et 3 min après le T_{lim} . La précision ainsi que la reproductibilité de telles mesures ont été validées par Liistro et al. (Liistro *et al.*, 2006). Chacun des tests était réalisé debout avec une pince sur le nez pour éviter toute fuite de gaz par les voies respiratoires supérieures.

Avant le T_{lim} , un minimum de 3 inspirations et expirations était réalisé et la plus haute des trois valeurs était définie comme la valeur maximale. A la fin du T_{lim} et du fait des contraintes de temps (récupération et autres mesures), seulement une mesure spirométrique était réalisée sur les participants afin de quantifier les changements de la fonction respiratoire induits par l'exercice.



Image 1 : Mesures spirométriques (avant et après le T_{lim}).

G. Réponses cardiaques (Etudes n°2).

1. Techniques.

Le Physioflow (Physioflow, Manatec Type PF05L1, Strasbourg, France), utilisé lors des tests, mesure les changements d'impédance en réponse à l'induction d'un faible courant électrique. Une paire d'électrodes (Ag-AgCl, Hewlett Packard 40493 E), une électrode de transmission et une de détection, était positionnée au-dessus de la fosse supra-claviculaire à la base gauche du cou et une seconde paire le long du processus xiphoïde. Une dernière paire d'électrodes était utilisée pour enregistrer l'eltro cardio-gramme (position CM5). Avec cette installation, une première évaluation de l'index de débit systolique (Qs) et du débit cardiaque (Qc) était calculée lors de la procédure de calibration basée sur 30 battements consécutifs, enregistrée au repos. Lors du T_{lim} , la variation des paramètres mesurés était analysée et comparée avec les valeurs obtenues lors de la procédure de calibration.

2. Analyses.

Le Qc et le Qs étaient mesurés en continu (données en « beat-to-beat » moyennées toutes les 5 sec), au repos, à l'exercice et au cours de la récupération (Physioflow, Manatec Type PF05L1, Strasbourg, France), de la même façon que la fréquence cardiaque (FC) (S810i and T61 electrode belt, Polar Electro, Kempele, Finland).



Image 2 : Mesure des Qs et Qc au repos à l'aide du Physioflow.

H. Biopsies musculaires. (Etude n°3)

1. Technique

Dans le cadre de la dernière étude, 8 biopsies étaient réalisées (4 par condition expérimentale) par un médecin expérimenté. Pour chacune des conditions les biopsies étaient prélevées en position allongée sur champ stérile au repos, immédiatement post-exercice, 6 h et 24 h post-exercice. Avant qu'une incision soit faite dans le muscle squelettique, la peau et le fascia entourant le *vastus lateralis* ont été anesthésiés en utilisant 5 mL de Xylocaïne 1%. Pour les deux premières biopsies, deux incisions étaient réalisées : une pour être utilisée directement pour la biopsie de repos et l'autre était fermée par Steri-Strip et était utilisée pour la biopsie immédiatement post-exercice. Toutes les autres biopsies étaient prises approximativement à 1cm de la précédente incision (Image 3A). Au maximum 300 mg de tissus musculaire humide étaient retirés du ventre du *vastus lateralis* (mi-chemin entre la hanche et le genou) pour chaque participant en utilisant la technique modifiée par aspiration de l'aiguille de Bergström (5 mm) (Evans *et al.*, 1982) (Image 3B). Les échantillons de muscle étaient ensuite nettoyés à sec de tout sang, tissus adipeux et tissus conjonctifs visibles à l'aide d'un papier filtre. La quantité de muscle restant était divisé en deux parties : 1/ une partie était immédiatement congelée dans de l'azote liquide et stockée en congélateur à -80°C dans l'attente des analyses enzymatiques et protéiques à venir, 2/ l'autre partie était utilisée directement pour l'étude *in situ* de la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées.

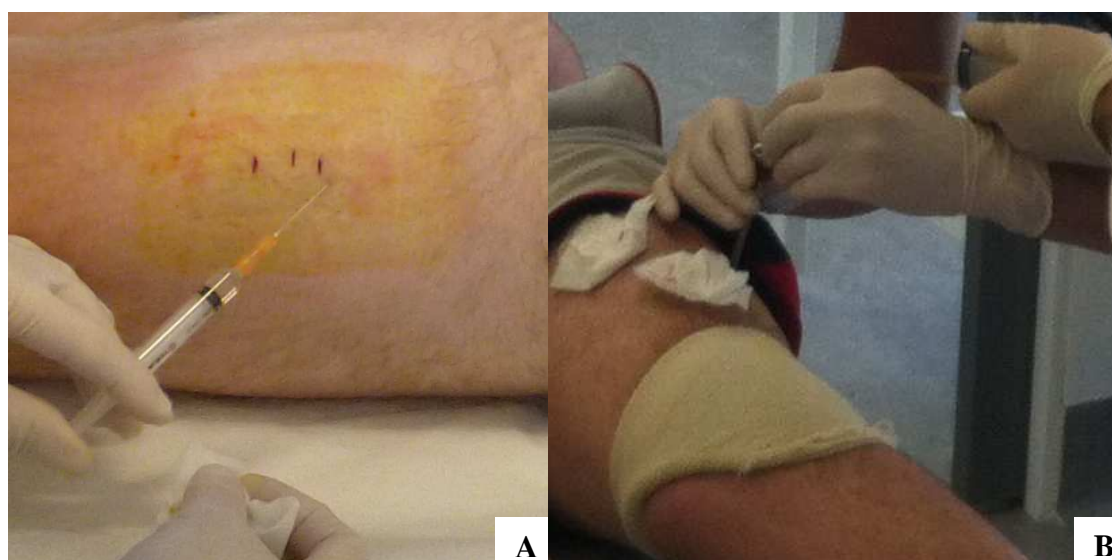


Image 3 : Positions des incisions faites sous anesthésie (A), préalables aux biopsies réalisées par succion à l'aide d'une aiguille de Bergström et d'une seringue de 50mL (B).

Tableau 9 : Liste du matériel nécessaire à la réalisation d'une biopsie.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• <u>Préparer pour le médecin:</u> champ stérile, scalpel, rasoir, gants, Stéri-Strips, glace, compresses, bandes élastiques, seringue + aiguille de Bergström, Xilocaine. (tout en double) |
| <ul style="list-style-type: none">• <u>Préparer pour l'expérimentateur :</u> balance, cryotubes, forceps, papier filtre, gants, lunettes, nitrogène liquide. BIOPS + glace (= conserver muscle pour respiration mitochondriale) |

2. Analyses

a) *Western Blots (Etude n°3)*

Les protéines étaient dans un premier temps isolées du muscle par une méthode déjà utilisée et décrite par McCullagh et al. (McCullagh *et al.*, 1996), ainsi que d'autres équipes de recherche (Thomas *et al.*, 2005b). Une fois les protéines séparées du reste du muscle par broyage puis centrifugation, la concentration totale en protéine était déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA, pour «Bicinchoninic acid assay») (Pierce, Interchim, Montluçon, France) avec l'utilisation de BSA (pour «bovine serum albumin») comme standard.

Des échantillons provenant des homogénats musculaires, contenant chacun 20 µg de protéines, étaient séparés sur des gels Bis-Tris 4 à 12% de 1.5mm d'épaisseurs (Nupage, NP0335BOX) pendant 60 min à 200 V, grâce à un système Novex (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) dans un tampon B (MOPS-SDS [1M MOPS, 1M Tris Base , 69.3 mM SDS, 20.5 mM EDTA, H₂O à ajuster à la bonne dilution, pH 7.7]). Un marqueur de poids moléculaire était systématiquement déposé dans le premier puits des gels (Euromedex 06P-0211, 10-250kDa). L'échantillon servant de contrôle pour l'ensemble des gels (contrôle des variations inter-gels) avait été obtenu à partir d'une biopsie de repos d'un participant ayant stopé l'étude avant la fin ([Image 4](#)). De plus pour chacune des protéines quantifiées, une protéine de référence (ou «housekeeping protein») était aussi quantifiée (en l'occurrence la tubuline, 50 kDa), afin de prévenir toute variation intra-gel.

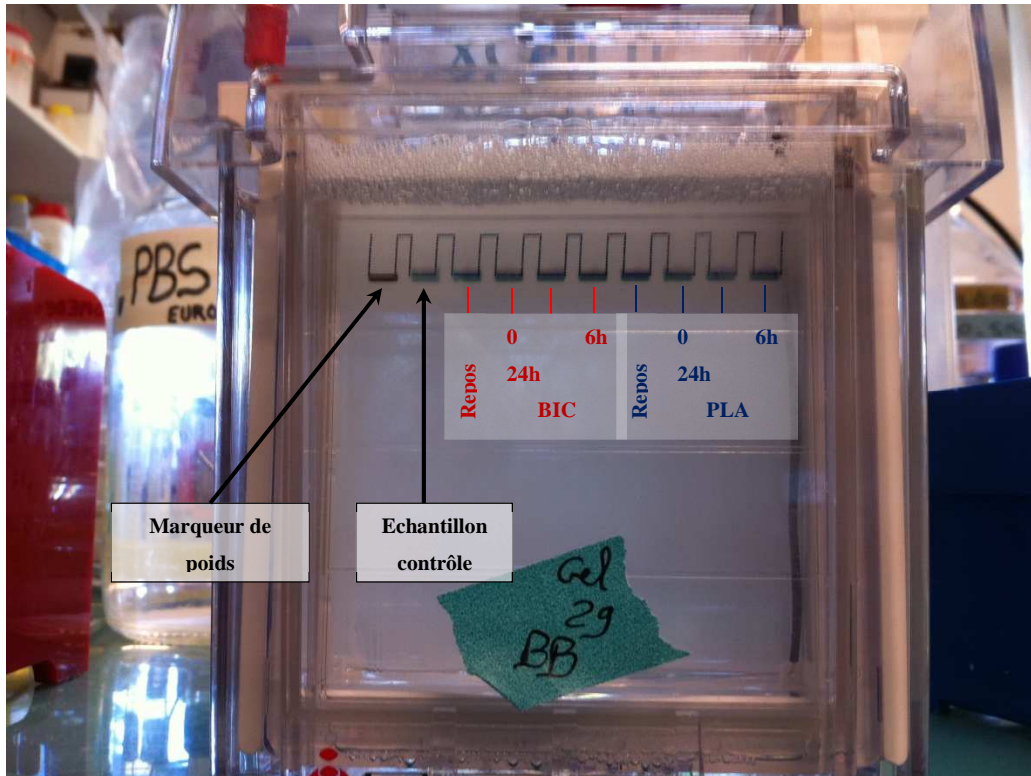


Image 4 : Photo représentant les différents échantillons tels que déposés lors de l'électrophorèse.

Après la migration des protéines, celles-ci étaient transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose (101mA pendant 75 min), puis les membranes ainsi obtenues étaient incubées sur un appareil à agitation mécanique (ou « shaker ») durant 90 min à température ambiante dans un tampon de blocage (Odyssey® Blocking Buffer; LI-COR, Cat. #927-40000; phosphate-buffered saline (PBS) contenant 0.1% de sodium azide; Euromedex). Ensuite, les membranes étaient incubées à 4°C pendant toute une nuit (minimum 12 h) avec l'anticorps primaire dans du tampon de blocage. La dilution de l'anticorps primaire variait de (1:1000 à 1:500) en fonction de la protéine ciblée. Après cette étape, les membranes étaient rincées trois fois 5 min dans du tampon PBS-Tween (PBS 1x [140 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.14 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4] + 0,25% Tween 20) et une fois 5 min dans du tampon PBS 1x. Les membranes étaient alors incubées pendant 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Tableau 10). Enfin, les membranes étaient une nouvelles fois rincées selon le même protocole et l'expression des protéines étaient détectée par immunofluorescence (Image 5) (Odyssey Infrared Imaging System LI-COR Biosciences, ScienceTec, Courtabœuf, France). La densité des bandes de protéines était mesurée en utilisant le logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) (Tableau 11) et les résultats exprimés en unités optiques arbitraires comme précédemment utilisé (Thomas *et al.*, 2005b).



Image 5 : Machine de révélation par immunofluorescence Odyssey.

Tableau 10 : Synthèse d'utilisation des différents anticorps

Protéine	Poids moléculaire	Dilution	Source	Réf. Fournisseur
<i>Protéines de transport membranaire</i>				
CD147	55 kDa	1/1000	Souris	sc-9757 SantaCruz
MCT1	55 kDa	1/1000	Lapin	AB3538P Millipore
MCT4	55 kDa	1/1000	Lapin	AB3316P Millipore
NBCe1	150 - 160 kDa	1/1000	Lapin	AB3212 Millipore
NHE1	100 - 110 kDa	1/1000	Souris	MAB3140 Millipore
CAII	31 kDa	1/1000	Lapin	sc-25596 SantaCruz
AMPK	62 kDa	1/500	Lapin	2532S Cell signaling
p-AMPK	62 kDa	1/500	Lapin	2531S Cell signaling
<i>Protéines mitochondriales</i>				
COX IV	17 kDa	1/1000	Lapin	4844S Cell signaling
PGC1α	93 kDa	1/1000	Lapin	2178S Ozyme
<i>Protéine de loading</i>				
Tubuline	50 kDa	1/2000	Souris	T6074 Sigma-A
<i>Quantification oxydation protéique et lipidique</i>				
OxyBlot	/	1/150	Lapin	S7150 Millipore
4-HNE	/	1/3000	Chèvre	AB5605 Millipore

Tableau 11 : Exemples des bandes de densité de l'ensemble des protéines après révélations.



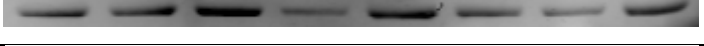

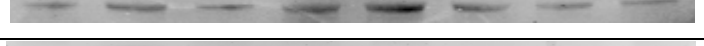






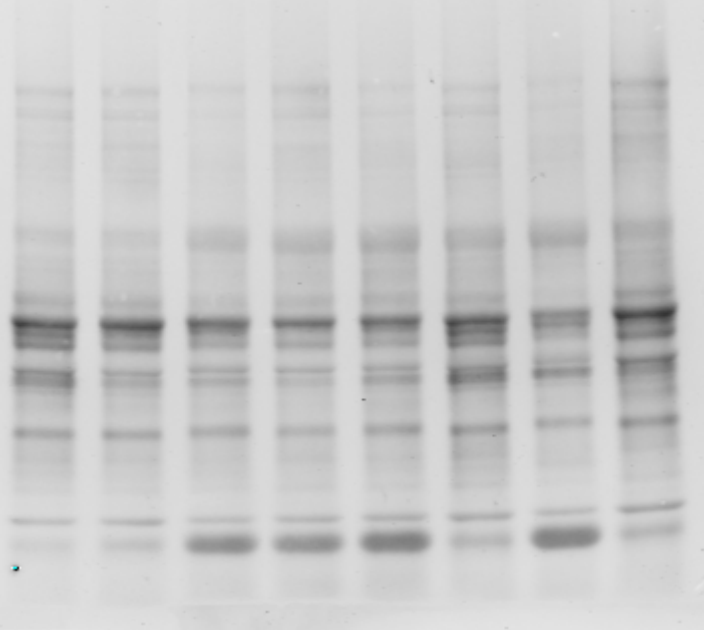
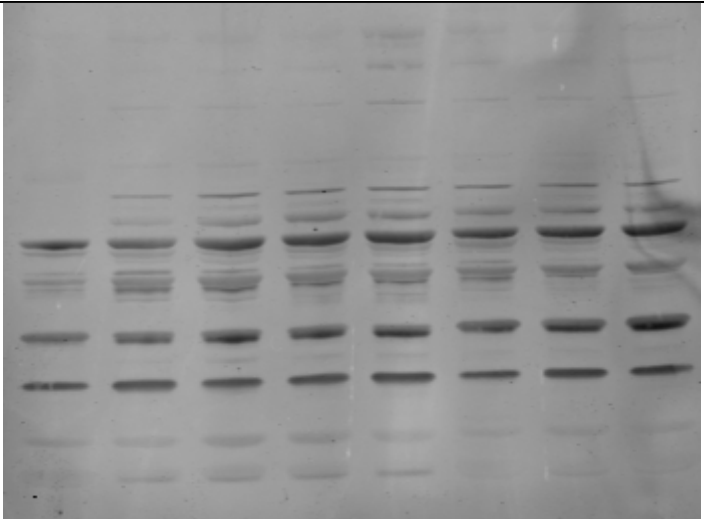
MCT4	
MCT1	
CD147	
CAII	
NBCe1	
NHE	
COX IV	
PGC1α	
AMPK	
pAMPK	
Tubuline	
Oxyblots	
4-HNE	

Tableau 12 : Récapitulatif des étapes suivies pour le dosage des protéines.

► Etape 1 : Extraction des protéines
• Dilution de l'échantillon au 10 ^{ème} dans tampon d'homogénéisation (Tampon A)*
• Homogénéisation au Potter manuel
• Centrifugation, 4°C, 10 000 G, pendant 4 min
• Récupérer le surnageant puis réaliser le dosage de protéine à l'aide du kit BCA
► Etape 2 : Préparation des échantillons (atteindre concentration finale de 20µg.µL⁻¹)
• Pour cela, faire en fonction de la concentration protéique de chaque échantillon
• X volumes d'homogénat + X volume de Tampon A + 30µL de Tampon 4x** + 30µL d'eau MilliQ
► Etape 3 : Séparation sur gel Bis-Tris 4-12% = migration
• Sortir les gels des emballages, et rincer chaque puits avec du tampon de migration***
• Placer les gels dans la cuve et la remplir de tampon de migration
• Ajouter l'antioxydant dans le tampon entre les deux gels
• Déposer précautionneusement les échantillons et le marqueur de poids moléculaire
• Lancer l'électrophorèse à 200 volts à 100mA pendant 1h à 1h30 (fonction du poids moléculaire)
• Vérifier le front de migration avant d'arrêter la migration
► Etape 4 : Transfert des protéines sur membrane
• Utilisation de membrane de nitrocellulose de 0.2µm (PM < 100 kDa), si > 100 kDa = 0.45µm
• Tremper les papiers wattman et la membrane dans le tampon de transfert****
• Placer les éléments de bas en haut : 3 papiers wattman/membrane/gel/3 papiers wattman
• Attention à la possible formation de bulles pendant le processus
• Lancer pendant 1 h à <5 volts et à un ampérage calculé comme suit : L x l x 0.8mA
► Etape 5 : Immunomarquage
• Placer la membrane dans tampon de blocage pendant 1 h à TA sous agitation
• Ajouter l'AC primaire à bonne dilution toute une nuit à 4°C sur agitateur
• Rincer
•Ajouter l'AC secondaire couplé à un fluorochrome 1 h à TA sur agitateur et à l'abri de la lumière
• Rincer
► Etape 6 : Révélation
• Sécher les membranes avec du papier absorbant en protégeant de la lumière
• Révéler les membranes à l'aide de l'Odyssey Infrared Imaging System
• Quantifier la densité des bandes (logiciel ImageJ)

Tableau 13 : Préparation de la solution de tampon d'homogénéisation

Tampon d'homogénéisation*			
Solution finale volume: (mL)			100
Eau MilliQ :	Ajuster à 100mL	pH:	7.4
Elément	Concentration (mM)	Poids Moléculaire	à ajouter (g)
Sucrose	210	342.3	7.188
HEPES	30	288.3	0.715
EGTA	2	380.4	0.076
NaCl	40	58.44	0.233
EDTA	5	295.24	0.073
<i>Le jour même ajouter :</i>			
Inhibiteurs de phosphatases (P5726 Sigma)	0.5% (=500µL pour 100mL de solution finale)		
Inhibiteurs de protéases (P8340 Sigma)	0.5% (=500µL pour 100mL de solution finale)		

Tableau 14 : Préparation de la solution de tampon Laemmli 4x

Tampon Laemmli 4x**	
Elément	Concentration finale
Tris-HCl	250 mM, pH 6.8
Bêta-mercaptoethanol	0.5 M
Glycérol	40%
SDS	8%
Bleu de bromophénol	0.02%

Tableau 15 : Préparation de la solution de tampon de migration

Tampon de migration***	
Elément	Quantité
MOPS-SDS Nupage	40mL
Eau MilliQ	800mL
Antioxydant	500µL / 200mL de solution (seulement entre les 2 gels)

Tableau 16 : Préparation de la solution de tampon de transfert

Tampon de transfert****	
Elément	Quantité
Eau MilliQ	100mL
Ethanol	10mL

b) Quantification des protéines oxydées (kit OxyBlot S7150)

(Tableau 21) (Etude n°3)

Cette quantification spécifique permet de rendre compte d'une réaction rédox particulière qui se caractérise par la fixation de groupements carbonyle très réactifs (i.e cétones) au niveau de certains acides aminés de protéines (i.e lysine, arginine). Cette fixation entraînera alors une cascade de réactions d'oxydation comme décrites par Davies et al. (Davies & Slater, 1987), et conduisant à des disfonctionnements protéiques irréparables.

Après avoir homogénéisé les échantillons musculaires pour en extraire les protéines, on procédait à une centrifugation ainsi qu'au dosage des protéines. Ensuite, 5 µL de chaque échantillon (contenant 15 µg de protéines) étaient dénaturés par addition de 5 µL de SDS 12% puis réduit en 2.4 DNP après incubation de 15 min avec 10 µL de DNPH. En parallèle, un échantillon « contrôle négatif » était préparé selon la même démarche, seulement le DNPH était remplacé par 10 µL de solution de réduction standard. Puis, 7.5 µL de la solution de neutralisation ont été ajoutés avec un volume de 5% de β-mercaptoéthanol. L'échantillon traité ainsi que le contrôle négatif ont ensuite été séparés par électrophorèse (selon la procédure du Western Blot décrite précédemment) et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après avoir été mise dans du tampon de blocage (Odyssey® Blocking Buffer; LI-COR, Cat. #927-40000; phosphate-buffered saline (PBS) contenant 0.1% de sodium azide; Euromedex) pendant 1 h à température ambiante, la membrane était mise à incuber sur une nuit avec l'anticorps polyclonal primaire, dilué au 1 :150, dans du tampon de blocage à 4°C. Après rinçage (Cf technique du Western Blot), la membrane devait incuber pendant 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horseradich Raifort Protein). Lors de la révélation par chimiluminescence, il est possible de détecter des bandes de protéines sur l'échantillon traité, alors que le contrôle négatif ne laissait rien apparaître prouvant ainsi que les protéines carbonylées n'ont pas été réduites.

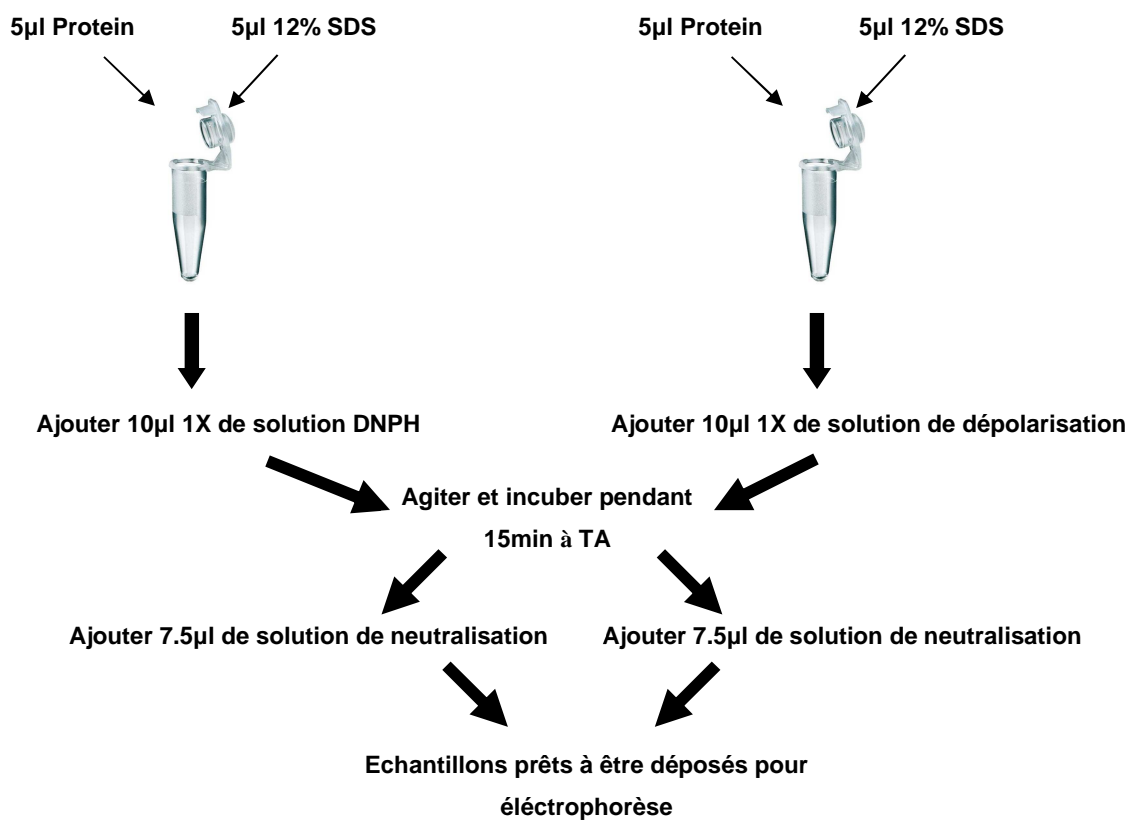


Figure 22 : Schématisation du protocole de préparation des échantillons pour la quantification de protéines oxydées.

c) Quantification de la peroxydation lipidique. (AB5605, Millipore) (Etude n°3)

La quantification de la 4-hydroxy-2nonenal (4-HNE), identifiée pour la première fois en 1991 par Esterbauer et al. (Esterbauer *et al.*, 1991), permet de compléter l'analyse des effets du stress oxydatif et apparaît aussi jouer un rôle important dans diverses voies de signalisation cellulaire (Zarkovic, 2003). Son principe de révélation est exactement le même que pour n'importe quelle autre protéine (Cf technique du Western blot), avec une dilution de l'anticorps secondaire au 1:1000.

d) *Mesure de l'activité citrate synthase. (CS) (Etude n°3)*

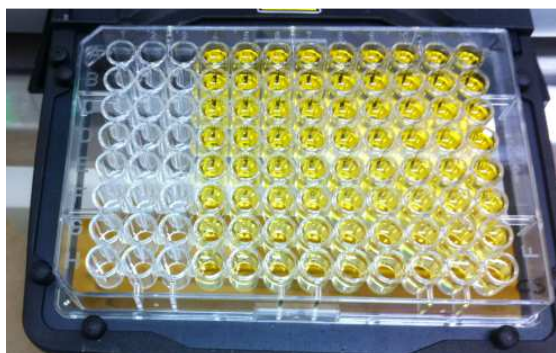


Image 6 : Remplissage des puits sur plaque à fond plat pour la mesure de la CS.

Les homogénats étaient préparés dans du Tampon A [210 mM sucrose, 2 mM EGTA, 40 mM NaCl, 30 mM HEPES, 5 mM EDTA, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.4] puis stockés à -80°C. La citrate synthase, considérée comme un marqueur du stock mitochondrial, catalyse la réaction suivante : Acétyl-CoA + oxaloacétate + H₂O citrate + CoA-SH + H⁺. L'activité enzymatique de la CS a été mesurée selon la méthode de Srere (1969), où l'apparition des groupes SH, dépendante de l'activité de la CS, permet la réduction du DTNB (réactif d'Ellman) en TNB (acide 5-thio 2-nitrobenzoïque) de couleur jaune dont l'absorbance est mesurée à 412 nm (Image 6).

Tableau 17 : Récapitulatif du protocole de mesure de l'activité CS

• Allumer le système au moins 30 min avant utilisation + lancer le logiciel
• Créer un dossier de sauvegarde puis préparer la plaque comme suit (valeur données par puits) :
• 10µL d'homogénat musculaire
• 790µL de Triton X100 1%
• 100µL acétyl-CoA 1mM
• 100µL DTNB 1mM
• agiter la plaque puis incuber 1 min à 37°C
• rajouter 10µL d'oxaloacétate 10mM
• Lire l'absorbance à 37°C après un délai de 20 sec pendant 3 min à 412 nm
• Les valeurs sont exprimées en mU.mg ⁻¹ de protéines. Sauvegarder les données.

e) *Mesure de la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées. (Etude n°3)*

❖ Préparation des fibres



Image 7 : Préparation des fibres musculaires perméabilisées.

Les fibres étaient isolées à partir d'échantillons de biopsies de *vastus lateralis* (Image 7) puis placées dans 5mL de Tampon B* [10 mM EGTA, 6.56 mM MgCl₂, 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 5.77 mM ATP, 20 mM imidazole, 50 mM MES potassium salt (KMES), 15 mM phosphocreatine, pH 7.1] (Tableau 18) avec 5 g.mL⁻¹ de saponine pendant 30 min à 4°C sur shaker, afin d'être perméabilisées. La saponine était ensuite retirée des fibres par rinçages successifs de 2 x 10 min à 4°C en utilisant 2 x 5 mL de Tampon C** (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 20 mM taurine, 10 mM K₂HPO₄, 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 60 mM K-lactobionate, pH 7.1) (Tableau 19).

Tableau 18 : Préparation de la solution de BIOPS.

BIOPS (Tampon B)*			
Solution finale volume: (mL)			1500
Eau MilliQ :	1350	pH:	7.1
Elément	Concentration (mM)	Poids Moléculaire	à ajouter (g)
Na ₂ ATP	5.77	551.1	4.77
MgCl ₂ -6H ₂ O	6.56	203.3	2.00
Taurine	20	125.15	3.75
PCr	15	273.1	6.14
Imidazole	20	68.08	2.04
DTT	0.5	154.25	0.12
MES	50	195.2	14.64
Stock solutions:			
Solution	[finale] (mM)	[stock] (mM)	à ajouter (mL)
K ₂ EGTA	7.23	100	108.45
CaK ₂ EGTA	2.77	100	41.55

Tableau 19 : Préparation de la solution de MIR05.

MiR05 (Tampon C)**			
Solution final volume: (mL)			2000
Eau MilliQ :	1760	pH:	7.1
Elément	Concentration (mM)	Poids Moléculaire	à ajouter (g)
EGTA	0.5	380.4	0.38
MgCl ₂ -6H ₂ O	3	203.3	1.22
Taurine	20	125.1	5.00
K ₂ HPO ₄	10	136.1	2.72
HEPES	20	238.3	9.53
Sucrose	110	342.3	75.31
BSA	1g/L	N/A	2
Stock solutions:			
Solution	[finale] (mM)	[stock] (mM)	à ajouter (mL)
K-lactobionate	60	500	240

❖ Mesure de la consommation d'oxygène des fibres



Image 8 : Oxygraphes Oroboros.

Pour tous les participants, les paramètres respiratoires de la population mitochondriale totale des fibres musculaires perméabilisées ont été étudiés en utilisant 2 oxygraphes-2k d'Oroboros (Image 8). Les mesures ont été conduites à 37°C, les échantillons étant baignés en continu dans 2.2 mL de tampon C avec ajout de différents substrats. La concentration en oxygène dans chacune des chambres des oxymètres était de 20 $\mu\text{M O}_2 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ tout au long de l'expérimentation. De 3 à 4 mg de fibres humides perméabilisées étaient placés dans leur chambre à oxygène respective. L'activité de respiration était exprimée en $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de poids. Avant tout ajout de substrats (Image 9), la consommation d'oxygène était mesurée afin d'évaluer la consommation d'oxygène au repos (V_o). Ensuite, 250 μM ($V_{s\text{-max}1}$), 2.5 mM ($V_{s\text{-max}2}$) et 5 mM (V_{max}) d'[ADP] ont été successivement ajoutés afin d'augmenter la consommation d'oxygène dans les chambres jusqu'à atteindre la consommation maximale d'oxygène. Le Complexe I (CI) a été testé en utilisant 2 mM de malate et 5 mM de pyruvate. Les complexes deux, trois et quatre (CII, CIII, CIV) ont été testés, en même temps que CI, par ajout de 10 mM de succinate + 0.1 μM FCCP. Par la suite, CI était inhibé par 0.01 μM de rotenone dans le but de tester uniquement CII, CIII et CIV. CII a été testé seul en inhibant CIII avec 3.75 μM d'antimycin A. CIV a finalement été testé par l'ajout de 2 mM d'ascorbate et 0.5 μM de N,N,N',N'-tetraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD). CIV était finalement inhibé par l'adjonction de >200 mM de sodium azide, ce qui permettait de contrôler l'intégrité des chambres des oxygraphes (absence de bactéries notamment). L'ensemble des mesures a été corrigé par l'activité de la CS.



Image 9 : Ensemble des seringues nécessaires à l'ajout des substrats dans les chambres de mesure de la respiration mitochondriale.

Tableau 20 : Synthèse des étapes nécessaires à la mesure de la respiration mitochondriale

• Allumer les oxygraphes et les ordinateurs associés
• Sortir du congélateur les différents produits chimiques et les placer dans de la glace
• Préparer la saponine (mg/mL dans Tampon C) et le pyruvate (44mg/200µL dans de l'eau)
• Aspirer l'éthanol 70% des chambres des oxygraphes + rincer 5 fois avec de l'eau bidistillée
• Remplir avec de l'eau bidistillée puis refermer avec les stoppers pendant 10 min
• Lancer le logiciel DatLab sur chaque ordinateur et créer les dossiers de sauvegarde
• Avant de lancer les agitateurs, retirer l'eau des chambres et mettre 2.2mL de Tampon B
• Pendant que la [d'O ₂] se stabilise, préparer les seringues d'injection dans l'ordre
• Perméabiliser les FM dans du Tampon C + saponine pendant 30' sur agitateur et sur glace
• Retirer les FM, les peser à l'aide d'un papier filtre afin de rentrer le poids dans DatLab
• Placer les échantillons dans les chambres puis ajouter l'O ₂ une fois les stoppers placés
• Suivre le protocole (Tableau 21)
<i>L'ensemble des étapes liées au protocole étaient marquées pendant l'enregistrement</i>
• Une fois terminé, nettoyer les chambres à l'eau bidistillée et à l'éthanol 70%
• Avant d'éteindre les systèmes : vérifier si la sauvegarde a fonctionné !

Tableau 21 : Protocole synthétisé (dans l'ordre des ajouts) de la mesure de respiration mitochondriale.

Eléments	quantité (/ taille seringue)	Stock solution	[C] / chambre	Stade de respiration	Commentaires	Nom complet
fibres permé	3.0÷4.0mg				viser ~3gr; <5 mgs	
O₂ inj	>480µM	(~50µM O ₂ /µl)	>480µM		fermer chambre quand > 480µM	Oxygen
M	5µL (25µL)	0.8M (H ₂ O)	2mM	CI	CI	L-Malic acid
P	5µL (25µL)	2M (H ₂ O)	5mM	(CI)L	CI	Pyruvic acid
MgCl₂·6H₂O	24µL (10µL)	250mM	3mM		réaction ADP vers ATP	Mg Chloride
ADP	0.4µL (10µL)	0.5M (H ₂ O)	250µM	(CI)D _{0.1}	CI sousmaximal	ADP
ADP	10µL (10µL)	0.5M (H ₂ O)	2.5mM	(CI)D _{2.6}	CI sousmaximal	ADP
ADP	10µL (10µL)	0.5M (H ₂ O)	5mM	(CI)D _{5.1}	resp maximale CI	ADP
S	20µL (50µL)	1M (H ₂ O)	10mM	(CI+CII)P	CI+II	Succinate
Cyt c	5µL (25µL)	4mM (H ₂ O)	10µM		contrôle de la prépa de l'échantillon	Cyt C
FCCP	1µL (10µL)	1mM (EtOH)	0.1µM	(CI+CII) _{ETS}	non-coupled state (1st titration)	FCCP
Rot	1µL (10µL)	0.1mM(EtOH)	0.01µM	(CII) _{ETS}	blocks CI	Rotenone
Ama	1.5µL (10µL)	5mM (EtOH)	3.75µM	ROX	blocks CIII	Antimycin A
O₂ inj	>480µM	(~50µM O ₂ /µl)	>480µM		fermer quand > 480µM	Oxygen
As	5µL (25µL)	0.8mM (H ₂ O)	2mM		CIV	Ascorbate
Tm	5µL (25µL)	0.2M (H ₂ O)	0.5mM	(C _{IV}) _{ETS} +autOX	CIV	TMPD
Azd	>50µL(50µL)	8M (H ₂ O)	>200mM	ROX+AutOx	inhibe CIV	Na Azide
O₂ inj	>[O ₂]CIV _{ETS}		>(C _{IV}) _{ETS} [O ₂]	AutOx		Oxygen

f) *Mesures musculaires du pH et de la $[H^+]$. (Etude n°3)*

Dans un premier temps, les échantillons de muscles ont été pesés avant et après avoir été congelés afin de déterminer le contenu en eau. Les échantillons secs et congelés (entre 1.8 et 2.5 mg) ont ensuite été homogénéisés sur glace pendant 2 min dans une solution contenant 10 mM de fluorure de sodium à une dilution de 30 mg de muscle sec.mL⁻¹ de solution homogénéisée (Mannion *et al.*, 1993). La mesure de toutes les valeurs de pH a été conduite dans un bain d'eau à une température de 37°C à l'aide d'une microélectrode (MI-415, Microelectrodes, Bedford, NH) connectée à un pH-mètre (SA 520, Orion Research, Cambridge, MA). La titration de chaque échantillon se faisait par enregistrement continu des valeurs entre la 3^{ème} et la 5^{ème} minute suivant l'insertion de la microélectrode (car atteinte d'une stabilité), ensuite l'ensemble des valeurs était moyenné.

g) *Mesure de la capacité tampon musculaire (in vitro). (Etude n°3)*

Après cette étape de détermination du pH, l'ensemble des échantillons était ajusté à un pH de 7.1-7.2 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (0.02 M), puis ensuite le pH était amené à une valeur de 6.1-6.2 par ajout progressif de 2 µL d'acide hydrochlorique (HCl : 10mM). A partir de la courbe de tendance (i.e mmol d'HCl ajoutés vs pH), le nombre de moles d'ions H⁺ (par gramme de muscle sec) nécessaire pour changer le pH de 7.1 à 6.5 était interpolé. Cette valeur était ensuite normalisée pour l'ensemble des valeurs de pH pour donner des micromoles d'H⁺ par gramme de muscle sec par unité de pH (µmol H⁺.g de muscle sec⁻¹.pH⁻¹), ce qui déterminait ainsi la capacité tampon musculaire *in vitro* (Edge *et al.*, 2006b; Bishop *et al.*, 2009).

Tableau 22 : Récapitulatif des différents tests et mesures/analyses effectués lors des 3 études.

	<u>Tests</u>	<u>Mesures</u>
<u>Etude n°1</u>	- 3x500-m all-out (<i>PLA/BIC</i>) - Squat-Jump (<i>PLA/BIC</i>)	- Sanguine (i-Stat + Biosen) - Perception de l'effort (Börg)
<u>Etude n°2</u>	- Force-Vitesse - VO _{2max} - Temps limite - 70-sec all-out (<i>PLA/BIC</i>)	- Sanguine (i-Stat) - Paramètres cardio-respiratoires - Paramètres ventilatoires
<u>Etude n°3</u>	- Force-Vitesse - Wingate - 3x30-sec all-out (<i>PLA/BIC</i>)	- Sanguine (Stat Plus+Rapidpoint) - Perception de l'effort (Börg) - Biopsies musculaires <ul style="list-style-type: none"> ◦ Western Blots ◦ Oxydation protéique/lipidique ◦ Citrate synthase ◦ Respiration mitochondriale

Partie IV. **RESULTATS DES
RECHERCHES**

Chapitre I. Etude n°1 : « Effets d'une supplémentation en NaHCO₃ sur les performances et les paramètres métaboliques lors de sprints répétés (3x500-m) et de squat-jumps chez les cyclistes sur piste de l'équipe de France. »

Cette étude a donné lieu à l'écriture de l'article suivant :

- **Delfour-Peyrethon R.**, Thomas C., David J. Bishop DJ., Sylvain Dorel S., Hug F., Hanon C. *Effect of metabolic induced-alkalosis on performance in world-class track cyclists*. En cours de soumission.

A. Méthodologie spécifique

1. Caractéristiques des participants.

6 athlètes élités (âge: 20.2±1.9 ans, taille: 178±7 cm, poids: 79.5±11.0 kg, record sur 500-m: 28.10±1.40 sec)

2. Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.

<u>Tests</u>	<u>Mesures</u>
- 3x500-m all-out (PLA/BIC) - Squat-Jump (PLA/BIC)	- Sanguine (i-Stat + Biosen) - Perception de l'effort (Börg)

3. Analyses statistiques.

La normalité de l'ensemble des données a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk et sont rapportées dans les résultats comme étant moyenne ± SD. La significativité a été fixée à P<0.05. Une analyse de la variance à deux voies (effet temps – effet condition) (ANOVA), avec mesures répétées a été conduite pour les paramètres sanguins ainsi que la performance en cyclisme et en saut. Lorsqu'une différence significative apparaissait, un test post-hoc de Tukey a été réalisé.

Les relations entre les variables ont été analysées grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Enfin, les *d* de Cohen (moyenne résiduelle/SD), pour les paramètres de performance, ont été calculés afin de catégoriser l'amplitude de l'estimation de l'erreur (>0.8 : effet important, 0.5-0.8 : effet modéré, <0.5 : effet minime, (Cohen, 1992)).

B. Résultats.

1. Effets de l'exercice et de l'alcalose induite sur les paramètres sanguins.

A la fois un effet condition ($P < 0.001$) et un effet temps ($P < 0.001$) ont été identifiés pour le pH, sans toutefois qu'une interaction ne soit trouvée. En condition PLA, les valeurs de pH étaient significativement plus faibles qu'en condition BIC (Figure 23). De plus, toutes les valeurs de pH étaient significativement plus basses que les valeurs enregistrées post-échauffement, pour les deux conditions ($P < 0.001$).

Une interaction significative (condition x temps) a été trouvée pour la $[\text{HCO}_3^-]$ ($P < 0.05$). Les valeurs post-échauffement étaient significativement plus élevées en condition BIC qu'en PLA (Figure 23; PLA : 25.3 ± 2.6 vs BIC : 30.6 ± 4.7 mmol.L⁻¹ ; $P < 0.05$), démontrant ainsi l'efficacité de la supplémentation en NaHCO_3 . De la même façon, 9 min après les sprints la $[\text{HCO}_3^-]$ était toujours significativement supérieure en BIC comparé à la condition PLA (Figure 23; PLA : 6.5 ± 0.6 vs BIC : 9.1 ± 1.7 mmol.L⁻¹ ; $P < 0.01$). Toutes les valeurs de $[\text{HCO}_3^-]$ étaient significativement plus faibles lorsque comparées avec les valeurs post-échauffement, pour les deux conditions ($P < 0.001$).

Une interaction significative (condition x temps) a été observée pour $[\text{La}^-_b]$ ($P < 0.001$). Les valeurs post-test de $[\text{La}^-_b]$ étaient significativement supérieures en condition BIC qu'en PLA (Figure 24; 5 mins post-sprint 3 : PLA : 20.0 ± 2.0 vs BIC : 24.0 ± 3.6 mmol.L⁻¹; $P < 0.05$; 9 mins post-sprint 3 : PLA : 18.5 ± 2.7 vs 24.1 ± 3.8 mmol.L⁻¹; $P < 0.01$). Enfin, les valeurs de $[\text{La}^-_b]$ augmentaient dans les deux conditions tout au long de la répétition de sprints ($P < 0.001$).

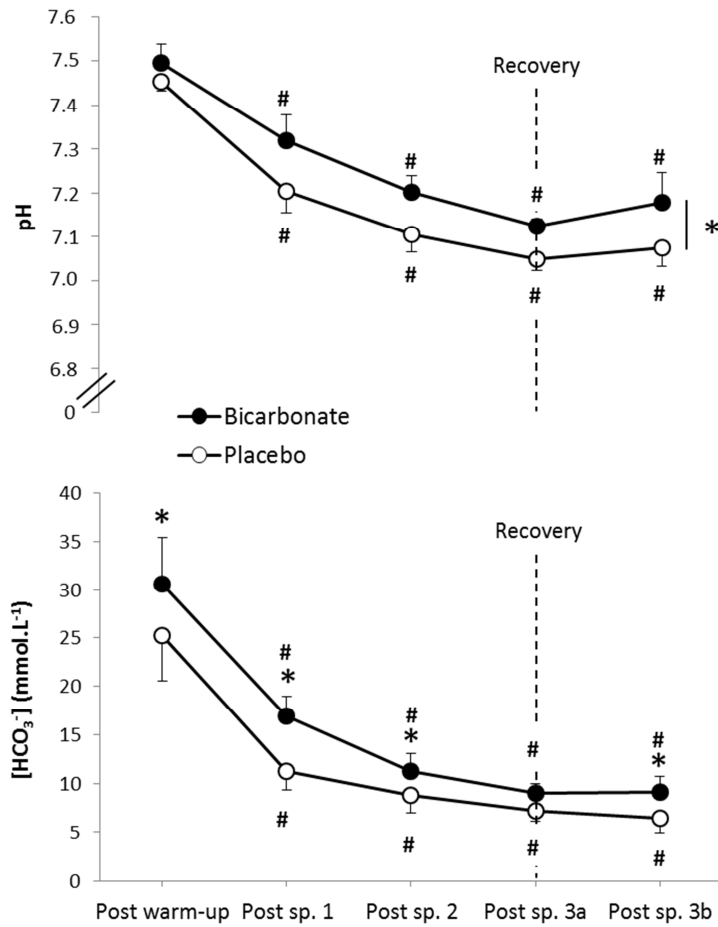


Figure 23 : Evolution du pH (A) et de la [HCO₃⁻] (B) lors du test de 3x500-m all-out (moyennes ± SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre condition (P<0.05) ; # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.001) (n=6).

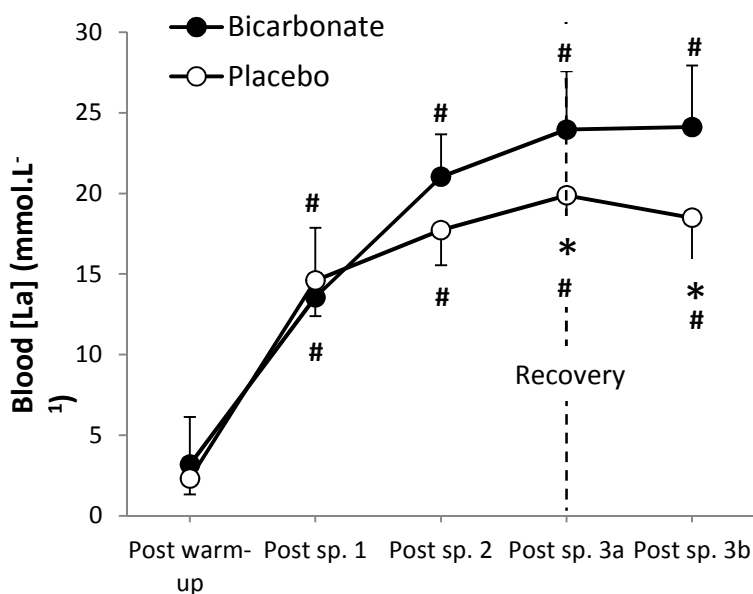


Figure 24 : Evolution de la [La] lors du test de 3x500-m all-out (moyennes \pm SE), PLA (\circ) et BIC (\bullet). * démontre une différence entre condition ($P < 0.05$) ; # démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.001$) ($n = 6$).

2. Performances mécaniques

La vitesse moyenne mesurée pendant chacun des sprints et celle moyennée pour les trois sprints n'étaient pas significativement différentes entre les deux conditions (Tableau 23 ; PLA : 16.97 ± 0.18 vs BIC : 17.02 ± 0.20 m.s⁻¹ ; $P < 0.05$, ES=0.47). Alors que les participants 1 et 2 n'avaient pas amélioré leurs performances sur les sprints de 500 mètres en condition BIC comparé au PLA. Les quatre autres participants ont produit une vitesse moyenne plus importante en BIC par rapport au PLA tout au long de la répétition de sprints (Tableau 23).

Une interaction significative (condition x temps) a été trouvée pour les performances en squat-jump (SJ) ($P < 0.05$). Comparé avec la condition PLA, l'alcalose induite a entraîné une hauteur de saut significativement plus importante lors des SJ post-exercice (**Figure XX** ; PLA : 30.4 ± 5.7 vs 32.9 ± 6.5 cm ; $P = 0.01$; ES=0.92), ceci correspondait à une amélioration de $+7.2 \pm 3.2\%$. Cet effet positif de la supplémentation en BIC s'échelonnait entre $+5.4$ et $+13.4\%$, avec les plus faibles effets notés pour les participants 1 et 2.

Tableau 23 : Présentation des vitesses individuelles (en m.s⁻¹) pendant le test de 3x500-m sprints et des performances en SJ (en cm) pour les conditions PLA et BIC, (M: male et F: female). * démontre une différence entre condition (P<0.05) ; # démontre une différence avec la mesure au repos (P<0.001) (n=6).

	First 500-m		Second 500-m		Third 500-m		Post warm-up SJ		Post sprints SJ	
	PLA	BIC	PLA	BIC	PLA	BIC	PLA	BIC	PLA	BIC
Athlete 1 (M)	16.66 ↘	16.12	17.16 ↘	16.98	17.27 ↘	17.05	36.00 ↘	35.85	29.80 ↘	28.50
Athlete 2 (M)	16.97 ↘	16.87	17.45 ↘	17.44	17.66 ↘	17.50	27.80 ↗	28.05	20.95 ↗	22.65
Athlete 3 (M)	16.83 ↗	16.96	17.31 ↗	17.55	17.92 ↗	17.93	43.40 ↘	41.85	35.45 ↗	37.05
Athlete 4 (M)	16.82 ↗	17.02	17.35 ↗	17.67	17.53 ↗	17.73	40.10 ↗	40.60	31.50 ↗	37.35
Athlete 5 (M)	16.56 ↗	16.82	16.93 ↗	17.08	17.09 ↗	17.25	46.10 ↘	43.35	36.60 ↗	39.70
Athlete 6 (F)	16.83 ↗	16.96	15.80 ↗	16.01	15.41 ↗	15.48	33.50 ↗	34.45	28.10 ↗	31.95
Mean ± SE	16.78±0.15	16.79±0.34	17.00±0.61	17.12±0.61	17.15±0.90	17.16±0.88	37.70±8.54	37.40±5.70	30.40±5.66#	32.90±6.50#*

3. Perception de l'effort

Une interaction significative a été identifiée pour l'échelle 1-10 de Börg (CR10) (P<0.05). Aucune différence significative n'a été révélée entre les conditions pour les deux échelles de Börg (Figure 25; P=0.09 et P=0.87, respectivement). Toutefois, pour les deux conditions, BIC et PLA, les scores notés après les sprints 2 et 3 étaient significativement différents des scores post-sprint 1, pour les deux échelles de perception de l'effort (Figure 25 ; P<0.001). De plus, des corrélations négatives significatives ont été trouvées entre l'ensemble des valeurs de pH et les échelles de Börg pour tous les sprints (6-20 : r = -0.37, n=12, P<0.05 ; 1-10 : r = -0.43, n=12, P<0.01), et aussi entre les valeurs de [HCO₃⁻] et les échelles de Börg (6-20 : r = -0.42, n=12, P<0.01 ; 1-10 : r = -0.44, n=12, P<0.01).

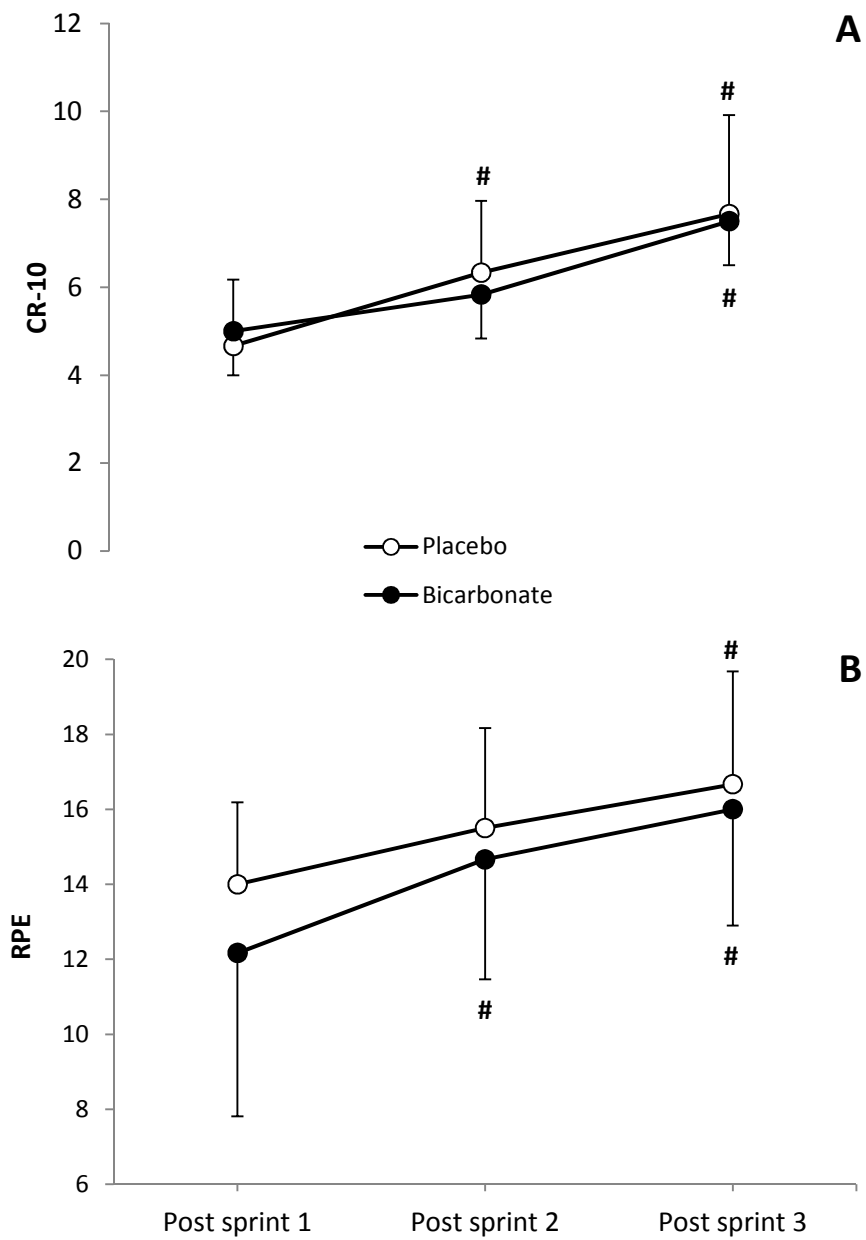


Figure 25 : Résultats des échelles de CR10 (A) et de RPE (B) lors du test de 3x500-m, 5-min post sprints 1, 2 et 3 (Post sp. 1, Post sp. 2, Post sp.3). # démontre une différence avec la mesure post sprint 1 ($P < 0.001$) ($n=6$).

C. Discussion des résultats de l'étude n°1.

L'objectif de cette étude était de tester l'effet d'une supplémentation en bicarbonate de sodium sur la performance au cours d'une répétition de sprints chez des athlètes de niveau international. Bien que ce type particulier de population soit connu pour produire de hautes concentrations d'ions H^+ , les résultats de cette étude n'ont montré aucune amélioration de la performance en cyclisme sur piste, néanmoins nous avons pu observer que 4 des 6 athlètes avaient amélioré leurs performances individuelles. De plus, la chute de performance mesurée entre les squat-jumps effectués avant et après le test de 3x500 m, était significativement réduite en BIC.

Comme il l'a déjà été rapporté dans la littérature, et sans qu'aucuns problèmes gastro-intestinaux ne surviennent, le statut acido-basique sanguin a significativement été altéré par l'ingestion de $NaHCO_3$, et ce, immédiatement avant et durant le test. Cette étude confirme aussi que la $[La^-]$ sanguine, en BIC, est significativement plus importante après un unique sprint ou une répétition d'exercice de haute intensité lorsque comparée avec une condition PLA (Gaitanos *et al.*, 1991; Bishop *et al.*, 2004a; Lindh *et al.*, 2008; Siegler & Gleadall-Siddall, 2010). Ceci pourrait corroborer l'effet positif du $NaHCO_3$ sur l'élimination du lactate musculaire (Lindinger *et al.*, 1990), due en partie à une augmentation du nombre et/ou de l'activité des transporteurs lactate/proton (Bishop *et al.*, 2004a; Douroudos *et al.*, 2006). Toutefois, puisque les performances en cyclisme n'étaient pas significativement améliorées lors de notre étude, les liens potentiels entre augmentation de la production de lactate et amélioration de la performance n'ont pas encore été vérifiés (Gaitanos *et al.*, 1991; Bishop *et al.*, 2004a; Lindh *et al.*, 2008). Ceci signifie ainsi que l'augmentation de la contribution énergétique de source anaérobie n'est pas confirmée comme étant la cause principale des effets ergogéniques du $NaHCO_3$ pour tous les participants.

Ce manque d'amélioration générale dans les performances de cyclisme (avec de longue période de récupération) entre en contradiction avec les effets positifs et significatifs de l'alcalose induite observés pour les performances en squat-jump. Réalisée après le test de 3x500 m, la performance en SJ était prise comme un indicateur indépendant de la force explosive des extenseurs du genou et de la hanche (Gorostiaga *et al.*, 2010) Après des courses de 200 et 400 m, des baisses de 17% et 27% de la hauteur de saut mesurée après exercice

(comparé à la performance pré-exercice) ont déjà été rapportées (Jiménez-Reyes *et al.*, 2013), similairement à la chute de 20% observée dans la présente étude en PLA.

Les différences de résultats entre performances en SJ et en cyclisme pourraient être expliquées par leurs différences en termes de demande énergétique. Les exercices pliométriques de courte durée, tels que les SJ, pourraient être plus sensibles à l'hydrolyse de l'ATP qu'à la glycolyse et donc être plus sensibles à la cinétique de récupération de la PCr post-exercice. Il a été montré que la récupération des stocks de PCr dépend de l'acidose (Lodi *et al.*, 1997) et cela pourrait expliquer pourquoi l'ingestion de NaHCO₃ a eu des effets ergogènes sur des SJ réalisés en alcalose métabolique. De plus, la moindre chute de performance en SJ notée en BIC comparativement à la condition PLA pourrait potentiellement être le résultat d'une élimination plus rapide des ions H⁺ du compartiment musculaire et d'une amélioration de la capacité tampon. Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse que cet effet positif de la supplémentation en NaHCO₃ serait uniquement valable pendant une courte durée immédiatement après un exercice chez des athlètes spécifiquement entraînés, qui présentent déjà de hauts niveaux de capacité de transport du lactate et des ions H⁺ (Pilegaard *et al.*, 1994, 1999b). Ceci suggérerait que le système de transport du lactate et des protons est important pour la performance lors d'exercices de haute intensité. En effet, une capacité améliorée de l'élimination des H⁺ du muscle réduirait la chute du pH musculaire pour une production donnée de lactate, ce qui pourrait retarder le développement de la fatigue.

Toutefois, (Zabala *et al.*, 2011) ont rapporté une amélioration non significative de la performance lors de countermovement jumps (CMJ) en BIC, comparé à une condition placebo. Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par l'utilisation de tests très distincts l'un de l'autre. Pour ce travail nous avons préféré utiliser le SJ plutôt que le CMJ car ce test est connu pour être moins sensibles aux qualités de coordination et plus précis sur les mesures des qualités concentriques sur le genou et d'extension de la hanche (Harman *et al.*, 1990). Cet aspect rend ainsi le SJ plus spécifique à l'activité de pédalage. De plus, les différences de résultats entre notre étude et celle de (Zabala *et al.*, 2011) pourraient aussi s'expliquer par les différences entre population (athlètes de BMX dans l'étude de Zabala *et al.*, contre des cyclistes spécialistes du sprint pour notre étude), ce qui peut influencer la masse ainsi que la typologie musculaire.

Le haut-niveau de pratique de nos participants (cyclistes sur piste de niveau international) était une condition nécessaire afin qu'ils puissent produire de très fortes acidoses métaboliques. La spécificité de notre population peut également justifier sa faible

taille et est la conséquence de nos hypothèses initiales. En effet, les 6 athlètes de notre étude étaient les seuls à pouvoir être recrutés du point de vue du niveau de performance demandé. Néanmoins, un des résultats importants de cette étude est que, pour les cyclistes sur piste de haut niveau, la réponse à la supplémentation en NaHCO_3 est « individu-dépendante ». Dans cette étude, 4/6 des participants ont amélioré leur performance en sprint (+0.8 à +1.8%) en condition BIC. Cette amélioration est dans le même ordre de grandeur (+1.7±2.0%) que celle trouvée en cyclisme après une supplémentation en NaHCO_3 rapportée par Carr et al. (Carr *et al.*, 2011). Il est important de noter que pour des athlètes élités, une amélioration de 2% de leur performance peut être interprété comme modérée (Hopkins *et al.*, 2009). En effet, une amélioration de la vitesse de l'ordre de 0.15 à 0.32 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (telle qu'observée individuellement pour le second sprint de 500 m) peut être une amélioration d'importance lors de compétitions, permettant à un athlète d'influer sur son résultat final, comme déjà mentionné par Lindh et al. (Lindh *et al.*, 2008).

De manière intéressante, les deux participants qui n'ont pas eu d'effet positif de la supplémentation en NaHCO_3 sur leur performance en cyclisme ont aussi démontré la plus faible amélioration de performance en SJ. De plus, malgré des valeurs métaboliques mesurées après l'échauffement similaires aux autres participants, les deux mêmes athlètes avaient le pH et la PCO_2 la plus faible après l'arrêt du premier sprint. Aussi, ces deux sujets présentaient une augmentation de leurs scores au CR10 en condition BIC contrairement aux 4 autres sujets qui notaient plus faiblement la difficulté des sprints en BIC qu'en PLA. Il n'est pas clair quant-à la façon dont le système nerveux central intègre les signaux afférents cardio-pulmonaires, métaboliques... et comment ceux-ci pourraient causer les modifications dans la perception de la fatigue lors de l'exercice. Il a été émis comme hypothèse que l'augmentation de la perception de l'effort lors de l'exercice pourrait être causée par l'accumulation d'ions H^+ au sein du muscle squelettique (Ament & Verkerke, 2009). Pour supporter cette idée, nous avons trouvé une corrélation négative entre la perception de l'effort (échelles de Börg, RPE et CR10) et le statut acido-basique (pH et $[\text{HCO}_3^-]$) confirmant les résultats présentés par Price et al. lors d'un protocole d'exercice intermittent long (Price *et al.*, 2003).

En conclusion, les résultats de cette étude indiquent que, lorsque comparée à la condition PLA, la supplémentation en NaHCO_3 a efficacement amélioré la performance en SJ après une répétition de sprints réalisée à haute intensité chez des cyclistes sur piste de niveau international. Ceci peut présenter un intérêt pour les athlètes et entraîneurs de sport collectif, par exemple dans les activités où un joueur doit combiner différents types d'effort tels que des

sprints à répétition directement suivis par des actions explosives, comme des extensions verticales (par exemple en basketball, handball et football). Il est important de noter qu'avant d'utiliser du NaHCO_3 en compétition, les entraîneurs et scientifiques du sport doivent impérativement tester les réponses des athlètes de manière personnalisée comme le démontre les variations inter-individuelles dans l'amélioration de la performance en cyclisme dans notre étude.

Ainsi, ce travail met en évidence la nécessité d'étudier plus en profondeur les potentiels effets ergogènes du NaHCO_3 sur la performance de même que les mécanismes pouvant expliquer ces effets. De plus, il semble important de chercher à mieux comprendre les différences entre les participants étant sensibles au NaHCO_3 et ceux ne l'étant pas, ou moins.

Chapitre II. Etude n°2 : « Etude de la VO₂, de paramètres cardio-respiratoires, de paramètres métaboliques et de la performance d'athlètes entraînés au cours d'un exercice de pédalage supramaximal : situation d'acidose *versus* alcalose. »

Cette étude a donné lieu à l'écriture des articles suivants :

- Hanon C., Dorel S., **Delfour-Peyrethon R.**, Leprêtre PM., Bishop DJ., Perrey S and Thomas C. *Prevalence of cardio-respiratory factors in the occurrence of the decrease in oxygen uptake during supra-maximal, constant-power exercise*. SpringerPlus 2013, 2:651.
- Thomas C., **Delfour-Peyrethon R.**, Bishop DJ, Perrey S., Leprêtre PM, Dorel S., Hanon C. *Effets of pre-exercise alkalosis on the decrease in VO₂ at the end of exercise*. Soumis à l'European Journal of Applied Physiology, Septembre 2014.

Ainsi qu'aux communications orales suivantes:

- Hanon C., Dorel S., **Delfour-Peyrethon R.**, Perrey S., Bishop D., Leprêtre P-M. and Thomas C. *Cardio-respiratory origin of the VO₂ decrease observed during a constant supramaximal cycling exercise*. 2012, Bruges, 17ème congrès annuel de l'European College of Sport Science.
- Leprêtre PM., Hanon C., **Delfour-Peyrethon R.**, Thomas C., Perrey S., Dorel S., Bishop D. *Blood alkalosis affected cardio-dynamic and oxygen uptake responses during all-out supra-maximal cycling exercise*. 2012, Bruges, 17ème congrès annuel de l'ECSS.
- **Delfour-Peyrethon R.**, Hanon C., Dorel S., Perrey S., Bishop D., Leprêtre P-M., Thomas C. *Effects of alkalosis on performance and muscular oxygenation during all-out cycling exercises*. 2011, Liverpool, 16ème congrès annuel de l'ECSS.
- Perrey S., **Delfour-Peyrethon R.**, Leprêtre P.M., Bishop D., Hanon C. *No effect of induced blood alkalosis on cerebral deoxygenation during supramaximal exercise*. 2011, Liverpool, 16ème congrès annuel de l'ECSS.

Dans la continuité de ces travaux, nous avons bien entendu souhaité appréhender les mécanismes potentiels sous-jacents à la chute de VO_2 . La puissance (constante ou variable) et l'acidose métabolique sont deux facteurs qui ont retenu notre attention, et dont nous avons voulu tester l'influence sur la chute de VO_2 en étudiant les différentes étapes de la chaîne de transport de l'oxygène.

A. Méthodologie spécifique: expérimentation A.

1. Caractéristiques des participants.

11 hommes sains (âge: 24.9 ± 6.5 ans, taille: 179 ± 5 cm, poids: 75.3 ± 8.2 kg, VO_{2max} : 57.9 ± 6.9 mL.min⁻¹.kg⁻¹)

2. Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.

<u>Tests</u>	<u>Mesures</u>
- Force-Vitesse - VO_{2max} - Temps limite	- Sanguine (i-Stat) - Paramètres ventilatoires (CVF, VEF ₁ , VIF, VIF ₁ , VO_2 , VCO ₂ , PETO ₂ , VE, VC, FR) - Paramètres cardiaques (Qs, Qc, FC)

3. Analyse statistique.

Les données sont rapportées ici en moyenne \pm SD. Le niveau de significativité a été fixé à $P < 0.05$. Du fait que tous les participants n'ont pas réalisés exactement le même temps lors du T_{lim} , les données ont été exprimées en fonction du % de temps total (tous les 5% de la durée du T_{lim}) pour les ANOVA. Les changements pour les variables respiratoires lors du T_{lim} ont été évalués par une analyse de la variance à une voie (ANOVA), avec mesures répétées à travers chaque intervalle de 5%, suivies par des comparaisons multiples (Student-Newman-Keuls), afin de tester l'effet temps sur les variables. La corrélation intra-classes (CIC) a été calculée pour les données spirométriques pré-test. Les relations entre les variables (ventilatoires, cardio-dynamique, saturation artérielle en O_2 , paramètres métaboliques et VO_2) à différents temps du test ainsi que la performance finale du T_{lim} ont été analysées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson.

B. Résultats.

1. Performance

a) *Tests de Force-Vitesse et VO_{2max}*

Les valeurs présentées ici ont été obtenues lors de tests réalisés indépendamment de toute supplémentation et ont permis d'individualiser l'intensité des tests supramaximaux. Ainsi la P_{max} moyenne et la V_{opt} mesurées par les tests de Force-Vitesse étaient respectivement de 1318±191 W et de 121±7 Rpm, et la PMA de 350±32 W. La VO_{2max} mesurée lors du test incrémental était égale à 57.9±6.9 mL.min⁻¹.kg⁻¹, et les valeurs maximales de Qc, Qs et FC était respectivement de 25.1±1.5 L.min⁻¹, 132.2±13.2 mL.battement⁻¹ et 188±10 bpm⁻¹.

b) *Tests de temps limite*

La performance moyenne réalisée pour le T_{lim} était de 51.4±6.9 sec (ordre de 43 à 65 sec). Lors du test, une puissance moyenne de 641±51 W a été maintenue à une fréquence de pédalage constante de 109±6 rpm, cette puissance correspondait à 185±24% de la PMA et à 49±3.8% de la P_{max}.

2. Paramètres métaboliques

a) *Effets de l'exercice sur les paramètres sanguins*

Les résultats mesurés avant et après le T_{lim} sont présentés dans le Tableau 24. Un effet temps a été identifié pour chacun des paramètres observés (P<0.01, Tableau 24). Les valeurs maximales de [La⁻], de la SaO₂ et de la pression artérielle O₂, ainsi que les valeurs minimales du pH et de la [HCO₃⁻] ont été mesurées 5 min après l'arrêt de l'exercice.

Tableau 24 : Présentation des valeurs des paramètres sanguins mesurés lors du Tlim (moyenne ± SD). * démontre une différence avec la valeur précédente (P<0.05) (n=11).

	Repos	Post-exercice	+5 min	+8 min
SaO ₂ (%)	95.2 ± 1.5	92.5 ± 2.7 *	95.9 ± 1.0 *	95.7 ± 1.2
[La ⁻] (mmol.L ⁻¹)	3.8 ± 1.1	9.4 ± 3.3 *	15.9 ± 1.7 *	14.9 ± 1.9 *
pH	7.39 ± 0.02	7.30 ± 0.06 *	7.21 ± 0.04 *	7.24 ± 0.04 *
[HCO ₃ ⁻] (mmol.L ⁻¹)	23.7 ± 1.1	20.7 ± 2.5 *	12.3 ± 1.8 *	12.4 ± 1.8
paO ₂ (mmHg)	78.9 ± 9.2	76.2 ± 15.5 *	99.0 ± 8.5 *	95.9 ± 14.0
paCO ₂ (mmHg)	38.8 ± 1.6	42.0 ± 3.1 *	30.7 ± 2.9 *	28.9 ± 2.8 *

b) Effets de l'exercice sur les paramètres cardio-respiratoires

❖ Réponses ventilatoires

La VO_{2pic} atteinte lors du T_{lim} était égale à $55.0 \pm 7.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ce qui représentait $95.0 \pm 7.6\%$ de la VO_{2max} . La Figure 26 représente la cinétique de VO_2 exprimée en fonction du temps pour l'ensemble des participants. Pendant le T_{lim} , la VO_{2pic} a, en moyenne, été atteinte après 43.3 ± 5.3 sec d'exercice, ce qui correspondait à 80% du temps total du test. A partir de 80% du temps total du test jusqu'à l'arrêt de celui-ci, la moyenne de VO_2 pour le groupe, a significativement chuté de $5.4 \pm 4.7\%$ par rapport à la VO_{2pic} ($P < 0.05$).

Chez 6 des 11 athlètes, la chute de VO_2 était supérieur à 5%, correspondant à une chute de $9.1 \pm 2.4\%$ par rapport à la valeur pic. Chez les 5 autres sujets, la chute était comprise entre 0 et 3.5%, soit $0.9 \pm 2.0\%$ de la valeur pic.

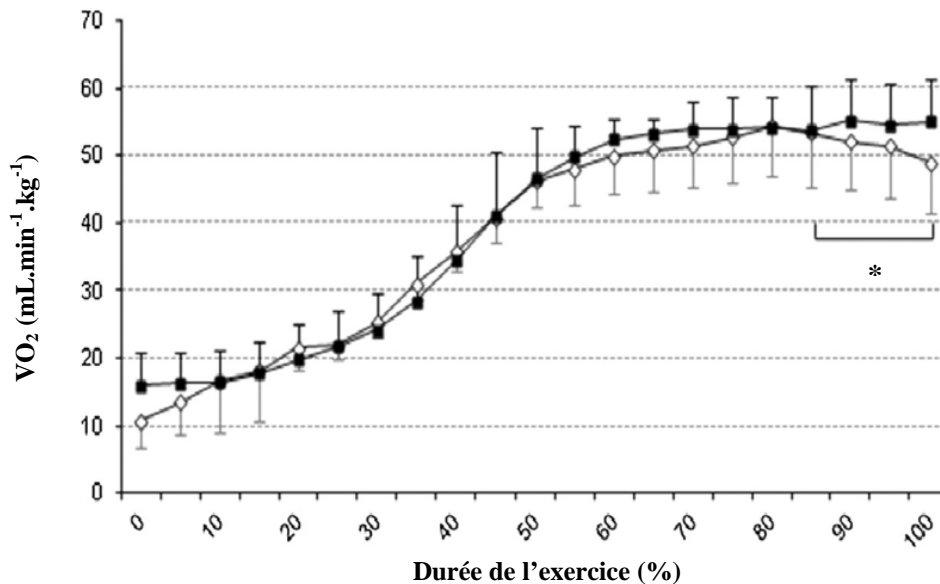


Figure 26 : Cinétique moyenne de la VO_2 lors du T_{lim} chez les « chuteurs » (◇) et « non-chuteurs » (■) (Moyenne \pm SD). * Démontre une chute de VO_2 par rapport à VO_{2pic} ($P < 0.05$) ($n=11$).

Pendant le T_{lim} , en considérant les valeurs pics (2.6 ± 0.5 L) et finales (2.4 ± 0.4 L), une chute globale du VC égale à $5.9 \pm 5.6\%$ a été identifiée ($P < 0.05$), sans chute en parallèle de la FR et de la VE. Cette chute de VC a été observée chez 7 participants (Figure 27), alors qu'une chute de VC et de VE (non représentée) a uniquement été notée, respectivement, chez 1 et 3 participants. La diminution du VC était égale à $7.9 \pm 6.4\%$ chez les sujets présentant une chute de VO_2 et une diminution de $3.5 \pm 3.8\%$ chez les sujets présentant une chute de VO_2 inférieure à 5%. La différence entre ces deux groupes était significative ($P < 0.05$).

Les données fonctionnelles pulmonaires sont présentées dans le Tableau 25. L'ICC pour les pré-tests de CVF était de 0.95 (intervalle de confiance : 0.88-0.98). Le pic moyen de $PETO_2$ était de 122.2 ± 4.8 mmHg. La différence entre les sujets présentant une chute de VO_2 inférieure ou supérieure à 5% était significative ($P < 0.05$) pour les valeurs de repos de VEF_1 . La comparaison entre les données pré et post- T_{lim} a révélé une chute significative de CVF et de VIF.

Tableau 25 : Présentation des valeurs spirométriques mesurées au repos et 3 min après l'exercice (moyenne \pm SD). * démontre une différence avec la valeur de repos ($P < 0.05$) ($n=11$).

	Repos	Post-exercice	Post-exercice (% de la valeur de repos)
CVF	5.2 ± 0.8	5.0 ± 0.8 *	96.4 ± 6.0
VEF1	4.4 ± 0.6	4.2 ± 0.7	95.5 ± 7.0
VIF	5.6 ± 0.7	5.4 ± 0.9 *	96.6 ± 4.7
VIF1	5.3 ± 0.6	4.7 ± 1.3	90.7 ± 21.0

❖ Réponses cardiaques

Les valeurs de FC ont atteint un état stable de 185 ± 11 battements par minute (bpm) ($98.4 \pm 5.0\%$ de la FC max enregistré lors du test de VO_{2max}). Les plus grandes valeurs moyennes de Q_c (25.0 ± 5.6 L.min⁻¹) et de Q_s (140.3 ± 33.0 mL) mesurées lors du T_{lim} n'était pas significativement différentes des valeurs mesurées lors du test de VO_{2max} . Chez 6 sujets sur 11, une chute du Q_s de plus de 5% a été observé (Figure 27).

Si nous comparons entre eux les participants ayant eu à la fois une chute du Q_s ainsi qu'une chute de VO_2 , puis ceux n'ayant pas eu de chute de VO_2 on s'aperçoit que les « chuteurs » présentent une chute de Q_s égale à $17.7 \pm 12.3\%$ alors que les « non-chuteurs » présentent seulement une chute de $3.8 \pm 8.4\%$. La différence entre ces deux groupes est significative ($P < 0.05$).

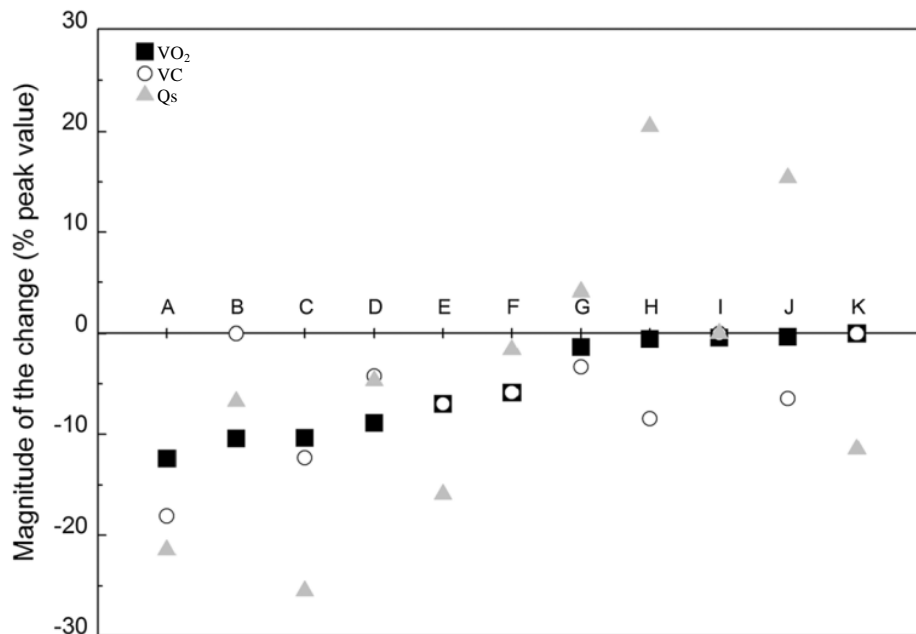


Figure 27 : Amplitude des changements pour les paramètres de VO_2 , VC et Q_s lors du T_{lim} . A,B,C...K représentent les 11 sujets classés de la plus forte à la plus faible chute de VO_2 (droite vers gauche). Les valeurs des différents paramètres sont exprimées en fonction de la valeur pic mesurée lors du T_{lim} .

3. Relations entre la chute de VO_2 , les réponses métaboliques, respiratoires et cardiaques.

L'amplitude de la chute de VO_2 était corrélée avec les valeurs pic de $PETO_2$ ($r = 0.80$, $P < 0.05$), et la corrélation avec la chute de VC s'approchait de la significativité ($r = 0.57$, $P = 0.06$). De plus, l'amplitude de la chute de VO_2 était aussi corrélée avec VEF_1 ($r = 0.72$, $P < 0.05$ mesuré au repos). Les corrélations entre la VO_2 d'une part et VC, Q_s , $PETO_2$ et VEF_1 de l'autre étaient de 0.52 ($P > 0.05$), 0.70, 0.78 et 0.71 ($P < 0.05$), respectivement. Comme présenté sur la [Figure 31](#), 5 des 6 sujets montrant une chute de VO_2 présentaient aussi une chute de Q_s (exprimée en pourcentage de la valeur pic) (8.6 ± 9.9 mL.batttement⁻¹), mais toutefois la relation inverse n'a pas été vérifiée chez un sujet présentant une chute de Q_s sans aucune diminution concomitante de la VO_2 en fin d'exercice. Néanmoins, la relation globale entre le Q_s et la chute de VO_2 était significative ($r = 0.75$, $P < 0.01$). Des corrélations significative ont aussi été identifiées entre la chute de Q_s et à la fois les valeurs pic de $PETO_2$ ($r = -0.65$, $P < 0.05$) et les valeurs de repos de VEF_1 ($r = 0.73$, $P < 0.01$), comme montré dans la [Figure 28](#). Aucune relations significatives ($P > 0.05$) n'ont été trouvées entre la chute de VO_2 et les données sanguines ($[La^-]$ ($r = -0.45$), pH ($r = 0.10$), SaO_2 ($r = 0.14$) et $[HCO_3^-]$ ($r = 0.24$).

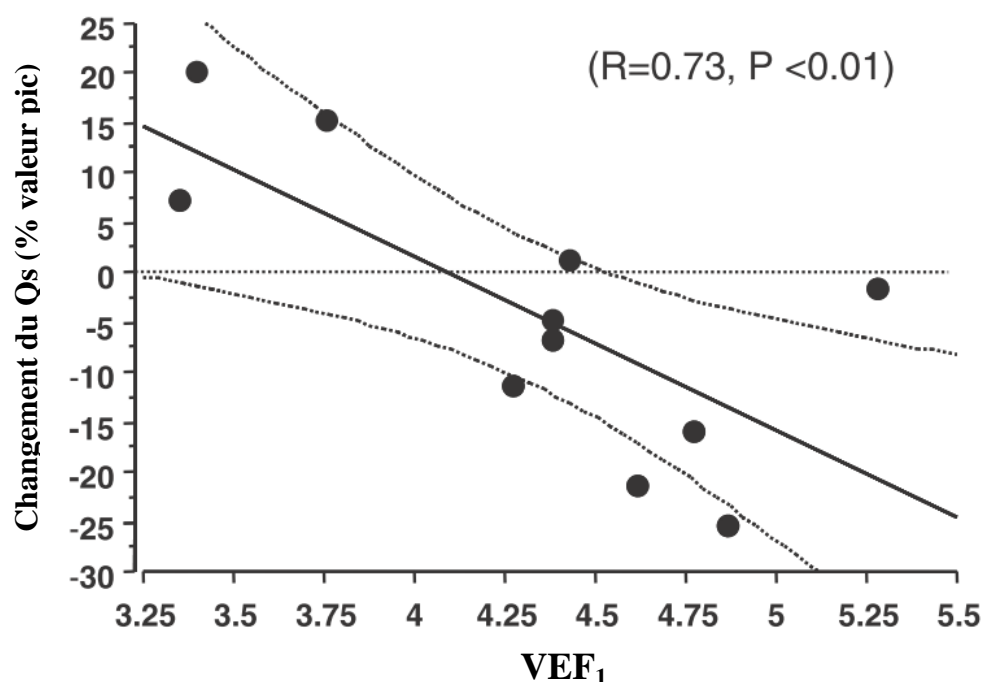


Figure 28 : Relation entre l'amplitude de la chute du débit cardiaque (Q_s) et le volume expiratoire forcé en 1 sec (VEF_1). VEF_1 est exprimé en L, Q_s en % de changement par rapport à la valeur pic. Les lignes en pointillées indiquent l'intervalle de confiance de 95% ($n=11$).

C. Discussion des résultats de l'expérimentation A.

Une diminution moyenne significative de la VO_2 a été observée dans les 20 derniers pourcent du total de la durée de l'exercice. L'amplitude de cette diminution était supérieure à 5% par rapport à la valeur pic de VO_2 chez 6 des 11 sujets, avec 5 de ces 6 sujets présentant aussi une diminution du Q_c . Les corrélations indiquaient que l'amplitude de la chute de VO_2 était liée avec celle du Q_s , et que ces deux paramètres étaient négativement liés avec les paramètres ventilatoires tels que le pic de pPO_2 enregistré à la fin de l'exercice, VC et le volume d'expiration forcé mesuré au repos en une seconde. Les fortes interrelations entre les réponses cardiaques et respiratoires suggèrent que ces deux paramètres contribuent à la chute de VO_2 lors d'un exercice de cyclisme supra-maximal. Enfin, une diminution significative a été observée post-exercice, pour les volumes courants inspiratoires et expiratoires suggérant qu'il y avait aussi une fatigue des muscles respiratoires.

1. Pic de VO_2 .

Cette expérimentation montre que lors d'un test de cyclisme réalisé à 185% de la PMA, les cyclistes très entraînés sont capable d'atteindre 95% de leur VO_{2max} en moins de 50 sec. Ceci est similaire à la valeur de 94% obtenue pendant une course de 400 m (Hanon *et al.*, 2010). Comme mis en évidence par (Gastin, 2001), 90% de la VO_{2max} peut être atteinte par les athlètes après 30 à 60 sec d'exercice intense. Toutefois, ces dernières études ont toutes utilisé des tests de cyclisme de courte durée et initiés par un départ à puissance maximale (test de Wingate ou test en all-out). Dans notre première partie d'étude, la puissance développée était constante, mais suffisamment élevée (185% PMA) pour induire une fatigue complète après moins de 60 sec. Toutefois, notre protocole permettait de solliciter un fort pourcentage de la VO_{2max} lors d'un exercice intense à puissance constante chez des cyclistes très entraînés en sprint.

2. Chute de VO_2 .

Une chute modérée de la VO_2 était observée lors des 20 derniers pourcents de la durée totale du test de cyclisme supra-maximal. L'amplitude de cette chute de VO_2 (0 à 12%) différaient de résultats récents obtenus lors d'un 400 m de course d'une durée similaire (50 sec), dans lequel une chute systématique et plus importante de la VO_2 (15%) était observée dans les 100 derniers mètres (Hanon *et al.*, 2010). A noter, et contrairement à

l'expérimentation présentée ici, ce dernier 100 m de course était réalisé avec une forte baisse de la vitesse. Néanmoins, une chute de VO_2 peut apparaître lors d'exercices réalisés à un rythme constant pour un sous-ensemble de sujets, suggérant qu'au moins une partie de cette chute est indépendante d'une chute de vitesse ou de puissance (Nummela & Rusko, 1995; Perrey *et al.*, 2002). Il est important de noter que la chute de VO_2 survient alors que la VO_{2max} n'a pas encore été atteinte.

Chaque étape dans le transport de l' O_2 , depuis l'air inspiré jusqu'au transport au niveau des cellules musculaires, pourrait influencer sur la disponibilité en O_2 , spécialement lors d'exercices maximaux sollicitant de grandes masses musculaires. Bien que l'hyperventilation produise une augmentation de la tension alvéolaire en O_2 pour surpasser la limitation de diffusion due aux poumons (Dempsey, 2006), ceci pourrait aussi avoir des conséquences négatives telles qu'un coût énergétique important, une fatigue des muscles respiratoires, ou l'atteinte de la réserve respiratoire. Chacun de ces facteurs pourraient avoir influé la VO_2 lors des derniers instants de notre protocole de test.

3. Données métaboliques et chute de VO_2 .

L'absence de relations entre l'amplitude de la chute de VO_2 et les modifications sanguines mesurées post-test n'est pas en adéquation avec des résultats obtenus précédemment. Dans ces travaux, une chute respective de 23 et de 12% de la vitesse était observée dans le dernier 100 m d'une course de 400 m (Hanon *et al.*, 2010) et de 800 m (Hanon & Thomas, 2011). La $[La^-]$, $[HCO_3^-]$ et les valeurs de pH étaient respectivement de 22.0 $mmol.L^{-1}$, $<5 mmol.L^{-1}$ et 7.00 après le 400 m, alors que ces valeurs étaient de 15.9 $mmol.L^{-1}$, $>12 mmol.L^{-1}$ et 7.21 dans notre étude présentée ici, indiquant une moindre altération du statut acido-basique. Ainsi, dans ce contexte, nous pouvons émettre l'hypothèse que les tampons sanguins n'étaient pas complètement déplétés ce qui a permis à l'organisme de se prémunir d'une acidose extrême, contrairement aux tests all-out de course (Hanon *et al.*, 2010), d'aviron (Nielsen, 1999) ou de cyclisme (Bishop *et al.*, 2007). Dans notre étude, les valeurs de saturation artérielle en O_2 enregistrées post-exercice ($92.5 \pm 2.7\%$) sont à la limite de la définition de l'hypoxie artérielle induite par l'exercice (inférieure ou égale à 92%). L'amplitude de la chute de VO_2 (5.4%) semble aller dans le même sens que l'hypothèse selon laquelle la VO_2 diminue de 2% pour chaque diminution de 1% de la SaO_2 à partir de 95% (Harms *et al.*, 2000). Néanmoins, aucune corrélation significative n'a été identifiée entre l'amplitude la chute de VO_2 et la pression artérielle en O_2 , la SaO_2 et les valeurs de pH. La

courte durée de ce test supra-maximal, le type d'exercice (puissance constante vs all-out) ainsi que la nature du test (cyclisme vs course) pourraient expliquer les plus faibles valeurs d'hypoxies artérielles induites par l'exercice comparées à celles habituellement observées chez des coureurs entraînés (Millet, 2009). Ces résultats métaboliques généraux suggèrent que si la réserve en bicarbonate est suffisante pour éliminer les excès d'ions H^+ , la saturation en O_2 pourrait ne pas être affectée de manière maximale par une éventuelle chute de la pression artérielle en O_2 (Nielsen, 2003) et pourrait ne pas représenter une cause majeure de la chute de VO_2 .

4. Coût respiratoire et fatigue des muscles respiratoires.

Lors d'un exercice de 10 min à 95% de la VO_{2max} , (Perrey *et al.*, 2002) observaient une chute significative de la VE (du fait d'une chute du VC) chez des sujets présentant une chute de VO_2 à la fin de l'exercice. Lors de notre test supra-maximal, la VE et la FR ont augmenté jusqu'à la fin de l'exercice, excepté pour deux sujets qui montraient une chute parallèle de la VE et de la VO_2 . Toutefois, la chute significative du VC (5%), observée chez 8 des participants à la fin du test, tendait à être corrélée avec la chute de VO_2 ($r = 0.57$, $P=0.06$, $n=11$). De plus les tests de capacité fonctionnelle démontraient une chute de la capacité inspiratoire forcée après le T_{lim} . Ce résultat est en adéquation avec ceux enregistrés chez des rameurs entraînés (Volianitis *et al.*, 2001), des cyclistes (Romer *et al.*, 2006) et des nageurs (Lomax & McConnell, 2003) qui présentaient une diminution de la force des muscles respiratoires immédiatement après un exercice. L'amplitude de la chute dans notre étude (10%) était inférieure à celle post- 300 et 400 m en natation (15%), mais cette mesure était réalisée 20 sec après la fin du test. A partir de l'observations selon laquelle l'activation volontaire récupère entièrement après 3 min de récupération (Bigland-Ritchie *et al.*, 1986), nous avons choisi de collecter les données de spirométrie trois minutes après l'arrêt du test afin d'exclure l'hypothèse d'un échec de l'activation centrale. Nos données démontrant une chute du VIF vont dans le même sens que les observations faites d'une fatigue du diaphragme par (Johnson *et al.*, 1993), qui estimaient que la réserve ventilatoire proche de sa valeur maximale ne pouvait être maintenue plus de 15 à 30 sec. Ainsi, nos données confirment le fait que la réponse des muscles respiratoires est probablement affectée pendant un test supra-maximal à puissance constante.

5. Réponses cardio-respiratoires et chute de VO₂.

Tous les sujets qui présentaient une chute de la VO₂ présentaient aussi une chute du Qs pendant l'exercice, et une corrélation était observée entre les données finales de Qs et la chute de VO₂. Le résultat, montrant une chute du Qc avant que la FC maximale ne soit atteinte, confirme les données présentées par (González-Alonso & Calbet, 2003) et indique que le rendement cardiaque maximal était atteint en-dessous de la FC max. La chute du Qs a clairement causé la diminution du Qc, bien que les mécanismes sous-jacents restent obscurs. La corrélation positive entre la chute de VO₂ et le VEF₁ pourrait indiquer que la pression expiratoire intra-thoracique pourrait avoir eu un effet négatif sur les réponses de VO₂. Du fait que le cœur et les poumons partagent une aire commune, l'inflation progressive des poumons pourrait augmenter la compétition pour occuper l'espace intra-thoracique et inhiber le remplissage cardiaque par une modification de la compliance du cœur (Peters *et al.*, 1989). La charge expiratoire conduit à une réduction du Qc liée à une augmentation de la pression expiratoire abdominale et intra-thoracique (Stark-Leyva *et al.*, 2004). (Hortop *et al.*, 1988) ont démontré auparavant, chez des patients atteints de mucoviscidose, une forte relation entre les variations du Qs à l'exercice et le VEF₁. Chez nos sujets entraînés, la chute de Qs était significativement corrélée avec la PETO₂ et le VEF₁, ce qui pourrait corroborer la relation rapportée entre le Qs et les changements de pression intra-thoracique à la suite d'une inflation volontaire des poumons (Stark-Leyva *et al.*, 2004), ainsi que les résultats d'un récent exposé soulignant les mécanismes respiratoires qui altèrent le transport de l'O₂ (Amann *et al.*, 2011). Chez ces sujets présentant de fortes capacités expiratoires, nous pourrions suggérer qu'en position allongée de pédalage, la pression expiratoire intra-thoracique est plus importante, augmentant ainsi la surcharge ventriculaire et réduisant le taux de remplissage ventriculaire lors de la diastole (Stark-Leyva *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2007). Ceci pourrait être délétère pour le maintien du Qs (Amann, 2012), et donc de la VO₂.

6. Conclusions.

En conclusion, nous avons démontré que la chute de VO₂ apparaît à la fin d'un exercice supra-maximal à puissance constante de pédalage chez 6/11 des participants. Le résultat principal est que ce phénomène était lié aux caractéristiques respiratoires ainsi qu'aux réponses cardiaques. La relation entre le Qs et la chute de VO₂ confirme, pour les exercices supra-maximaux, les précédentes observations pour des exercices plus longs et moins intenses de cyclisme (González-Alonso & Calbet, 2003; Mortensen *et al.*, 2008). De plus, l'influence

du système respiratoire sur la VO_2 mesurée durant l'exercice chez les participants présentant à la fois un important VEF de repos et un grand pic de $PETO_2$, est un résultat nouveau qui confirme que le système pulmonaire est un déterminant physiologique clé précédant l'arrêt d'un exercice supra-maximal. Les données présentées ici suggèrent que la réponse ventilatoires, dans le cas d'exercice courts et intenses, pourrait être à l'origine de la diminution du Q_s et de la VO_2 en position de pédalage assis. La relation entre les paramètres respiratoires, cardiaques et la chute de VO_2 lors d'une acidose métabolique aigue doit encore être testée, car différents mécanismes peuvent être impliqués dans cette chute de VO_2 en fonction du niveau d'acidose.

D. Méthodologie spécifique: expérimentation B.

1. Caractéristiques des participants.

8 hommes sains (âge: 21.7 ± 0.9 ans, taille: 179 ± 2 cm, poids: 73.4 ± 2.7 kg, VO_{2max} : 59.5 ± 5.5 mL.min⁻¹.kg⁻¹)

2. Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.

<u>Tests</u>	<u>Mesures</u>
- Force-Vitesse - VO_{2max} - 70-sec all-out (<i>PLA/BIC</i>)	- Sanguine (i-Stat) - Paramètres ventilatoires (VO_2 , VCO_2 , P_{ETO_2} , P_{ETCO_2} VE, VC, FR) - Paramètres cardiaques (FC)

3. Analyses statistiques.

L'ensemble des données sont présentées en moyenne \pm SE. Le niveau de significativité a été fixé à $P < 0.05$. Les différences entre PLA et BIC ont été identifiées à l'aide d'un test apparié ou d'un test de Wilcoxon selon la normalité. Une analyse de la variance à deux voies (effet temps – effet condition) (ANOVA), avec mesures répétées, a été utilisée pour comparer les données ventilatoires, sanguines et de performance. Lorsque nécessaire, des comparaisons post-hoc ont été utilisées (Student-Newman-Keuls test). Les relations possibles entre les variables ont été analysées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson. Toutes les analyses ont été conduites à l'aide du logiciel Sigmastat.

E. Résultats.

1. Exercice incrémental.

La VO_{2max} mesurée lors du test incrémental était égale à 59.5 ± 5.5 mL.min⁻¹.kg⁻¹ et la puissance maximale aérobie correspondait à 370.0 ± 9.3 W. Les valeurs maximales de VE, FR et VC étaient respectivement de 167.0 ± 7.0 L.min⁻¹, 56.1 ± 1.6 cycles.min⁻¹, et 3.0 ± 0.1 L. Les valeurs moyennées de la FC_{max} étaient de 190 ± 4 bpm.

2. Réponses métaboliques sanguines.

A la fois un effet condition ($P < 0.001$) et un effet temps ($P < 0.001$) ont été identifiés pour le pH, sans toutefois qu'une interaction ne soit trouvée. En condition PLA, les valeurs de pH étaient significativement plus faibles qu'en condition BIC (Figure 29). De plus, toutes les valeurs de pH étaient significativement plus basses que les valeurs enregistrées au repos, après la fin de la supplémentation, ainsi que celles mesurées post-échauffement, pour les deux conditions ($P < 0.001$).

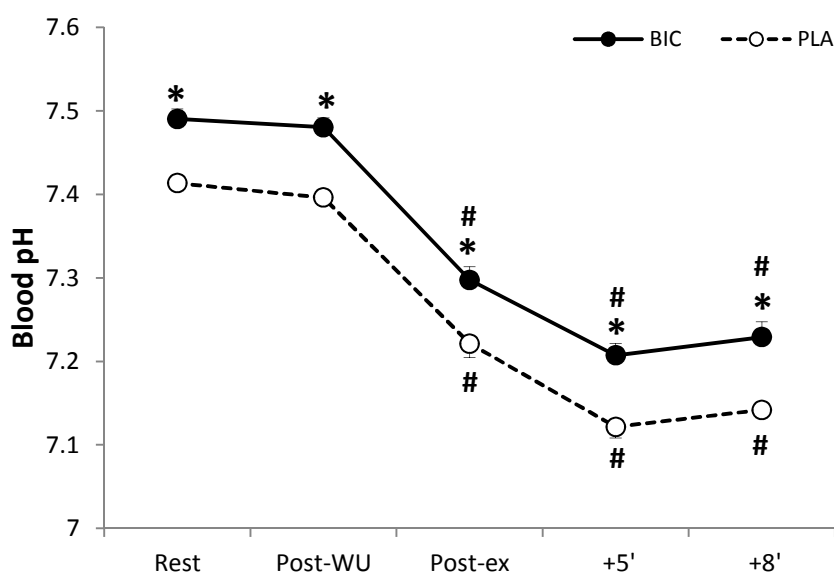


Figure 29 : Evolution du pH lors du test supramaximal de 70 sec (moyennes \pm SE), PLA (\circ) et BIC (\bullet). * démontre une différence entre condition ($P < 0.05$); # démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.001$) ($n=8$).

Une interaction significative (condition x temps) a été trouvée pour la $[HCO_3^-]$ ($P < 0.001$). Les valeurs post-ingestion et post-échauffement étaient significativement plus élevées en condition BIC lorsque comparées avec la condition PLA (Figure 30; post-ingestion : PLA: 27.1 ± 1.9 vs BIC : 33 ± 2.7 mmol.L⁻¹; $P < 0.001$; post-échauffement : PLA: 23.8 ± 2.1 vs BIC : 30.2 ± 3.7 mmol.L⁻¹; $P < 0.001$), démontrant ainsi l'efficacité de la supplémentation en $NaHCO_3$. De la même façon, lors du dernier prélèvement effectué après

l'exercice la $[HCO_3^-]$ était toujours significativement supérieure en BIC comparé à la condition PLA (Figure 30 ; PLA : 9.6 ± 1.7 vs BIC : 11.9 ± 2.2 mmol.L⁻¹ ; $P < 0.05$). Toutes les valeurs de $[HCO_3^-]$ étaient significativement plus faibles lorsque comparées avec les valeurs obtenus 1 h après la fin de la supplémentation (repos) et post-échauffement, pour les deux conditions ($P < 0.001$).

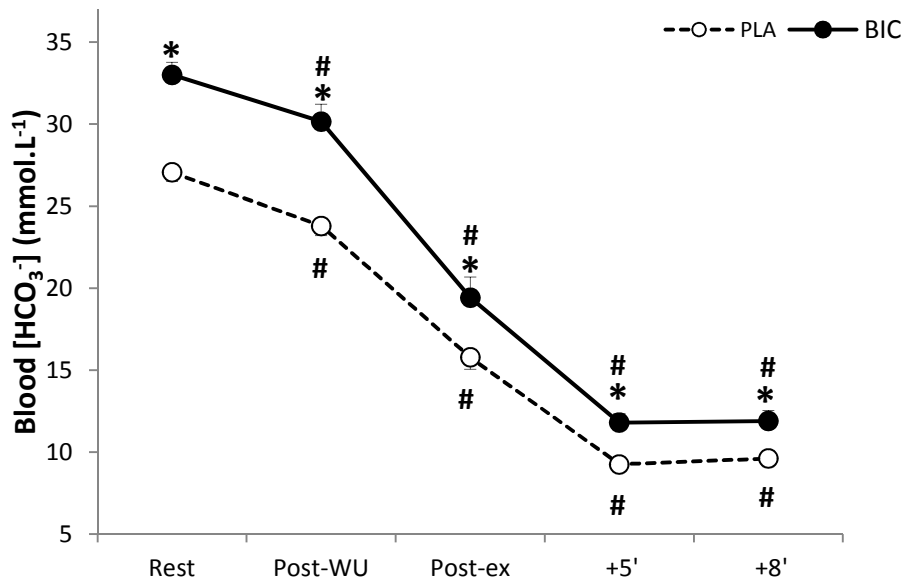


Figure 30 : Evolution de la $[HCO_3^-]$ lors du test supramaximal de 70 sec (moyennes \pm SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre condition ($P < 0.05$) ; # démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.001$) ($n=8$).

Concernant la $[La^-]$ seul un effet temps a été mis en évidence par l'analyse statistique (Figure 31 ; $P < 0.01$).

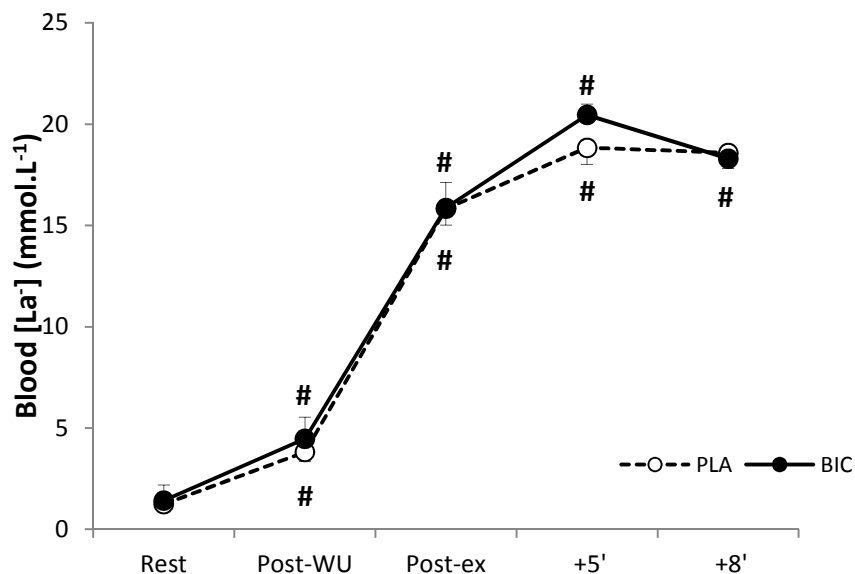


Figure 31 : Evolution de la $[La^-]$ lors du test supramaximal de 70 sec (moyennes \pm SE), PLA (○) et BIC (●). # démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.01$) ($n=8$).

3. Sprint de 70 sec all-out

La puissance moyenne réalisée par les participants au cours du test supramaximal BIC de 70 sec était significativement supérieure à celle mesurée en PLA (PLA : 584.3 ± 16.8 vs BIC : 605.6 ± 16.4 W ; $P < 0.01$, Tableau 26). Alors qu'aucune différence significative de puissance développée n'apparaît pour les 20 premières secondes ni pour les 5 dernières ($P > 0.05$, Figure 32), la différence de puissance se situe au niveau des 45 sec intermédiaires (PLA : 494.8 ± 18.0 vs BIC : 522.6 ± 20.8 W ; $P < 0.01$, Tableau 26). De plus, les IF pour chacune des conditions ne sont pas significativement différents (PLA : 56.5 ± 2.7 % vs BIC : 55.0 ± 4.1 %).

De plus, la chute de VO_2 observée lors du test n'était pas liée à la baisse de puissance lors des 50 dernières secondes, pour les deux conditions ($P > 0.05$). De la même façon, la différence de puissance entre PLA et BIC n'était pas liée à la différence de chute de VO_2 mesurée selon les conditions.

L'intensité du test supramaximal de chaque sujet a été individualisée grâce à la P_{max} et la V_{opt} mesurées par les tests de Force-Vitesse, qui étaient respectivement de 1296.75 ± 161.99 W et de 120.5 ± 6.97 Rpm, et la PMA de 350 ± 30.74 W.

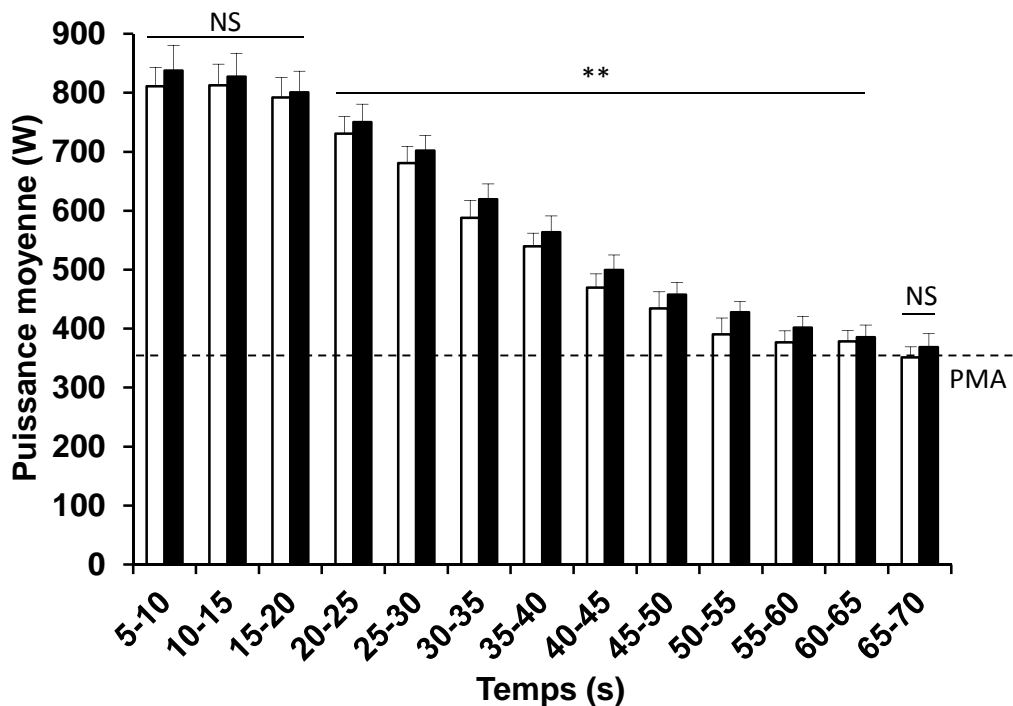


Figure 32 : Cinétique de la puissance développée lors du test de 70 sec en PLA (□) et en BIC (■). PMA : Puissance Maximal Aérobie, ** démontre une différence entre conditions ($P < 0.01$), NS : Non significatif ($P > 0.05$) ($n=8$).

4. Réponses ventilatoires.

Comme présenté sur la [Figure 33](#), la consommation d'O₂ a augmenté jusqu'à atteindre un état stable correspondant à 95.2±3.6% (PLA) et 100.8±3.2% (BIC) de la VO_{2max}, avec aucune différence significative entre les conditions (P>0.05). A la fin du test de 70 sec, la VO₂ a significativement diminuée de 13.0±2.9% en PLA (P<0.01) et de 6.6±2.1% en BIC (P<0.05) ([Tableau 26](#)). Bien qu'une tendance ait été identifiée quant à l'effet de l'alcalose sur l'amplitude de la chute de VO₂ entre les conditions, cet effet n'apparaît pas comme étant significatif (P>0.05). Il est toutefois important de noter que pour 6 des 8 participants, l'alcalose induite pré-exercice a significativement réduit l'amplitude de la chute de VO₂ (PLA : 14.7±3.6% vs BIC : 3.6±0.9, P<0.05)

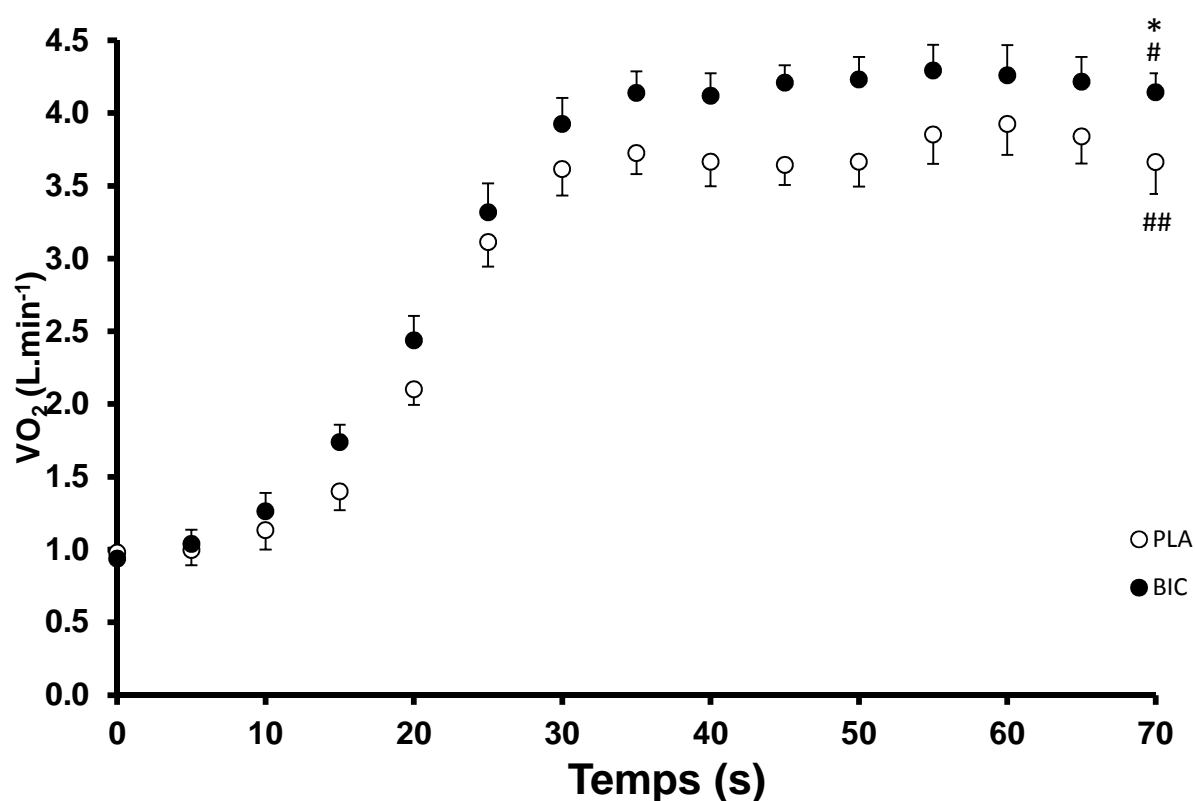


Figure 33 : Cinétiques des consommations d'oxygène mesurées lors du test supra-maximal de 70 sec (Moyenne ± SE), réalisé après supplémentation en placebo (PLA : ○) ou en bicarbonate de sodium (BIC : ●). * démontre une différence entre conditions (P<0.05), # et ## démontre une différence avec la valeur précédente (P<0.05 et P<0.01, respectivement) (n=8).

De plus, la VO₂ de fin d'exercice était significativement plus faible en PLA comparé à BIC chez tous les participants (P<0.05, [Figure 33](#)). Cette VO₂ finale était aussi significativement plus faible que la VO_{2max} en PLA (P<0.05) mais pas en BIC (P>0.05). Enfin, la consommation cumulée d'oxygène lors du test était significativement plus importante en BIC qu'en PLA (P<0.05).

Comme présenté dans le [Tableau 26](#), la VCO_2 a significativement diminuée dans les deux conditions ($P < 0.05$), mais la VCO_2 pic ainsi que la VCO_2 finale étaient significativement supérieures en BIC comparé à PLA. De plus, une chute significative de VE a aussi été observée à la fin du test de 70 sec dans les deux conditions (PLA : $9.9 \pm 2.4\%$, $P < 0.01$; BIC : $4.3 \pm 2.0\%$, $P < 0.05$), pour l'ensemble des participants. La chute de VO_2 était significativement moins prononcée en BIC qu'en PLA ($P < 0.05$). La chute de VE était significativement liée à la chute de VO_2 chez les 8 participants ($r = 0.61$, $P < 0.01$), ainsi que chez les 6 participants qui présentaient une différence d'amplitude de chute de VO_2 entre les conditions ($r = 0.72$, $P < 0.01$). Les changements observés dans la chute de VO_2 entre les conditions étaient fortement corrélés avec les changements de chute de VE ($r = 0.96$, $P < 0.001$, $n = 8$). Enfin, lors des 20 dernières secondes du test, la $PETCO_2$ était significativement réduite en BIC ($P < 0.01$) alors que la $P_{ET}CO_2$ était significativement supérieure en BIC comparé à la condition PLA ($P < 0.001$).

Tableau 26 : Synthèse des paramètres physiologiques mesurés lors du test de 70 sec, en condition placebo (PLA) et bicarbonate de sodium (BIC). * démontre une différence entre conditions ($P < 0.05$), § démontre une différence avec la valeur pic ($P < 0.05$) ($n=8$).

	PLA	BIC
Puissance des 20 premières secondes (W)	817.4 ± 32.0	847.8 ± 41.7
Puissance des 45 secondes intermédiaires (W)	494.8 ± 18.0	522.6 ± 20.8*
Puissance totale (W)	584.3 ± 16.8	605.6 ± 16.4*
Puissance des 5 dernières secondes (W)	351.5 ± 17.9	372.9 ± 24.1
IF (%)	56.5 ± 2.7 %	55.0 ± 4.1%
CCO (L.min ⁻¹)	420.6 ± 20.9	494.8 ± 25.8*
VO_2 pic (L.min ⁻¹)	4.21 ± 0.21	4.46 ± 0.18
VO_2 finale (L.min ⁻¹)	3.66 ± 0.22 [§]	4.14 ± 0.13 ^{§*}
Différence _{entre valeurs pic et finale de VO_2} (%)	13.0 ± 2.9	6.6 ± 2.1
VCO_2 pic (L.min ⁻¹)	5.6 ± 0.1	6.5 ± 0.2*
VCO_2 finale (L.min ⁻¹)	5.4 ± 0.1 [§]	6.1 ± 0.3 ^{§*}
Différence _{entre valeurs pic et finale de VCO_2} (%)	5.1 ± 1.5	5.1 ± 1.6
VE pic (L.min ⁻¹)	180.9 ± 8.0	186.9 ± 7.9
VE finale (L.min ⁻¹)	163.3 ± 9.4 [§]	179.1 ± 8.9 [§]
Différence _{entre valeurs pic et finale de VE} (%)	9.9 ± 2.4	4.3 ± 2.0*
$PETCO_2$	119.7 ± 1.3	118.1 ± 1.1*
$PETCO_2$	38.6 ± 1.3	41.3 ± 1.1*
SaO ₂ , t = 0s (%)	97.0 ± 0.4	96.1 ± 0.3
SaO ₂ , t = 70s (%)	97.4 ± 0.3	97.4 ± 0.3

F. Discussion des résultats de l'expérimentation B.

Dans cette seconde expérimentation, tous les participants présentaient une diminution de la VO_2 à la fin de l'exercice supra-maximal de 70 sec, dans la condition PLA. Le nouveau résultat mis en évidence est qu'augmenter le pH sanguin avant et pendant le test via une supplémentation en $NaHCO_3$ a significativement réduit la chute de VO_2 chez 6 des 8 athlètes entraînés. La chute de VO_2 observée dans les deux conditions était liée à l'amplitude de la chute de VE, et la différence de chute de VO_2 entre PLA et BIC était positivement corrélée avec la différence de chute de VE. La chute de VO_2 n'était pas associée avec les changements de puissance dans les deux conditions.

1. Chute de VO_2 et acidose

Nous avons pu noter une chute de 13% de la VO_2 à la fin du test supra-maximal de 70 sec chez les 8 participants dans la condition PLA, ce qui confirme de précédents résultats à la fin d'exercices épuisants de course (Perrey *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2005a; Hanon *et al.*, 2010) et de cyclisme (Astrand & Saltin, 1961; Mortensen *et al.*, 2008). Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'alcalose induite pourrait réduire l'amplitude de ce phénomène, nous avons utilisé une supplémentation égale à 0.3 g.kg^{-1} de $NaHCO_3$ dans notre protocole expérimental. Comme nous nous y attendions, cette supplémentation a significativement altéré le pH sanguin, la $[HCO_3^-]$ avant le départ du test supramaximal (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2004a), comparée à la condition PLA. L'effet de l'alcalose induite pré-exercice sur 6 des participants était en adéquation avec notre hypothèse, puisque la chute de VO_2 était significativement modifiée, passant de $14.7 \pm 3.6\%$ en PLA à 3.6 ± 0.9 en BIC ($P < 0.05$). De plus, la CCO et la VO_2 finale étaient significativement plus grandes en BIC chez tous les sujets comparativement à la condition PLA ($P < 0.05$). Ce dernier résultat va dans le même sens que la relation observée entre la VO_2 finale à la fin d'une course de 400 m et le statut acido-basique mesuré aux 300 m de la course (Hanon *et al.*, 2010). Ceci suggère que les valeurs supérieures de pH sanguin dues soit à une alcalose induite, soit à une meilleure utilisation des ressources énergétiques aérobie (Hanon *et al.*, 2010) pourrait influencer la cinétique de VO_2 à la fin d'un test supra-maximal réalisé jusqu'à l'épuisement.

2. Chute de la VO₂ et chute de la VE

Nos résultats indiquaient clairement que la chute de VO₂ était liée à la chute de VE à la fin de l'exercice supra-maximal de 70 sec ($r = 0.96$, $P < 0.001$, $n=8$), et que la supplémentation pré-exercice en NaHCO₃ était associée avec une plus grande VE finale et une plus faible chute de la VE à la fin du test. Il est important de noter, que l'alcalose induite n'avait pas eu d'effet significatif sur le pic de VE pendant le test de 70 sec (PLA: 180.9 ± 8.0 versus BIC: 186.9 ± 7.9 L.min⁻¹, $P > 0.05$). Ceci est en accord avec les résultats de (Nielsen *et al.*, 2002), suggérant que le pic de la réponse ventilatoire à un exercice de pédalage maximal n'était pas atténué par un excès de [H⁺]. L'ensemble de ces résultats pourraient être expliqué par une réduction de l'espace mort s'accompagnant d'un changement de la pression partielle artérielle en O₂, lors d'une alcalose induite ((Nielsen *et al.*, 2002). En effet, la PETO₂, qui est un reflet direct de la tension en oxygène alvéolaire, était significativement plus faible dans la condition BIC dans l'expérimentation présentée ici, et pourrait donc expliquer la plus faible amplitude de la chute de VO₂ à la suite de la supplémentation en NaHCO₃. De plus, la différence significative de la PETO₂ à la fin du test supra-maximal entre les conditions, est en faveur d'une facilitation du tamponnage des protons par l'alcalose métabolique et d'une stimulation des chémorécepteurs pour contrer la chute de VE. Ceci peut probablement expliquer aussi les valeurs de VCO₂ significativement supérieures à la fin du test de 70 sec en condition BIC (Peronnet & Aguilaniu, 2006) et confirmer ainsi le modèle mathématique de (Duffin, 2005) qui proposait un changement du seuil d'activation de l'arc chémoréflexe pour la PCO₂ en condition d'alcalose.

3. Chute de la VO₂ et acidose intracellulaire.

La chute de VO₂ que nous avons observée pourrait aussi être liée à l'inhibition de la phosphorylation oxydative induite par l'acidose dans les muscles en activité (Jubrias *et al.*, 2003). En effet, il a été rapporté que l'acidose musculaire pourrait diminuer l'efficacité du signal activant la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (Forbes *et al.*, 2005), et qu'un pH musculaire de 6.6 produisait un moindre flux oxydatif comparé à un pH de 7.0, à des concentrations sous-maximales d'ADP (Walsh *et al.*, 2002). Bien que nous ne l'ayions pas testé ici, ces altérations cellulaires induites par l'acidose pourraient aussi contribuer à expliquer la plus forte chute de VO₂ à la fin de l'exercice en condition PLA lorsque les valeurs de pH sanguin étaient autour de 7.10, comparé à la condition BIC où les valeurs de pH post-test était d'environ 7.25. Une réduction de la chute du pH musculaire a

précédemment été montrée suite à l'ingestion de NaHCO_3 (Stephens *et al.*, 2002), et, comme il a été rapporté que l'acidose affecte OXPHOS (Forbes *et al.*, 2005), ceci pourrait aider à expliquer pourquoi les participants ont une plus grande VO_2 finale dans la condition BIC. De plus, il a été montré que l'alcalose induite pré-exercice pouvait induire des signaux glycolytiques et oxydatifs plus importants au sein du muscle comparé à une condition placebo (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2004a). Ce dernier point pourrait aussi expliquer la CCO significativement supérieure ainsi que la chute de VO_2 moins prononcée lors de l'alcalose induite.

4. Chute de VO_2 et performance.

Nous avons rapporté une importante chute de la puissance moyenne lors des dernières 50 sec du test réalisé en PLA, avec une diminution moins importante en BIC. Toutefois, nous n'avons pas observé de relation entre la chute de VO_2 et les modifications de puissance au cours du test de 70 sec en PLA, ce qui est en accord avec de précédents résultats obtenus à puissance constante (Perrey *et al.*, 2002; González-Alonso & Calbet, 2003; Mortensen *et al.*, 2008; Hanon *et al.*, 2013) et lors d'un exercice all-out (Hanon *et al.*, 2010). De plus, la plus faible chute de VO_2 ne pourrait s'expliquer par une puissance initiale supérieure en condition d'alcalose métabolique. En effet, nous avons spécifiquement choisi de maintenir la puissance à un niveau constant pendant les 20 premières secondes du test afin d'éviter un départ plus rapide lors de la condition BIC qui aurait influencé la consommation d' O_2 et la tolérance à l'exercice (22). Ainsi, les changements de puissance observés en condition BIC étaient similaires tout au long du test de 70 sec, ce qui était en adéquation avec les résultats d'une étude précédente (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2004a). Bien que nous ne l'ayons pas mesuré dans cette expérimentation, il a déjà été rapporté que ces changements de puissance sont associés avec des modifications de pH musculaire, ce qui supporte l'idée que les variations de performance n'ont pas influé la chute de VO_2 dans notre travail, mais pourrait être affecté par le pH intracellulaire.

5. Chute de VO_2 et réponses des athlètes.

Alors qu'à la fois les paramètres ventilatoires et la puissance étaient affectés par une modification de pH sanguin, 2 participants sur 8 n'ont pas été sensibles à l'alcalose induite concernant la chute de VO_2 . Il est concevable que les effets limités de l'alcalose chez ces deux

athlètes puissent résulter de la faible différence entre leurs valeurs de pH mesurés au repos pour les deux conditions (différence de 0.06) comparativement aux autres participants (différence de 0.10). Cette divergence pourrait aussi être due au fait que les tampons physicochimiques fixes sanguins et que les compensations ventilatoires contre l'acidose métabolique varient entre individus (Peronnet & Aguilaniu, 2006). Ainsi, ces “non-répondeurs” pourraient expliquer pourquoi dans certaines études l'alcalose induite pré-exercice altère la performance et la fatigue musculaire (Higgins *et al.*, 2013) ainsi que les réponses métaboliques et pourquoi dans d'autres études ces alterations n'ont pas lieu (Saunders *et al.*, 2013).

6. Conclusion

En conclusion, même si la chute de VO_2 observée en fin d'exercice est certainement la conséquence d'une combinaison de plusieurs facteurs induits par l'exercice de haute intensité, les résultats de cette expérimentation démontrent qu'une chute de la VO_2 apparaît à la fois en condition PLA et BIC. Toutefois, de manière intéressante, l'alcalose induite pré-exercice permet de réduire cette chute chez la plupart des participants. Ceci semble être dû aux changements de chute de VE en conséquence de modifications du pH mais pas de la performance.

Chapitre III. Etude n°3 : « Effets combinés de la réalisation de sprints répétés et de l'alcalose induite sur les protéines de transports membranaires impliquées dans la régulation du pH musculaire, et la respiration mitochondriale chez des sujets sains. »

Cette étude a donné lieu à l'écriture des articles suivants :

- **Delfour-Peyrethon R.**, Bishop DJ., Hanon C., Lambert K., De Oliveira R., McGinley C., Molinari N., Thomas C. *Preexercise-induced alkalosis regulates MCT1, CD147, NHE1 proteins expression and oxidative stress 24 h after an acute bout of sprint exercise, but not MCT4, NBCe1 and CAII.* En cours de soumission à l'American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism.
- **Delfour-Peyrethon R.**, Hanon C., Granata C., De Oliveira R., Lambert K., Claire Thomas C., Bishop DJ. *Effects of both acute sprint exercise and alkalosis on skeletal muscle on maximal muscle oxidative capacities.* En cours d'écriture, soumission prévue début 2015.

Ainsi qu'à la communication orale suivante :

- **Delfour-Peyrethon R.**, Thomas C., Hanon C., Granata C., Bishop D. *Mitochondrial respiration changing after repeated-cycling-sprints performed under classic acidosis and induced-alkalosis.* 2013, Barcelone, 18ème congrès annuel de l'ECSS.

Cette communication a été récompensée par le 4^{ème} prix du *Young Investigator Award*, dans la catégorie « Mini-oral ».

A. Méthodologie spécifique.

1. Caractéristiques des participants.

8 hommes sains (âge: 22.4±3.9 ans, taille: 179.6±5.7 cm, poids: 80.3±13 kg, VO_{2max}: 44.3±5.5 mL.min⁻¹.kg⁻¹)

2. Synthèse de l'ensemble des tests utilisés.

<u>Tests</u>	<u>Mesures</u>
- Force-vitesse - Wingate - 3x30 sec all-out (<u>PLA/BIC</u>)	- Sanguine (Stat Plus+Rapidpoint) - Perception de l'effort (Börg) - Biopsies musculaires <ul style="list-style-type: none">◦ Western Blots◦ Oxydation protéique/lipidique<ul style="list-style-type: none">◦ Citrate synthase◦ Respiration mitochondriale

3. Analyses statistiques

La normalité de l'ensemble des données a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk et les données sont rapportées dans les résultats comme étant moyenne ± SE. La significativité a été fixée à P<0.05. Une analyse de la variance à deux voix (effet temps – effet condition) (ANOVA), avec mesures répétées a été conduite. Lorsqu'une différence significative apparaissait, un test post-hoc de Tukey a été réalisé.

Les relations possibles entre les variables ont été analysées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel SigmaPlot (Systat Software, Inc., San Jose, California, USA).

B. Résultats.

1. Paramètres sanguins en réponse à l'exercice et à l'alcalose induite.

L'ingestion de NaHCO_3 a eu les effets escomptés sur le statut acido-basique sanguin. L'analyse à mesures répétées (ANOVA) a révélé un effet condition (PLA vs BIC ; $P < 0.01$) et un effet temps significatif ($P < 0.001$) pour le pH sanguin, ainsi qu'un effet interaction (condition vs temps ; $P < 0.01$). Comme montré sur la Figure 34, les valeurs de pH obtenues après ingestion, avant le début de l'échauffement, étaient de 7.39 ± 0.01 et 7.44 ± 0.01 pour les conditions PLA et BIC respectivement ($P < 0.05$). De la même façon, les valeurs de pH en PLA sont restées significativement plus basses jusqu'à l'arrêt de l'exercice par rapport aux valeurs en BIC (PLA : 7.14 ± 0.03 vs BIC : 7.27 ± 0.04 ; $P < 0.001$). La $[\text{HCO}_3^-]$ sanguine avant le départ des 3 sprints était de $16.9 \pm 1.41 \text{ mmol.L}^{-1}$ en PLA et de $22.11 \pm 2.14 \text{ mmol.L}^{-1}$ en BIC ($P < 0.001$; Figure 34). Nous pouvons aussi observer un effet significatif sur la $[\text{HCO}_3^-]$ en fonction des conditions ($P < 0.01$) et du temps ($P < 0.001$). A l'inverse, aucun effet condition ou temps n'a été relevé pour la $[\text{La}^-]$ ($[\text{La}^-]_{\text{max}}$: 10.9 ± 0.7 vs $11.7 \pm 1.1 \text{ mmol.L}^{-1}$ en PLA et BIC respectivement, $P > 0.05$).

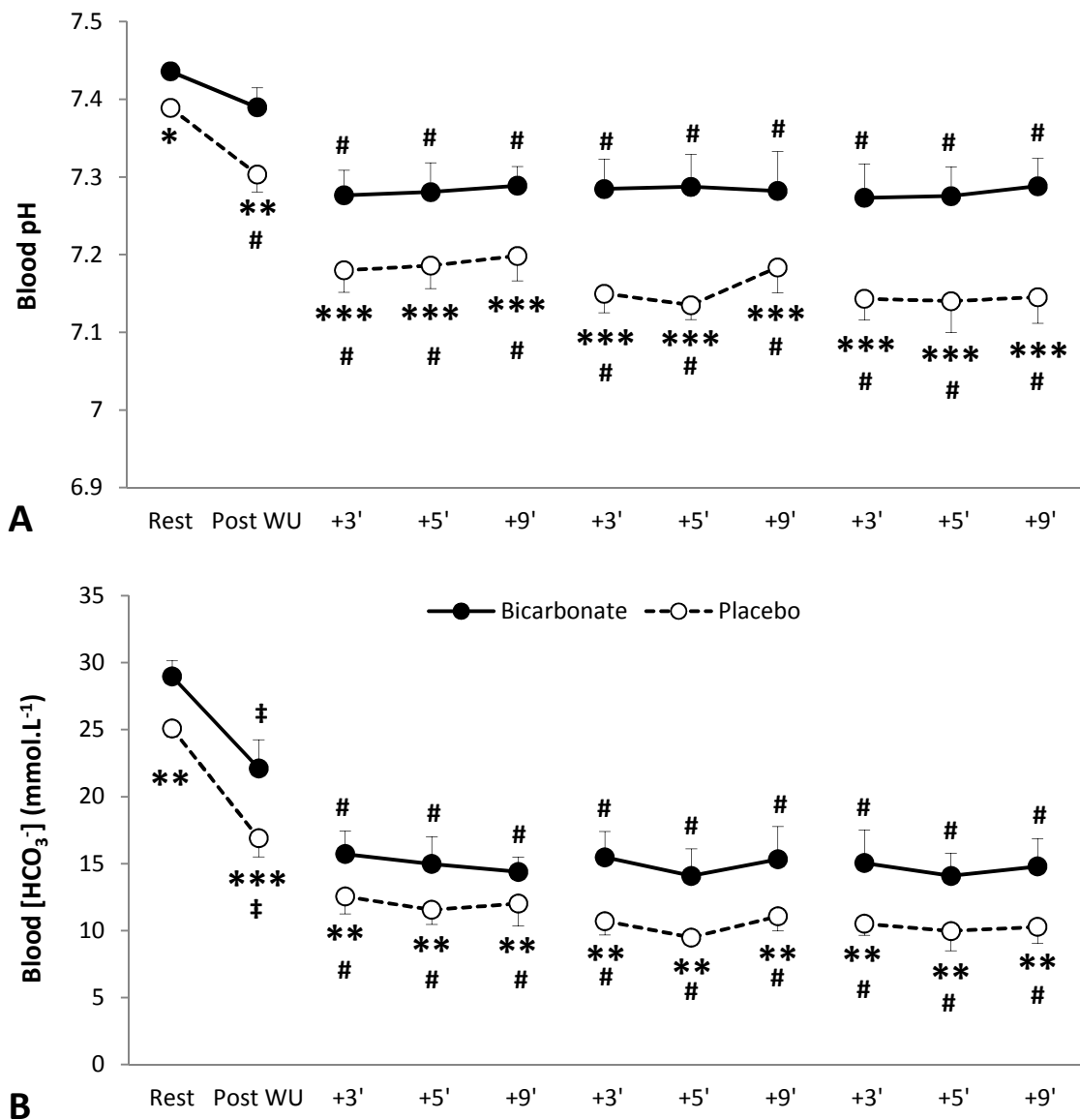


Figure 34 : Evolution du pH (A) et de la $[HCO_3^-]$ (B) lors du test de 3x30 sec all-out (moyennes \pm SE), PLA (○) et BIC (●). * démontre une différence entre conditions ($P < 0.05$) ; ** démontre une différence entre conditions ($P < 0.01$) ; *** démontre une différence entre conditions ($P < 0.001$) ; ‡ démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.001$) ; # démontre une différence avec la mesure post-exercice ($P < 0.001$) ($n=8$).

2. pH et [H⁺] musculaires en réponse à l'exercice et à l'alcalose induite.

A la fois pour les mesures de pH et de [H⁺] musculaires aucune différence significative n'a été trouvée entre les conditions PLA et BIC, pour l'ensemble des mesures. Toujours pour ces deux paramètres ainsi que pour les deux conditions, les valeurs mesurées immédiatement après l'exercice étaient significativement différentes des valeurs au repos ($P < 0.001$), de plus les valeurs à +6 h et +24 h étaient significativement différentes des valeurs obtenues immédiatement post-exercice (Figure 35 ; $P < 0.001$). On peut noter que les valeurs immédiatement post-exercice de [H⁺] étaient 2 fois supérieures aux valeurs de repos, dans chaque condition, ce qui correspond à une chute de 0.3 unités de pH.

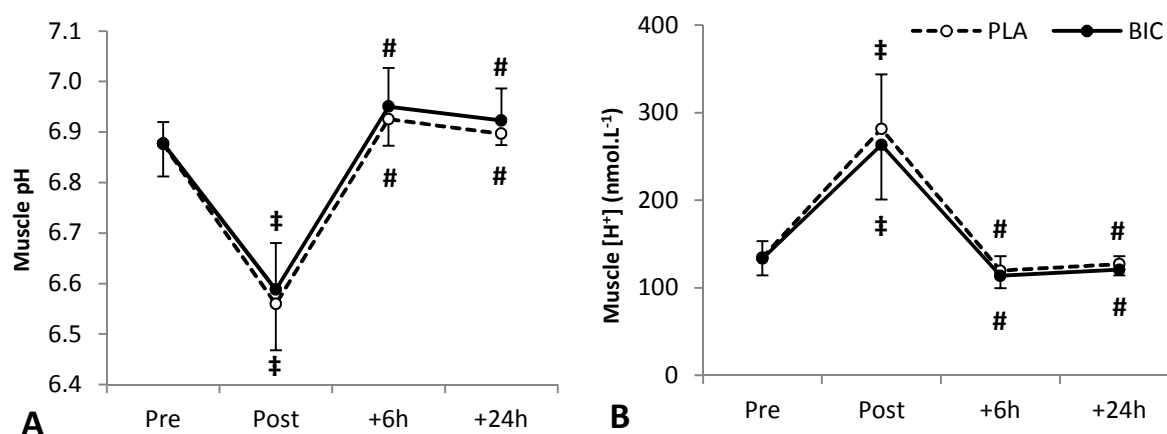


Figure 35 : Evolution du pH (A) et de la [H⁺] (B) musculaires lors du test de 3x30 sec all-out (moyennes \pm SD), PLA (○) et BIC (●). ‡ démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.001$) ; # démontre une différence avec la mesure post-exercice ($P < 0.001$) ($n = 7$).

3. Performances mécaniques et perception de l'effort.

a) Performance lors du test 3 x 30 sec all-out.

L'ensemble des performances réalisées lors des tests de sprints de 3x30 sec est reporté dans le [Tableau 27](#). Aucun effet significatif, condition et temps, n'a été mesuré pour P_{\max} (PLA : 863 ± 24.8 W vs BIC : 833 ± 29 W ; $P > 0.05$), P_{moy} (PLA : 655 ± 8.8 W vs 637 ± 1.6 W ; $P > 0.05$), P_{fin} (PLA : 313 ± 20.8 W vs BIC : 381 ± 10.6 W ; $P > 0.05$) ou IF (PLA : $50.8 \pm 1.6\%$ vs BIC : $45.7 \pm 2.2\%$; $P > 0.05$). De plus, aucune corrélation n'a été établie entre les résultats de performance et les contenus en protéines décrits plus loin.

Tableau 27 : Résultats des performances réalisées lors du test de 3x30 sec all-out, en condition BIC et PLA.
(Moyenne \pm SE ; n=8)

	Wingate number	Maximal Power-Output (W)	Mean Power-Output (W)	Minimum Power-Output (W)	Fatigue Index (%)
BIC	1 st	876 \pm 74.6	660 \pm 56.9	395 \pm 46.2	49.3 \pm 2.2
	2 nd	767 \pm 71.2	620 \pm 58.4	404 \pm 34.2	39.8 \pm 3.9
	3 rd	856 \pm 103.5	633 \pm 58.7	344 \pm 36.0	48.1 \pm 4.8
	Mean \pm SE	833 \pm 29	637 \pm 1.6	381 \pm 10.6	45.7 \pm 2.2
PLA	1 st	885 \pm 113.4	664 \pm 56.2	350 \pm 19.7	50.1 \pm 4.6
	2 nd	825 \pm 83.9	645 \pm 45.4	342 \pm 33.8	46.8 \pm 3.5
	3 rd	879 \pm 104.9	657 \pm 51.6	248 \pm 45.0	55.5 \pm 2.6
	Mean \pm SE	863 \pm 24.8	655 \pm 8.8	313 \pm 20.8	50.8 \pm 1.6

b) Notations sur les échelles de Börg (6-20 et 1-10).

Il n'a pas non plus été identifié d'effet significatif entre les conditions PLA et BIC au cours de l'ensemble des sprints pour les deux échelles de Börg (Börg 6-20 : PLA : 15.6 ± 0.1 vs BIC : 16 ± 0.4 ; Börg 1-10 : PLA 7.8 ± 0.1 vs BIC : 7.2 ± 0.02 ; $P > 0.05$). Egalement pour ce paramètre aucune corrélation n'a été établie avec les contenus en protéines décrits plus loin.

4. Effets de l'exercice sur l'expression des protéines musculaires squelettiques.

Les effets de l'exercice aigu pendant 24 h ont été étudiés en condition PLA. Le contenu en MCT1 tendait à diminuer immédiatement, à +6 h et à +24 h après l'arrêt de l'exercice, comparé aux valeurs de repos, mais il n'y avait pas d'effet temps significatif ($P > 0.05$). Cependant, allant dans le même sens, le contenu de CD147 tendait aussi à diminuer immédiatement après l'exercice et était significativement inférieur à +6 h et +24 h de récupération comparativement au repos (-78.8% and -74.5% respectivement ; $P < 0.01$). Concernant le contenu en MCT4, il n'y avait pas d'effet temps significatif entre les valeurs de repos jusqu'aux valeurs enregistrées à +24 h après les 3 sprints de 30 sec. De plus, une grande variabilité des valeurs a été notée entre les participants. Enfin, aucun effet temps significatif n'a été observé après l'exercice, pour l'ensemble des points de mesures, pour les contenus en NHE1, NBCe1, CAII, COX IV ($P < 0.05$).

Afin de vérifier si le contenu en MCT1 était lié au contenu des autres protéines sarcolemmales, nous en avons étudié les corrélations. Nous avons ainsi trouvé que les contenus en MCT1 et NHE1 étaient positivement corrélés au repos ($r = 0.64$; $P < 0.01$), immédiatement après l'exercice ($r = 0.89$; $P < 0.01$) ainsi qu'à +6 h après l'exercice ($r = 0.89$; $P < 0.01$). Aucune autre corrélation n'a été établie avec les autres protéines sarcolemmales (MCT4, NBCe1 et CAII) en condition PLA.

De plus, comme MCT1 a déjà été considérée comme un marqueur de la capacité oxydative, nous avons étudié les corrélations avec COX IV, une protéine mitochondriale. Ainsi, en PLA, les contenus en MCT1 et COX IV apparaissent positivement corrélés pour tous les points de mesures, au repos ($r = 0.89$; $P < 0.01$), immédiatement après l'exercice ($r = 0.83$; $P < 0.01$), à 6 h après l'exercice ($r = 0.62$; $P < 0.05$) et à +24 h ($r = 0.73$; $P < 0.05$).

Du fait que les contenus en NHE1 et COX IV étaient corrélés au contenu en MCT1 nous avons aussi testé les relations potentielles entre ces deux protéines. Les contenus en NHE1 et COX IV étaient positivement corrélés au repos ($r = 0.75$; $P < 0.05$), immédiatement après l'exercice ($r = 0.74$; $P < 0.05$), à +6 h après l'exercice ($r = 0.79$; $P < 0.05$) et à +24 h ($r = 0.73$; $P < 0.05$).

Enfin, le contenu de repos en MCT1 était corrélé positivement au contenu de repos en NBCe1 ($r = 0.63$; $P < 0.01$) mais cette relation n'a pas été maintenue après l'exercice.

5. Effets de l'alcalose induite sur l'expression des protéines musculaires squelettiques.

A partir des résultats précédents, montrant les cinétiques de réponse ainsi que les relations entre les contenus en protéines à l'exercice et pendant la récupération, nous avons réalisé une supplémentation en NaHCO_3 (alcalinisant) afin de mettre en lumière les effets de l'acidose sur l'expression protéique. Tout d'abord, nous pouvons observer, sur la Figure 36, que si l'exercice induit une balance négative du contenu en protéine pour MCT1, MCT4, CD147, COX IV et NHE1 pendant les 24 h suivant l'arrêt de l'exercice, à l'inverse l'alcalose induite préexercice semble contrecarrer ces effets induits par l'exercice sur toutes les protéines exceptées NBCe1 et CA II.

Ainsi, en condition BIC, le contenu en MCT1 tendait à augmenter entre le repos et immédiatement, à +6 h et à +24 h après l'exercice sans qu'il y ait toutefois d'effet temps significatif ($P > 0.05$). Par contre, le contenu relatif était significativement supérieur en condition BIC comparé à la condition PLA à +6 h (+21.6%) et +24 h (+23.7%) après l'arrêt de l'exercice ($P < 0.01$). En BIC comparé à la condition PLA, le contenu en CD147 était aussi significativement plus important +6 h (+70.3%) et +24 h (+70.4%) de récupération ($P < 0.01$). Une interaction (temps x condition) a été trouvée pour le contenu en CD147 ($P < 0.05$).

Concernant MCT4, il n'y avait pas d'effet condition ou temps significatif du repos jusqu'à 24 h post-exercice, même si l'expression en MCT4 a augmenté de 42.5% entre +6 h et +24 h en BIC, comparé à seulement +5.3% en PLA.

Après 24 h de récupération en condition BIC, le contenu relatif en NHE1 était de 57.7% supérieur ($P < 0.01$) comparé aux valeurs de repos, et était de 58.7% supérieur comparé à la valeur PLA à +24 h ($P < 0.01$). Pour les contenus en NBCe1, CAII et COX IV aucun effet condition ou temps n'a été noté pour l'ensemble des points de mesure ($P > 0.05$).

De plus, l'alcalose préexercice n'avait pas affecté la relation entre MCT1 et les capacités oxydatives puisque les contenus en MCT1 et COX IV étaient positivement corrélés immédiatement post-exercice ($r = 0.72$, $P < 0.05$), après 6 h de récupération ($r = 0.81$; $P < 0.05$) ainsi que 24 h après l'exercice ($r = 0.83$, $P < 0.01$).

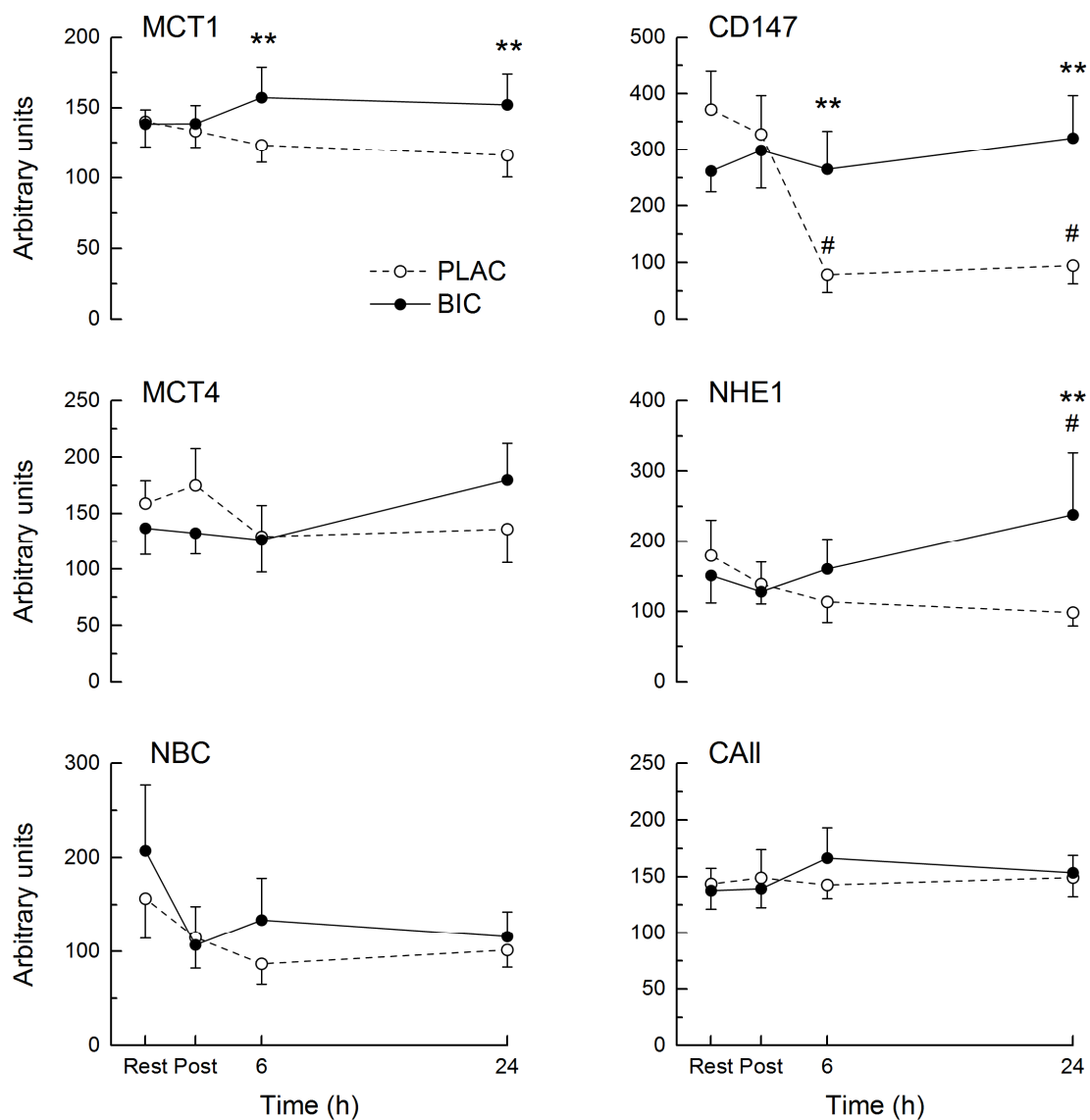


Figure 36 : Comparaison de l'évolution des concentrations protéiques (en unités arbitraires) entre les conditions BIC (■) et PLA (□), exprimées en pourcentage d'un échantillon contrôlé. * démontre une différence entre conditions ($P < 0.01$); # démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.01$) ($n=8$).

6. Effets de l'exercice et de l'alcalose induite sur le stress oxydatif d'un muscle squelettique.

Afin d'établir la quantité de stress oxydatif induite par l'exercice dans les muscles squelettiques nous avons étudié l'oxydation musculaire en mesurant la carbonylation totale des protéines (Barreiro & Hussain, 2010) ainsi que le niveau de peroxydation lipidique (Barreiro *et al.*, 2003) par immunotransfert. Une interaction « condition x temps » a été trouvée pour la quantité totale de protéines oxydées ($P < 0.05$). En condition PLA, 24 h après l'arrêt des 3 sprints, la formation totale de groupes carbonyles était significativement supérieure (+23.8% ; $P < 0.01$, [Figure 37](#)) aux valeurs obtenues immédiatement après l'exercice. A l'inverse, la quantité de protéines oxydées en condition BIC n'a pas évolué au cours du temps. Par ailleurs, les valeurs enregistrées à +24 h étaient significativement plus faibles en BIC qu'en PLA (-30% ; $P < 0.01$, [Figure 37](#)).

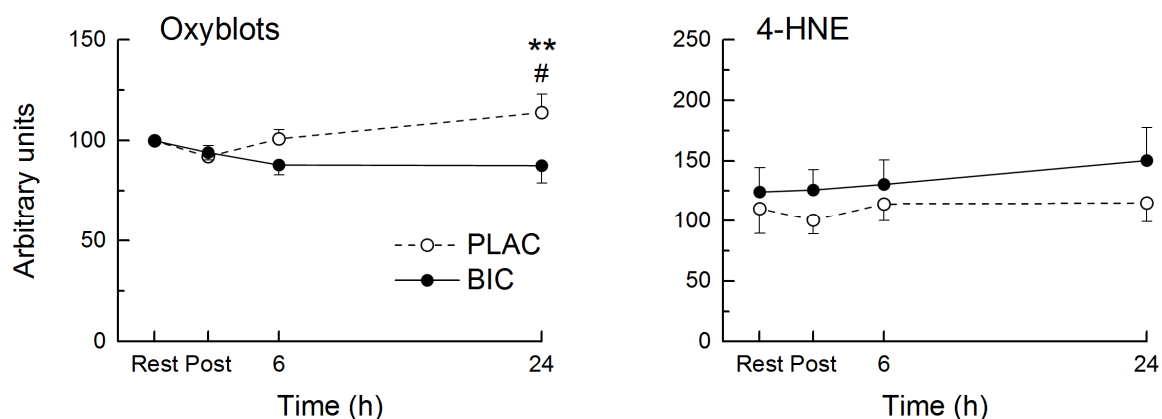


Figure 37 : Comparaison de la carbonylation protéique et de la peroxydation lipidique (en unités arbitraires) entre les conditions BIC (■) et PLA (□), exprimées en pourcentage d'un échantillon contrôlé. ** démontre une différence entre conditions ($P < 0.01$), # démontre une différence avec la mesure au repos ($P < 0.01$) ($n=8$).

7. Effets de l'exercice et de l'alcalose sur l'expression de protéines liées à l'activité mitochondriale.

a) Contenu en PGC1 α .

Ni effet temps ni effet condition n'ont été identifiés pour l'ensemble des contenus en PGC1 α mesurés ($P > 0.05$).

b) Contenu en COX IV.

Ni effet temps ni effet condition n'ont été identifiés pour l'ensemble des contenus en COX IV mesurés ($P > 0.05$).

8. Effets de l'exercice et de l'alcalose induite sur les paramètres de respiration mitochondriale.

a) *Dosage de la Citrate Synthase (CS).*

Ni effet temps ni effet condition n'ont été identifiés pour l'ensemble des valeurs de la CS ($P > 0.05$).

b) *Mesure de la respiration mitochondriale.*

V_{s-max2} ainsi que V_{max} étaient significativement inférieures 24 h après l'exercice en condition BIC (V_{s-max2} repos: 6.2 ± 0.5 vs V_{s-max2} +24 h: 4.3 ± 0.7 pmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$; $P < 0.01$; and V_{max} repos: 7.2 ± 0.6 vs V_{max} +24 h: 4.8 ± 0.9 pmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$; $P < 0.01$, Figure 38). Pour les deux conditions expérimentales, concernant les valeurs de V_0 , V_{s-max1} , la respiration dissociée (« uncoupled respiration ») à travers CII ainsi que la respiration à travers CIV, aucun effet temps ou condition n'a été trouvé ($P > 0.05$, Figure 38).

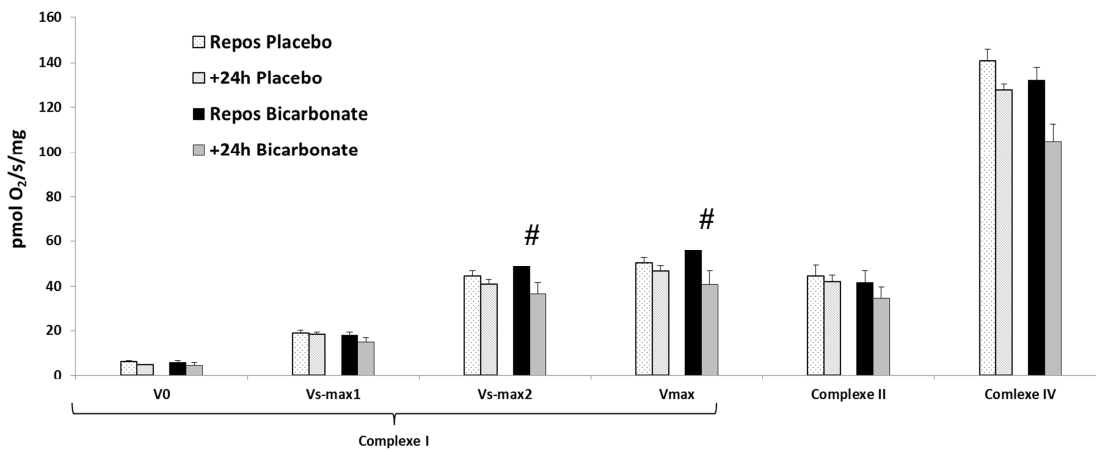


Figure 38 : Evolution de l'activité des complexes de la chaîne mitochondriale. # démontre un effet temps ($p < 0,01$).

C. Discussion des résultats de l'étude n°3.

Cette étude est la première à examiner les effets de 3 sprints de 30 sec ainsi que d'une alcalose induite sur l'expression des protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire squelettique humain. Comparé à la condition PLA, l'alcalose induite pré-exercice a significativement réduit l'augmentation de la carbonylation protéique provoquée par l'exercice, après 24 h de récupération, et a permis une augmentation de l'expression de MCT1, de sa protéine chaperone CD147 et de NHE1. Dans notre étude, ces différences dans l'expression des protéines entre les conditions PLA et BIC, 24 h après l'arrêt de l'exercice, ne peuvent s'expliquer par une activation plus importante de l'AMPK dans la condition BIC. De plus, l'expression de MCT4, NBCe1, CAII et COX IV, pendant la récupération, n'était pas significativement sensible ni à un exercice aigu ni à une alcalose induite pré-exercice. Nos données apportent une nouvelle vision des cinétiques de changements d'expression de différentes protéines musculaires squelettiques, telles que MCT1, CD147 et NHE1 impliquées dans la régulation du pH musculaire soit après une unique répétition de 3 sprints maximaux conduisant à d'importantes perturbations métaboliques (PLA), soit après que ces perturbations aient été contrées par une alcalose induite pré-exercice (BIC).

1. Méthodologie.

a) *Supplémentation.*

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'alcalose induite pourrait altérer l'expression des protéines induite par l'exercice pendant 24 h de récupération, nous avons utilisé une dose de 0.3 g.kg^{-1} de NaHCO_3 dans notre protocole expérimental. En adéquation avec de précédentes études (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2004a), cette supplémentation a conduit à des valeurs de pH et de $[\text{HCO}_3^-]$ sanguines supérieures avant, pendant et après la répétition des trois sprints, comparée à la condition PLA. Toutefois, l'ingestion de NaHCO_3 n'a pas affecté le pH musculaire mesuré immédiatement post-exercice lorsque comparé à la condition PLA. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes de recherche (Stephens *et al.*, 2002; Bishop *et al.*, 2004a). En effet, la concentration plus importante en tampons extracellulaires, augmentant l'élimination des ions H^+ du muscle vers le sang, altérerait le pH musculaire lors de la récupération (Lindinger *et al.*, 1999).

b) Test des sprints répétés.

Dans cette étude, les participants ont présenté un profil de puissance développée au cours du test de 3x30 sec conforme à celui déjà observé chez des athlètes entraînés en sprint : une importante chute de la puissance moyenne lors des trois sprints dans chacune des conditions (PLA et BIC), caractérisée par des index de fatigue compris entre 45 et 50% (Granier *et al.*, 1995; Hunter *et al.*, 2003). Aucune différence dans les diminutions de puissance n'a été observée entre les conditions, ce qui est en accord avec les résultats d'autres études ayant eu recours à une alcalose induite pré-exercice chez l'Homme (Vanhatalo *et al.*, 2010; Zabala *et al.*, 2011). Par conséquent, toute différence de l'expression des protéines ou de la carbonylation protéique entre les conditions ne pourrait être expliquée par des différences de puissance développée au cours du test.

2. Effets de l'exercice de haute intensité sur l'expression des protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire.

c) Effets de l'exercice aigu sur les contenus en MCTs et CD147.

Nous avons choisi de réaliser un enchaînement de biopsies qui nous permettait de déterminer les réponses à court (0 et 6 h post-test) et moyen terme (24 h), après une unique session type d'entraînement en cyclisme, des cinétiques de l'expression des MCT1 et 4 basée sur différentes études selon notre hypothèse (Thomas *et al.*, 2012). Un des nouveaux résultats mis en avant dans notre travail est que le contenu en MCT1 était significativement supérieur à 6 h et à 24 h post-test, comparé aux valeurs de repos, dans la condition BIC uniquement. A l'inverse, MCT4 n'était pas significativement altéré par l'exercice dans les deux conditions. Ces résultats diffèrent de résultats rapportés précédemment. En effet, il a été montré que les contenus en MCT1 et 4 augmentaient dans les premiers instants suivant un exercice d'endurance chez le rat (Coles *et al.*, 2004), et jusqu'à 4 jours après un unique exercice épuisant chez l'Homme (Green *et al.*, 2002). Toutefois, un test de course à intensité supra-maximale conduit jusqu'à l'épuisement total provoquait une augmentation à court terme uniquement dans le contenu en MCT1 2 h après un exercice chez l'Homme, mais pas pour le contenu en MCT4 (Bickham *et al.*, 2006). Concernant le contenu en MCT4, nous avons rapporté une grande variabilité inter-individuelle comme déjà observé chez l'Homme (Pilegaard *et al.*, 1999a; Juel *et al.*, 2004; Burgomaster *et al.*, 2007; Mohr *et al.*, 2007; Bishop

et al., 2008). Il n'y avait aucune augmentation du contenu en MCT4 à la fin de la période de récupération de 24 h post-test, ce qui pourrait indiquer, au moins chez l'Homme, que les exercices aigus (Bickham *et al.*, 2006) et chroniques (Bickham *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2008; Gunnarsson *et al.*, 2013) en sprint n'affectent pas significativement la sur-expression de MCT4. Ceci pourrait aussi être lié aux différences de cinétique de régulation entre les Hommes (notre étude) et les animaux (Coles *et al.*, 2004). De plus, l'absence de changements d'expression en MCT1 et 4 à la suite de contractions de haute intensité en condition PLA lors des 24 h suivant la fin de l'exercice pourrait être due aux différences dans la planification des biopsies choisie dans les différentes études, mais aussi au type d'exercice. Si nous considérons la cinétique d'expression protéique entre le début de l'exercice et le prélèvement de muscle, nos résultats sont en adéquation avec le modèle précédemment mis en exergue (Thomas *et al.*, 2012). En effet, 40 min après le début de la répétition de sprints (i.e., immédiatement post-test), nous n'avons pas observé de changement des contenus en MCT1 et MCT4. Du fait de notre planification des biopsies, nous n'avons pas été en mesure de vérifier une potentielle augmentation de l'expression de MCT1 2 h après l'arrêt de l'exercice chez l'Homme, comme précédemment observé par (Bickham *et al.*, 2006). Toutefois, nous avons rapporté une sur-expression aigue pour MCT1 aux mêmes instants (6 h et 24 h) post-exercice que (Coles *et al.*, 2004), mais seulement en condition BIC. Ces données suggèrent que l'exercice de haute intensité, incluant de larges changements de pH, pourrait retarder ou empêcher l'augmentation de la densité de MCT1, et que les exercices d'endurance, causant de moindres variations de pH, pourraient suffire à augmenter les contenus en MCT1.

Ces hypothèses sont en accord avec de précédentes études portant sur les effets de l'entraînement, qui ont rapporté que différents types d'activité contractile (force / endurance) pourraient augmenter les contenus en MCT1 (Bonen *et al.*, 1998; Pilegaard *et al.*, 1999a; Dubouchaud *et al.*, 2000; Juel *et al.*, 2004; Burgomaster *et al.*, 2007; Mohr *et al.*, 2007). Ces études rapportent qu'un entraînement en sprint induisant de hauts niveaux de perturbations métaboliques sanguines et musculaires, et qui ne montre pas de changement de MCT1 (Bickham *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2008; Gunnarsson *et al.*, 2013). Par ailleurs, (Bonen *et al.*, 1998; Pilegaard *et al.*, 1999a; Dubouchaud *et al.*, 2000; Juel *et al.*, 2004; Burgomaster *et al.*, 2007; Mohr *et al.*, 2007) ont observé une augmentation du contenu en MCT1 après deux types d'entraînement en sprint et ont suggéré que le niveau d'accumulation du lactate et des protons dans le muscle n'était pas le facteur principal pouvant stimuler la synthèse protéique. Toutefois, les valeurs de pH musculaire avoisinaient les 7.0 pour les deux types

d'entraînement ((Bonen *et al.*, 1998; Pilegaard *et al.*, 1999a; Dubouchaud *et al.*, 2000; Juel *et al.*, 2004; Burgomaster *et al.*, 2007; Mohr *et al.*, 2007), alors que nos valeurs de pH musculaires mesurées immédiatement post-exercice étaient inférieures à 6.6. Cela nous laisse suggérer que de hauts niveaux d'accumulation en protons pourraient finalement altérer l'expression de protéines par la stimulation de voies de signalisation, en particulier pour MCT1.

Bien que l'expression des MCT1 et 4 peut être régulée au niveau génétique, le positionnement correct des MCTs nécessite l'action de sa protéine chaperone CD147 (Kirk *et al.*, 2000; Philp *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005). Ainsi l'interaction entre MCT1/4 et CD147 permet leur bonne translocation et leur bon positionnement sur la membrane plasmique (Schneiderhan *et al.*, 2009), nécessaires à leur fonctionnement optimal. Cette protéine chaperone, qui dans notre étude a, pour la première fois, été quantifiée dans le muscle squelettique humain à la suite d'un exercice aigu, a été significativement diminuée après 24 h de récupération en condition PLA. Bien que non-significatif, le contenu en MCT1 était aussi diminué chez 7/8 des participants après 24 h de repos dans la condition PLA. Ce résultat va dans le sens d'une co-régulation de MCT1 et CD147 en réponse à l'activité contractile, comme précédemment observé chez des rats diabétiques (Nikooie *et al.*, 2013). Par conséquent, le niveau d'accumulation en ions H⁺ pourrait à la fois stimuler la dégradation de CD147 (et probablement MCT1) et retarder la synthèse de ces protéines en réponse à l'activité contractile à moyen terme post-exercice (24 h).

Pour la première fois, dans notre étude, il a été montré chez l'Homme une augmentation significative du contenu en NHE1 24 h après la fin d'un unique exercice de sprints répétés combiné avec une alcalose induite pré-exercice.

Les contenus en MCT1 et NHE1 étaient significativement corrélés entre eux, dans la condition PLA, à chaque instant de la récupération où des biopsies étaient prélevées, suggérant une régulation synchronisée de l'expression de ces deux protéines au repos et lors de la récupération. De plus, les contenus en MCT1 et NHE1 étaient tous les deux corrélés au contenu en COX IV dans la condition PLA. Ces résultats pris ensemble sont en accord avec le concept des navettes du lactate qui avance l'existence d'un complexe de régulation du lactate et du pH entre la mitochondrie et le sarcolemme. D'avantage d'études sont nécessaires afin de

déterminer la co-localisation de MCT1 et NHE1 dans le muscle squelettique et leur coopération dans la régulation des ions H⁺ et du lactate.

Il a précédemment été montré que le contenu en NBCe1 augmentait après un « interval-training » dans le *soleus* de rat (Thomas *et al.*, 2007). Dans notre étude, l'exercice aigu n'avait aucun effet sur l'expression de NBCe1 lors des premières 24 h de récupération. Comme NBCe1 était, ici, étudiée dans le *vastus lateralis*, et qu'il a déjà été montré que le contenu en NBC était négativement corrélé avec les fibres musculaires de type I (Kristensen *et al.*, 2004a), il est possible qu'une sur-expression aurait pu être observée dans un muscle constitué principalement de fibres musculaires rapides. De plus, CAII, une protéine pouvant significativement augmenter l'activité de NBC (Pushkin *et al.*, 2004; Becker & Deitmer, 2007; Schueler *et al.*, 2011) et de MCT1 (Becker *et al.*, 2005, 2011; Becker & Deitmer, 2008; Stridh *et al.*, 2012), n'a pas été sur-exprimée ici par notre test de 3x30 sec. Toutefois, nous avons trouvé une corrélation significative au repos entre les contenus en NBCe1 et MCT1. Ce qui va dans le sens des résultats de (Thomas *et al.*, 2007), qui ont montré une corrélation positive modérée entre ces deux mêmes protéines dans un muscle oxydatif après entraînement. Ensemble, ces résultats semblent indiquer que, malgré des interactions entre CAII, MCT1 et NBC (Schueler *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2011; Stridh *et al.*, 2012; Deitmer & Becker, 2013), leur cinétique de régulation pendant les 24 premières heures de récupération suivant 3 sprints maximaux n'est pas exactement la même.

En conclusion, en réponse à 3 tests de Wingate séparés de 20 min de récupération, il y avait soit une chute ou aucun changement dans l'expression de protéines associées à la régulation du pH musculaire. Toutefois, lorsque combiné avec une alcalose induite, l'exercice aigu était associé avec une augmentation significative des contenus en MCT1, CD147 et NHE1.

3. Effets de l'exercice à haute intensité et de l'alcalose induite sur la régulation de l'expression de MCT1, CD147 et NHE1: effet du stress oxydatif.

De la présente étude, il ressort que la différence d'expression pour les protéines MCT1, CD147 et NHE1 entre les conditions PLA et BIC commence 6 h après l'arrêt de l'exercice (pour MCT1 et CD147) et était maintenue au moins jusqu'à 24 h post-exercice. Il a

auparavant été rapporté que les dommages oxydatifs intervenaient souvent après un unique exercice, ce qui pourrait limiter les réponses adaptatives (Radak *et al.*, 2013). Dans notre étude, alors qu'aucune peroxydation lipidique n'a été observée pendant la récupération, la carbonylation des protéines musculaires, un marqueur du stress oxydatif, a significativement augmenté 24 h après l'arrêt de l'exercice dans la condition PLA, et a significativement été réduite par la supplémentation en NaHCO₃ pré-exercice. La carbonylation protéique est un type d'oxydation des protéines qui peut être induite par les espèces oxygénées réactives, et est une modification irréversible post-transcriptionnelle qui conduit souvent à la perte de fonction protéique, et pourrait affecter l'expression protéique. Nous pouvons noter, dans notre étude, que l'absence d'entraînement préalable en sprint de nos participants a pu influencer les réponses adaptatives de la carbonylation des protéines à des exercices aigus (Coffey *et al.*, 2006) comparativement à des athlètes de haut niveau. En effet, nos participants n'étaient pas impliqués dans la pratique régulière d'une activité physique impliquant des sprints, et auraient donc pu produire de plus importants niveaux d'EOR pour une intensité donnée comparé à des athlètes spécifiquement entraînés en sprint (Radak *et al.*, 2001). Toutefois, la réalisation d'un exercice physique comme ce type de sprints répétés (3x30 sec) pourrait être délétère aux adaptations physiologiques de notre population peu entraînée. Par conséquent, ce stress oxydatif pourrait expliquer à la fois l'absence de synthèse protéique dans la condition PLA durant les 24 premières heures de récupération pour MCT1, CD147 et NHE1 et/ou la chute significative du contenu en CD147 et la tendance à la diminution chez 7 des 8 sujets pour MCT1, ce qui peut refléter en contraste, la stimulation de la dégradation protéique.

A partir des données de notre étude, la sur-expression de certaines protéines en condition BIC comparée au placebo, ne semble pas être régulée par l'activité de l'AMPK durant les 24 premières heures de récupération suivant la fin du test de 3x30 sec. En effet, l'AMPK totale ainsi que sa forme phosphorylée (p-AMPK) n'ont pas été modifiées en 24 h de temps post-exercice, ce qui est en adéquation avec les résultats de Gibala *et al.* (2009) après une répétition de sprints de 30 sec séparés de 4 min de repos. De plus, puisque notre population n'avait pas le même niveau d'entraînement (1 à 3 séances d'activité physique par semaine) et n'était pas spécifiquement impliquée dans le cyclisme de sprint, il est possible que quelques unes des variations inter-individuelles relevées pour les contenus en MCT4 et AMPK aient pu être réduites avec des participants ayant eu exactement le même niveau d'entraînement.

4. Effet de l'exercice aigu et de l'alcalose induite sur la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale joue un rôle important dans la production d'énergie et nous avons pu étudier à la fois les effets de l'exercice répété et de l'alcalose induite sur sa fonction. Il ressort de nos résultats qu'en condition BIC et non en condition PLA, 24 h après la réalisation d'une unique répétition de sprints de 30 sec, V_{s-max2} et V_{max} sont significativement diminuées. Cette modification de la fonction pourrait s'expliquer par une inhibition des signaux d'activation de la respiration mitochondriale, en condition BIC, du fait d'une réduction du stress oxydatif ayant entraîné une moindre activation de la transcription de protéines impliquées dans la biogénèse mitochondriale. En effet, bien qu'aucune différence de contenus en PGC1 α et COX IV n'est été rapportée dans notre étude, il se pourrait que l'expression génique est, elle, été modifiée et que ceux-ci n'aient entraîné une augmentation de l'expression protéique dans un délai supérieur à 24 h.

5. Futures études.

Alors que les données présentées ici donnent des preuves claires qu'à la fois trois sprints de 30 sec et une alcalose induite pré-exercice sont impliqués dans l'expression de protéines responsables de la régulation du pH musculaire squelettique chez l'Homme dans un intervalle de 24 h, d'autres études restent à réaliser pour étudier tous les mécanismes par lesquels ces mêmes protéines sont régulées. L'inclusion prochaine de participants plus entraînés, de sessions d'exercice et de biopsies supplémentaires sont prévues. Néanmoins, malgré la petite taille de notre échantillon, l'utilisation d'un protocole séparé en deux semaines avec des mesures répétées a permis que chaque individu serve comme son propre contrôle et a apporté une rigueur supplémentaire dans l'interprétation de nos nouveaux résultats en terme d'expression protéique. Finalement, il semble justifié, pour de futures études, d'analyser l'expression protéique des MCT1, CD147 et NHE1 ainsi que l'oxydation des protéines jusqu'à 48 h après l'arrêt de l'exercice. Ceci dans le but de déterminer, par exemple, si les contenus en protéines sont revenus à des valeurs basales ou non, mais aussi afin d'analyser les effets de l'entraînement couplés à une supplémentation en placebo et NaHCO₃ sur leur régulation.

6. Résumé des principales conclusions.

Nos résultats montrent des différences significatives de réponses métaboliques sanguines pendant la récupération avec une plus grande $[\text{HCO}_3^-]$ et de plus faibles valeurs de pH dans la condition BIC. En résumé, nous avons rapporté des altérations dans les niveaux d'expression de protéines impliquées dans la régulation du pH après la combinaison d'un exercice aigu de haute intensité et d'une alcalose induite pour MCT1, CD147 et NHE1. Cette augmentation de leur expression pourrait résulter d'un moindre stress oxydatif induit par l'exercice dans la condition BIC mesuré 24 h après l'arrêt de l'exercice, mais ne semble pas être induite par l'activation de l'AMPK. De plus, l'expression de NBCe1, CAII et COX IV n'était pas significativement sensible à ces mêmes stimuli. De futures études seront nécessaires afin de définir les potentielles utilisations de MCT1, CD147 et NHE comme biomarqueurs des adaptations liées à l'exercice et de la régulation du pH, et de mieux comprendre leur rôle mécanistique dans le contrôle de la régulation des ions H^+ et du lactate.

Partie V. **SYNTHESE ET
CONCLUSION**

Chapitre IV. Discussion Méthodologique

A. Population.

Pour réaliser l'ensemble de ces études, nous avons recrutés et testés une population hétérogène au regard de la pratique d'activité physique, mais étant très homogène au niveau des âges et des caractéristiques anthropométriques. Ainsi, pour la première étude nous avons testés une population d'athlètes internationaux, habitués à pratiquer des exercices intenses et répétés, afin d'investiguer les effets d'une supplémentation en NaHCO_3 sur les paramètres de performance et de fatigue musculaire. Ensuite, dans le but de modéliser et comprendre les différences de cinétiques de VO_2 entre condition PLA et BIC, des cyclistes, très entraînés et familiers à produire et subir de fortes perturbations métaboliques, ont participé à nos expérimentations. Enfin, pour pouvoir investiguer les aspects physiologiques liés à la performance au niveau musculaire, nous avons été limités dans le choix des sujets du fait du nombre de biopsies musculaires à réaliser. De ce fait, notre dernière population était de moindre niveau. Cependant, nous avons retrouvé les mêmes réponses à l'exercice (chute importante de puissance lors d'exercices supra-maximaux répétés) que chez des athlètes de haut-niveau, ce qui nous a permis d'appréhender les mécanismes musculaires.

B. Supplémentation.

La dose, la nature de l'agent alcalinisant, la forme de supplémentation (en gélules ou dilué dans l'eau) ainsi que le délai entre la prise et le début de l'exercice peuvent faire varier les résultats. En nous basant sur des études précédentes ayant mis en exergue une amélioration de la performance, nous avons volontairement choisi une dose de 0.3g.kg^{-1} de NaHCO_3 (McNaughton, 1992; Douroudos *et al.*, 2006; McNaughton *et al.*, 2008). De plus, plusieurs auteurs ayant reporté des problèmes gastro-intestinaux chez les sujets ayant ingérés le NaHCO_3 dilué dans de l'eau (Cameron *et al.*, 2010), nous avons choisi de procéder à nos supplémentation de NaHCO_3 conditionné sous forme de gélules (Mc Naughton & Thompson, 2001; Bishop *et al.*, 2004a). Enfin, la majorité des études ayant montré une amélioration de la performance, ont réalisé leur supplémentation 90 min avant le début de l'exercice (Mc Naughton & Thompson, 2001; Bishop *et al.*, 2004a; Lindh *et al.*, 2008; Siegler & Hirscher, 2010), Aussi, il ressort que ce délai permet d'obtenir une alcalose métabolique important (pH $\approx 7,50$) (Siegler *et al.*, 2010). Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons retenu un délai de 90 min entre l'ingestion des gélules et le début du test.

C. Choix des tests.

1. Test du 3x500 m.

Ce test de répétition de sprints à intensité maximale a été effectué sur le terrain en coordination avec la Fédération Française de Cyclisme. L'objectif était d'appréhender les réponses métaboliques et leurs conséquences sur la fatigue musculaire et la perception de l'effort lors d'une session d'entraînement fréquemment utilisée par le pôle France de cyclisme sur piste et connue pour engendrer de hauts niveaux d'acidose et de fatigue musculaire.

2. Test de T_{lim} et test de 70 sec.

L'utilisation d'un test de temps limite à puissance constante, nous a permis d'identifier en laboratoire si la chute de VO_2 observée en fin d'exercice de haute-intensité, sur le terrain avec des variations de puissances, était reproductible en laboratoire, indépendante de la baisse de puissance, mais également liée à l'acidose métabolique..

En ce qui concerne le test de 70 sec, il a été utilisé afin de se rapprocher de l'épreuve de un kilomètre sur piste, épreuve olympique, et ainsi étudier les effets du $NaHCO_3$ sur la performance et la consommation d' O_2 . Ainsi, en plus du test de 3x500 m, nous avons pu appréhender à la fois les effets d'une supplémentation sur un exercice unique et sur une répétition de sprints.

3. Test de 3x30 sec.

Nous voulions ici un test de laboratoire qui puisse solliciter de façon très importante le système anaérobie tout en se rapprochant du test de 3x500 m classiquement utilisée par l'Equipe de France de Cyclisme sur piste. Pour cette raison, les 30 sec d'exercice étaient réalisées selon le modèle du test de Wingate. Afin d'établir de façon optimale la fréquence initiale de pédalage, la V_{opt} a été établie à l'aide d'un test de force-vitesse. Ainsi, pour éviter l'apparition d'une fatigue précoce due à l'atteinte de la résistance cible, la roue était actionnée manuellement jusqu'à la valeur de V_{opt} avant le début des 30 sec de test.

D. Consommation d'oxygène.

L'ensemble des mesures liées à la consommation d'oxygène a été réalisé à l'aide d'un analyseur cycle-à-cycle (Quark CPET, Cosmed, Roma, Italy), ce qui nous a permis d'obtenir des données homogènes et en accord avec la littérature.

E. Western blots.

Nous avons fait le choix de réaliser nos western-blots sur homogénats totaux et non pas sur des purifications de membranes cellulaires, afin de pouvoir étudier l'expression de plusieurs protéines sur une quantité minimum d'échantillon.

Pour la quantification des protéines, tous les anticorps primaires ont été testés lors de pré-manipulation. Ces pré-tests étaient effectués avec des concentrations initiales en protéines différentes dans le but de trouver la concentration optimale à déposer par la suite sans toutefois gaspiller d'échantillon. Nos résultats ont tous été normalisés par la β -Tubuline ainsi qu'à l'aide d'un contrôle interne.

F. Respiration mitochondriale.

Nous avons mesuré la fonction mitochondriale à 37°C pour nous rapprocher les conditions physiologiques. L'adjonction de cytochrome C au cours des mesures n'a pas modifié la respiration mitochondriale, témoignant ainsi de l'intégrité de la membrane interne de la mitochondrie. Par ailleurs, comme déjà mentionné, nous avons testé les substrats malate + pyruvate, car ils rendent compte de la deuxième étape de métabolisation du lactate, après son oxydation en pyruvate.

De plus, nous avons fait le choix de travailler sur fibres musculaires perméabilisées pour pouvoir étudier la mitochondrie dans son milieu intracellulaire physiologique, en préservant ses interactions avec d'autres organelles essentielles. Par ailleurs, cette technique demande moins de tissu que lorsque l'on travaille sur des mitochondries isolées.

G. Futures recherches

A la lumière de l'ensemble des résultats exposés dans ce travail de thèse, nous pouvons identifier plusieurs axes de recherche pour de prochaines études. Ainsi, après avoir mis en évidence dans la dernière partie de ce travail, une co-activation temporelle de l'expression de plusieurs protéines sarcolemmales impliquées dans la régulation du pH musculaire (MCT1, CD147, NHE1), nous pourrions maintenant déterminer plus précisément s'il existe ou non une co-localisation de ces protéines sarcolemmales (ce qui a déjà été mis en évidence pour la CAII qui participerait à la co-localisation de NBCe1 et MCT1, via leur partie C terminal). Afin de compléter nos premières observations relatives à l'implication du stress oxydatif dans la régulation de l'expression protéique, nous souhaiterions poursuivre une analyse plus complète de ce mécanisme. Pour cela, il serait possible de quantifier, en plus de la carbonylation protéique et de la peroxydation lipidique, l'ensemble des protéines anti-oxydantes au niveau musculaire, mais également de tester les effets de supplémentation en molécules antioxydantes, comme nous l'avons fait avec les supplémentations en bicarbonate de sodium. Ensuite, il serait intéressant d'appréhender plus en profondeur les mécanismes pouvant expliquer les modifications de la respiration mitochondriale, résultantes de la combinaison de l'exercice de haute-intensité et de l'alcalose induite. En effet, alors que dans ce travail, nous n'avons pas mis en évidence d'activation des voies de la biogénèse mitochondriale via l'AMPK, il serait intéressant d'explorer la deuxième branche d'activation par le biais de p38MAPK. De la même façon, il serait pertinent de se focaliser sur les mécanismes du remodelage mitochondriale (fusion et fission), par le biais de l'analyse de l'expression des protéines MFN 1 et 2 (mitofusine 1 et 2). L'étude de l'expression de ces protéines permettrait d'avoir de nouvelles données sur la densité mitochondriale en réponse à un exercice aigu.

Ainsi, si ce travail de thèse s'inscrivait dans le cadre des problématiques du sport de Haut Niveau, il s'inscrivait également dans le cadre de problématique de santé publique, où la pratique de l'exercice physique de haute intensité est fortement recommandé (Cf Gibala 2009). La compréhension des réponses et des adaptations induites par ce type d'exercice est un domaine encore très vaste à étudier avec de nouvelles perspectives de travail que ce soit au niveau physiologique, cellulaire ou moléculaire.

Chapitre V. Conclusion

Les exercices supra-maximaux provoquent de fortes perturbations métaboliques, avec, entre autre, l'apparition d'une forte acidose musculaire et sanguine. L'ingestion de bicarbonate de sodium contre placebo a permis d'étudier précisément le rôle de l'accumulation de protons au cours de séances de sprints en cyclisme sur les réponses et les adaptations métaboliques.

Ainsi, ce travail de thèse a mis en évidence qu'une alcalose induite pendant des séances de très haute intensité, à allure constante et all-out, pouvait modifier les performances réalisées en squat-jump. A l'inverse nous n'avons pas identifié de différence significative de la performance en cyclisme ou de modification de la perception de l'effort chez des athlètes de haut niveau (Cf résultats de l'étude n°1, expérimentation A). Puis, nos résultats ont permis d'établir qu'une baisse de la consommation d'oxygène, observée en fin d'effort à puissance constante ou à puissance variable, pouvait être freinée significativement par une alcalose induite chez des cyclistes entraînés. Enfin, la répétition de sprints de 30 sec, combinée à la prise de bicarbonate provoque une sur-expression du co-transporteur lactate/proton (MCT1), de sa protéine chaperonne CD147, ainsi que de l'échangeur sodium/proton (NHE1) après 24 h de récupération par rapport à la prise de placebo chez des sujets actifs. Ceci est en lien avec une réduction de la carbonylation protéique par l'alcalose induite, suggérant un rôle délétère du stress oxydatif sur l'expression de ces protéines. En revanche, MCT4, l'anhydrase carbonique et le co-transporteur de sodium bicarbonate ne sont pas régulés à moyen terme en réponse à l'exercice et l'alcalose induite pré-exercice. Par ailleurs, la fonction mitochondriale a été significativement altérée après trois sprints de 30 sec en condition BIC. L'ensemble de ces résultats suggère que l'acidose musculaire et sanguine joue un rôle dans la régulation aigue des réponses et des adaptations au niveau physiologique, cellulaire et moléculaire du muscle strié squelettique au décours d'exercices de haute-intensité.

Grâce à ces travaux, nous avons pu montrer que même si une alcalose induite n'améliorait pas systématiquement les performances de sprint en cyclisme, une perturbation importante du pH sanguin conduisait à des modifications du transport de l'oxygène, de l'expression protéique et du fonctionnement des mitochondries. Ces résultats permettent d'avoir un nouveau regard sur le rôle joué par l'acidose dans les mécanismes impliqués dans la régulation du pH et de ses conséquences sur les adaptations engendrées par des exercices de haute intensité.

Partie VI. **REFERENCES**

- Adams GR, Fisher MJ & Meyer RA (1991). Hypercapnic acidosis and increased H₂PO₄-concentration do not decrease force in cat skeletal muscle. *Am J Physiol* **260**, C805–812.
- Aickin CC & Thomas RC (1977). An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J Physiol* **273**, 295–316.
- Allen DG, Kabbara AA & Westerblad H (2002). Muscle fatigue: the role of intracellular calcium stores. *Can J Appl Physiol* **27**, 83–96.
- Allen DG, Lamb GD & Westerblad H (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* **88**, 287–332.
- Allen DG, Lännergren J & Westerblad H (1995). Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Exp Physiol* **80**, 497–527.
- Allen DG & Westerblad H (2001). Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue. *J Physiol* **536**, 657–665.
- Almquist J, Lang P, PrÄatzel-Wolters D, W. Deitmer J & Jirstrand M (2010). A Kinetic Model of the Monocarboxylate Transporter MCT1 and its Interaction with Carbonic Anhydrase II. *J Comput Sci Syst Biol*; DOI: 10.4172/jcsb.1000066.
- Amann M (2012). Pulmonary system limitations to endurance exercise performance in humans. *Exp Physiol* **97**, 311–318.
- Amann M, Runnels S, Morgan DE, Trinity JD, Fjeldstad AS, Wray DW, Reese VR & Richardson RS (2011). On the contribution of group III and IV muscle afferents to the circulatory response to rhythmic exercise in humans. *J Physiol* **589**, 3855–3866.
- Amemiya M, Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Alpern RJ & Moe OW (1995). Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int* **48**, 1206–1215.
- Ament W & Verkerke GJ (2009). Exercise and fatigue. *Sports Med Auckl NZ* **39**, 389–422.
- Applegate EA & Grivetti LE (1997). Search for the competitive edge: a history of dietary fads and supplements. *J Nutr* **127**, 869S–873S.
- Artoli GG, Gualano B, Coelho DF, Benatti FB, Gailey AW & Lancha AH (2007). Does sodium-bicarbonate ingestion improve simulated judo performance? *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **17**, 206–217.
- Astrand PO & Saltin B (1961). Maximal oxygen uptake and heart rate in various types of muscular activity. *J Appl Physiol* **16**, 977–981.
- Bailey DM, Lawrenson L, McEneny J, Young IS, James PE, Jackson SK, Henry RR, Mathieu-Costello O, McCord JM & Richardson RS (2007). Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free Radic Res* **41**, 182–190.
- Bailey DM, Wang Y, England BK, Price SR, Ding X & Mitch WE (1996). The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest* **97**, 1447–1453.
- Bailey DM, Young IS, McEneny J, Lawrenson L, Kim J, Barden J & Richardson RS (2004). Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H1689–1699.
- Bailey JL, Zheng B, Hu Z, Price SR & Mitch WE (2006). Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1388–1394.
- Baird NR, Orłowski J, Szabó EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG & Shull GE (1999). Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J Biol Chem* **274**, 4377–4382.

- Baker AJ, Brandes R & Weiner MW (1995). Effects of intracellular acidosis on Ca²⁺ activation, contraction, and relaxation of frog skeletal muscle. *Am J Physiol* **268**, C55–63.
- Baker AJ, Kostov KG, Miller RG & Weiner MW (1993). Slow force recovery after long-duration exercise: metabolic and activation factors in muscle fatigue. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **74**, 2294–2300.
- Baker JS, Bailey DM, Hullin D, Young I & Davies B (2004). Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and markers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol* **92**, 321–327.
- Balakrishnan VS, Rao M, Menon V, Gordon PL, Pilichowska M, Castaneda F & Castaneda-Sceppa C (2010). Resistance training increases muscle mitochondrial biogenesis in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* **5**, 996–1002.
- Balsom PD, Seger JY, Sjodin B & Ekblom B (1992). Maximal-intensity intermittent exercise: effect of recovery duration. *Int J Sports Med* **13**, 528–533.
- Bangsbo J, Krstrup P, González-Alonso J & Saltin B (2001). ATP production and efficiency of human skeletal muscle during intense exercise: effect of previous exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E956–964.
- Bangsbo J, Michalsik L & Petersen A (1993). Accumulated O₂ deficit during intense exercise and muscle characteristics of elite athletes. *Int J Sports Med* **14**, 207–213.
- Barreiro E, Gea J, Corominas JM & Hussain SNA (2003). Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**, 771–778.
- Barreiro E & Hussain SN (2010). Protein carbonylation in skeletal muscles: impact on function. *Antioxid Redox Signal* **12**, 417–429.
- Becker HM, Broer S & Deitmer JW (2004). Facilitated lactate transport by MCT1 when coexpressed with the sodium bicarbonate cotransporter (NBC) in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* **86**, 235–247.
- Becker HM & Deitmer JW (2004). Voltage dependence of H⁺ buffering mediated by sodium bicarbonate cotransport expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **279**, 28057–28062.
- Becker HM & Deitmer JW (2007). Carbonic anhydrase II increases the activity of the human electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem* **282**, 13508–13521.
- Becker HM & Deitmer JW (2008). Nonenzymatic proton handling by carbonic anhydrase II during H⁺-lactate cotransport via monocarboxylate transporter 1. *J Biol Chem* **283**, 21655–21667.
- Becker HM, Hirnet D, Fecher-Trost C, Sultemeyer D & Deitmer JW (2005). Transport activity of MCT1 expressed in *Xenopus* oocytes is increased by interaction with carbonic anhydrase. *J Biol Chem* **280**, 39882–39889.
- Becker HM, Klier M & Deitmer JW (2010). Nonenzymatic augmentation of lactate transport via monocarboxylate transporter isoform 4 by carbonic anhydrase II. *J Membr Biol* **234**, 125–135.
- Becker HM, Klier M, Schüler C, McKenna R & Deitmer JW (2011). Intramolecular proton shuttle supports not only catalytic but also noncatalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3071–3076.
- Berger NJ, McNaughton LR, Keatley S, Wilkerson DP & Jones AM (2006). Sodium bicarbonate ingestion alters the slow but not the fast phase of VO₂ kinetics. *Med Sci Sports Exerc* **38**, 1909–1917.
- Bergman BC, Butterfield GE, Wolfel EE, Lopaschuk GD, Casazza GA, Horning MA & Brooks GA (1999). Muscle net glucose uptake and glucose kinetics after endurance training in men. *Am J Physiol* **277**, E81–92.

- Bergman BC, Horning MA, Casazza GA, Wolfel EE, Butterfield GE & Brooks GA (2000). Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E244–51.
- Bickham DC, Bentley DJ, Le Rossignol PF & Cameron-Smith D (2006). The effects of short-term sprint training on MCT expression in moderately endurance-trained runners. *Eur J Appl Physiol* **96**, 636–643.
- Bigland-Ritchie B, Furbush F & Woods JJ (1986). Fatigue of intermittent submaximal voluntary contractions: central and peripheral factors. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **61**, 421–429.
- Billat VL, Morton RH, Blondel N, Berthoin S, Bocquet V, Koralsztein JP & Barstow TJ (2000). Oxygen kinetics and modelling of time to exhaustion whilst running at various velocities at maximal oxygen uptake. *Eur J Appl Physiol* **82**, 178–187.
- Billaut F & Smith K (2010). Prolonged repeated-sprint ability is related to arterial O₂ desaturation in men. *Int J Sports Physiol Perform* **5**, 197–209.
- Bishop D, Bonetti D & Dawson B (2002). The influence of pacing strategy on VO₂ and supramaximal kayak performance. *Med Sci Sports Exerc* **34**, 1041–1047.
- Bishop D & Claudius B (2005). Effects of induced metabolic alkalosis on prolonged intermittent-sprint performance. *Med Sci Sports Exerc* **37**, 759–767.
- Bishop D, Edge J, Davis C & Goodman C (2004a). Induced metabolic alkalosis affects muscle metabolism and repeated-sprint ability. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 807–813.
- Bishop D, Edge J & Goodman C (2004b). Muscle buffer capacity and aerobic fitness are associated with repeated-sprint ability in women. *Eur J Appl Physiol* **92**, 540–547.
- Bishop D, Edge J, Mendez-Villanueva A, Thomas C & Schneiker K (2009). High-intensity exercise decreases muscle buffer capacity via a decrease in protein buffering in human skeletal muscle. *Pflugers Arch* **458**, 929–936.
- Bishop D, Edge J, Thomas C & Mercier J (2007). High-intensity exercise acutely decreases the membrane content of MCT1 and MCT4 and buffer capacity in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **102**, 616–621.
- Bishop D, Edge J, Thomas C & Mercier J (2008). Effects of high-intensity training on muscle lactate transporters and postexercise recovery of muscle lactate and hydrogen ions in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R1991–8.
- Bishop DJ, Thomas C, Moore-Morris T, Tonkonogi M, Sahlin K & Mercier J (2010). Sodium bicarbonate ingestion prior to training improves mitochondrial adaptations in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Bizeau ME, Willis WT & Hazel JR (1998). Differential response to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J Appl Physiol* **85**, 1279–1284.
- Bloomer RJ, Falvo MJ, Fry AC, Schilling BK, Smith WA & Moore CA (2006). Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Med Sci Sports Exerc* **38**, 1436–1442.
- Bloomer RJ, Fry AC, Falvo MJ & Moore CA (2007). Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J Sci Med Sport Sports Med Aust* **10**, 411–417.
- Bloomer RJ & Goldfarb AH (2004). Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appliquée* **29**, 245–263.
- Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ & Consitt LA (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **19**, 276–285.
- Bogdan C, Röllinghoff M & Diefenbach A (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 64–76.

- Bogdanis GC, Nevill ME, Boobis LH & Lakomy HK (1996). Contribution of phosphocreatine and aerobic metabolism to energy supply during repeated sprint exercise. *J Appl Physiol* **80**, 876–884.
- Bogdanis GC, Nevill ME, Boobis LH, Lakomy HK & Nevill AM (1995). Recovery of power output and muscle metabolites following 30 s of maximal sprint cycling in man. *J Physiol* **482** (Pt 2), 467–480.
- Bogdanis GC, Nevill ME, Lakomy HK & Boobis LH (1998). Power output and muscle metabolism during and following recovery from 10 and 20 s of maximal sprint exercise in humans. *Acta Physiol Scand* **163**, 261–272.
- Bohr C, Hasselbach K & Krogh A (n.d.). Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung ueb. *Skand Arch Physiol* **16**, 1904.
- Bonen A (2000). Lactate transporters (MCT proteins) in heart and skeletal muscles. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 778–789.
- Bonen A, McCullagh KJ, Putman CT, Hultman E, Jones NL & Heigenhauser GJ (1998). Short-term training increases human muscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. *Am J Physiol* **274**, E102–107.
- Bonen A, Miskovic D, Tonouchi M, Lemieux K, Wilson MC, Marette A & Halestrap AP (2000a). Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E1067–77.
- Bonen A, Tonouchi M, Miskovic D, Heddle C, Heikkila JJ & Halestrap AP (2000b). Isoform-specific regulation of the lactate transporters MCT1 and MCT4 by contractile activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E1131–8.
- Boning D, Klarholz C, Himmelsbach B, Hutler M & Maassen N (2007). Extracellular bicarbonate and non-bicarbonate buffering against lactic acid during and after exercise. *Eur J Appl Physiol* **100**, 457–467.
- Borg E & Kaijser L (2006). A comparison between three rating scales for perceived exertion and two different work tests. *Scand J Med Sci Sports* **16**, 57–69.
- Boscá L, Aragón JJ & Sols A (1985). Modulation of muscle phosphofructokinase at physiological concentration of enzyme. *J Biol Chem* **260**, 2100–2107.
- Bottinelli R & Westerblad H (2011). Reactive oxygen and nitrogen species in skeletal muscle: acute and long-term effects. *J Physiol* **589**, 2117–2118.
- Boveris A & Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**, 707–716.
- Broer S, Broer A, Schneider HP, Stegen C & Halestrap A (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter 2 MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* **341**, 529–535.
- Brooks GA (1985). Lactate:Glycolytic End Product and Oxidative Substrate During Sustained Exercise in Mammals — The “Lactate Shuttle.” In *Circulation, Respiration, and Metabolism*, ed. Gilles PDR, Proceedings in Life Sciences, pp. 208–218. Springer Berlin Heidelberg. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-70610-3_15 [Accessed August 27, 2014].
- Brooks GA (1986). The lactate shuttle during exercise and recovery. *Med Sci Sports Exerc* **18**, 360–368.
- Brooks GA (1991). Current concepts in lactate exchange. *Med Sci Sports Exerc* **23**, 895–906.
- Brooks GA (1998). Mammalian fuel utilization during sustained exercise. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **120**, 89–107.
- Brooks GA (2000). Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 790–799.

- Brown MA & Brooks GA (1994). Trans-stimulation of lactate transport from rat sarcolemmal membrane vesicles. *Arch Biochem Biophys* **313**, 22–28.
- Brown SP, Miller WC & Eason JM (2006). *Exercise Physiology: Basis of Human Movement in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Burgomaster KA, Cermak NM, Phillips SM, Benton CR, Bonen A & Gibala MJ (2007). Divergent response of metabolite transport proteins in human skeletal muscle after sprint interval training and detraining. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1970–6.
- Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, MacDonald MJ, McGee SL & Gibala MJ (2008). Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol* **586**, 151–160.
- Burke L (2004). ACSM and MSSE: nutrition and metabolism perspective. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 179.
- Cady EB, Jones DA, Lynn J & Newham DJ (1989). Changes in force and intracellular metabolites during fatigue of human skeletal muscle. *J Physiol* **418**, 311–325.
- Cameron SL, McLay-Cooke RT, Brown RC, Gray AR & Fairbairn KA (2010). Increased blood pH but not performance with sodium bicarbonate supplementation in elite rugby union players. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **20**, 307–321.
- Carr AJ, Hopkins WG & Gore CJ (2011). Effects of acute alkalosis and acidosis on performance: a meta-analysis. *Sports Med Auckl NZ* **41**, 801–814.
- Casey A, Constantin-Teodosiu D, Howell S, Hultman E & Greenhaff PL (1996a). Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. *Am J Physiol* **271**, E31–37.
- Casey A, Constantin-Teodosiu D, Howell S, Hultman E & Greenhaff PL (1996b). Metabolic response of type I and II muscle fibers during repeated bouts of maximal exercise in humans. *Am J Physiol* **271**, E38–43.
- Caso G, Garlick BA, Casella GA, Sasvary D & Garlick PJ (2004). Acute metabolic acidosis inhibits muscle protein synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E90–96.
- Cheatham ME, Boobis LH, Brooks S & Williams C (1986). Human muscle metabolism during sprint running. *J Appl Physiol* **61**, 54–60.
- Chilibeck PD, Bell GJ, Socha T & Martin T (1998). The effect of aerobic exercise training on the distribution of succinate dehydrogenase activity throughout muscle fibres. *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appliquée* **23**, 74–86.
- Chow C-W, Herrera Abreu MT, Suzuki T & Downey GP (2003). Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**, 427–431.
- Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, Kim CH, Lee J, Kim HS, Kim ND, Jung JH & Yu BP (2011). Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res* **90**, 830–840.
- Cieslar JH & Dobson GP (2001). Force reduction uncoupled from pH and H⁽²⁾PO⁽⁻⁾(4) in rat gastrocnemius in vivo with continuous 2-Hz stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R511–518.
- Coffey VG, Reeder DW, Lancaster GI, Yeo WK, Febbraio MA, Yaspelkis BB 3rd & Hawley JA (2007). Effect of high-frequency resistance exercise on adaptive responses in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 2135–2144.
- Coffey VG, Shield A, Canny BJ, Carey KA, Cameron-Smith D & Hawley JA (2006). Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E849–855.
- Cohen J (1992). A power primer. *Psychol Bull* **112**, 155–159.

- Coles L, Litt J, Hatta H & Bonen A (2004). Exercise rapidly increases expression of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 in rat muscle. *J Physiol* **561**, 253–261.
- Connor MK, Irrcher I & Hood DA (2001). Contractile activity-induced transcriptional activation of cytochrome C involves Sp1 and is proportional to mitochondrial ATP synthesis in C2C12 muscle cells. *J Biol Chem* **276**, 15898–15904.
- Costill DL, Verstappen F, Kuipers H, Janssen E & Fink W (1984). Acid-base balance during repeated bouts of exercise: influence of HCO₃. *Int J Sports Med* **5**, 228–231.
- Dascombe BJ, Reaburn PR, Sirotic AC & Coutts AJ (2007). The reliability of the i-STAT clinical portable analyser. *J Sci Med Sport* **10**, 135–140.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA & Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 1198–1205.
- Davies MJ & Slater TF (1987). Studies on the metal-ion and lipoxxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin-resonance spectroscopy. *Biochem J* **245**, 167–173.
- Davies MJ & Truscott RJ (2001). Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J Photochem Photobiol B* **63**, 114–125.
- Dawson B, Fitzsimons M, Green S, Goodman C, Carey M & Cole K (1998). Changes in performance, muscle metabolites, enzymes and fibre types after short sprint training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **78**, 163–169.
- Dawson B, Goodman C, Lawrence S, Preen D, Polglaze T, Fitzsimons M & Fournier P (1997). Muscle phosphocreatine repletion following single and repeated short sprint efforts. *Scand J Med Sci Sports* **7**, 206–213.
- Degroot M, Massie BM, Boska M, Gober J, Miller RG & Weiner MW (1993). Dissociation of [H⁺] from fatigue in human muscle detected by high time resolution 31P-NMR. *Muscle Nerve* **16**, 91–98.
- Deitmer JW & Becker HM (2013). Transport metabolons with carbonic anhydrases. *Front Physiol* **4**, 291.
- Dempsey J, Hanson P, Pegelow D, Claremont A & Rankin J (1982). Limitations to exercise capacity and endurance: pulmonary system. *Can J Appl Sport Sci* **7**, 4–13.
- Dempsey JA (2006). Challenges for future research in exercise physiology as applied to the respiratory system. *Exerc Sport Sci Rev* **34**, 92–98.
- Dempsey JA, Hanson PG & Henderson KS (1984). Exercise-induced arterial hypoxaemia in healthy human subjects at sea level. *J Physiol* **355**, 161–175.
- Dempsey JA & Wagner PD (1999). Exercise-induced arterial hypoxemia. *J Appl Physiol* **87**, 1997–2006.
- Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW & Broer S (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* **350 Pt 1**, 219–227.
- Dobson GP, Yamamoto E & Hochachka PW (1986). Phosphofructokinase control in muscle: nature and reversal of pH-dependent ATP inhibition. *Am J Physiol* **250**, R71–76.
- Donaldson SK, Hermansen L & Bolles L (1978). Differential, direct effects of H⁺ on Ca²⁺-activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac and adductor magnus muscles of rabbits. *Pflüg Arch Eur J Physiol* **376**, 55–65.
- Dorel S, Couturier A, Lacour J-R, Vandewalle H, Hautier C & Hug F (2010). Force-velocity relationship in cycling revisited: benefit of two-dimensional pedal forces analysis. *Med Sci Sports Exerc* **42**, 1174–1183.
- Douroudos II, Fatouros IG, Gourgoulis V, Jamurtas AZ, Tsitsios T, Hatzinikolaou A, Margonis K, Mavromatidis K & Taxildaris K (2006). Dose-related effects of

- prolonged NaHCO₃ ingestion during high-intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc* **38**, 1746–1753.
- Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC & Brooks GA (2000). Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E571–579.
- Dubouchaud H, Eydoux N, Granier P, Prefaut C & Mercier J (1999). Lactate transport activity in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles after acute exhaustive exercise. *J Appl Physiol* **87**, 955–961.
- Duffield R, Dawson B & Goodman C (2005). Energy system contribution to 400-metre and 800-metre track running. *J Sports Sci* **23**, 299–307.
- Duffin J (2005). Modelling the respiratory chemoreflex control of Acid-base balance. *Conf Proc Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Conf* **6**, 5836–5839.
- Dufour E & Larsson N-G (2004). Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochim Biophys Acta* **1658**, 122–132.
- Edge EJ, Bishop D & Goodman C (2006a). Very high-intensity interval training with short rest periods decreases muscle buffer capacity. *Proc ECSS Conf Lausannep*. 477.
- Edge EJ, Bishop D, Hill-Haas S, Dawson B & Goodman C (2006b). Comparison of muscle buffer capacity and repeated-sprint ability of untrained, endurance-trained and team-sport athletes. *Eur J Appl Physiol* **96**, 225–234.
- Edge J, Bishop D & Goodman C (2006c). Effects of chronic NaHCO₃ ingestion during interval training on changes to muscle buffer capacity, metabolism, and short-term endurance performance. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **101**, 918–925.
- Esbjörnsson-Liljedahl M, Sundberg CJ, Norman B & Jansson E (1999). Metabolic response in type I and type II muscle fibers during a 30-s cycle sprint in men and women. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **87**, 1326–1332.
- Essig DA (1996). Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* **24**, 289–319.
- Esterbauer H, Schaur RJ & Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81–128.
- Evans WJ, Phinney SD & Young VR (1982). Suction applied to a muscle biopsy maximizes sample size. *Med Sci Sports Exerc* **14**, 101–102.
- Eydoux N, Dubouchaud H, Py G, Granier P, Prefaut C & Mercier J (2000a). Lactate transport in rat sarcolemmal vesicles after a single bout of submaximal exercise. *Int J Sports Med* **21**, 393–399.
- Eydoux N, Py G, Lambert K, Dubouchaud H, Prefaut C & Mercier J (2000b). Training does not protect against exhaustive exercise-induced lactate transport capacity alterations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E1045–52.
- Fabiato A & Fabiato F (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* **276**, 233–255.
- Faccini P & Dai Monte A (1996). Physiologic demands of badminton match play. *Am J Sports Med* **24**, S64–66.
- Favero TG (1999). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and muscle fatigue. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **87**, 471–483.
- Favero TG, Zable AC, Bowman MB, Thompson A & Abramson JJ (1995). Metabolic end products inhibit sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and [3H]ryanodine binding. *J Appl Physiol* **78**, 1665–1672.

- Ferretti G, Antonutto G, Denis C, Hoppeler H, Minetti AE, Narici MV & Desplanches D (1997). The interplay of central and peripheral factors in limiting maximal O₂ consumption in man after prolonged bed rest. *J Physiol* **501** (Pt 3), 677–686.
- Figueiredo PA, Mota MP, Appell HJ & Duarte JA (2008). The role of mitochondria in aging of skeletal muscle. *Biogerontology* **9**, 67–84.
- De Filippis E, Alvarez G, Berria R, Cusi K, Everman S, Meyer C & Mandarino LJ (2008). Insulin-resistant muscle is exercise resistant: evidence for reduced response of nuclear-encoded mitochondrial genes to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E607–614.
- Fisher-Wellman K & Bloomer RJ (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med DM* **8**, 1.
- Fitts RH (1996). Muscle fatigue: the cellular aspects. *Am J Sports Med* **24**, S9–13.
- Fitzsimmons M, Dawson B, Ward D & Wilkinson A (1993). Cycling and running tests of repeated sprint ability. *Aust J Sci Med Sport* **25**, 82–87.
- Forbes SC, Raymer GH, Kowalchuk JM & Marsh GD (2005). NaHCO₃-induced alkalosis reduces the phosphocreatine slow component during heavy-intensity forearm exercise. *J Appl Physiol* **99**, 1668–1675.
- Forster HV & Pan LG (1995). Contribution of acid-base changes to control of breathing during exercise. *Can J Appl Physiol* **20**, 380–394.
- Freund H, Oyono-Enguelle S, Heitz A, Marbach J, Ott C & Gartner M (1989). Effect of exercise duration on lactate kinetics after short muscular exercise. *Eur J Appl Physiol* **58**, 534–542.
- Freund H, Oyono-Enguelle S, Heitz A, Marbach J, Ott C, Zouloumian P & Lampert E (1986). Work rate-dependent lactate kinetics after exercise in humans. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **61**, 932–939.
- Friedlander AL, Casazza GA, Horning MA, Huie MJ, Piacentini MF, Trimmer JK & Brooks GA (1998). Training-induced alterations of carbohydrate metabolism in women: women respond differently from men. *J Appl Physiol* **85**, 1175–1186.
- Gaitanos GC, Nevill ME, Brooks S & Williams C (1991). Repeated bouts of sprint running after induced alkalosis. *J Sports Sci* **9**, 355–370.
- Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH & Brooks S (1993). Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol* **75**, 712–719.
- Gallagher CG, Hof VI & Younes M (1985). Effect of inspiratory muscle fatigue on breathing pattern. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **59**, 1152–1158.
- Gastin PB (2001). Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports Med* **31**, 725–741.
- Gastin PB, Costill DL, Lawson DL, Krzeminski K & McConell GK (1995). Accumulated oxygen deficit during supramaximal all-out and constant intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc* **27**, 255–263.
- Gastin PB & Lawson DL (1994). Influence of training status on maximal accumulated oxygen deficit during all-out cycle exercise. *Eur J Appl Physiol* **69**, 321–330.
- Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC & Neese RA (1988). Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* **82**, 2017–2025.
- Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ & Hargreaves M (2009). Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **106**, 929–934.
- Ginsburg GS, Agil A, O'Toole M, Rimm E, Douglas PS & Rifai N (1996). Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in triathletes. *JAMA J Am Med Assoc* **276**, 221–225.

- Gladden LB (2008). 200th anniversary of lactate research in muscle. *Exerc Sport Sci Rev* **36**, 109–115.
- Glaister M (2005). Multiple sprint work : physiological responses, mechanisms of fatigue and the influence of aerobic fitness. *Sports Med Auckl NZ* **35**, 757–777.
- Goldfinch J, Mc Naughton L & Davies P (1988). Induced metabolic alkalosis and its effects on 400-m racing time. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **57**, 45–48.
- Gollnick PD & King DW (1969). Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **216**, 1502–1509.
- Gomez-Cabrera M-C, Viña J & Ji LL (2009). Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. *Phys Sportsmed* **37**, 116–123.
- González-Alonso J & Calbet JAL (2003). Reductions in systemic and skeletal muscle blood flow and oxygen delivery limit maximal aerobic capacity in humans. *Circulation* **107**, 824–830.
- Gorostiaga EM, Asiáin X, Izquierdo M, Postigo A, Aguado R, Alonso JM & Ibáñez J (2010). Vertical jump performance and blood ammonia and lactate levels during typical training sessions in elite 400-m runners. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **24**, 1138–1149.
- Granier P, Mercier B, Mercier J, Anselme F & Préfaut C (1995). Aerobic and anaerobic contribution to Wingate test performance in sprint and middle-distance runners. *Eur J Appl Physiol* **70**, 58–65.
- Green H, Halestrap A, Mockett C, O’Toole D, Grant S & Ouyang J (2002). Increases in muscle MCT are associated with reductions in muscle lactate after a single exercise session in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E154–160.
- Green HJ (1997). Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise. *J Sports Sci* **15**, 247–256.
- Green HJ, Bombardier E, Duhamel TA, Stewart RD, Tupling AR & Ouyang J (2008). Metabolic, enzymatic, and transporter responses in human muscle during three consecutive days of exercise and recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R1238–1250.
- Greenhaff PL & Timmons JA (1998). Pyruvate dehydrogenase complex activation status and acetyl group availability as a site of interchange between anaerobic and oxidative metabolism during intense exercise. *Adv Exp Med Biol* **441**, 287–298.
- Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J & Gratas-Delamarche A (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* **89**, 14–20.
- Gunnarsson TP, Christensen PM, Thomassen M, Nielsen LR & Bangsbo J (2013). Effect of intensified training on muscle ion kinetics, fatigue development, and repeated short-term performance in endurance-trained cyclists. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**, R811–821.
- Halestrap AP & Meredith D (2004). The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* **447**, 619–628.
- Hall JE, Guyton AC & Brands MW (1996). Pressure-volume regulation in hypertension. *Kidney Int Suppl* **55**, S35–41.
- Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **91**, 14S–22S.
- Hanon C, Dorel S, Delfour-Pereyhton R, Leprêtre P-M, Bishop DJ, Perrey S & Thomas C (2013). Prevalence of cardio-respiratory factors in the occurrence of the decrease in oxygen uptake during supra-maximal, constant-power exercise. *SpringerPlus* **2**, 651.

- Hanon C & Gajer B (2009). Velocity and stride parameters of world-class 400-meter athletes compared with less experienced runners. *J Strength Cond Res* **23**, 524–531.
- Hanon C, Lepretre PM, Bishop D & Thomas C (2010). Oxygen uptake and blood metabolic responses to a 400-m run. *Eur J Appl Physiol* **109**, 233–240.
- Hanon C, Leveque J-M, Thomas C & Vivier L (2008). Pacing strategy and VO₂ kinetics during a 1500-m race. *Int J Sports Med* **29**, 206–211.
- Hanon C, Rabate M & Thomas C. Effect of expertise on post maximal long sprint blood metabolite responses. *J Strength Cond Res*.
- Hanon C & Thomas C (2011). Effects of optimal pacing strategies for 400-, 800-, and 1500-m races on the VO₂ response. *J Sports Sci* **29**, 905–912.
- Hansford RG (1972). Some properties of pyruvate and 2-oxoglutarate oxidation by blowfly flight-muscle mitochondria. *Biochem J* **127**, 271–283.
- Harman EA, Rosenstein MT, Frykman PN & Rosenstein RM (1990). The effects of arms and countermovement on vertical jumping. *Med Sci Sports Exerc* **22**, 825–833.
- Harmer AR, McKenna MJ, Sutton JR, Snow RJ, Ruell PA, Booth J, Thompson MW, Mackay NA, Stathis CG, Cramer RM, Carey MF & Eager DM (2000). Skeletal muscle metabolic and ionic adaptations during intense exercise following sprint training in humans. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **89**, 1793–1803.
- Harms CA, McClaran SR, Nিকেle GA, Pegelow DF, Nelson WB & Dempsey JA (2000). Effect of exercise-induced arterial O₂ desaturation on VO₂max in women. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 1101–1108.
- Hashimoto T & Brooks GA (2008). Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 486–494.
- Hashimoto T, Hussien R & Brooks GA (2006). Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E1237–44.
- Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K & Brooks GA (2007). Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *Faseb J* **21**, 2602–2612.
- Hashimoto T, Masuda S, Taguchi S & Brooks GA (2005). Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. *J Physiol* **567**, 121–129.
- Higgins MF, James RS & Price MJ (2013). The effects of sodium bicarbonate (NaHCO₃) ingestion on high intensity cycling capacity. *J Sports Sci*; DOI: 10.1080/02640414.2012.758868.
- Hirche H, Grun D & Waller W (1970). Utilization of carbohydrates and free fatty acids by the gastrocnemius of the dog during long lasting rhythmical exercise. *Pflugers Arch* **321**, 121–132.
- Hirvonen J, Nummela A, Rusko H, Rehunen S & Harkonen M (1992). Fatigue and changes of ATP, creatine phosphate, and lactate during the 400-m sprint. *Can J Sport Sci* **17**, 141–144.
- Hitomi Y, Watanabe S, Kizaki T, Sakurai T, Takemasa T, Haga S, Ookawara T, Suzuki K & Ohno H (2008). Acute exercise increases expression of extracellular superoxide dismutase in skeletal muscle and the aorta. *Redox Rep Commun Free Radic Res* **13**, 213–216.
- Hogan MC, Gladden LB, Kurdak SS & Poole DC (1995). Increased [lactate] in working dog muscle reduces tension development independent of pH. *Med Sci Sports Exerc* **27**, 371–377.
- Hogan MC, Richardson RS & Haseler LJ (1999). Human muscle performance and PCr hydrolysis with varied inspired oxygen fractions: a ³¹P-MRS study. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **86**, 1367–1373.

- Hollidge-Horvat MG, Parolin ML, Wong D, Jones NL & Heigenhauser GJ (2000). Effect of induced metabolic alkalosis on human skeletal muscle metabolism during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E316–29.
- Holloszy JO (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* **242**, 2278–2282.
- Hood DA (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 **90**, 1137–1157.
- Hopkins WG, Marshall SW, Batterham AM & Hanin J (2009). Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Med Sci Sports Exerc* **41**, 3–13.
- Hoppeler H & Fluck M (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* **35**, 95–104.
- Hoppeler H, Howald H, Conley K, Lindstedt SL, Claassen H, Vock P & Weibel ER (1985). Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 **59**, 320–327.
- Hortop J, Desmond KJ & Coates AL (1988). The mechanical effects of expiratory airflow limitation on cardiac performance in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **137**, 132–137.
- Howley ET, Bassett DR Jr & Welch HG (1995). Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Med Sci Sports Exerc* **27**, 1292–1301.
- Hultman E, Del Canale S & Sjöholm H (1985). Effect of induced metabolic acidosis on intracellular pH, buffer capacity and contraction force of human skeletal muscle. *Clin Sci* **69**, 505–510.
- Hultman E & Sahlin K (1980). Acid-base balance during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* **8**, 41–128.
- Hultman E & Sjöholm H (1983). Energy metabolism and contraction force of human skeletal muscle in situ during electrical stimulation. *J Physiol* **345**, 525–532.
- Hunter AM, St Clair Gibson A, Lambert MI, Nobbs L & Noakes TD (2003). Effects of supramaximal exercise on the electromyographic signal. *Br J Sports Med* **37**, 296–299.
- Isozaki U, Mitch WE, England BK & Price SR (1996). Protein degradation and increased mRNAs encoding proteins of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in BC3H1 myocytes require an interaction between glucocorticoids and acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1967–1971.
- James DVB, Sandals LE, Draper SB, Maldonado-Martin S & Wood DM (2007). VO₂ attained during treadmill running: the influence of a specialist (400-m or 800-m) event. *Int J Sports Physiol Perform* **2**, 128–136.
- Ji LL (2008). Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med* **44**, 142–152.
- Jiménez-Reyes P, Molina-Reina M, González-Hernández J & González-Badillo J (2013). Metabolic and mechanical responses to 200-400 m races in high level sprinters. *Br J Sports Med* **47**, i–e4.
- Johannsson E, Lunde PK, Heddle C, Sjaastad I, Thomas MJ, Bergersen L, Halestrap AP, Blackstad TW, Ottersen OP & Sejersted OM (2001). Upregulation of the cardiac monocarboxylate transporter MCT1 in a rat model of congestive heart failure. *Circulation* **104**, 729–734.
- Johnson BD, Babcock MA, Suman OE & Dempsey JA (1993). Exercise-induced diaphragmatic fatigue in healthy humans. *J Physiol* **460**, 385–405.
- Jones AM, Wilkerson DP, Vanhatalo A & Burnley M (2008). Influence of pacing strategy on O₂ uptake and exercise tolerance. *Scand J Med Sci Sports* **18**, 615–626.

- Jubrias SA, Crowther GJ, Shankland EG, Gronka RK & Conley KE (2003). Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J Physiol* **553**, 589–599.
- Juel C (1986). Potassium and sodium shifts during in vitro isometric muscle contraction, and the time course of the ion-gradient recovery. *Pflugers Arch* **406**, 458–463.
- Juel C (1991). Muscle lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1065**, 15–20.
- Juel C (1995). Regulation of cellular pH in skeletal muscle fiber types, studied with sarcolemmal giant vesicles obtained from rat muscles. *Biochim Biophys Acta* **1265**, 127–132.
- Juel C (1996a). Lactate/proton co-transport in skeletal muscle: regulation and importance for pH homeostasis. *Acta Physiol Scand* **156**, 369–374.
- Juel C (1996b). Symmetry and pH dependency of the lactate/proton carrier in skeletal muscle studied with rat sarcolemmal giant vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1283**, 106–110.
- Juel C (1997). Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* **77**, 321–358.
- Juel C (1998). Skeletal muscle Na⁺/H⁺ exchange in rats: pH dependency and the effect of training. *Acta Physiol Scand* **164**, 135–140.
- Juel C (2000). Expression of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE1 in rat skeletal muscle and effect of training. *Acta Physiol Scand* **170**, 59–63.
- Juel C, Bangsbo J, Graham T & Saltin B (1990). Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. *Acta Physiol Scand* **140**, 147–159.
- Juel C & Halestrap AP (1999). Lactate transport in skeletal muscle -- role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* **517**, 633–642.
- Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krstrup P, Mohr M & Bangsbo J (2004). Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E245–251.
- Juel C, Kristiansen S, Pilegaard H, Wojtaszewski J & Richter EA (1994). Kinetics of lactate transport in sarcolemmal giant vesicles obtained from human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **76**, 1031–1036.
- Juel C & Pilegaard H (1998). Lactate/H⁺ transport kinetics in rat skeletal muscle related to fibre type and changes in transport capacity. *Pflugers Arch* **436**, 560–564.
- Kemp G, Young H & Fliegel L (2008). Structure and function of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Channels Austin Tex* **2**, 329–336.
- Kiessling K-H, Piehl K & Lundquist C-G (1971). Effect of Physical Training on Ultrastructural Features in Human Skeletal Muscle. In *Muscle Metabolism During Exercise*, ed. Pernow B & Saltin B, pp. 97–101. Springer US, Boston, MA. Available at: http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4613-4609-8_9.pdf [Accessed July 26, 2013].
- Kindermann W, Keul J & Huber G (1977). Physical exercise after induced alkalosis (bicarbonate or tris-buffer). *Eur J Appl Physiol* **37**, 197–204.
- Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN & Halestrap AP (2000). CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* **19**, 3896–3904.
- Klier M, Andes FT, Deitmer JW & Becker HM (2014). Intracellular and extracellular carbonic anhydrases cooperate non-enzymatically to enhance activity of monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* **289**, 2765–2775.
- Knez WL, Coombes JS & Jenkins DG (2006). Ultra-endurance exercise and oxidative damage : implications for cardiovascular health. *Sports Med Auckl NZ* **36**, 429–441.

- Kolkhorst FW, Rezende RS, Levy SS & Buono MJ (2004). Effects of sodium bicarbonate on VO₂ kinetics during heavy exercise. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 1895–1899.
- Kristensen JM, Kristensen M & Juel C (2004a). Expression of Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter proteins (NBCs) in rat and human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **182**, 69–76.
- Kristensen JM, Kristensen M & Juel C (2004b). Expression of Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter proteins (NBCs) in rat and human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **182**, 69–76.
- Kyte J & Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105–132.
- Lamb GD, Stephenson DG, Bangsbo J & Juel C (2006). Point:Counterpoint: Lactic acid accumulation is an advantage/disadvantage during muscle activity. *J Appl Physiol* **100**, 1410–1412.
- Lamb GD & Westerblad H (2011). Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. *J Physiol* **589**, 2119–2127.
- Launikonis BS, Zhou J, Santiago D, Brum G & Ríos E (2006). The changes in Ca²⁺ sparks associated with measured modifications of intra-store Ca²⁺ concentration in skeletal muscle. *J Gen Physiol* **128**, 45–54.
- Lavender G & Bird SR (1989). Effect of sodium bicarbonate ingestion upon repeated sprints. *Br J Sports Med* **23**, 41–45.
- Leek BT, Mudaliar SR, Henry R, Mathieu-Costello O & Richardson RS (2001). Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R441–447.
- Liang H & Ward WF (2006). PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* **30**, 145–151.
- Liistro G, Vanwelde C, Vincken W, Vandevoorde J, Verleden G, Buffels J & COPD Advisory Board (2006). Technical and functional assessment of 10 office spirometers: A multicenter comparative study. *Chest* **130**, 657–665.
- Lin RY, Vera JC, Chaganti RS & Golde DW (1998). Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem* **273**, 28959–28965.
- Lindh AM, Peyrebrune MC, Ingham SA, Bailey DM & Folland JP (2008). Sodium bicarbonate improves swimming performance. *Int J Sports Med* **29**, 519–523.
- Lindinger MI, Franklin TW, Lands LC, Pedersen PK, Welsh DG & Heigenhauser GJ (1999). Role of skeletal muscle in plasma ion and acid-base regulation after NaHCO₃ and KHCO₃ loading in humans. *Am J Physiol* **276**, R32–43.
- Lindinger MI & Heigenhauser GJ (2008). Last word on point:counterpoint: lactate is/is not the only physicochemical contributor to the acidosis of exercise. *J Appl Physiol* **105**, 369.
- Lindinger MI, Heigenhauser GJ & Spriet LL (1990). Effects of alkalosis on muscle ions at rest and with intense exercise. *Can J Physiol Pharmacol* **68**, 820–829.
- Lindinger MI & Heigenhauser GJF (2012). Effects of gas exchange on acid-base balance. *Compr Physiol* **2**, 2203–2254.
- Linnarsson D (1974). Dynamics of pulmonary gas exchange and heart rate changes at start and end of exercise. *Acta Physiol Scand Suppl* **415**, 1–68.
- Little JP, Safdar A, Bishop D, Tarnopolsky MA & Gibala MJ (2011). An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1 α and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1303–1310.
- Little JP, Safdar A, Cermak N, Tarnopolsky MA & Gibala MJ (2010). Acute endurance exercise increases the nuclear abundance of PGC-1 α in trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R912–917.

- Lodi R, Muntoni F, Taylor J, Kumar S, Sewry CA, Blamire A, Styles P & Taylor DJ (1997). Correlative MR imaging and 31P-MR spectroscopy study in sarcoglycan deficient limb girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD* **7**, 505–511.
- Lomax ME & McConnell AK (2003). Inspiratory muscle fatigue in swimmers after a single 200 m swim. *J Sports Sci* **21**, 659–664.
- Lowell BB & Shulman GI (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* **307**, 384–387.
- Lwow F, Dunajska K, Tworowska U, Jedrzejuk D, Laczmański L, Milewicz A & Szmigiero L (2007). Post-exercise oxidative stress and obesity in postmenopausal women: the role of beta3-adrenergic receptor polymorphism. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* **23**, 597–603.
- Mannion AF, Jakeman PM & Willan PL (1993). Determination of human skeletal muscle buffer value by homogenate technique: methods of measurement. *J Appl Physiol* **75**, 1412–1418.
- Margaritis I, Tessier F, Richard MJ & Marconnet P (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* **18**, 186–190.
- Marx JO, Gordon SE, Vos NH, Nindl BC, Gómez AL, Volek JS, Pedro J, Ratamess N, Newton RU, French DN, Rubin MR, Häkkinen K & Kraemer WJ (2002). Effect of alkalosis on plasma epinephrine responses to high intensity cycle exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* **87**, 72–77.
- Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L & Della Valle G (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fit* **37**, 235–239.
- Mastaloudis A, Leonard SW & Traber MG (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* **31**, 911–922.
- Matsuura R, Arimitsu T, Kimura T, Yunoki T & Yano T (2007). Effect of oral administration of sodium bicarbonate on surface EMG activity during repeated cycling sprints. *Eur J Appl Physiol* **101**, 409–417.
- Maughan R & Aulin KP (1997). Energy costs of physical activity. *World Rev Nutr Diet* **82**, 18–32.
- Mazzeo RS, Brooks GA, Schoeller DA & Budinger TF (1986). Disposal of blood [1-13C]lactate in humans during rest and exercise. *J Appl Physiol* **60**, 232–241.
- Mc Naughton L & Thompson D (2001). Acute versus chronic sodium bicarbonate ingestion and anaerobic work and power output. *J Sports Med Phys Fitness* **41**, 456–462.
- McAnulty S, McAnulty L, Nieman D, Morrow J, Dumke C & Utter A (2007). Carbohydrate effect: hormone and oxidative changes. *Int J Sports Med* **28**, 921–927.
- McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Utter AC, Henson DA, Dumke CL & Vinci DM (2003). Influence of carbohydrate ingestion on oxidative stress and plasma antioxidant potential following a 3 h run. *Free Radic Res* **37**, 835–840.
- McArdle A & Jackson MJ (2000). Exercise, oxidative stress and ageing. *J Anat* **197 Pt 4**, 539–541.
- McArdle WD, Katch FI & Katch VL (2010). *Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance*. Lippincott Williams & Wilkins.
- McClelland GB, Khanna S, Gonzalez GF, Butz CE & Brooks GA (2003). Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 130–135.
- McCullagh KJ, Poole RC, Halestrap AP, O'Brien M & Bonen A (1996). Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *Am J Physiol* **271**, E143–50.

- McCully KK, Authier B, Olive J & Clark BJ 3rd (2002). Muscle fatigue: the role of metabolism. *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appliquée* **27**, 70–82.
- McDermott JC & Bonen A (1994). Lactate transport in rat sarcolemmal vesicles and intact skeletal muscle, and after muscle contraction. *Acta Physiol Scand* **151**, 17–28.
- McKenna MJ, Bangsbo J & Renaud J-M (2008). Muscle K⁺, Na⁺, and Cl⁻ disturbances and Na⁺-K⁺ pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **104**, 288–295.
- McNaughton LR (1992). Bicarbonate ingestion: effects of dosage on 60 s cycle ergometry. *J Sports Sci* **10**, 415–423.
- McNaughton LR, Siegler J & Midgley A (2008). Ergogenic effects of sodium bicarbonate. *Curr Sports Med Rep* **7**, 230–236.
- Medbø JJ & Tabata I (1989). Relative importance of aerobic and anaerobic energy release during short-lasting exhausting bicycle exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **67**, 1881–1886.
- Mendez-Villanueva A, Edge J, Suriano R, Hamer P & Bishop D (2012). The recovery of repeated-sprint exercise is associated with PCr resynthesis, while muscle pH and EMG amplitude remain depressed. *PloS One* **7**, e51977.
- Messonnier L, Kristensen M, Juel C & Denis C (2007). Importance of pH regulation and lactate/H⁺ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *J Appl Physiol*.
- Metzger JM & Fitts RH (1987). Role of intracellular pH in muscle fatigue. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **62**, 1392–1397.
- Miller JD, Smith CA, Hemauer SJ & Dempsey JA (2007). The effects of inspiratory intrathoracic pressure production on the cardiovascular response to submaximal exercise in health and chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H580–592.
- Millet G (2009). [Physiological differences between cycling and running]. *Rev Médicale Suisse* **5**, 1564–1567.
- MITCHELL P (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148.
- Mitchelson KR & Hird FJ (1973). Effect of pH and halothane on muscle and liver mitochondria. *Am J Physiol* **225**, 1393–1398.
- Miyachi M & Katayama K (1999). Effects of maximal interval training on arterial oxygen desaturation and ventilation during heavy exercise. *Jpn J Physiol* **49**, 401–407.
- Mohr M, Krstrup P, Nielsen JJ, Nybo L, Rasmussen MK, Juel C & Bangsbo J (2007). Effect of two different intense training regimens on skeletal muscle ion transport proteins and fatigue development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1594–602.
- Van Montfoort MC, Van Dieren L, Hopkins WG & Shearman JP (2004). Effects of ingestion of bicarbonate, citrate, lactate, and chloride on sprint running. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 1239–1243.
- Montpetit RR (1990). Applied physiology of squash. *Sports Med Auckl NZ* **10**, 31–41.
- Mortensen SP, Damsgaard R, Dawson EA, Secher NH & González-Alonso J (2008). Restrictions in systemic and locomotor skeletal muscle perfusion, oxygen supply and VO₂ during high-intensity whole-body exercise in humans. *J Physiol* **586**, 2621–2635.
- Muller FL, Liu Y & Van Remmen H (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **279**, 49064–49073.
- Myburgh KH (2004). Can any metabolites partially alleviate fatigue manifestations at the cross-bridge? *Med Sci Sports Exerc* **36**, 20–27.

- Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K & Kanazawa H (2005). Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem* **280**, 1561–1572.
- Nevill ME, Boobis LH, Brooks S & Williams C (1989). Effect of training on muscle metabolism during treadmill sprinting. *J Appl Physiol* **67**, 2376–2382.
- Nielsen HB (1999). pH after competitive rowing: the lower physiological range? *Acta Physiol Scand* **165**, 113–114.
- Nielsen HB (2003). Arterial desaturation during exercise in man: implication for O₂ uptake and work capacity. *Scand J Med Sci Sports* **13**, 339–358.
- Nielsen HB, Bredmose PP, Stromstad M, Volianitis S, Quistorff B & Secher NH (2002). Bicarbonate attenuates arterial desaturation during maximal exercise in humans. *J Appl Physiol* **93**, 724–731.
- Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Ahmed A & Heward CB (2004). Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 1328–1335.
- Nikooie R, Rajabi H, Gharakhanlu R, Atabi F, Omidfar K, Aveseh M & Larijani B (2013). Exercise-induced changes of MCT1 in cardiac and skeletal muscles of diabetic rats induced by high-fat diet and STZ. *J Physiol Biochem* **69**, 865–877.
- Nosek TM, Fender KY & Godt RE (1987). It is diprotonated inorganic phosphate that depresses force in skinned skeletal muscle fibers. *Science* **236**, 191–193.
- Nummela A & Rusko H (1995). Time course of anaerobic and aerobic energy expenditure during short-term exhaustive running in athletes. *Int J Sports Med* **16**, 522–527.
- Nummela A, Vuorimaa T & Rusko H (1992). Changes in force production, blood lactate and EMG activity in the 400-m sprint. *J Sports Sci* **10**, 217–228.
- Okuno NM, Tricoli V, Silva SBC, Bertuzzi R, Moreira A & Kiss MAPDM (2013). Postactivation potentiation on repeated-sprint ability in elite handball players. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **27**, 662–668.
- Orlowski J, Kandasamy RA & Shull GE (1992). Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* **267**, 9331–9339.
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA & Mootha VK (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* **134**, 112–123.
- Palazzetti S, Richard M-J, Favier A & Margaritis I (2003). Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appliquée* **28**, 588–604.
- Parkhouse WS & McKenzie DC (1984). Possible contribution of skeletal muscle buffers to enhanced anaerobic performance: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* **16**, 328–338.
- Parkhouse WS, McKenzie DC, Hochachka PW & Ovalle WK (1985). Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. *J Appl Physiol* **58**, 14–17.
- Parry-Billings M & MacLaren DP (1986). The effect of sodium bicarbonate and sodium citrate ingestion on anaerobic power during intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol* **55**, 524–529.
- Passarella S, de Bari L, Valenti D, Pizzuto R, Paventi G & Atlante A (2008). Mitochondria and L-lactate metabolism. *FEBS Lett* **582**, 3569–3576.
- Pedersen TH, Nielsen OB, Lamb GD & Stephenson DG (2004). Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science* **305**, 1144–1147.

- Perez-Schindler J, Phil A & Baar K (2009). Sodium bicarbonate increases glucose uptake and mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes potentially via the transcriptional co-activator PGC-1 α (Abstract). *Proc Physiol Soc* **14**, PC44.
- Peronnet F & Aguilaniu B (2006). Lactic acid buffering, nonmetabolic CO₂ and exercise hyperventilation: A critical reappraisal. *Respir Physiol Neurobiol* **150**, 4–18.
- Perrey S, Candau R, Millet GY, Borrani F & Rouillon JD (2002). Decrease in oxygen uptake at the end of a high-intensity submaximal running in humans. *Int J Sports Med* **23**, 298–304.
- Perry CGR, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJF, Bonen A & Spriet LL (2010). Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol* **588**, 4795–4810.
- Peters J, Fraser C, Stuart RS, Baumgartner W & Robotham JL (1989). Negative intrathoracic pressure decreases independently left ventricular filling and emptying. *Am J Physiol* **257**, H120–131.
- Philp NJ, Ochrietor JD, Rudoy C, Muramatsu T & Linser PJ (2003). Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1305–1311.
- Pilegaard H & Asp S (1998). Effect of prior eccentric contractions on lactate/H⁺ transport in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **274**, E554–9.
- Pilegaard H, Bangsbo J, Richter EA & Juel C (1994). Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J Appl Physiol* **77**, 1858–1862.
- Pilegaard H, Domino K, Noland T, Juel C, Hellsten Y, Halestrap AP & Bangsbo J (1999a). Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **276**, E255–61.
- Pilegaard H & Juel C (1995). Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rat skeletal muscles: effect of denervation. *Am J Physiol* **269**, E679–82.
- Pilegaard H, Terzis G, Halestrap A & Juel C (1999b). Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **276**, E843–8.
- Poulsen HE, Loft S & Vistisen K (1996). Extreme exercise and oxidative DNA modification. *J Sports Sci* **14**, 343–346.
- Price M, Moss P & Rance S (2003). Effects of sodium bicarbonate ingestion on prolonged intermittent exercise. *Med Sci Sports Exerc* **35**, 1303–1308.
- Pushkin A, Abuladze N, Gross E, Newman D, Tatischev S, Lee I, Fedotoff O, Bondar G, Azimov R, Ngyuen M & Kurtz I (2004). Molecular mechanism of kNBC1-carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells. *J Physiol* **559**, 55–65.
- Pushkin A, Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J & Kurtz I (1999). Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem* **274**, 16569–16575.
- Radák Z, Apor P, Pucsok J, Berkes I, Ogonovszky H, Pavlik G, Nakamoto H & Goto S (2003a). Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci* **72**, 1627–1633.
- Radák Z, Ogonovszky H, Dubecz J, Pavlik G, Sasvari M, Pucsok J, Berkes I, Csont T & Ferdinandy P (2003b). Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest* **33**, 726–730.

- Radák Z, Pucsuk J, Boros S, Jوسفai L & Taylor AW (2000). Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Sci* **66**, 1763–1767.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H & Goto S (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* **7**, 90–107.
- Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H & Atalay M (2013). Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1208–1246.
- Radzyukevich T & Edman K a. P (2004). Effects of intracellular acidification and varied temperature on force, stiffness, and speed of shortening in frog muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C106–113.
- Ranatunga KW (1987). Effects of acidosis on tension development in mammalian skeletal muscle. *Muscle Nerve* **10**, 439–445.
- Ratel S, Williams CA, Oliver J & Armstrong N (2006). Effects of Age and Recovery Duration on Performance During Multiple Treadmill Sprints. *Int J Sports Med* **27**, 1–8.
- Reaich D, Channon SM, Scrimgeour CM & Goodship TH (1992). Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *Am J Physiol* **263**, E735–739.
- Requena B, Zabala M, Padial P & Ferliche B (2005). Sodium bicarbonate and sodium citrate: ergogenic aids? *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **19**, 213–224.
- Rico-Sanz J (2003). Progressive decrease of intramyocellular accumulation of H⁺ and Pi in human skeletal muscle during repeated isotonic exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1490–6.
- Riggs TE, Shafer AW & Guenter CA (1973). Acute changes in oxyhemoglobin affinity. Effects on oxygen transport and utilization. *J Clin Invest* **52**, 2660–2663.
- Robergs RA, Ghiasvand F & Parker D (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R502–16.
- Röcker K, Striegel H, Freund T & Dickhuth HH (1994). Relative functional buffering capacity in 400-meter runners, long-distance runners and untrained individuals. *Eur J Appl Physiol* **68**, 430–434.
- Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, Milan G, Masiero E, Del Piccolo P, Foretz M, Scorrano L, Rudolf R & Sandri M (2010). Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J* **29**, 1774–1785.
- Romer LM, Lovering AT, Haverkamp HC, Pegelow DF & Dempsey JA (2006). Effect of inspiratory muscle work on peripheral fatigue of locomotor muscles in healthy humans. *J Physiol* **571**, 425–439.
- Rösler K, Hoppeler H, Conley KE, Claassen H, Gehr P & Howald H (1985). Transfer effects in endurance exercise. Adaptations in trained and untrained muscles. *Eur J Appl Physiol* **54**, 355–362.
- Roth DA & Brooks GA (1990). Lactate and pyruvate transport is dominated by a pH gradient-sensitive carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *Arch Biochem Biophys* **279**, 386–394.
- Roussel D, Lhenry F, Ecochard L, Sempore B, Rouanet JL & Favier R (2000). Differential effects of endurance training and creatine depletion on regional mitochondrial adaptations in rat skeletal muscle. *Biochem J* **350 Pt 2**, 547–553.
- Roy D, Johannsson E, Bonen A & Marette A (1997). Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT-4 to T tubules in skeletal muscle. *Am J Physiol* **273**, E688–94.

- Saborido A, Naudí A, Portero-Otín M, Pamplona R & Megías A (2011). Stanozolol treatment decreases the mitochondrial ROS generation and oxidative stress induced by acute exercise in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* **110**, 661–669.
- Sahlin K (1992). Metabolic factors in fatigue. *Sports Med* **13**, 99–107.
- Sahlin K (2008). Response to point:counterpoint on “lactic acid.” *J Appl Physiol* **105**, 366.
- Sahlin K, Alvestrand A, Brandt R & Hultman E (1978). Acid-base balance in blood during exhaustive bicycle exercise and the following recovery period. *Acta Physiol Scand* **104**, 370–372.
- Sahlin K, Harris RC, Ny Lind B & Hultman E (1976). Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise. *Pflugers Arch* **367**, 143–149.
- Sahlin K & Henriksson J (1984). Buffer capacity and lactate accumulation in skeletal muscle of trained and untrained men. *Acta Physiol Scand* **122**, 331–339.
- Sahlin K & Ren JM (1989). Relationship of contraction capacity to metabolic changes during recovery from a fatiguing contraction. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **67**, 648–654.
- Saunders B, Sale C, Harris RC & Sunderland C (2013). Sodium Bicarbonate and High-Intensity Cycling Capacity: Variability in Responses. *Int J Sports Physiol Perform*.
- Schiffel C, Zieres C & Zankl H (1997). Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutat Res* **389**, 243–246.
- Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann K-H, Marx M, Gschwend JE, Bucholz M, Gress TM, Seufferlein T, Adler G & Oswald F (2009). CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. *Gut* **58**, 1391–1398.
- Schrauwen-Hinderling VB, Roden M, Kooi ME, Hesselink MK & Schrauwen P (2007). Muscular mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**, 698–703.
- Schueler C, Becker HM, McKenna R & Deitmer JW (2011). Transport activity of the sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is enhanced by different isoforms of carbonic anhydrase. *PLoS One* **6**, e27167.
- Sejersted OM & Sjøgaard G (2000). Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* **80**, 1411–1481.
- Sen CK (2001). Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med Auckl NZ* **31**, 891–908.
- Serpiello FR, McKenna MJ, Bishop DJ, Aughey RJ, Caldwell MK, Cameron-Smith D & Stepto NK (2012). Repeated sprints alter signaling related to mitochondrial biogenesis in humans. *Med Sci Sports Exerc* **44**, 827–834.
- Sieck GC & Prakash YS (1995). Fatigue at the neuromuscular junction. Branch point vs. presynaptic vs. postsynaptic mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **384**, 83–100.
- Siegler JC & Gleadall-Siddall DO (2010). Sodium bicarbonate ingestion and repeated swim sprint performance. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **24**, 3105–3111.
- Siegler JC & Hirscher K (2010). Sodium bicarbonate ingestion and boxing performance. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **24**, 103–108.
- Siegler JC, Midgley AW, Polman RCJ & Lever R (2010). Effects of various sodium bicarbonate loading protocols on the time-dependent extracellular buffering profile. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **24**, 2551–2557.
- Sies H, Stahl W & Sevanian A (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* **135**, 969–972.
- Smith DO (1980). Mechanisms of action potential propagation failure at sites of axon branching in the crayfish. *J Physiol* **301**, 243–259.
- Soderlund K, Greenhaff PL & Hultman E (1992). Energy metabolism in type I and type II human muscle fibres during short term electrical stimulation at different frequencies. *Acta Physiol Scand* **144**, 15–22.

- Soleimani M & Burnham CE (2001). Na⁺:HCO₃⁻ cotransporters (NBC): cloning and characterization. *J Membr Biol* **183**, 71–84.
- Spriet LL, Lindinger MI, McKelvie RS, Heigenhauser GJ & Jones NL (1989). Muscle glycogenolysis and H⁺ concentration during maximal intermittent cycling. *J Appl Physiol* **66**, 8–13.
- Spriet LL, Söderlund K, Bergström M & Hultman E (1987a). Skeletal muscle glycogenolysis, glycolysis, and pH during electrical stimulation in men. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **62**, 616–621.
- Spriet LL, Söderlund K, Bergström M & Hultman E (1987b). Anaerobic energy release in skeletal muscle during electrical stimulation in men. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **62**, 611–615.
- Srere PA (1969). [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In *Methods in Enzymology*, ed. John M. Lowenstein, Citric Acid Cycle, pp. 3–11. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687969130050> [Accessed August 30, 2014].
- Stark-Leyva KN, Beck KC & Johnson BD (2004). Influence of expiratory loading and hyperinflation on cardiac output during exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **96**, 1920–1927.
- Stephens TJ, McKenna MJ, Canny BJ, Snow RJ & McConell GK (2002). Effect of sodium bicarbonate on muscle metabolism during intense endurance cycling. *Med Sci Sports Exerc* **34**, 614–621.
- Stewart PA (1981). How to understand acid-base. *Quant Acid-Base Primer Biol Med New York (NY): Elsevier*, 1–186.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R & Spiegelman BM (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**, 397–408.
- Street D, Nielsen J-J, Bangsbo J & Juel C (2005). Metabolic alkalosis reduces exercise-induced acidosis and potassium accumulation in human skeletal muscle interstitium. *J Physiol* **566**, 481–489.
- Stridh MH, Alt MD, Wittmann S, Heidtmann H, Aggarwal M, Riederer B, Seidler U, Wennemuth G, McKenna R, Deitmer JW & Becker HM (2012). Lactate flux in astrocytes is enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J Physiol* **590**, 2333–2351.
- Suzuki Y, Ito O, Takahashi H & Takamatsu K (2004). The Effect of Sprint Training on Skeletal Muscle Carnosine in Humans. *Int J Sport Health Sci* **2**, 105–110.
- Svensson M, Malm C, Tonkonogi M, Ekblom B, Sjödin B & Sahlin K (1999). Effect of Q10 supplementation on tissue Q10 levels and adenine nucleotide catabolism during high-intensity exercise. *Int J Sport Nutr* **9**, 166–180.
- Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguiló A, Rodríguez-Marroyo JA, Villa G, Tur JA & Pons A (2006). Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem* **17**, 665–671.
- Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T & Mercier J (2007). Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E916–22.
- Thomas C, Bishop DJ, Lambert K, Mercier J & Brooks GA (2012). Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4 contents in human skeletal muscles: current status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**, R1–14.

- Thomas C, Hanon C, Perrey S, Le Chevalier JM, Couturier A & Vandewalle H (2005a). Oxygen uptake response to an 800-m running race. *Int J Sports Med* **26**, 268–273.
- Thomas C, Perrey S, Lambert K, Hugon G, Mornet D & Mercier J (2005b). Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. *J Appl Physiol* **98**, 804–809.
- Thompson LV, Balog EM, Riley DA & Fitts RH (1992). Muscle fatigue in frog semitendinosus: alterations in contractile function. *Am J Physiol* **262**, C1500–1506.
- Thorens B & Mueckler M (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **298**, E141–E145.
- Tiryaki GR & Atterbom HA (1995). The effects of sodium bicarbonate and sodium citrate on 600 m running time of trained females. *J Sports Med Phys Fitness* **35**, 194–198.
- Tonkonogi M, Harris B & Sahlin K (1997). Increased activity of citrate synthase in human skeletal muscle after a single bout of prolonged exercise. *Acta Physiol Scand* **161**, 435–436.
- Tonkonogi M & Sahlin K (1999). Actively phosphorylating mitochondria are more resistant to lactic acidosis than inactive mitochondria. *Am J Physiol* **277**, C288–293.
- Tonkonogi M, Walsh B, Tiivel T, Saks V & Sahlin K (1999). Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. *Pflüg Arch Eur J Physiol* **437**, 562–568.
- Tonouchi M, Hatta H & Bonen A (2002). Muscle contraction increases lactate transport while reducing sarcolemmal MCT4, but not MCT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1062–9.
- Toubekis AG, Douda HT & Tokmakidis SP (2005). Influence of different rest intervals during active or passive recovery on repeated sprint swimming performance. *Eur J Appl Physiol* **93**, 694–700.
- Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY, Hsu CF & Kong CW (2001). Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med* **31**, 1465–1472.
- Vanhatalo A, McNaughton LR, Siegler J & Jones AM (2010). Effect of induced alkalosis on the power-duration relationship of “all-out” exercise. *Med Sci Sports Exerc* **42**, 563–570.
- Vasilaki A, Mansouri A, Remmen H, van der Meulen JH, Larkin L, Richardson AG, McArdle A, Faulkner JA & Jackson MJ (2006). Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell* **5**, 109–117.
- Virkki LV, Wilson DA, Vaughan-Jones RD & Boron WF (2002). Functional characterization of human NBC4 as an electrogenic Na⁺-HCO cotransporter (NBCe2). *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C1278–1289.
- Volianitis S, McConnell AK, Koutedakis Y, McNaughton L, Backx K & Jones DA (2001). Inspiratory muscle training improves rowing performance. *Med Sci Sports Exerc* **33**, 803–809.
- Vollaard NBJ, Shearman JP & Cooper CE (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med Auckl NZ* **35**, 1045–1062.
- Walsh B, Tiivel T, Tonkonogi M & Sahlin K (2002). Increased concentrations of P(i) and lactic acid reduce creatine-stimulated respiration in muscle fibers. *J Appl Physiol* **92**, 2273–2276.
- Wasserman K & Whipp BJ (1975). Exercise physiology in health and disease. *Am Rev Respir Dis* **112**, 219–249.
- Watt MJ, Southgate RJ, Holmes AG & Febbraio MA (2004). Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta

- and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *J Mol Endocrinol* **33**, 533–544.
- Westerblad H & Allen DG (1992). Changes of intracellular pH due to repetitive stimulation of single fibres from mouse skeletal muscle. *J Physiol* **449**, 49–71.
- Westerblad H & Allen DG (1993). The influence of intracellular pH on contraction, relaxation and $[Ca^{2+}]_i$ in intact single fibres from mouse muscle. *J Physiol* **466**, 611–628.
- Westerblad H, Allen DG & Lannergren J (2002). Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol Sci* **17**, 17–21.
- Westerblad H, Bruton JD & Lannergren J (1997a). The effect of intracellular pH on contractile function of intact, single fibres of mouse muscle declines with increasing temperature. *J Physiol* **500 (Pt 1)**, 193–204.
- Westerblad H, Lannergren J & Allen DG (1997b). Slowed relaxation in fatigued skeletal muscle fibers of *Xenopus* and Mouse. Contribution of $[Ca^{2+}]_i$ and cross-bridges. *J Gen Physiol* **109**, 385–399.
- Wicks KL & Hood DA (1991). Mitochondrial adaptations in denervated muscle: relationship to muscle performance. *Am J Physiol* **260**, C841–850.
- Williams JH & Ward CW (1992). Reduced Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum at low pH. *Can J Physiol Pharmacol* **70**, 926–930.
- Wilson MC, Jackson VN, Heddle C, Price NT, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter OF & Halestrap AP (1998). Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J Biol Chem* **273**, 15920–15926.
- Wilson MC, Meredith D, Fox JEM, Manoharan C, Davies AJ & Halestrap AP (2005). Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem* **280**, 27213–27221.
- Wolosker H, Rocha JB, Engelender S, Panizzutti R, De Miranda J & de Meis L (1997). Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoforms: diverse responses to acidosis. *Biochem J* **321 (Pt 2)**, 545–550.
- Wright DC, Han D-H, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE & Holloszy JO (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* **282**, 194–199.
- Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC & McMillin JB (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11399–11404.
- Xu X & Arriaga EA (2009). Qualitative Determination of Superoxide Release at Both Sides of the Mitochondrial Inner Membrane by Capillary Electrophoretic Analysis of the Oxidation Products of Triphenylphosphonium Hydroethidine. *Free Radic Biol Med* **46**, 905–913.
- Yamamoto M & Kanehisa H (1995). Dynamics of anaerobic and aerobic energy supplies during sustained high intensity exercise on cycle ergometer. *Eur J Appl Physiol* **71**, 320–325.
- Yoshida Y, Holloway GP, Ljubicic V, Hatta H, Spriet LL, Hood DA & Bonen A (2007). Negligible direct lactate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria obtained from red and white rat skeletal muscle. *J Physiol* **582**, 1317–1335.

- Zabala M, Peinado AB, Calderón FJ, Sampedro J, Castillo MJ & Benito PJ (2011). Bicarbonate ingestion has no ergogenic effect on consecutive all out sprint tests in BMX elite cyclists. *Eur J Appl Physiol* **111**, 3127–3134.
- Zabala M, Requena B, Sánchez-Muñoz C, González-Badillo JJ, García I, Oöpik V & Pääsuke M (2008). Effects of sodium bicarbonate ingestion on performance and perceptual responses in a laboratory-simulated BMX cycling qualification series. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* **22**, 1645–1653.
- Zamparo P, Capelli C & Guerrini G (1999). Energetics of kayaking at submaximal and maximal speeds. *Eur J Appl Physiol* **80**, 542–548.
- Zarkovic N (2003). 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* **24**, 281–291.
- Zoladz JA, Szkutnik Z, Duda K, Majerczak J & Korzeniewski B (2005). Preexercise metabolic alkalosis induced via bicarbonate ingestion accelerates Vo₂ kinetics at the onset of a high-power-output exercise in humans. *J Appl Physiol* **98**, 895–904.

Partie VII. ANNEXES

A. Annexe n° 1.

Hanon et al. *SpringerPlus* 2013, **2**:651
<http://www.springerplus.com/content/2/1/651>

 SpringerPlus
a SpringerOpen Journal

RESEARCH

Open Access

Prevalence of cardio-respiratory factors in the occurrence of the decrease in oxygen uptake during supra-maximal, constant-power exercise

Christine Hanon^{1*}, Sylvain Dorel^{1,2}, Rémi Delfour-Peyrethron^{1,2}, Pierre-Marie Leprêtre³, David J Bishop⁵, Stéphane Perrey⁴ and Claire Thomas^{1,6}

Abstract

Purpose: To investigate the physiological mechanisms that explain the end-exercise decrease in oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) during strenuous constant-power exercise, we recruited eleven trained, track cyclists.

Methods: On two separated days they performed 1) resting spirometric measures, followed by an incremental test on a cycle ergometer to determine the power output at $\dot{V}O_{2max}$ ($P-\dot{V}O_{2max}$) and 2) an exhaustive isokinetic supramaximal cycling exercise ($Tlim_{supra}$) at $185 \pm 24\%$ of $P-\dot{V}O_{2max}$ (i.e., 640.5 ± 50.8 W). During cycling exercise tests, $\dot{V}O_2$, ventilation parameters, stroke volume (SV) and heart rate were continuously recorded. Furthermore, arterialed capillary blood samples were collected to measure blood pH, arterial oxygen saturation, lactate and bicarbonate concentration before and 5 min after $Tlim_{supra}$.

Results: A $> 5\%$ decrease in $\dot{V}O_2$ and/or SV was observed in 6 subjects, with 5 out of 6 subjects presenting both phenomena. The magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease was correlated with the magnitude of the SV decrease ($R = 0.75$, $P < 0.01$), the peak-exercise end-tidal O_2 partial pressure ($R = 0.80$, $P < 0.005$) and the resting, forced expiratory volume in 1 s ($R = 0.72$, $P < 0.05$), but not with any blood variables. The significant post- $Tlim_{supra}$ decrease in forced vital capacity and forced inspiratory volume corroborate with a possible respiratory muscle fatigue.

Conclusion: Based on these findings, we demonstrate that the occurrence of $\dot{V}O_2$ decrease in more than half of our subjects, during a strenuous constant-power exercise leading to a mild-acidosis ($pH = 7.21 \pm 0.04$), results mainly from cardio-respiratory factors and not from blood metabolic responses.

Keywords: High-intensity exercise; Oxygen consumption; Acidosis; Cardio-respiratory parameters

Background

A significant decrease in whole-body pulmonary oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) at the end of supra-maximal running exercise in the field has been reported (Billat et al. 2009, Hanon et al. 2010; Thomas et al. 2005). Of note, the $\dot{V}O_2$ decrease was concomitant with a decrease in running velocity that could logically be considered as one of the explanations for this phenomenon. However, it is important to note that (i) the $\dot{V}O_2$ decrease was proportionally larger than the drop in running velocity (Hanon and Thomas 2011) and (ii) the final velocity was always

greater than the velocity associated with the maximal $\dot{V}O_2$ ($\dot{V}O_{2max}$) of each subject (Hanon and Thomas 2011). Additionally, researchers have also observed a $\dot{V}O_2$ decrease during exhaustive treadmill exercise performed at a constant intensity (Nummela and Rusko 1995), (Perrey et al. 2002). An important unresolved physiological question therefore, is what are the mechanisms that contribute to this phenomenon?

Gathering their 400-, 800- and 1500-m data, Hanon et al. (Hanon and Thomas 2011), established correlations between the peak blood lactate concentration ([La]) ($R = 0.55$, $P < 0.05$) and the magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease, and between the 300-m intermediate pH value and the 400-m final $\dot{V}O_2$ ($R = 0.86$) (Hanon et al. 2010).

* Correspondence: christine.hanon@insep.fr

¹French National Institute of Sports (INSEP), Research Department, Laboratory of Sport, Expertise and Performance, 11 Tremblay Avenue, 75012 Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Hanon et al.; licensee Springer. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Low blood pH values reduce the affinity of O₂ to haemoglobin and contribute to an exercise-induced arterial hypoxemia (EIAH). Harms et al. (Harms et al. 2000) stated that $\dot{V}O_2$ appears to decrease by 2% for each 1% decrease of arterial O₂ saturation (SaO₂), at least when SaO₂ is less than 95%. Furthermore, acid–base disturbances have been shown to change the partial pressure at which carbon dioxide begins to stimulate breathing (Duffin 2005). The model simulations presented by this author (Duffin 2005) demonstrated the importance of the central strong ions difference (SID) in the regulation of breathing. Therefore, an altered acid–base balance in response to supra-maximal exercise may also contribute to disturbances in exercise ventilation, O₂ transport, and utilisation. Independent of changes in blood pH, increases in blood lactate levels have also been associated with decreases in oxygen supply (Rozier et al. 2007, Mortensen et al. 2007) and O₂ extraction (Poole et al. 1994). Therefore, large ionic and metabolic perturbations at the end of exhaustive supra-maximal exercise may affect O₂ transport and utilisation and contribute to the end-exercise $\dot{V}O_2$ decrease.

Concomitant with the decrease in $\dot{V}O_2$ observed during exercise performed at ~95% of $\dot{V}O_{2max}$, Perey et al. (Perrey et al. 2002) observed a decrease in minute ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T). Hanon & Thomas (Hanon and Thomas 2011) also reported a strong correlation between the V_T and $\dot{V}O_2$ responses observed in the last 100 m of 400-, 800-, and 1500-m races ($r=0.85$, $P<0.0001$), suggesting that respiratory response patterns may play a role in the $\dot{V}O_2$ decrease during the latter part of supra-maximal exercise. With little increase in alveolar O₂ pressure (PAO₂) during exercise, the pulmonary diffusion capacity becomes critical for the maintenance of arterial O₂ pressure (PaO₂) (Dempsey 2006), and large lungs appear to be an advantage when performing whole-body exercise (Nielsen 2003). On the other hand, large swings in thorax movement could present negative consequences such as excessive fluctuations in intra-thoracic pressures (Amann 2011) or extreme respiratory muscle work and fatigue (Aaron et al. 1992). Indeed, many studies having shown that the respiratory system might affect the quality of the O₂ transport during strenuous exercises (Nielsen 2003), it remains to test the contribution of end-exercise respiratory response on the $\dot{V}O_2$ decrease.

The significant $\dot{V}O_2$ decline observed in the last two minutes of a 5–10 min exhaustive test (Gonzalez-Alonso and Calbet 2003) has also been directly associated with the inability of the heart to maintain the rate of O₂ delivery to locomotive skeletal muscles. These authors emphasised that the mechanisms of fatigue which could explain the declining systemic O₂ delivery and $\dot{V}O_2$ during heavy exercise were complex, possibly involving

inhibitory signals that originated in different bodily tissues and organs. However, these authors did not concurrently measure changes in respiratory variables, and, further, it is not known if changes in cardiac parameters also contribute to the exercise-induced decrease in $\dot{V}O_2$ during supra-maximal exercise lasting less than 2 min. The link between resting lung volumes, exercise-induced cardio-respiratory responses on one hand, and the decrease in $\dot{V}O_2$ on the other, needs to be investigated.

Therefore, the main aims of this study were to identify the primary factors associated with the inability to maintain a high steady-state $\dot{V}O_2$ in healthy, trained subjects. To rule out the potential confounding influence of a decrease in velocity or power output, we chose a constant-work-load cycle exercise. The subjects were tested on a cycle ergometer in order to control the pedalling pattern as participants fatigued (i.e., to avoid a frequency and then a power decrease). We hypothesized that the impairment of both cardiac and respiratory function associated to metabolic perturbations would result in a $\dot{V}O_2$ decrease.

Results

The results are expressed as the group average, with corresponding statistical results, and for the main physiological variables, as the individual responses referenced as a letter (A to K).

Torque velocity and incremental tests

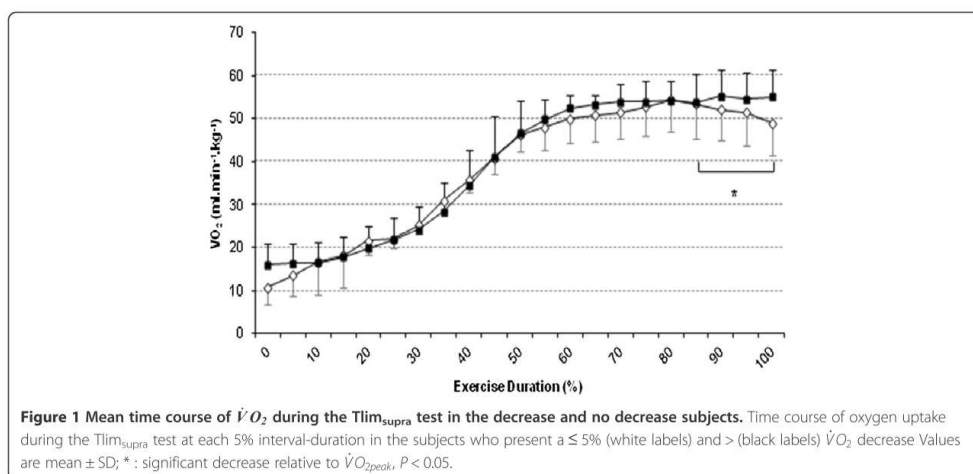
Mean values for P_{max} and f_{opt} were $1,318 \pm 191$ W and 121 ± 7 rpm, respectively. $\dot{V}O_{2max}$ and $P-\dot{V}O_{2max}$ corresponded to 4.2 ± 0.7 L.min⁻¹ (57.9 ± 6.9 mL.min⁻¹.kg⁻¹) and 350 ± 32 W, respectively. The maximal blood lactate value measured at the end of the incremental test was 13.1 ± 2.5 mmol.L⁻¹. Maximal CO, SV and HR were 25.1 ± 1.5 L.min⁻¹, 132.2 ± 13.2 mL.beat⁻¹ and 188 ± 10 beats.min⁻¹, respectively.

Tlim_{supra} test

The mean performance for Tlim_{supra} test was 51.4 ± 6.9 s (range from 43 to 65 s). During this test, a mean power ($P_{supra\Delta 30\%}$) of 641 ± 51 W was sustained at a mean pedalling rate of 109 ± 6 rpm; the mean power output corresponded to $185 \pm 24\%$ of $P-\dot{V}O_{2max}$ and $49 \pm 3.8\%$ of P_{max} .

Respiratory responses

The $\dot{V}O_{2peak}$ reached during the Tlim_{supra} test was equal to 55.0 ± 7.3 mL.min⁻¹.kg⁻¹ ($95.0 \pm 7.6\%$ of $\dot{V}O_{2max}$). Figure 1 displays the time course of the $\dot{V}O_2$ expressed relative to time for the eleven subjects. During Tlim_{supra}, a $\dot{V}O_{2peak}$ value was detected at 43.3 ± 5.3 s after the onset of the test

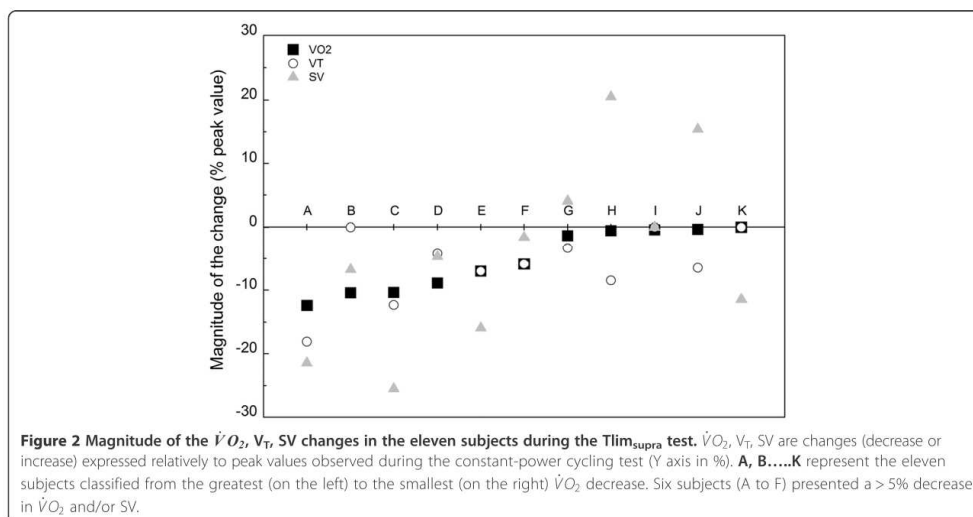


(~80% of the total test duration). From 80% of the total duration until the end of the test, average mean $\dot{V}O_2$ for the group, significantly decreased by $5.4 \pm 4.7\%$ of the $\dot{V}O_{2peak}$ ($P < 0.05$). The peak $VRMO_2$ value observed at the end of the exercise was 423.9 ± 96.7 mL.min⁻¹. This corresponded to $11.9 \pm 2.1\%$ (ranged from 8.6 to 15.0%) of the whole pulmonary oxygen uptake.

In 6 of our 11 subjects (subjects A, B, C, D, E, F in Figure 2), the decrease in $\dot{V}O_2$ was greater than 5%,

corresponding to $9.1 \pm 2.4\%$ of peak values. In the 5 other subjects (G, H, I, J, K), the decrease was between zero and 3.5% ($0.9 \pm 2.0\%$).

During the $Tlim_{supra}$, considering the peak (2.6 ± 0.5 L) and final values (2.4 ± 0.4 L), a global decrease in V_T corresponding to $5.9 \pm 5.6\%$ was found ($P < 0.05$) with no concomitant global decrease in RF and \dot{V}_E . This V_T decrease was observed in 7 subjects (Figure 2), whereas a decrease in RF and in \dot{V}_E (not presented in Figure 2)



was only observed in one (subject E) and 3 subjects (subjects A, E and J), respectively. The decrease in VT was $7.9 \pm 6.4\%$ in subjects who present a $\dot{V}O_2$ decrease (A to F) and $3.5 \pm 3.8\%$ in subjects G to K who present a $<5\%$ $\dot{V}O_2$ decrease. The difference between these two groups was significant ($P < 0.05$) with an effect size equivalent to 0.80.

The functional pulmonary data are presented in Table 1. The ICC for the FVC pre-tests was 0.95 (confidence interval: 0.88-0.98). The mean $P_{ET}O_2$ peak value was 122.2 ± 4.8 mmHg and VR was $89.8 \pm 10.5\%$ of the estimated MVV. The difference between the subjects who exhibited a $<$ or $>$ 5% $\dot{V}O_2$ decrease was significant ($P < 0.05$) for the pre-exercise values of FEV₁ with a corresponding effect size equivalent to 2.24.

The comparison between pre and post-Tlim_{supra} (Figure 3) data revealed a significant decrease in FEV₂₅, FIVC and FVC ($P < 0.05$).

Cardiac responses

HR values attained a steady-state value of 185 ± 11 beats.min⁻¹ ($98.4 \pm 5.0\%$ of IT maximal HR). The highest CO (25.0 ± 5.6 L.min⁻¹) and SV (140.3 ± 33.0 mL) mean values measured during Tlim_{supra} were not different from maximal values recorded during the IT. In 6 out of 11 subjects (A, B, C, D, E and K), a SV decrease of more than 5% was observed (Figure 2).

If we compare the decrease in SV in those subjects who present a $\dot{V}O_2$ decrease or not, the decrease values in SV were $17.7 \pm 12.3\%$ in subjects A to F and $3.8 \pm 8.4\%$ in subjects G to K. The difference between the two groups was significant ($P < 0.05$) with a corresponding effect size equivalent to 1.29.

Blood metabolic responses

The blood results measured before and after Tlim_{supra} are presented in Table 2. The peak values of [La], pH and [HCO₃]⁻ were obtained 5 min after the end of the exercise. The SaO₂ value measured immediately after stopping exercise was $92.5 \pm 2.7\%$.

Relationships between the $\dot{V}O_2$ decrease and metabolic, respiratory and cardio-dynamic data

The magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease was correlated with the $P_{ET}O_2$ peak values ($R = 0.80$, $P < 0.005$), and the correlation with the decrease in V_T approached significance ($R = 0.57$, $P = 0.06$). The magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease was also correlated with FEV₁ ($R = 0.72$, $P < 0.005$) and FEV₂₅ ($R = 0.73$, $P < 0.01$) measured at rest and post-exercise, respectively. The partial correlations between $\dot{V}O_2$ on one part and V_T, SV, $P_{ET}O_2$ and FEV₁ on the other part, were 0.52, ($P > 0.05$), 0.70, 0.78 and 0.71 ($P < 0.05$), respectively. As observed in Figure 2, 5 of the 6 subjects exhibiting a $\dot{V}O_2$ decrease also presented a SV decrease (expressed as a percentage of the peak value) (8.6 ± 9.9 mL.beat⁻¹), but the inverse was not verified with one subject (K) presenting a drop in SV without a $\dot{V}O_2$ decrease. Nevertheless, the relationship between the SV and $\dot{V}O_2$ decrease was significant ($R = 0.75$, $P < 0.01$). Significant correlations were also observed between SV decrease and both the peak value of $P_{ET}O_2$ ($R = -0.65$, $P < 0.05$) and the resting FEV₁ ($R = 0.73$, $P < 0.01$) as shown in Figure 4. No significant relationships ($P > 0.05$) were observed between the $\dot{V}O_2$ decrease and the blood data ([La] ($R = -0.45$), pH ($R = 0.10$), SaO₂ ($R = 0.14$) and [HCO₃]⁻ ($R = 0.24$)).

Discussion

A significant mean decrease in $\dot{V}O_2$ was observed in the last 20% of the total exercise duration. This decrease was greater than 5% of the peak value in 6 out of 11 subjects, with 5 of these 6 subjects also presenting a decrease in stroke volume. The correlations indicated that the magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease was linked with that of SV, and that both were negatively linked with respiratory parameters such as peak exercise end tidal O₂ partial pressure and resting forced expiratory volume in 1 s. The strong interrelations between cardiac and respiratory responses suggest that both contribute to the $\dot{V}O_2$ decrease during intense, supra-maximal cycling exercise. A significant post-exercise decrease in resting expiratory and inspiratory flow volumes was observed suggesting that there was also respiratory muscle fatigue.

Table 1 Mean (SD) spirometric data measured at rest (pre-test) and 3 min after exercise (post-test)

	Pre-test	Post-test	Post-test (%)
FVC	5.2 (0.8)	5.0 (0.8) *	96.4 (6.0)
FEV ₁ (L)	4.4 (0.6)	4.2 (0.7) †	95.5 (7.0)
FEV ₁ /FVC (%)	85.7 (7.6)	84.7 (8.9)	99.2 (9.7)
FIVC (L)	5.6 (0.7)	5.4 (0.9) *	96.6 (4.7)
FIV ₁ (L)	5.3 (0.6)	4.7 (1.3)	90.7 (21.0)
FEV ₂₅ (L.s ⁻¹)	6.6 (1.5)	5.2 (1.9) *	86.2 (32.6)
FEV ₅₀ (L.s ⁻¹)	4.8 (0.8)	4.7 (1.2)	98.5 (19.5)
FEV ₇₅ (L.s ⁻¹)	2.6 (0.9)	3.0 (1.2)	108.5 (32.3)

*: Significant difference between pre and post test at $P < 0.05$, †: $P = 0.08$.
 Post-test (%) post-test expressed in % pre-test, FVC forced vital capacity, FEV₁ forced expiratory volume in 1 s, FEV₁/FVC, FIVC forced inspiratory volume, FIV₁ forced inspiratory volume in 1 s, FEV_{25, 50, 75} forced expiratory flow at that point that is 25, 50 and 75% from FVC.

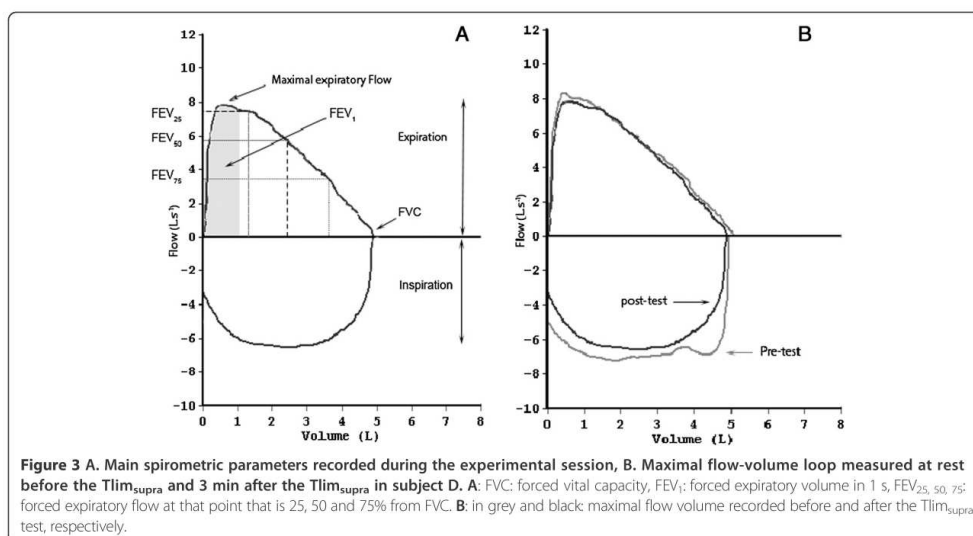


Figure 3 A. Main spirometric parameters recorded during the experimental session, **B.** Maximal flow-volume loop measured at rest before the Tlim_{supra} and 3 min after the Tlim_{supra} in subject D. **A:** FVC: forced vital capacity, FEV₁: forced expiratory volume in 1 s, FEV_{25, 50, 75}: forced expiratory flow at that point that is 25, 50 and 75% from FVC. **B:** in grey and black: maximal flow volume recorded before and after the Tlim_{supra} test, respectively.

VO₂ peak

The present study indicates that during a cycling test performed at 185% of MAP, well-trained cyclists are able to reach 95% of their $\dot{V}O_{2max}$ in less than 50 s. This is similar to the value of 94% obtained during a 400-m track run (Hanon et al. 2010). As reviewed by Gastin (Gastin 2001), $\dot{V}O_2$ can be as high as 90% of the athlete's maximum after 30–60 s. However, these previous studies all utilized intensive cycling exercise of short duration and initiated with a maximal starting power (Wingate test or all-out exercise). In the present study, the power was constant, but sufficiently elevated (185% P- $\dot{V}O_{2max}$) to induce exhaustion in less than 60 s. Therefore, our

protocol was successful at soliciting a large percentage of the $\dot{V}O_{2max}$ during an intense constant-power exercise in well-trained sprint cyclists.

$\dot{V}O_2$ decrease

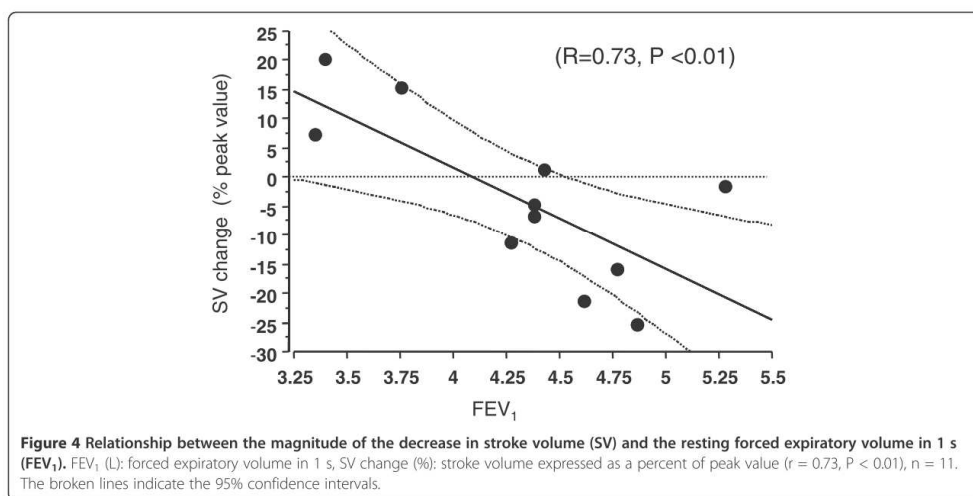
A moderate decrease in the mean $\dot{V}O_2$ was observed during the final 20% of the supramaximal cycle test. The magnitude of this $\dot{V}O_2$ decrease (0 to 12%) differed from our recent results obtained during a 400-m running field test of similar duration (50 s), in which a systematic and greater $\dot{V}O_2$ drop (15%) was observed in the final 100 m (Hanon et al. 2010). Of note, and contrary to the present study, this last exercise segment was performed with a large velocity decrease. Nevertheless, a $\dot{V}O_2$ decrease can occur in exercise performed at a constant pace in a subset of subjects, suggesting that at least some of this decrease is independent from a velocity or power decrease (Nummela and Rusko 1995, Perrey et al. 2002). It should be noted that, as in the above-mentioned studies (Hanon et al. 2010), the $\dot{V}O_2$ decrease occurred while $\dot{V}O_{2max}$ was not reached.

Each step in the O₂ supply chain, from breathing air to transport to the muscle cells, could influence O₂ availability, especially during whole-body, maximal-intensity exercise. Although hyperventilation produces an increase in alveolar O₂ tension to overcome the diffusion limitation of the lungs (Dempsey 2006), this could also have negative consequences such as extreme energetic cost, respiratory muscle fatigue, or attainment of the respiratory reserve. Each of these factors could have

Table 2 Mean (SD) values for blood parameters measured during the Tlim_{supra} test

	Pre-test	0	5 min	8 min
SaO ₂ (%)	95.2 (1.5)	92.5 (2.7) *	95.9 (1.0) *	95.7 (1.2)
[La] (mmol·L ⁻¹)	3.8 (1.1)	9.4 (3.3) *	15.9 (1.7) *	14.9 (1.9) *
pH	7.39 (0.02)	7.30 (0.06) *	7.21 (0.04) *	7.24 (0.04) *
[HCO ₃ ⁻] (mmol·L ⁻¹)	23.7 (1.1)	20.7 (2.5) *	12.3 (1.8) *	12.4 (1.8)
paO ₂ (mmHg)	78.9 (9.2)	76.2 (15.5) *	99.0 (8.5) *	95.9 (14.0)
paCO ₂ (mmHg)	38.8 (1.6)	42.0 (3.1) *	30.7 (2.9) *	28.9 (2.8) *

* statistically different from the previous result (post 5 is different from post 0, ..., post 8 from post 5). P < 0.05.
 The blood parameters were collected 1 min before the test at the end of the warm-up (pre-test), and at 0, 5 and 8 min of passive recovery following the Tlim_{supra} test.
 The blood variables are oxygen saturation (SaO₂), lactate concentration [La] and bicarbonate concentration [HCO₃⁻], pH and partial pressure for O₂ (PaO₂) and CO₂ (PaCO₂). n = 11.



influenced $\dot{V}O_2$ during the latter stages of our exercise protocol.

Metabolic data and the $\dot{V}O_2$ decrease

The lack of a relationship between the magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease and the post-test blood changes is not in accordance with our previous all-out running data. In this previous experiment, a 23 and 12% drop in velocity was observed in the last 100 m of 400- (Hanon et al. 2010) and 800-m (Hanon and Thomas 2011) races, respectively. The [lactate], [HCO₃⁻] and pH were respectively 22.0 mmol.L⁻¹, <5 mmol.L⁻¹ and 7.00 after the 400-m race, whereas these values were 15.9 mmol.L⁻¹, >12 mmol.L⁻¹ and 7.21 in the present constant-power exercise, indicating a more moderate alteration of the acid-base balance. Therefore, in this context, we can hypothesize that the blood buffers were not completely depleted with the result that, contrary to the running (Hanon et al. 2010), rowing (Nielsen et al. 1999) or cycling (Bishop et al. 2007) all-out exercises, the organism was able to prevent an additional acidosis. In the present study, the post-exercise arterial saturation values (92.5 ± 2.7%) are at the limit of the definition of EIAH (less or equal to 92%). The magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease (5.4%) appears to be in line with the statement that $\dot{V}O_2$ appears to decrease by 2% for each 1% decrease of SaO₂ under 95% (Harms et al. 2000). Nevertheless, no significant correlation was observed between the magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease and the present blood PaO₂, SaO₂ and pH values. The brief duration of this supra-maximal exercise, the type of exercise (constant-power vs all-out), and the chosen sport (cycling vs. running), could

explain the lower EIAH values compared to those usually observed in well-trained runners (Millet et al. 2009). These global metabolic results suggest that if the bicarbonate reserve are sufficient to eliminate excess H⁺, the O₂ saturation may not be maximally affected by the eventual decrease in PaO₂ (Nielsen 2003) and may not represent a major cause of the decrease in $\dot{V}O_2$.

Respiratory cost and respiratory muscle fatigue

During a 10-min exercise at ~95% of $\dot{V}O_{2max}$, Perrey et al. (Perrey et al. 2002) observed a significant decrease in \dot{V}_E (due to a decrease in V_T) in subjects who demonstrated a $\dot{V}O_2$ decrease. In the present supra-maximal exercise, \dot{V}_E and RF increased until the end of the exercise, except in two subjects who exhibited a concomitant \dot{V}_E and $\dot{V}O_2$ decrease. However, the overall significant V_T decrease (5%), observed in eight subjects at the end of the test, tended to be correlated with the decrease in $\dot{V}O_2$ ($R = 0.57$, $P = 0.06$, $n = 11$). The maximal VRMO₂ values (9–15% of the whole pulmonary $\dot{V}O_2$), similar to the maximal values previously published (Aaron et al. 1992) and the VR values (90 ± 10% of MVV), could also raise questions about the ability to carry out this ventilatory load. Furthermore, the functional capacity tests demonstrated a decrease in the inspiratory forced capacity after the Tlim_{supra}. This result is in line with that recorded in well-trained rowers (Volianitis et al. 2001), cyclists (Romer et al. 2006) and swimmers (Lomax and McConnell 2003) who experienced a reduction in inspiratory muscle strength immediately after exercise. The magnitude of this decrease in the present study

(10%) was less than post 300- and 400-m swimming (15%), but this latter measurement was performed 20 s after the end of the test. Based on the observation that voluntary activation recovers almost fully by 3 min (Bigland-Ritchie et al. 1986), we chose to collect post-test spirometric data 3 min after the exercise in order to exclude the hypothesis of a central activation failure. Our data demonstrating a FIVC decrease are in line with the observation of the diaphragm fatigue shown by Johnson et al. (Johnson and Sieck 1993) who stated that near maximal VR values cannot be carried out for more than 15 to 30 s. Therefore, our data confirm that the respiratory muscle response is likely to be affected during constant-power supra-maximal exercise.

Respiratory reserve

Maintaining the O_2 alveolar pressure (P_AO_2) through the stimulation of the respiratory muscles could cause athletes to reach and even surpass the respiratory reserve during maximal exercise, and a small portion of the maximal exercise flow volume and pressure-volume envelope on expiration could approach maximal expiratory flow limits near end-expiratory lung volume (Johnson et al. 1996). In the present study, only one subject reached the resting VR values and this subject did not exhibit a $\dot{V}O_2$ decrease but, Babb (Babb 2013) stated that expiratory flow limitation is not all or none phenomenon and that approaching maximal expiratory flow can affect breathing mechanics. The onset of dynamic airways compression and subsequent airway resistance start long before expiratory flow becomes limited. Therefore in the last part of the exercise, when near $\dot{V}O_{2max}$ values are attained, a number of mechanisms for inadequate hyperventilation are possible (Johnson et al. 1992). Furthermore, based on the demonstration of a modified \dot{V}_E response in an inclined versus an upright position (Grappe et al. 1998), we cannot exclude an influence of the inclined cycling position on the ratio between \dot{V}_E recorded in the cycling position and the MVV recorded in an upright position.

Cardio-respiratory responses and $\dot{V}O_2$ decrease

All subjects who exhibited a decrease in $\dot{V}O_2$ also presented a decrease in SV during the exercise, and a correlation was observed between the final SV data and the decrease in $\dot{V}O_2$. The observation that CO declined significantly before maximal heart rate was reached confirms the results presented by Gonzales-Alonso (Gonzalez-Alonso and Calbet 2003) and indicates that maximal cardiovascular function was attained below maximal heart rate. The decline in stroke volume clearly caused the drop in CO, although the underlying mechanisms remain obscure. The positive correlation

between the decrease in $\dot{V}O_2$ and FEV₁ could indicate that expiratory intrathoracic pressure could have a negative effect on the $\dot{V}O_2$ response. Because the heart and lungs share a common surface area, progressive lung inflation and hyperpnea with exercise may increase competition for intrathoracic space and inhibit cardiac filling via a change in cardiac compliance (Peters et al. 1989). Expiratory load leads to a reduction in CO related to an increase in expiratory abdominal and intrathoracic pressure (Stark-Leyva et al. 2004). Hortop et al. (Hortop et al. 1988) has previously demonstrated, in patients with a cystic fibrosis, a strong relationship between the changes in SV with exercise and the FEV₁. In our trained subjects, the decrease in SV was significantly correlated with $P_{ET}O_2$ and FEV₁, which could corroborate the relationship reported between SV and changes in intrathoracic pressure following voluntary lung inflation (Stark-Leyva et al. 2004) and the findings of a recent overview emphasizing the respiratory mechanisms that impair O_2 transport (Amann 2011). In those subjects with high levels of expiratory flow, we could suggest that, in inclined cycling position, positive expiratory intrathoracic pressure is greater, increasing the ventricular afterload and reducing the rate of ventricular filling during diastole (Miller et al. 2007, Stark-Leyva et al. 2004) which could be deleterious for the maintenance of SV (Amann 2012) and therefore $\dot{V}O_2$.

Conclusions

We demonstrated that a $\dot{V}O_2$ decrease occurs at the end of a constant-power supra-maximal exercise in 6/11 subjects, with the main result being that this phenomenon was related to respiratory characteristics and to the cardiac response. The relationship between stroke volume and $\dot{V}O_2$ decrease confirms, for supramaximal exercise, previous observations for longer and less intensive cycling exercise (Gonzalez-Alonso and Calbet 2003), (Mortensen et al. 2008). Furthermore, the influence of the respiratory system on the $\dot{V}O_2$ response observed during the exercise in the participants who present both high resting forced expiratory volume and exercise peak $P_{ET}O_2$ are innovative and confirm that the pulmonary system is a key determinant of the physiologic responses before stopping a supramaximal cycling exercise. The present data suggest that the respiratory response in case of acute maximal exercise could be the origin of the decrease in SV and $\dot{V}O_2$ in cycling position. The relation between respiratory, cardiac parameters and $\dot{V}O_2$ decrease in the case of acute acidosis remains to be tested, and we can hypothesize that different mechanisms may be involved in the $\dot{V}O_2$ decrease depending on the level of acidosis and the body position.

Methods

Fourteen specifically trained subjects were solicited for this study. They had at least 5 years of competitive cycling experience and trained 8 hours per week in sprint track cycling and/or BMX. All were successful at national-level events and none had any history of pathology of the lower-limb muscles or joints.

Three subjects were not retained in data processing because of signal loss in the collection of ventilatory data or non observance of the given pedalling rate. Then, eleven trained men (age 24.9 ± 6.5 y, height 1.79 ± 0.05 m and body mass 75.3 ± 8.2 kg) volunteered for this study. They were informed of the nature of the study, and the possible risks and discomforts associated with the experimental procedures, before giving their written consent to participate. The experimental design of the study was approved by the local Ethics Committee of Saint-Germain-en-Laye (France; acceptance n°2009-A01004-53), and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Experimental protocol

The protocol, carried out during the pre-competition period, included two sessions separated by two days: (1) a first session consisting of anthropometric measurements, resting spirometric monitoring (volume and flow), a torque-velocity cycling test, and an incremental test performed until exhaustion on a calibrated cycle ergometer, (2) a second session consisting of a constant-load, supra-maximal cycle test performed until exhaustion; in a pilot study, we observed that the body temperature was not increased by more than 1°C during this test.

During the first visit, anthropometric data were recorded, subjects were familiarized with the spirometric tests to be performed in this study, and three resting spirometric tests were recorded in order to test the reliability of the measures (Figure 3). Subjects began with a warm-up of 15 min of cycling at 100–150 W, 1 min of recovery and a 5-s sprint. After a 5-min recovery, participants were asked to perform three maximal cycling sprints (5 s separated by 3 min of recovery) according to a previous protocol (Dorel et al. 2010). Three different resistive torques of 0, 0.4–0.7, 1–1.5 Nm/kg body mass were applied to obtain maximal force and power values over a large range of pedaling rates among the three bouts. After computation, the data from the three sprints were used to draw force- and power-velocity relationships and hence to determine maximum power (P_{\max}) and the corresponding specific optimal pedaling rate (f_{opt}) at which P_{\max} occurred (for details, see (Dorel et al. 2010)).

After 20 min of rest, they performed an incremental cycle test (IT) to determine their $\dot{V}O_{2\max}$ and power

output at $\dot{V}O_{2\max}$ ($P-\dot{V}O_{2\max}$, i.e. the power that elicited $\dot{V}O_{2\max}$). The progressive protocol consisted of 6 min of pedaling at 100 W followed by a stepped ramp increase in power output of $20 \text{ W}\cdot\text{min}^{-1}$ until volitional exhaustion. Participants were instructed to maintain their chosen preferred cadence for as long as possible, and the test was completed when the cadence fell more than 10 rpm below this value for more than 5 s despite strong verbal encouragement. All respiratory and cardiac variables were recorded continuously.

During the second session, subjects were asked to perform a standard warm-up: 8 min at 150 W, 2 min at 260 W, a recovery period (i.e., 2 min), a 10-s sprint of progressively increasing intensity with the last 3 s performed at a maximal all-out intensity, 90 s of recovery and finally two brief all-out sprints (5 s in duration) interspersed with 90 s of recovery. After a further 10 minutes of passive recovery, subjects performed the cycling exercise ($T_{\text{lim}_{\text{supra}}}$) at a constant power output ($P_{\text{supra}\Delta 30\%}$) for as long as possible until exhaustion. $P_{\text{supra}\Delta 30\%}$ was defined as the supra-maximal intensity above MAP corresponding to an increment of 30% of the difference between P_{\max} (estimated from torque-velocity test) and $P-\dot{V}O_{2\max}$ ($P_{\text{supra}\Delta 30\%} = P-\dot{V}O_{2\max} + [0.3 \times (P_{\max} - P-\dot{V}O_{2\max})]$). Subjects were required to keep a constant pedalling rate (i.e., corresponding to f_{opt} minus 10%). No information relative to test duration was given to the subjects. The test continued until complete exhaustion: either until the cyclists voluntarily chose to stop the exercise or until they were no longer able to maintain their initial test cadence (± 3 rpm), which was considered as a failure to maintain the required task (i.e., the target power output at a constant cadence). Respiratory and cardiac responses were recorded continuously during the entire experimental session. Arterialised capillary blood samples (85 μL) were taken from a hyperemized ear-lobe just before the start of $T_{\text{lim}_{\text{supra}}}$ (7 min after the end of the warm-up), at exhaustion, and 5 and 8 min during the passive recovery.

Material and data collection/processing

All testing sessions took place in a well-ventilated laboratory at a temperature of $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$ and were conducted using an electronically-braked cycle ergometer (Excalibur Sport, Lode, Groningen, The Netherlands). Vertical and horizontal positions of the saddle, handlebar height, crank and stem lengths were set to match the most comfortable and usual position of the participants.

Respiratory responses

Spirometric variables, [i.e. forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 1 s (FEV_1), Tiffeneau index (FEV/FVC), forced inspiratory volume (FIVC) forced inspiratory volume in 1 s (FIV_1), forced expiratory flow at

that point that is 25, 50 or 75% from FVC ($FEV_{25, 50 \text{ or } 75}$) (Figure 2A) were measured with an ergospirometric device (Spirobank II, MIR, Roma, Italy) before and 3 min after the end of $Tlim_{supra}$. The precision and reproducibility of the data (FEV_1 and FVC) have been reported (Liistro et al. 2006). Before $Tlim_{supra}$, a minimum of three satisfactory inspiratory and expiratory efforts were conducted with the highest measurement being defined as maximal. At the end of the $Tlim_{supra}$, and due to time-constraints (recovery influence), only one satisfactory measurement was asked to the subjects in order to measure the exercise-induced changes in the respiratory function.

During both IT and $Tlim_{supra}$, $\dot{V}O_2$, $\dot{V}E$, CO_2 production ($\dot{V}CO_2$), respiratory frequency (RF), V_T and end-tidal oxygen tension ($P_{ET}O_2$) were recorded breath by breath with a fixed gas exchange system (Quark CPET, Cosmed, Roma, Italy). Calibration of the gas analyser was performed according to the manufacturer's instructions before each test for each subject. To avoid artefacts in recording signals, the finger was warmed with a vasodilator ointment 10–15 min before starting the measurement. The apparatus was automatically calibrated before each test. During the IT, breath-by-breath gas exchange values were smoothed (i.e., 3-s central moving average). In order to characterize the subjects, the highest $\dot{V}O_2$ value in a 30-s period was considered as the $\dot{V}O_{2max}$. The criteria used for the determination of $\dot{V}O_{2max}$ were threefold: a plateau in $\dot{V}O_2$ despite an increase in power output, a respiratory exchange ratio (RER) above 1.1, and a heart rate (HR) above 90% of the predicted maximal HR. For the purpose of comparing, over the same period of sampling, with the peak value of $\dot{V}O_2$ ($\dot{V}O_{2peak}$) measured during $Tlim_{supra}$, the highest 5-s average was also determined. To determine $\dot{V}O_{2peak}$ during $Tlim_{supra}$ (and as previously reported (Hanon et al. 2010)), values were smoothed (i.e. 3-s central moving average) and then a 5-s average was applied in order to compare $\dot{V}O_2$ and other ventilatory responses (V_T , RF, $\dot{V}E$), with those of cardiac output (CO), stroke volume (SV) and changes in SaO_2 at the same time.

For $Tlim_{supra}$, the end $\dot{V}O_2$ value ($\dot{V}O_{2end}$) was defined as the average during the last 5-s period and the $\dot{V}O_2$ decrease was considered as $\dot{V}O_{2peak} - \dot{V}O_{2end}$. The $\dot{V}O_2$ decline was considered as a $\dot{V}O_2$ decrease, when the magnitude of the phenomenon was larger than 5% of the peak value while the power of exercise continued to be above $P - \dot{V}O_{2max}$ (Billat et al. 2009). The same criterion was applied to the other cardio-respiratory variables.

The $\dot{V}O_2$ of the respiratory muscles ($VRMO_2$, expressed in $mL \cdot min^{-1}$), was calculated from the work of

breathing (W_B , $kg \cdot min^{-1}$) using the equation proposed by Coast et al. (Coast et al. 1993):

$$W_B = -0.251 + 0.0382 \dot{V}E + 0.00176 \dot{V}E^2, \\ \text{and } VRMO_2 = 34.9 + 7.45 W_B.$$

The ventilatory reserve (VR) was defined as $\dot{V}E$ expressed as a percent of the estimated resting MVV (maximal voluntary ventilation):

$$\dot{V}E \div MVV, \text{ where } MVV = \text{rest } FEV_1 \times 40$$

(Johnson et al. 1996).

Cardiac responses

A bio-impedance method was used to determine SV, HR and CO (Physioflow, Manatec Type PF05LL, Strasbourg, France). The basis for this technique and its application, validity and reliability for exhaustive exercise testing have been described (Lepretre et al. 2004), and it has been demonstrated that thoracic hyperinflation does not alter CO (Charloux et al. 2000). For this experiment, SV, HR and CO values were averaged every five seconds.

Blood metabolic responses

Prior to, 0 and 3 min post-IT, blood samples were collected and analysed for lactate concentration using a Lactate Pro analyser (Arkray, Japan). Prior to and post- $Tlim_{supra}$ session, arterialised capillary blood samples (85 μL) were analysed to measure blood pH, [La], SaO_2 , PaO_2 and CO_2 ($PaCO_2$) and bicarbonate concentration ($[HCO_3^-]$) with an i-STAT dry chemistry analyser (Abbott, Les Ulis, France).

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SD. Because subjects did not perform exactly the same exercise duration, data were expressed relative to the % of total duration (every 5% of $Tlim_{supra}$ duration) for Figure 1 and for ANOVA. Changes in gas-exchange variables during $Tlim_{supra}$ were evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA), with repeated-measures across each 5% interval, followed by multiple comparisons (Student-Newman-Keuls) to test the effect of time on the variables. The intra-class correlation (ICC) was calculated for pre-test spirometric data. Relationships between variables (ventilatory, cardio-dynamic, arterial oxygen saturation, metabolic parameters and $\dot{V}O_2$) at different times of the test and final $Tlim_{supra}$ performance were analyzed by a Pearson's correlation coefficient. In order to measure the strength of the relationship between the $\dot{V}O_2$ decrease and a given variable, while controlling the effect of the other variables, Pearson partial correlations were also calculated. The level of significance was set at $P < 0.05$. Finally, aiming to

compare the difference in main variables, between the subject who exhibited a > 5% decrease in $\dot{V}O_2$ and the others, effect sizes (ES) were calculated using Cohen's *d*. Effect sizes of 0.8 or greater, around 0.5 and 0.2 or less were considered as large, moderate, and small, respectively. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

CH and CT conceived of the study and carried out the experimental design, participated in acquisition of data (respiratory and metabolic data). CH drafted the manuscript and performed the statistical analysis. SD had substantial contributions to conception and design (cycling procedure) and managed the cycling performance analysis. RDP performed the acquisition and analysis of the cycling data. PML carried out the acquisition and analysis of the cardiac data. JDB substantially helped in the draft of the manuscript and participated in acquisition of the data. SP revised the manuscript and participated in acquisition, analysis and interpretation of data. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgement

The authors are grateful to the French Ministry of Health, Youth and Sport for their financial support, the Doctor C. Palierne for his medical assistance and P. Arnal for his technical assistance. The authors warmly thank the subjects involved in this study for their trust and availability.

Author details

¹French National Institute of Sports (INSEP), Research Department, Laboratory of Sport, Expertise and Performance, 11 Tremblay Avenue, 75012 Paris, France. ²Laboratory "Motricité, Interactions, Performance" (EA 4334), University of Nantes, F-44000 Nantes, France. ³University of Picardie Jules Verne (EA-3300), 80025 Amiens cedex, France. ⁴Movement to Health (M2H), Montpellier-1 University, Euromov, Montpellier, France. ⁵Institute of Sport, Exercise and Active Living (ISEAL), and the College of Sport and Exercise Science, Victoria University, Melbourne, Australia. ⁶STAPS Department, University of Evry Val d'Essonne, François Mitterrand Boulevard 91025, Evry, France.

Received: 10 September 2013 Accepted: 18 November 2013

Published: 5 December 2013

References

- Aaron EA, Seow KC, Johnson BD, Dempsey JA (1992) Oxygen cost of exercise hyperpnea: implications for performance. *J Appl Physiol* 72:1818–1825
- Amann M (2011) Central and peripheral fatigue: interaction during cycling exercise in humans. *Med Sci Sports Exerc* 43:2039–2045
- Amann M (2012) Pulmonary system limitations to endurance exercise performance in humans. *Exp Physiol* 97:311–318
- Babb TG (2013) Exercise ventilatory limitation: the role of expiratory flow limitation. *Exerc Sport Sci Rev* 41:11–18
- Bigland-Ritchie B, Furbush F, Woods JJ (1986) Fatigue of intermittent submaximal voluntary contractions: central and peripheral factors. *J Appl Physiol* 61:421–429
- Billat V, Hamard L, Koralsztein JP, Morton RH (2009) Differential modeling of anaerobic and aerobic metabolism in the 800-m and 1,500-m run. *J Appl Physiol* 107:478–487
- Bishop D, Edge J, Thomas C, Mercier J (2007) High-intensity exercise acutely decreases the membrane content of MCT1 and MCT4 and buffer capacity in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102:616–621
- Charloux A, Lonsdorfer-Wolf E, Richard R, Lampert E, Oswald-Mammosser M, Mettauer B, Geny B, Lonsdorfer J (2000) A new impedance cardiograph device for the non-invasive evaluation of cardiac output at rest and during exercise: comparison with the "direct" Fick method. *Eur J Appl Physiol* 82:313–320
- Coast JR, Rasmussen SA, Krause KM, O'Kroy JA, Rhodes J (1993) Ventilatory work and oxygen consumption during exercise and hyperventilation. *J Appl Physiol* 74:793–798
- Dempsey JA (2006) Is the healthy respiratory system (always) built for exercise? *J Physiol* 576:339–340
- Dorel S, Couturier A, Lacour JR, Vandewalle H, Hautier C, Hug F (2010) Force-velocity relationship in cycling revisited: benefit of two-dimensional pedal forces analysis. *Med Sci Sports Exerc* 42:1174–1183
- Duffin J (2005) Role of acid-base balance in the chemoreflex control of breathing. *J Appl Physiol* 99:2255–2265
- Gastin PB (2001) Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports Med* 31:725–741
- Gonzalez-Alonso J, Calbet JA (2003) Reductions in systemic and skeletal muscle blood flow and oxygen delivery limit maximal aerobic capacity in humans. *Circulation* 107:824–830
- Grappe F, Candau R, Busso T, Rouillon JD (1998) Effect of cycling position on ventilatory and metabolic variables. *Int J Sports Med* 19:336–341
- Hanon C, Thomas C (2011) Effects of optimal pacing strategies for 400-, 800-, and 1500-m races on the $\dot{V}O_2$ response. *J Sports Sci* 29:905–912
- Hanon C, Lepretre PM, Bishop D, Thomas C (2010) Oxygen uptake and blood metabolic responses to a 400-m run. *Eur J Appl Physiol* 109:233–240
- Harms CA, McClaran SR, Nickle GA, Pegelow DF, Nelson WB, Dempsey JA (2000) Effect of exercise-induced arterial O_2 desaturation on $\dot{V}O_{2max}$ in women. *Med Sci Sports Exerc* 32:1101–1108
- Hortop J, Desmond KJ, Coates AL (1988) The mechanical effects of expiratory airflow limitation on cardiac performance in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 137:132–137
- Johnson BD, Sieck GC (1993) Differential susceptibility of diaphragm muscle fibers to neuromuscular transmission failure. *J Appl Physiol* 75:341–348
- Johnson BD, Saupé KW, Dempsey JA (1992) Mechanical constraints on exercise hyperpnea in endurance athletes. *J Appl Physiol* 73:874–886
- Johnson BD, Aaron EA, Babcock MA, Dempsey JA (1996) Respiratory muscle fatigue during exercise: implications for performance. *Med Sci Sports Exerc* 28:1129–1137
- Lepretre PM, Koralsztein JP, Billat VL (2004) Effect of exercise intensity on relationship between $\dot{V}O_{2max}$ and cardiac output. *Med Sci Sports Exerc* 36:1357–1363
- Liistro G, Vanwelde C, Vincken W, Vandevoorde J, Verleden G, Buffels J (2006) Technical and functional assessment of 10 office spirometers: A multicenter comparative study. *Chest* 130:657–665
- Lomax ME, McConnell AK (2003) Inspiratory muscle fatigue in swimmers after a single 200 m swim. *J Sports Sci* 21:659–664
- Miller JD, Smith CA, Hemauer SJ, Dempsey JA (2007) The effects of inspiratory intrathoracic pressure production on the cardiovascular response to submaximal exercise in health and chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H580–H592
- Millet GP, Vleck VE, Bentley DJ (2009) Physiological differences between cycling and running: lessons from triathletes. *Sports Med* 39:179–206
- Mortensen SP, Gonzalez-Alonso J, Damsgaard R, Saltin B, Hellsten Y (2007) Inhibition of nitric oxide and prostaglandins, but not endothelial-derived hyperpolarizing factors, reduces blood flow and aerobic energy turnover in the exercising human leg. *J Physiol* 581:853–861
- Mortensen SP, Damsgaard R, Dawson EA, Secher NH, Gonzalez-Alonso J (2008) Restrictions in systemic and locomotor skeletal muscle perfusion, oxygen supply and $\dot{V}O_2$ during high-intensity whole-body exercise in humans. *J Physiol* 586:2621–2635
- Nielsen HB (2003) Arterial desaturation during exercise in man: implication for O_2 uptake and work capacity. *Scand J Med Sci Sports* 13:339–358
- Nielsen HB, Boushel R, Madsen P, Secher NH (1999) Cerebral desaturation during exercise reversed by O_2 supplementation. *Am J Physiol* 277:H1045–H1052
- Nummela A, Rusko H (1995) Time course of anaerobic and aerobic energy expenditure during short-term exhaustive running in athletes. *Int J Sport Med* 16:522–527
- Perrey S, Candau R, Millet GY, Borrani F, Rouillon JD (2002) Decrease in oxygen uptake at the end of a high-intensity submaximal running in humans. *Int J Sport Med* 23:298–304
- Peters J, Fraser C, Stuart RS, Baumgartner W, Robotham JL (1989) Negative intrathoracic pressure decreases independently left ventricular filling and emptying. *Am J Physiol* 257:H120–H131
- Poole DC, Gladden LB, Kurdak S, Hogan MC (1994) L-(+)-lactate infusion into working dog gastrocnemius: no evidence lactate per se mediates $\dot{V}O_2$ slow component. *J Appl Physiol* 76:787–792
- Romer LM, Lovering AT, Haverkamp HC, Pegelow DF, Dempsey JA (2006) Effect of inspiratory muscle work on peripheral fatigue of locomotor muscles in healthy humans. *J Physiol* 571:425–439

- Rozier MD, Zata VJ, Ellsworth ML (2007) Lactate interferes with ATP release from red blood cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H3038–H3042
- Stark-Leyva KN, Beck KC, Johnson BD (2004) Influence of expiratory loading and hyperinflation on cardiac output during exercise. *J Appl Physiol* 96:1920–1927
- Thomas C, Hanon C, Perrey S, Le Chevalier JM, Couturier A, Vandewalle H (2005) Oxygen uptake response to an 800-m running race. *Int J Sports Med* 26:268–273
- Volianitis S, McConnell AK, Koutedakis Y, McNaughton L, Backx K, Jones DA (2001) Inspiratory muscle training improves rowing performance. *Med Sci Sports Exerc* 33:803–809

doi:10.1186/2193-1801-2-651

Cite this article as: Hanon *et al.*: Prevalence of cardio-respiratory factors in the occurrence of the decrease in oxygen uptake during supra-maximal, constant-power exercise. *SpringerPlus* 2013 2:651.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- ▶ Convenient online submission
- ▶ Rigorous peer review
- ▶ Immediate publication on acceptance
- ▶ Open access: articles freely available online
- ▶ High visibility within the field
- ▶ Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ▶ springeropen.com

B. Annexe n°2.

Original Investigation : Applied Sciences

Effets de pre-exercice alcalosis on the decrease in VO₂ at the end of exercise.

Running title : Effects of acidosis on VO₂ decrease

Claire Thomas^{1,2,3}, Rémi Delfour-Peyrethon^{1,7}, David J Bishop⁴, Stéphane Perrey⁵, Pierre-Marie Leprêtre⁶, Sylvain Dorel⁷, Christine Hanon¹

¹ French National Institute of Sports (INSEP), Sport Expertise and Performance Laboratory- 11 Tremblay Avenue, 75012 Paris, France.

² University of Evry Val d'Essonne, STAPS department. François Mitterrand Boulevard 91025 Evry, France.

³ INSERM U1046 Physiology and experimental medicine: Heart and Muscle, UM1, UM2 Montpellier, France.

⁴ Institute of Sport, Exercise and Active Living (ISEAL), College of Sport and Exercise Science, Victoria University, Melbourne, Australia.

⁵ Movement to Health (M2H), Montpellier-1 University, Euromov, Montpellier, France.

⁶ University of Picardie Jules Verne Laboratory of Research in Physiological Adaptations during Exercise and Readaptation, EA-3300, UFR-STAPS, , 80025 Amiens cedex, France

⁷ University of Nantes, Laboratory “Motricité, Interactions, Performance” (EA 4334), 44000 Nantes, France

Corresponding author: Claire Thomas, PhD, University of Evry Val d'Essonne, STAPS department. François Mitterrand Boulevard 91025 Evry, France. Phone: + 33 169 644 892. Fax: + 33 169 644 891. e-mail : claire.thomas@univ-evry.fr

The authors are grateful to the French Ministry of Health, Youth and Sport for their financial support. The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

Abstract

Introduction: This study determined the effects of induced pre-exercise sodium bicarbonate ingestion (ALK) on changes in oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) at the end of supramaximal exercise test (SXT). **Methods:** Eight well-trained cyclists completed a 70-s all-out cycling effort, in double-blind conditions after oral ingestion of either 0.3 g.kg⁻¹ of sodium bicarbonate (NaHCO₃) or 0.2 g.kg⁻¹ body mass of calcium carbonate (PLA). Blood samples were taken to assess changes in acid-base balance at rest, and 0, 5 and 8 min after exercise exhaustion; respiratory parameters were also measured at rest and during the SXT. **Results:** At the end of the PLA trial, which induced mild acidosis (pH = 7.2), all subjects presented a significant decrease in $\dot{V}O_2$ (P < 0.05), which was related to the amplitude of decrease in minute ventilation (\dot{V}_E) value during SXT (r = 0.61, P < 0.01, n = 8). Pre-exercise metabolic alkalosis prevented the exercise-induced decrease in $\dot{V}O_2$ in six out of eight well-trained participants (PLA: 14.7 ± 3.6% and ALK: 3.6 ± 0.9%, P < 0.05) and the decrease in mean power output was significantly less pronounced in ALK (P < 0.05). Changes in the $\dot{V}O_2$ decrease between PLA and ALK conditions were positively related to changes in the \dot{V}_E decrease (r = 0.96, P < 0.001), but not to changes in power output (P > 0.05). **Conclusions:** Pre-exercise alkalosis counteracted the $\dot{V}O_2$ decrease related to mild acidosis, potentially as a result of changes in \dot{V}_E and in muscle acid-base status during the all-out supramaximal exercise.

Key-words: OXYGEN UPTAKE, MINUTE VENTILATION, ACID-BASE STATUS, HIGH-INTENSITY EXERCISE, FATIGUE, SODIUM BICARBONATE

Introduction

Paragraph number 1. Supramaximal exercise until exhaustion is characterized by a decline in muscle performance at the end of exercise (Fitts, 1996), which has been associated with a decrease in oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) (Thomas *et al.*, 2005a). This specific $\dot{V}O_2$ response pattern has been shown to occur at the end of both all-out and constant-power exercise performed until exhaustion, particularly in well-trained athletes (Nummela *et al.*, 1992; González-Alonso & Calbet, 2003; Thomas *et al.*, 2005a; Mortensen *et al.*, 2008; Hanon *et al.*, 2010). The decrease in $\dot{V}O_2$ has been attributed to failure of the heart to maintain cardiac output and O₂ delivery to locomotive muscles (González-Alonso & Calbet, 2003; Mortensen *et al.*, 2008; Hanon *et al.*, 2010), and also to the increase in blood proton and lactate concentration at the end of supramaximal running exercises (400-, 800-, 1500-m running races) (Hanon *et al.*, 2010; Hanon & Thomas, 2011).

Paragraph number 2. The hypothesis that metabolic disturbances may contribute to the decrease in $\dot{V}O_2$ at the end of supramaximal exercises is in accordance with the relationship observed between blood pH and the $\dot{V}O_2$ response in the last 100 m of a 400-m running race (Hanon *et al.*, 2010), and with the large decrease in blood bicarbonate concentration ($[HCO_3^-]_b$) after competitive rowing (Nielsen, 1999). Both proton (H⁺) and lactate accumulation have been reported to affect the excitation-contraction coupling process in skeletal muscle (Fitts, 1996), and both the $\dot{V}O_2$ response and the decrease in velocity at the end of 400- and 800-m races has been related to high-metabolic disturbances (Thomas *et al.*, 2005a; Hanon *et al.*, 2010; Hanon & Thomas, 2011). Reducing muscle pH may also affect energy supply (Hirvonen *et al.*, 1992) via established effects on glycolytic and oxidative enzymes (Gaitanos *et al.*, 1993; Jubrias *et al.*, 2003) and the rate of oxidative phosphorylation (Walsh *et al.*, 2002; Jubrias *et al.*, 2003).

Paragraph number 3. Metabolic acidosis during high-intensity exercise could also induce physiological perturbations in the O₂ transport system by influencing ventilatory responses which have been linked to changes in acid-base balance (Lindinger & Heigenhauser, 2012) and the affinity of oxygen to hemoglobin (Bohr *et al.*, n.d.). A strong positive relationship has been observed between ventilatory parameters (decrease in tidal volume) and the decrease in the $\dot{V}O_2$ during the last 100-m of 400-, 800- and 1500-m running-races (Hanon *et al.*, 2010), which could reflect an hyperpnoea due to metabolic acidosis (Forster & Pan, 1995). The

runners may have hyperventilated in order to partially compensate for their metabolic acidosis and to maintain an effective alveolar O₂ pressure (Miyachi & Katayama, 1999). All of these changes suggest that if the organism is unable to prevent additional acidosis, it may result in a complex series of metabolic effects during exercise, that lead to a decrease in $\dot{V}O_2$ at the end of exhaustive supramaximal exercise.

Paragraph number 4. A limitation of the above-mentioned research is that it has predominantly relied on correlations between pH changes and physiological modifications. A novel means to assess the effects of metabolic acidosis on the end-exercise decrease in $\dot{V}O_2$ would be delay the accumulation of H⁺ via the ingestion of a buffering agent [i.e., sodium bicarbonate (NaHCO₃) or sodium citrate taken 90–120 min before exercise] (Bishop *et al.*, 2004a). While pre-exercise metabolic alkalosis has controversial effects on performance improvement during high-intensity exercise, it has been reported to facilitate lactate and proton transport across the sarcolemmal membrane (2), and to enhance energy supply via glycolytic (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2004a) and oxidative metabolic pathways (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000). Pre-exercise alkalosis has equivocal effects on pulmonary $\dot{V}O_2$ kinetics during heavy exercises (Nielsen *et al.*, 2002; Kolkhorst *et al.*, 2004; Zoladz *et al.*, 2005; Berger *et al.*, 2006), but could result in increased CO₂ release and consequently may be associated with changes in ventilatory regulation.

Paragraph number 5. Therefore, the present research aimed to investigate, for the first time, the effects of altering extracellular pH on the end-exercise $\dot{V}O_2$ decrease during acute supramaximal exercise. Based on the aforementioned studies, it was hypothesised that pre-exercise alkalosis would prevent or reduce the $\dot{V}O_2$ decrease. In an attempt to verify this hypothesis, the oxygen uptake and performance responses of highly-trained participants were measured during 70-s of supramaximal exercise performed under induced alkalosis or a placebo condition.

Methods

Participants

Paragraph number 6. Eight trained males (age 21.7 ± 0.9 years, height 1.79 ± 0.02 m and body mass 73.4 ± 2.7 kg) volunteered for this study. They had at least five years of cycling experience and trained eight hours per week in sprint track-cycling and/or BMX. All of them were successful at national-level events. None had a history of pathology of the lower-limb muscles or joints. They were informed of the nature of the study and the possible risks and discomforts associated with the experimental procedures before giving their written consent to participate. The experimental design of the study was approved by the French Ethical Committee of Saint-Germain-en-Laye (n°2009-A01004-53) and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Experimental design

Paragraph number 7. The testing sessions took place in a well-ventilated laboratory at a temperature of 20–22°C. In addition to a familiarization session for all tests, the main experiment required the participants to be tested on three separate occasions in two weeks, with a minimum of 72 h between each test. All exercises were conducted using an electronically-braked cycle ergometer (Excalibur Sport, Lode, Groningen, The Netherlands). The vertical and horizontal positions of the saddle, handlebar height, crank and stem lengths were set to match the most comfortable and usual position of the participants. All exercise tests were performed in the standing position.

Paragraph number 8. An initial laboratory visit was scheduled to obtain data on physical characteristics, and to enable familiarization with the cycle ergometer and the supramaximal exercise test. On day two, participants performed a torque-velocity test in order to determine their maximal power output (P_{\max}), and a graded exercise test (GXT) to determine both their maximal $\dot{V}O_2$ ($\dot{V}O_{2\max}$) and their maximal aerobic power (MAP). At least 72 h later, participants performed the 70-s supramaximal exercise test (SXT) 90 min after the ingestion of either NaHCO_3 or a placebo (calcium carbonate: CaCO_3). A week later, participants performed the alternate condition, and both SXT were conducted at the same time of day to control for diurnal effects. Participants were required to consume no food or beverages (other than water) 2 h before testing and were asked not to consume alcohol or perform vigorous exercise in the 24 h before testing.

Substance ingestion.

Paragraph number 9. Participants ingested either 0.3 g·kg⁻¹ of NaHCO₃ (Alkalosis condition: ALK) or 0.2 g·kg⁻¹ of CaCO₃ (Placebo condition: PLA), contained within 1-g gelatin capsules, with 500 mL of water 90 min before performing the SXT. Treatment was assigned in a counterbalanced, randomized, double-blind manner.

First test session

Torque-velocity test

Paragraph number 10. Participants began with a 20-min warm-up consisting of 15 min of cycling at 100-150 W followed by a 5-s sprint. Then, the participants were asked to perform three maximal cycling sprints (5 s in duration with 8 min of total recovery) according to the protocol proposed by Dorel et al. (Dorel *et al.*, 2010). Three different resistive torques of 0, 0.7-1, 1.4-1.8 Nm.kg⁻¹ body mass were applied to obtain maximal force and power values from a large range of pedaling rates during the three bouts. After computation, the cumulated data from the three sprints were used to draw force- and power-velocity relationships and hence to determine maximum power (P_{\max}) and the corresponding specific optimal pedaling rate (f_{opt}) at which P_{\max} occurred (for details, see Dorel et al. (Dorel *et al.*, 2010)).

Assessment of Maximal Oxygen Uptake and Maximal Aerobic Power

Paragraph number 11. After 20 min of rest, participants performed a graded exercise test to determine their $\dot{V}O_{2\max}$ and their MAP (i.e. the power output achieved when $\dot{V}O_{2\max}$ was first reached). The progressive protocol consisted of 6 min of pedaling at 100 W followed by a ramp increase in power output of 20 W.min⁻¹ until voluntary exhaustion. Participants were instructed to maintain their chosen preferred cadence as long as possible and the test was completed when the cadence decreased more than 10 rpm below this value for more than 5 s despite strong verbal encouragement. All ventilatory parameters and heart rate (HR) values were recorded continuously during the test.

Second and third test sessions

70-s supramaximal exercise tests

Paragraph number 12. During the 3rd and 4th visits, participants performed supramaximal exercise tests in one of the two conditions of supplementation (ALK or PLA). One hour after the beginning of the supplementation, they performed a standardized warm-up consisting of 8 min at 150 W, 2 min at 260 W, a recovery period (2 min of rest), a 10-s sprint of progressively increasing intensity with the last 3 s performed at maximal intensity, 90 s of

recovery, and finally two brief 5-s sprints interspersed with 90 s of recovery. Upon completion of the warm-up, participants rested for 10 min before performing the SXT. Before starting the 70-s test, participants were asked to assume the ready position and await the start signal. The initial work rate ($p \approx 50$) was held constant during the first 20 s to avoid differences in pacing strategies between the two tests. Participants were then asked to maintain constant their pedaling rate (isokinetic mode) at 90 rpm. The power $p \approx 50$ was defined as the intensity midway between the MAP and the maximal theoretical power produced at the corresponding pedaling rate (determined from the torque-velocity test). After this initial period of 20 s, subjects were asked to perform an all-out maximal effort in the isokinetic mode until the end of the test. Strong verbal encouragement was provided to each subject during all SXT, but no feedback on test duration was given to the participants.

Material and data collection / processing

Performance

Paragraph number 13. During the SXT, different mechanical power outputs (W) were calculated: the mean power for the entire test (P_{tot}), during the first 20 s (P_{20}), the last 50 s (P_{50}) and the last 5 s ($P_{5_{end}}$). Then, a fatigue index (FI) was calculated as: $(P_{5_{end}} - P_{20})/P_{20}$ and expressed as a percentage.

Cardio-respiratory parameters

Paragraph number 14. During both sessions (GXT and SXT), breath-by-breath $\dot{V}O_2$, minute ventilation (\dot{V}_E), carbon dioxide production ($\dot{V}CO_2$), respiratory frequency (Rf), tidal volume (V_T), and end-tidal O_2 and CO_2 tensions (P_{ETO_2} and P_{ETCO_2}) were recorded continuously with a laboratory metabolic cart (Quark CPET, Cosmed, Roma, Italy). Calibration of the gas analyser was performed according to the manufacturer's instructions before each test for each subject. The different ventilatory variables were recorded continuously during the entire experimental protocol. For the GXT, breath-by-breath gas exchange values were smoothed (i.e., 3-s moving average). The highest $\dot{V}O_2$ value in a 30-s period was considered as the $\dot{V}O_{2_{max}}$. The criteria used for the determination of $\dot{V}O_{2_{max}}$ were threefold: a plateau in $\dot{V}O_2$ despite an increase in power output, a respiratory exchange ratio above 1.1 and a HR above 90% of the predicted maximal HR (HR_{max}) (Howley *et al.*, 1995). To determine peak $\dot{V}O_2$ ($\dot{V}O_{2_{peak}}$) and peak \dot{V}_E ($\dot{V}_{E_{peak}}$) during the supramaximal exercise tests, values were smoothed (i.e. 3-s

central moving average) and then a 5-s average was applied in order to compare $\dot{V}O_2$ and other ventilatory responses ($\dot{V}CO_2$, V_T , Rf, \dot{V}_E , $PETO_2$). In the same line, end $\dot{V}O_2$ ($\dot{V}O_{2_end}$) and end \dot{V}_E (\dot{V}_{E_end}) were determined in the last 5 s of the SXT. Changes in ventilatory parameters were calculated by [(Peak value - End value)/ Peak Value * 100]. The $\dot{V}O_2$ decline was considered a $\dot{V}O_2$ decrease when the magnitude of the phenomenon was larger than 5% of the peak value observed during exercise (Hanon *et al.*, 2013). The accumulated oxygen consumption (AOC) was calculated from the area under the $\dot{V}O_2$ curve (L.min⁻¹). HR was measured and recorded continuously with a heart rate monitor (S810i and T61 electrode belt, Polar Electro, Kempele, Finland) for each subject. Finally, blood oxygen saturation (SpO₂) was measured by pulse oxymetry with a digital probe (Cosmed, Roma, Italy).

Capillary blood sampling and analysis

Paragraph number 15. At rest, after the warm-up of the torque-velocity protocol, and at exhaustion, 5 and 8 min after the GXT, 5- μ L capillary blood was collected from the earlobe and blood lactate concentration ($[La^-]_b$) was determined with a Lactate Pro analyser (Arkray, Japan). Before and after the SXT session, arterialised capillary blood samples (85 μ L) were analysed to measure blood pH, arterial oxygen saturation (SaO₂), base excess (BE) and $[HCO_3^-]_b$ with an i-STAT dry chemistry analyser (Abbott, Les Ulis, France). Capillary blood was sampled before ingestion of the test substance, 90 min post-ingestion (i.e., immediately pre-exercise), immediately after the SXT, and after 5 and 8 min of recovery. Measurements with the i-STAT portable analyser, anaerobically collected (cartridges closed hermetically) have been found to be reliable (ICC = 0.77–0.95) following maximal exercise (Dascombe *et al.*, 2007).

Statistical analysis

Paragraph number 16. Descriptive statistics are expressed as mean \pm SE. The level of significance was set at $P < 0.05$. Differences in PLA and ALK were identified by means of the paired student t-test or Wilcoxon signed rank test depending on the normality. One-way ANOVA (1 group x 2 treatments), with repeated measures for treatment, were used to compare ventilatory, blood and performance data. Where appropriate, post-hoc comparisons were employed (Student-Newman-Keuls test). Relationships between variables were analyzed by a Pearson's correlation coefficient. In addition, the effect size (ES) difference between PLA and ALK groups was calculated for results that approached significance ($P < 0.16$). The

pooled SD was used to calculate ES when the SD were unequal. Cohen's conventions for effect size were used for interpretation, where $ES = 0.2, 0.5,$ and 0.8 are considered as small, medium, and large, respectively. All statistical analyses were conducted using Sigmastat software (version 3.1).

Results

Graded exercise test

Paragraph number 17. $\dot{V}O_{2\max}$ during the graded exercise test was equal to $4.42 \pm 0.17 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ and MAP corresponded to $370.0 \pm 9.3 \text{ W}$. Maximal mean values of \dot{V}_E , Rf and V_T were $167.0 \pm 7.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, $56.1 \pm 1.6 \text{ cycles}\cdot\text{min}^{-1}$, and $3.0 \pm 0.1 \text{ L}$, respectively. Mean values of HR_{\max} corresponded to $190 \pm 4 \text{ beats}\cdot\text{min}^{-1}$.

Supramaximal exercise tests

Blood gas variables

Paragraph number 18. As shown in Figure 1, the ingestion of NaHCO_3 produced the expected effects on blood acid-base status, and $[\text{HCO}_3^-]_b$, blood pH and BE were significantly elevated 90 min post-ingestion and immediately before the SXT ($P < 0.05$). Blood pH, $[\text{HCO}_3^-]_b$, and BE significantly decreased after the SXT in both conditions, but blood pH and BE were significantly higher in the ALK condition at 0, 5 and 8 min during the recovery compared to the PLA condition ($P < 0.05$). After SXT, $[\text{La}^-]_b$ significantly increased, but no significant difference was observed for $[\text{La}^-]_b$ between conditions ($P > 0.05$). Arterial saturation did not decrease in either the PLA or ALK conditions during the SXT (Table 1, $P > 0.05$).

INSERT FIGURE 1 ABOUT HERE

$\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$ and ventilatory responses

Paragraph number 19. As shown in Figure 2, oxygen uptake increased to a steady state corresponding to 95.2 ± 3.6 (PLA) and 100.8 ± 3.2 (ALK) % of $\dot{V}O_{2\max}$, with no significant difference between conditions ($P > 0.05$). At the end of the SXT, $\dot{V}O_2$ decreased by 13.0 ± 2.9 % in PLA ($P < 0.01$), and 6.6 ± 2.1 % in ALK ($P < 0.05$) (Table 1), Although there was a trend ($P = 0.16$, $ES = 0.89$) for the effect of pre-exercise alkalosis on the magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease between conditions, this effect was not significant, since two participants presented the same amplitude of $\dot{V}O_2$ decrease in both conditions. It was noteworthy that for the other six participants, pre-exercise alkalosis significantly prevented the magnitude of $\dot{V}O_2$ decrease

(PLA: 14.7±3.6% to ALK: 3.6±0.9%, $P < 0.05$). Furthermore, $\dot{V}O_{2\text{end}}$ was significantly lower in the PLA condition compared to the ALK condition in all participants ($P < 0.05$). This value was also significantly lower than $\dot{V}O_{2\text{max}}$ in the PLA condition ($P < 0.05$), but not in the ALK condition ($P > 0.05$). Finally, AOC during the test was significantly greater in ALK compared to PLA ($P < 0.05$).

INSERT FIGURE 2 AND TABLE 1 ABOUT HERE

Paragraph number 20. As shown in Table 1, $\dot{V}CO_2$ significantly decreased in both conditions ($P < 0.05$), but $\dot{V}CO_{2\text{peak}}$ and $\dot{V}CO_{2\text{end}}$ were significantly higher in the ALK condition compared to the PLA condition. Furthermore, a significant decrease in \dot{V}_E was also observed at the end of SXT in both conditions (PLA: 9.9±2.4%, $P < 0.01$, and ALK : 4.3±2.0%, $P < 0.05$) in all subjects. The decrease was significantly less pronounced in the ALK ($P < 0.05$) compared to the PLA condition. The decrease in $\dot{V}O_2$ was significantly related to this decrease in \dot{V}_E in all eight subjects ($r = 0.61$, $P < 0.01$) and in the six subjects who presented a different amplitude of $\dot{V}O_2$ decrease in both conditions ($r = 0.72$, $P < 0.01$, Figure 3). The changes in the $\dot{V}O_2$ decrease between the PLA and ALK conditions was highly correlated to the change in the \dot{V}_E decrease ($r = 0.96$, $P < 0.001$, $n = 8$). Finally, during the last 20 s of the SXT, $PETO_2$ was significantly reduced in the ALK condition ($P < 0.01$), whereas $PETCO_2$ ($P < 0.001$) was significantly higher in the ALK condition compared to the PLA condition.

INSERT FIGURE 3 ABOUT HERE

Mechanical performance

Paragraph number 21. The values for P20, P50, P5_{end} and P_{tot} of the SXT are given in Table 1. During the first 20 s of the SXT, the mean power output was not significantly different between both conditions ($P > 0.05$). As shown in Figure 4, this parameter significantly decreased for both conditions ($P < 0.001$), and significant higher values were observed for P50 and P_{tot} in the ALK condition ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) compared to the PLA

condition. Furthermore, the $\dot{V}O_2$ decrease was not related to the decrease in power-output in the last 50 s in both conditions ($P > 0.05$), and the difference in power output between ALK and PLA was not related to difference in $\dot{V}O_2$ decrease ($P > 0.05$).

INSERT FIGURE 4 ABOUT HERE

Discussion

Paragraph number 22. In the present study, all participants presented a significant $\dot{V}O_2$ decrease in the placebo condition at the end of the supramaximal cycling exercise. The new result was that raising the blood pH before and during the supramaximal exercise task via pre-exercise ingestion of NaHCO_3 , reduced the $\dot{V}O_2$ decrease in six out of eight well-trained participants. The decrease in $\dot{V}O_2$ in both conditions was related to the amplitude of \dot{V}_E decrease, and the difference in the $\dot{V}O_2$ decrease between the PLA and ALK conditions was positively correlated with the difference in the \dot{V}_E decrease. The $\dot{V}O_2$ decrease was not associated with the changes in power output in both conditions.

$\dot{V}O_2$ decrease and blood acidosis

Paragraph number 23. In the present study, a $\dot{V}O_2$ decrease of 13% was observed at the end of the 70-s supramaximal exercise in all eight participants in the PLA condition (Figure 2), which confirmed previous results at the end of running (Perrey *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2005a; Hanon *et al.*, 2010) and cycling (Astrand & Saltin, 1961; Mortensen *et al.*, 2008) exhaustive exercises. In order to test the hypothesis that pre-exercise alkalosis could reduce the magnitude of this phenomenon, we used a loading dose of 0.3 kg^{-1} body mass of NaHCO_3 in our experimental design. As expected, this resulted in significant alterations of blood pH, $[\text{HCO}_3^-]_b$ and BE before the supramaximal test (Figure 1) (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2004a), compared to the PLA condition. The effect of pre-exercise-induced alkalosis on six participants was in accordance with our hypothesis, since the $\dot{V}O_2$ decrease was significantly modified from $14.7 \pm 3.6 \%$ in PLA to 3.6 ± 0.9 in ALK ($P < 0.05$) in these subjects. Furthermore, AOC and $\dot{V}O_{2 \text{ end}}$ were significantly higher in the ALK condition in all subjects compared to the PLA condition ($P < 0.05$). This last result is in line with the

relationship observed between $\dot{V}O_{2\text{end}}$ at the end of 400-m race and acid-base status measured at 300-m of the race (Hanon *et al.*, 2010). This suggests that higher blood pH values due to either pre-exercise alkalosis (present study) or a greater use of aerobic energy resources (present study and (Hanon *et al.*, 2010)) could influence $\dot{V}O_2$ kinetics at the end of a supramaximal exercise performed until exhaustion.

Decrease in $\dot{V}O_2$ and decrease in ventilation

Paragraph number 24. In the present study, our results clearly indicated that the $\dot{V}O_2$ decrease was related to the \dot{V}_E decrease at the end of the SXT ($r = 0.96$, $P < 0.001$, $n = 8$, Figure 3), and that pre-exercise ingestion of NaHCO_3 was associated with a larger $\dot{V}_{E\text{end}}$ and a smaller end-exercise decrease in \dot{V}_E (Table 1). Importantly, ALK did not have a significant effect on the $\dot{V}_{E\text{peak}}$ during the SXT (PLA: 180.9 ± 8.0 versus ALK: 186.9 ± 7.9 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, $P > 0.05$). This is in accordance with results of Nielsen *et al.* (Nielsen *et al.*, 2002), suggesting that the peak ventilatory response to maximal cycling exercise was not attenuated by excess H^+ concentration. All these results could be explained by a reduction of the dead space ventilation with change in arterial O_2 partial pressure with alkalosis (Nielsen *et al.*, 2002). Indeed, PETO_2 , which is a reflection of the alveolar oxygen tension, was significantly lower in the ALK condition in the present study, and could explain lower magnitude of the $\dot{V}O_2$ decrease with pre-exercise alkalosis. In addition, the significant difference in PETCO_2 at the end of SXT between both conditions (Table 1), is in favor of metabolic alkalosis allowing buffering of protons accumulation and stimulating chemoreceptor to counteract \dot{V}_E decrease. This also likely contributed to explain the significant higher $\dot{V}CO_2$ value at the end of ALK SXT (Peronnet & Aguilaniu, 2006) and confirmed the mathematical model of Duffin (Duffin, 2005) which proposed a change in the chemoreflex threshold for PCO_2 with alkalosis.

Decrease in $\dot{V}O_2$ and intracellular acidosis

Paragraph number 25. This decrease in $\dot{V}O_2$ could also be related to the inhibition of oxidative phosphorylation induced by acidosis in the contracting muscles (Jubrias *et al.*, 2003). Indeed, it has been reported that muscle acidosis could decrease the effectiveness of

the signals driving oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Forbes *et al.*, 2005), and that a muscle pH of 6.6 produced a lower oxidative flux compared to a pH of 7.0 at a constant submaximal ADP concentration (Walsh *et al.*, 2002). Although untested in the present study, these cellular effects induced by acidosis could also contribute to explain the greater decrease in $\dot{V}O_2$ at the end of exercise in the PLA condition when blood pH values were around 7.10, compared to the ALK condition when post-exercise pH values were ~ 7.25 . Sodium bicarbonate ingestion has previously been reported to reduce pH decrease in skeletal muscle (Stephens *et al.*, 2002), and, as acidosis has been reported to affect OXPHOS (Forbes *et al.*, 2005), this could help to explain why subjects had a higher $\dot{V}O_{2\text{end}}$ values in the ALK condition. In addition, pre-exercise alkalosis has been reported to induce higher glycolytic and oxidative pathways in skeletal muscle compared to placebo condition (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000). This could also explain the significant higher accumulated oxygen consumption and the less-pronounced $\dot{V}O_2$ decrease with pre-exercise alkalosis.

Decrease in $\dot{V}O_2$ and performance

Paragraph number 26. In the present study, a large decrease in mean power output during the last 50 s in the PLA condition was measured, with a less pronounced decrease in power output in the ALK condition. However, we did not observe a relationship between the $\dot{V}O_2$ decrease and the change in power output during the SXT in the PLA condition, which was in accordance with previous results performed at a constant power output (Perrey *et al.*, 2002; González-Alonso & Calbet, 2003; Mortensen *et al.*, 2008; Hanon *et al.*, 2013) and an all-out condition (Hanon *et al.*, 2010). Furthermore, the smaller decrease in $\dot{V}O_2$ in the ALK condition could not be explained by a higher initial power output with metabolic alkalosis. Indeed, we specifically chose to maintain the power output at a high constant level during the first 20 s in order to avoid a faster all-out start during ALK that would influence oxygen uptake and exercise tolerance (Jones *et al.*, 2008). Then, the changes in power output in the ALK condition were similar throughout the SXT, which was consistent with previous research (Bishop *et al.*, 2004a). Although it was not measured in the present study, previous research (Costill *et al.*, 1984) has reported that these changes are associated with changes in muscle pH, which support the idea that changes in performance did not influence $\dot{V}O_2$ decrease in the present study, but could be affected by intracellular pH.

Decrease in $\dot{V}O_2$ and subjects responses

Paragraph number 27. Whereas both ventilatory parameters and power output were affected by an alteration in blood pH, 2/8 participants were non-responders to pre-exercise alkalosis for $\dot{V}O_2$ decrease. It is conceivable that the limited effects of alkalosis in these two participants could result from the small difference in their resting pH values (pH difference between ALK – PLA of 0.06) after supplementation between both conditions compared to the other participants (pH difference between ALK – PLA of 0.10). This divergence could also be due to the fact that the capacity of fixed physicochemical buffers in the blood varies and that ventilatory compensation of metabolic acidosis also varies (Peronnet & Aguilaniu, 2006). Then, these nonresponder participants could explain why in some experiments, pre-exercise alkalosis altered muscle fatigue and performance (Higgins *et al.*, 2013) and metabolic responses, whereas in other studies it does (Saunders *et al.*, 2013).

Conclusion

Paragraph number 28. In conclusion, even though the end-exercise $\dot{V}O_2$ decrease is likely to be the consequence of several factors induced by high-intensity exercise, the results of the present study demonstrate that a $\dot{V}O_2$ decrease occurs in both placebo and the pre-exercise alkalosis conditions at the end of a 70-s supramaximal exercise test. Interestingly, pre-exercise alkalosis is able to reduce this decrease in most participants. This appears to be due to changes in the \dot{V}_E decrease as a consequence of changes in the extracellular pH, but not to changes in performance improvement.

Acknowledgments

Paragraph number 29. The authors thank the athletes for their time and efforts, and are grateful to the French Ministry of Health, Youth and Sport for their financial support. They also thank Doctor Christian Palierne for his medical assistance, and Pierrick Arnal, Julien Siracusa, and Thibault Herluison for their technical assistance.

Disclosures

Paragraph number 30. The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

References

1. Astrand PO, Saltin B. Maximal oxygen uptake and heart rate in various types of muscular activity. *J Appl Physiol* 1961;16:977–81.
2. Becker HM, Deitmer JW. Voltage dependence of H⁺ buffering mediated by sodium bicarbonate cotransport expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 2004;279(27):28057–62.
3. Berger NJ, McNaughton LR, Keatley S, Wilkerson DP, Jones AM. Sodium bicarbonate ingestion alters the slow but not the fast phase of VO₂ kinetics. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38:1909–17.
4. Bishop D, Edge J, Davis C, Goodman C. Induced metabolic alkalosis affects muscle metabolism and repeated-sprint ability. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(5):807–13.
5. Bohr C, Hasselbach K, Krogh A. Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung ueb. *Skand Arch Physiol* 1904;16(402–412).
6. Costill DL, Verstappen F, Kuipers H, Janssen E, Fink W. Acid-base balance during repeated bouts of exercise: influence of HCO₃. *Int J Sports Med* 1984;5(5):228–31.
7. Dascombe BJ, Reaburn PR, Sirotic AC, Coutts AJ. The reliability of the i-STAT clinical portable analyser. *J Sci Med Sport* 2007;10(3):135–40.
8. Dorel S, Couturier A, Lacour J-R, Vandewalle H, Hautier C, Hug F. Force-velocity relationship in cycling revisited: benefit of two-dimensional pedal forces analysis. *Med Sci Sports Exerc* 2010;42(6):1174–83.
9. Duffin J. Modelling the respiratory chemoreflex control of Acid-base balance. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2005;6:5836–9.
10. Fitts RH. Muscle fatigue: the cellular aspects. *Am J Sports Med* 1996;24(6):S9–13.
11. Forbes SC, Raymer GH, Kowalchuk JM, Marsh GD. NaHCO₃-induced alkalosis reduces the phosphocreatine slow component during heavy-intensity forearm exercise. *J Appl Physiol* 2005;99(5):1668–75.
12. Forster HV, Pan LG. Contribution of acid-base changes to control of breathing during exercise. *Can J Appl Physiol* 1995;20:380–94.
13. Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH, Brooks S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol* 1993;75:712–9.
14. González-Alonso J, Calbet JAL. Reductions in systemic and skeletal muscle blood flow and oxygen delivery limit maximal aerobic capacity in humans. *Circulation* 2003;107(6):824–30.

15. Hanon C, Dorel S, Delfour-Pereyhton R, et al. Prevalence of cardio-respiratory factors in the occurrence of the decrease in oxygen uptake during supra-maximal, constant-power exercise. *SpringerPlus* 2013;2(1):651.
16. Hanon C, Lepretre PM, Bishop D, Thomas C. Oxygen uptake and blood metabolic responses to a 400-m run. *Eur J Appl Physiol* 2010;109(2):233–40.
17. Hanon C, Thomas C. Consequences of optimal pacing strategies for 400-, 800- and 1500-m races on VO₂ response. *Journal of Sports Sciences*
18. Higgins MF, James RS, Price MJ. The effects of sodium bicarbonate (NaHCO₃) ingestion on high intensity cycling capacity. *J Sports Sci* 2013;
19. Hirvonen J, Nummela A, Rusko H, Rehunen S, Harkonen M. Fatigue and changes of ATP, creatine phosphate, and lactate during the 400-m sprint. *Can J Sport Sci* 1992;17:141–4.
20. Hollidge-Horvat MG, Parolin ML, Wong D, Jones NL, Heigenhauser GJ. Effect of induced metabolic alkalosis on human skeletal muscle metabolism during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278(2):E316–29.
21. Howley ET, Bassett DR Jr, Welch HG. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27(9):1292–301.
22. Jones AM, Wilkerson DP, Vanhatalo A, Burnley M. Influence of pacing strategy on O₂ uptake and exercise tolerance. *Scand J Med Sci Sports* 2008;18(5):615–26.
23. Jubrias SA, Crowther GJ, Shankland EG, Gronka RK, Conley KE. Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J. Physiol.* 2003;553(2):589–99.
24. Kolkhorst FW, Rezende RS, Levy SS, Buono MJ. Effects of sodium bicarbonate on VO₂ kinetics during heavy exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(11):1895–9.
25. Kristensen JM, Kristensen M, Juel C. Expression of Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter proteins (NBCs) in rat and human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2004;182(1):69–76.
26. Lindinger MI, Heigenhauser GJF. Effects of gas exchange on acid-base balance. *Compr Physiol* 2012;2(3):2203–54.
27. Miyachi M, Katayama K. Effects of maximal interval training on arterial oxygen desaturation and ventilation during heavy exercise. *Jpn J Physiol* 1999;49(5):401–7.
28. Mortensen SP, Damsgaard R, Dawson EA, Secher NH, González-Alonso J. Restrictions in systemic and locomotor skeletal muscle perfusion, oxygen supply and VO₂ during high-intensity whole-body exercise in humans. *J. Physiol. (Lond.)* 2008;586(10):2621–35.

29. Nielsen HB, Bredmose PP, Stromstad M, Volianitis S, Quistorff B, Secher NH. Bicarbonate attenuates arterial desaturation during maximal exercise in humans. *J Appl Physiol* 2002;93(2):724–31.
30. Nielsen HB. pH after competitive rowing: the lower physiological range? *Acta Physiol Scand* 1999;165:113–4.
31. Nummela A, Vuorimaa T, Rusko H. Changes in force production, blood lactate and EMG activity in the 400-m sprint. *J Sports Sci* 1992;10(3):217–28.
32. Peronnet F, Aguilaniu B. Lactic acid buffering, nonmetabolic CO₂ and exercise hyperventilation: A critical reappraisal. *Respir Physiol Neurobiol* 2006;150:4–18.
33. Perrey S, Candau R, Millet GY, Borrani F, Rouillon JD. Decrease in oxygen uptake at the end of a high-intensity submaximal running in humans. *Int J Sport Med* 2002;23(4):298–304.
34. Saunders B, Sale C, Harris RC, Sunderland C. Sodium Bicarbonate and High-Intensity Cycling Capacity: Variability in Responses. *Int J Sports Physiol Perform* 2013;
35. Stephens TJ, McKenna MJ, Canny BJ, Snow RJ, McConell GK. Effect of sodium bicarbonate on muscle metabolism during intense endurance cycling. *Med Sci Sports Exerc* 2002;34(4):614–21.
36. Thomas C, Hanon C, Perrey S, Le Chevalier JM, Couturier A, Vandewalle H. Oxygen uptake response to an 800-m running race. *Int J Sports Med* 2005;26(4):268–73.
37. Walsh B, Tiivel T, Tonkonogi M, Sahlin K. Increased concentrations of Pi and lactic acid reduce creatine-stimulated respiration in muscle fibers. *J Appl Physiol* 2002;92(6):2273–6.
38. Zoladz JA, Szkutnik Z, Duda K, Majerczak J, Korzeniewski B. Preexercise metabolic alkalosis induced via bicarbonate ingestion accelerates VO₂ kinetics at the onset of a high-power-output exercise in humans. *J Appl Physiol* 2005;98:895–904.

Table Legends

Table 1: Group mean (\pm SE) physiological responses to the 70-s all out test after PLA and ALK supplementations. n = 8

PLA: group with placebo supplementation; ALK: group with sodium bicarbonate supplementation; P20: Mean power output during the first 20 s of the test, P50: Mean power output during the last 50 s of the test, Ptot: Mean power output during the whole 70 s of the test; P5_{end}: Mean power output during the last 5 s of the test; $\dot{V}O_{2\ peak}$ and $\dot{V}O_{2\ end}$: peak and end values of pulmonary oxygen uptake; $\dot{V}CO_{2\ peak}$ and $\dot{V}CO_{2\ end}$: peak and end values of expired carbon dioxide; \dot{V}_E : pulmonary ventilation; $PETO_2$ and $PETCO_2$: End-tidal partial pressure of O_2 and CO_2 during the last 20 s of the test.

* $P < 0.05$ Significant difference between PLA and ALK

\$ $P < 0.05$ Significant difference from peak value

Table 1: Group mean (\pm SE) physiological responses to the 70-s all out test after PLA and ALK supplementations. n = 8

PLA: group with placebo supplementation; ALK: group with sodium bicarbonate supplementation; P20: Mean power output during the first 20 s of the test, P50: Mean power output during the last 50 s of the test, Ptot: Mean power output during the whole 70 s of the test; P5_{end}: Mean power output during the last 5 s of the test; $\dot{V}O_{2\ peak}$ and $\dot{V}O_{2\ end}$: peak and end values of pulmonary oxygen uptake; $\dot{V}CO_{2\ peak}$ and $\dot{V}CO_{2\ end}$: peak and end values of expired carbon dioxide; $\dot{V}_{E\ peak}$ and $\dot{V}_{E\ end}$: peak and end values of pulmonary ventilation; $PETO_2$ and $PETCO_2$: End-tidal partial pressure of O_2 and CO_2 during the last 20 s of the test. Arterial saturation values was given at the beginning ($t = 0s$) and at the end of exercise ($t = 70s$)

	PLA	ALK
P20 (W)	817.4 \pm 32.0	847.8 \pm 41.7
P50 (W)	494.8 \pm 18.0	522.6 \pm 20.8*
Ptot (W)	584.3 \pm 16.8	605.6 \pm 16.4*
P5 _{end} (W)	351.5 \pm 17.9	372.9 \pm 24.1
Fatigue index (%)	56.5 \pm 2.7 %	55.0 \pm 4.1%
Accumulated Oxygen consumption (L.min ⁻¹)	420.6 \pm 20.9	494.8 \pm 25.8*
$\dot{V}O_{2\ peak}$ (L.min ⁻¹)	4.21 \pm 0.21	4.46 \pm 0.18
$\dot{V}O_{2\ end}$ (L.min ⁻¹)	3.66 \pm 0.22 [§]	4.14 \pm 0.13 ^{§*}
Difference _{between peak and end values for VO2} (%)	13.0 \pm 2.9	6.6 \pm 2.1
$\dot{V}CO_{2\ peak}$ (L.min ⁻¹)	5.6 \pm 0.1	6.5 \pm 0.2*
$\dot{V}CO_{2\ end}$ (L.min ⁻¹)	5.4 \pm 0.1 [§]	6.1 \pm 0.3 ^{§*}
Difference _{between peak and end values for VCO2} (%)	5.1 \pm 1.5	5.1 \pm 1.6
$\dot{V}_{E\ peak}$ (L.min ⁻¹)	180.9 \pm 8.0	186.9 \pm 7.9
$\dot{V}_{E\ end}$ (L.min ⁻¹)	163.3 \pm 9.4 [§]	179.1 \pm 8.9 [§]
Difference _{between peak and end values for VE} (%)	9.9 \pm 2.4	4.3 \pm 2.0*
$PETO_2$	119.7 \pm 1.3	118.1 \pm 1.1*
$PETCO_2$	38.6 \pm 1.3	41.3 \pm 1.1*
Arterial saturation at t = 0s (%)	97.0 \pm 0.4	96.1 \pm 0.3
Arterial saturation at t = 70s (%)	97.4 \pm 0.3	97.4 \pm 0.3

* $P < 0.05$ Significant difference between PLA and ALK

[§] $P < 0.05$ Significant difference from peak value

Legend Figures

Figure 1: Blood pH (A), $[\text{HCO}_3^-]$ (B), base excess (C), and [lactate] (D) responses post-ingestion of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white), 60 min post-ingestion (Post-Ing), immediately before (Pre-Ex), immediately after the 70-s supramaximal exercise (Post-Ex) and at 5 (R5) and 8 (R8) min of the recovery after the supramaximal exercise test.

n = 8 for PLA and n = 8 for ALK

Figure 2: Mean \pm SE ventilatory and gas exchange responses during the 70-s supramaximal exercise test after supplementation of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white) prior to the supramaximal exercise

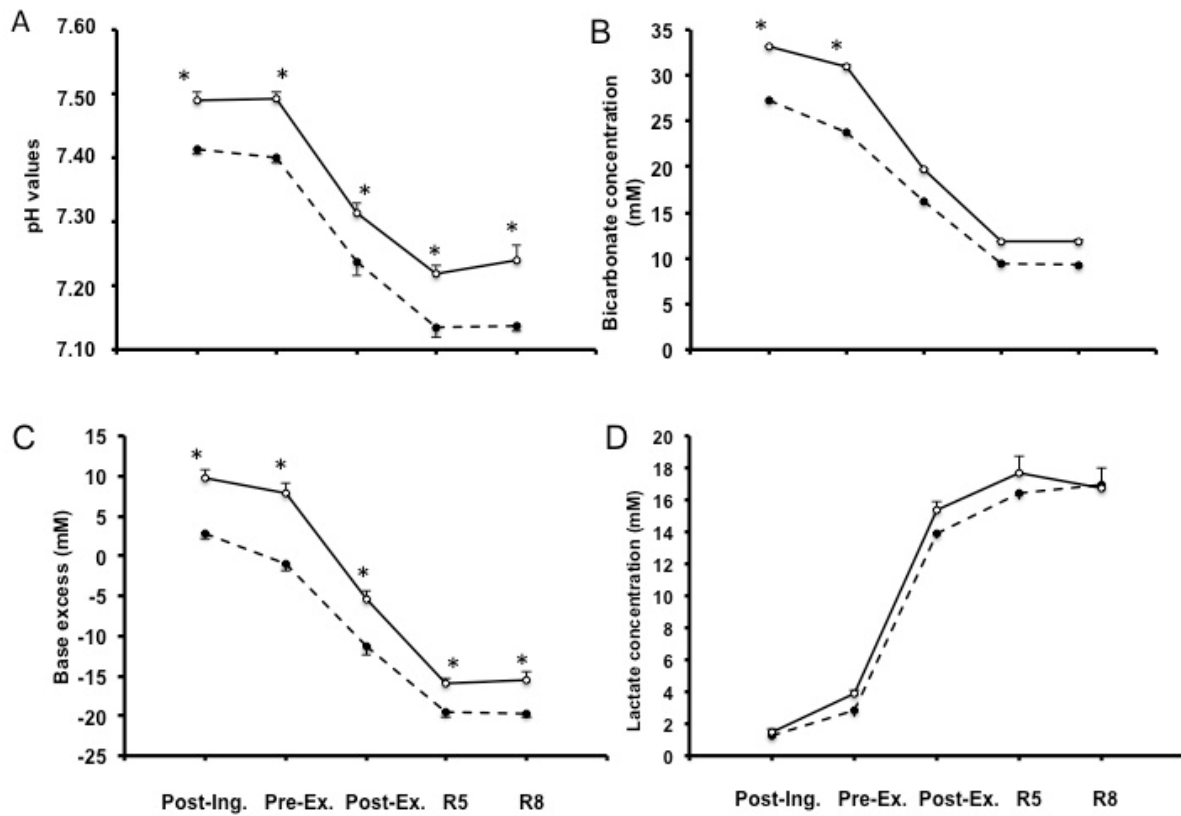
n = 8 for PLA and n = 8 for ALK

Figure 3: Relationships between $\dot{V}O_2$ decrease and \dot{V}_E decrease ($r = 0.72$, $P < 0.01$, $n = 6$ subjects), after supplementation of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white) prior supramaximal exercise in six participants who presented a $\dot{V}O_2$ decrease greater than 5% in Placebo.

Figure 4: Mean \pm SE power output during the 70-s supramaximal test after supplementation of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white).

Figure 1: Blood pH (A), $[\text{HCO}_3^-]$ (B), base excess (C), and [lactate] (D) responses post-ingestion of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white), 60 min post-ingestion (Post-Ing), immediately before (Pre-Ex), immediately after the 70-s supramaximal exercise (Post-Ex) and at 5 (R5) and 8 (R8) min of the recovery after the supramaximal exercise test.

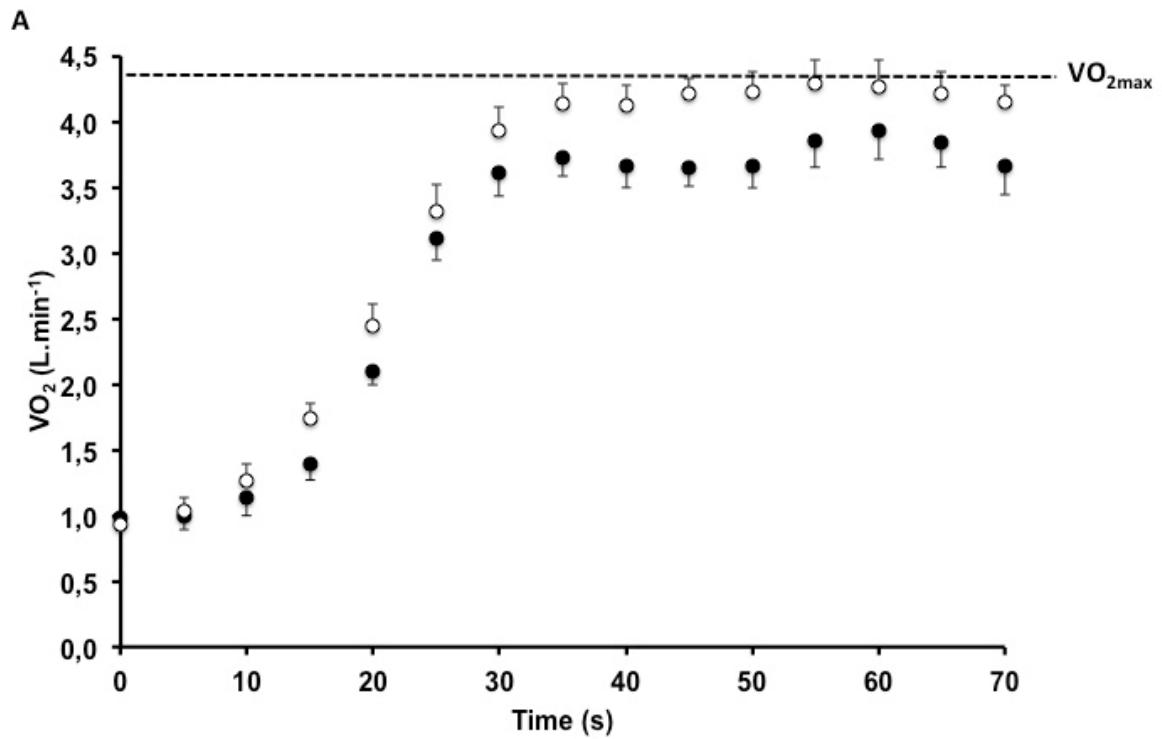
$n = 8$ for PLA and $n = 8$ for ALK



* $P < 0.05$ Significant difference between PLA and ALK

Figure 2: Mean \pm SE ventilatory and gas exchange responses during the 70-s supramaximal exercise test after supplementation of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white) prior to the supramaximal exercise

$n = 8$ for PLA and $n = 8$ for ALK



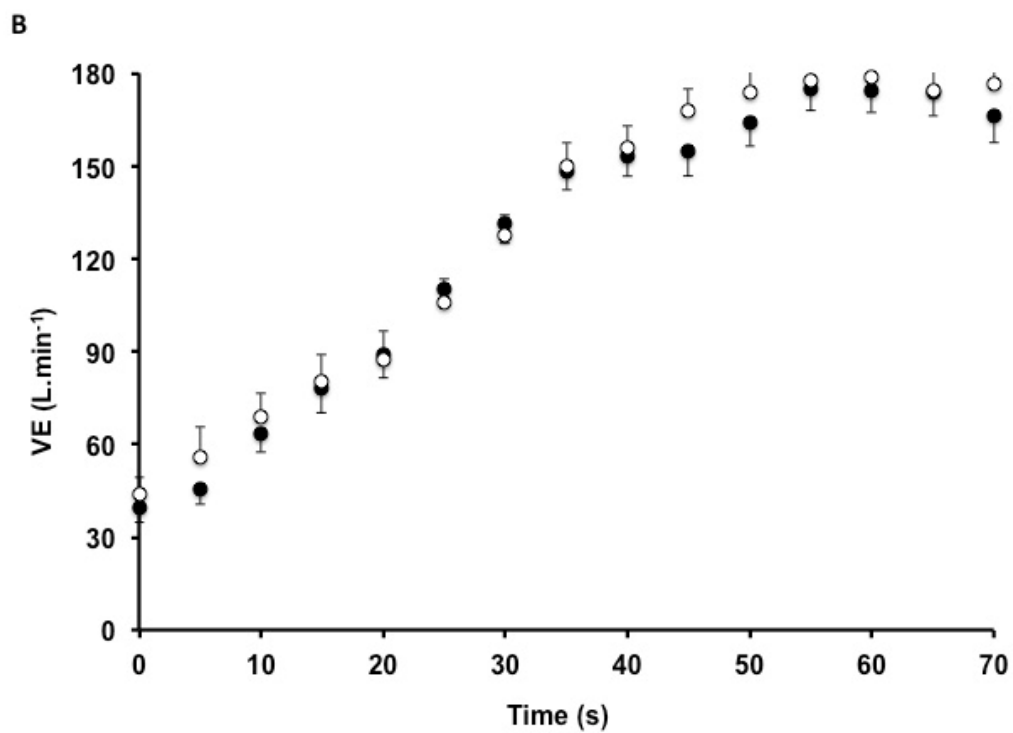


Figure 3: Relationships between $\dot{V}O_2$ decrease and \dot{V}_E decrease ($r = 0.72$, $P < 0.01$, $n = 6$ subjects), after supplementation of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white) prior supramaximal exercise in six participants who presented a $\dot{V}O_2$ decrease greater than 5% in Placebo.

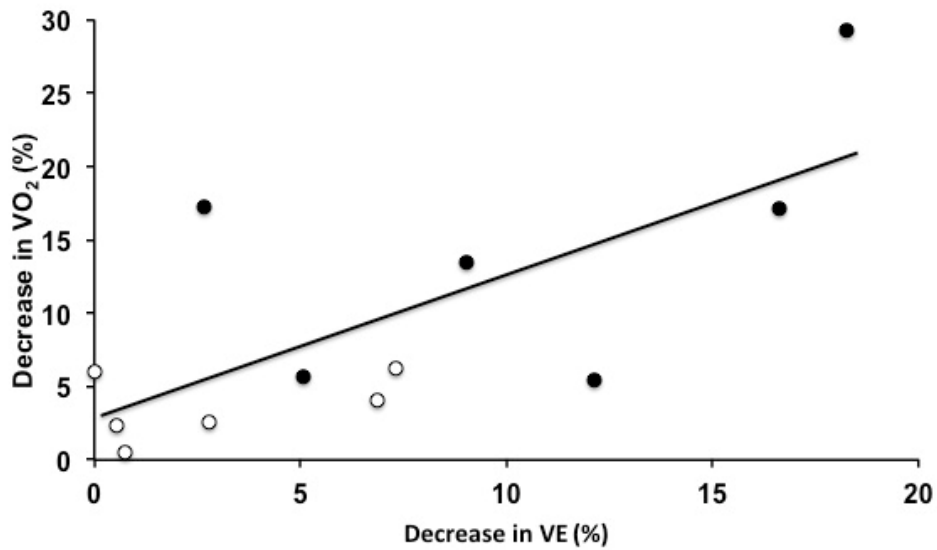
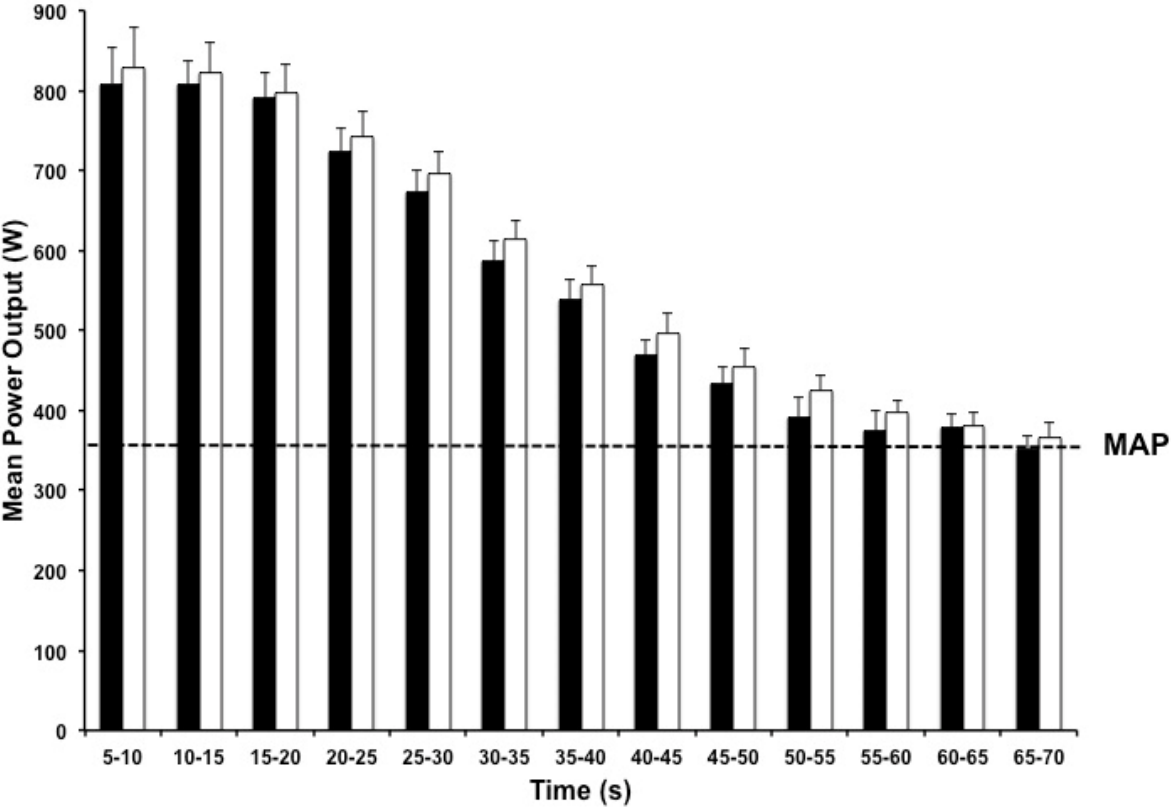


Figure 4: Mean \pm SE power output during the 70-s supramaximal test after supplementation of placebo (PLA: black) and sodium bicarbonate (ALK: white). (MAP: maximal aerobic speed) $n = 8$



C. Annexe n°3.

Original Investigation – Applied Sciences

Running Title: Alkalosis and all-out repeated-sprint ability

Effect of metabolic induced-alkalosis on performance in world-class track cyclists

Rémi Delfour-Peyrethon ^{1,2}, Claire Thomas ^{1,3}, David J. Bishop ⁴, Sylvain Dorel ^{1,2}, François Hug ^{2,5}, Christine Hanon ¹

¹ National Institute of Sports, Expertise and Performance (INSEP), Research Department, Laboratory Sport, Expertise, Performance, 11 avenue du Tremblay, F-75012 Paris, France.

² University of Nantes, Laboratory “Motricité, Interactions, Performance” (EA 4334), F-44000, Nantes, France.

³ University of Evry Val d’Essonne, Sport Sciences Department, François Mitterrand street, F-91025 Evry cedex, France.

⁴ Institute of Sport, Exercise and Active Living (ISEAL), Victoria University, Melbourne, Australia.

⁵ The University of Queensland, NHMRC Centre of Clinical Research Excellence in Spinal Pain, Injury and Health, School of Health and Rehabilitation Sciences, Brisbane, Australia.

Corresponding author: Rémi Delfour-Peyrethon

French National Institute of sports (INSEP),

Laboratory of Sport, Expertise and Performance - 11 Tremblay Avenue, 75012 PARIS, France

E-mail: remi.delfour-peyrethon@insep.fr

Tel: +33 1 41 74 43 55

Abstract

This study aimed to determine the effects of metabolic alkalosis on the performance of a sprint cycling session in world-class athletes. Six elite cyclists ingested either sodium bicarbonate (NaHCO₃; BIC) or calcium carbonate (CaCO₃; PLA), in a double-blind and randomized order, 90-min before performing 3 x 500-m all-out sprints, interspersed with 20-min of recovery. One week separated BIC and PLA conditions. Blood bicarbonate concentration ([HCO₃⁻]), pH, and lactate concentration ([La⁻_b]) were measured before exercise, 5-min after each sprint, 9-min after the last sprint. Sprint velocities, ratings of perceived exertion immediately after each sprint, and squat-jump performance (SJ) 2.5-min post-exercise, were also assessed. BIC ingestion significantly increased post warm-up [HCO₃⁻] when compared with PLA, (30.6±4.7 vs 25.3±2.6 mmol.L⁻¹, respectively; *P*=0.003). Post-exercise [La⁻_b] was significantly higher in BIC compared to PLA condition. BIC and associated pre-exercise alkalosis significantly attenuated the decrease in SJ (BIC: 32.9±6.5 vs PLA: 30.4±5.7 cm; *P*=0.013, *Effect Size (ES)* =0.92) but had no significant effect on overall repeated sprint performances (*P*=0.60, *ES*=0.47). Our results demonstrate that pre-exercise alkalosis enhances the post-exercise SJ performance, and highlight the variability of BIC ingestion responses in world-class athletes.

Key Words: Sodium bicarbonate, track-cycling, repeated sprints, lactate, pH.

INTRODUCTION

Track-cycling sprint competitions consist of 10 to 60-s all-out sprints, repeated 3 to 4 times for cyclists making the finals. A sprinter's preparation therefore often comprises of specific training sessions aimed at increasing their ability to produce large amounts of power. As such, sprint training sessions with long recovery, known to solicit glycolysis at high rates (Hanon, Rabate, & Thomas, 2011), are performed during the pre-competitive period. In world-class athletes particularly, these track cycling exercises are known to induce large drop in muscle and blood pH (Bishop, Edge, Davis, & Goodman, 2004; Hanon et al., 2011).

It has previously been shown that that both hydrogen ions (H^+) (Sahlin, 1992) and lactate (Hogan *et al.*, 1995) accumulation may contribute to muscle fatigue (Fitts, 1996), but the causal relationship is still discussed. The H^+ efflux out of the cell can be reduced by extra-cellular acidosis (Hirche *et al.*, 1970), and increased by a higher extra-cellular buffer concentration (Nevill *et al.*, 1989; Nielsen *et al.*, 2002; Siegler & Gleadall-Siddall, 2010). Furthermore, Hollidge-Horvat (Hollidge-Horvat *et al.*, 2000) have shown that, under imposed acidosis during exercise, $[La^-_b]$ and intracellular $[La^-]$ were both decreased comparatively to a control situation. This resulted from the inhibition of the glycogenolysis, by the alteration of Phos *a* and phosphofructokinase function, which is detrimental for energy production. Induced metabolic alkalosis, with sodium bicarbonate supplementation (BIC), 60 to 90 min before high-intensity exercise increases the blood buffer capacity (Bishop *et al.*, 2004a; Matsuura *et al.*, 2007; Vanhatalo *et al.*, 2010) and thereby enhances the H^+ efflux from the muscle. Also, BIC has been shown to allow greater $[La^-_b]$ during exercise and this could be explained by a greater activity of the glycolysis and/or glycogenolysis metabolism, leading to an enhanced ATP production, when compared with classic acidosis (Bishop *et al.*, 2004a; Lindh *et al.*, 2008). However, the effects of BIC on performance are contradictory. Improvements in performance during acute maximal exercise have been reported following induced-alkalosis (Nielsen *et al.*, 2002; Lindh *et al.*, 2008), whereas some studies have failed to demonstrate any effects compared to a placebo condition (Zabala *et al.*, 2008, 2011; Vanhatalo *et al.*, 2010).

BIC supplementations have also been reported to have ergogenic effects or no benefit on long-duration sprint exercises (3 to 4 × 30-s) irrespective of the recovery duration between the sprints (5 to 30-min) (Parry-Billings & MacLaren, 1986; Zabala *et al.*, 2008, 2011). However, most of these studies were performed with untrained or non-sprint-trained participants who were not able to produce high concentrations of $[H^+]$ and blood lactate ($[La^-]$

b]) (i.e., maximal values of about 7.18 and 17mM for pH and $[La^-]$, respectively (Zabala *et al.*, 2011). A literature review (Requena *et al.*, 2005) suggested that BIC supplementation is effective with high-intensity exercise involving large muscular groups. In this context, BIC supplementation is likely to further glycolysis and/or enhance the H^+ efflux from the muscle, and one would expect that BIC would be more effective in a population of well-trained participants, known to produce large amounts of H^+ , (e.g., athletes) (Kindermann *et al.*, 1977; Nielsen, 1999; Hanon & Gajer, 2009).

Another possible explanation for the lack of BIC ergogenic effect reported by previous studies would be that they have been performed in laboratory condition with atypical training designs. Therefore, the present study was designed to determine the effects of BIC compared to placebo during a specific and typical training session in world-class track cyclists. We investigated the physiological (blood responses) and performance responses during a 3 x 500-m all-out repeated cycling sprints interspersed with 20-min of recovery, accompanied with post-exercise jump test aimed at assessing knee extensor performances. We hypothesized that pre-exercise induced-alkalosis would be effective to improve performances in these world-class cyclists trained to produce large amounts of lactate and H^+ .

METHODS

1/ Experimental approach:

The aim of the present work was to study track-cycling and squat-jump performance following induced alkalosis or under exercise-induced acidosis. Eight world-class athletes were recruited (convenience sample). After familiarisation, participants completed two testing sessions, separated by one week. In a double blind and randomized fashion, athletes ingested either $0.3\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of BIC or a placebo of $0.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of calcium carbonate (PLA) within 15-min, 90-min before exercise. Supplements were contained within 20-27 gelatine capsules, and taken with water *ad libitum*. Water consumption was recorded and then replicated for supplementation during the second testing session. Both supplements were well tolerated by all participants, with no reported gastro-intestinal distress. Two participants were unable to complete the second condition due to injury and thus 6 participants are included in the analysis.

Each testing session comprised of three 500-m ‘all-out’ sprints, interspersed with 20-min of passive recovery. Immediately before and 2.5-min after the exercise session, participants performed a squat-jump test to assess the effect of BIC on lower limbs explosive strength (Fig. 1). Testing took place in a well-ventilated cycling 166-m indoor cycling track, maintained at a temperature of 20–22°C.

2/ Participants:

Six elite athletes (five males and one female) from the French National track cycling have been selected to complete all the experiments (Table 1). These athletes have already been selected to participate in a world-level competition, and have all previously won a medal at an international junior or senior event. They were all informed about the risks of the experiment before giving written informed consent. The experimental design of the study was approved by the local Ethical Committee of Saint-Germain-en-Laye (2009-A01004-53) and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

3/ Procedures:

3.1/ 3 × 500-m:

Fifty minutes after the start of the supplementation, participants performed a warm-up consisting of 20 minutes of cycling, three laps (166-m, each) of consecutive (without recovery) all-out sprints, followed by a 20-min rest. Before the start of each sprint, participants performed three laps in order to reach their optimal velocity, which was not different from a sprint to another. Participants were required to pedal as fast as possible in an attempt to avoid pacing strategies. Strong verbal encouragement was provided during all the sprints.

Final and intermediary completed lap times were measured with an electronic system (REI2, Microgate, Bolzano, Italy). The average velocity for each lap was then calculated.

3.2/ Ratings of Perceived Exertion:

Immediately after each sprint, during the deceleration phase, participants were required to provide a rating of their perceived exertion (RPE) using the Börg-RPE and Börg-CR10 scales (Borg & Kaijser, 2006).

3.3/ Squat-jump tests:

Two weeks before the real testing session, all participants had two familiarization sessions with the squat-jumps. After the warm up and 2-min 30-s after the third sprint, participants were asked to perform three squat-jumps (Optojump, Microgate, Bolzano-Bozen, Italy). The test was performed with hands on the hips, and the knee angle controlled and set at 90°. When participants had stabilized the position with no backswing, the experimenter asked them to jump as high as possible. For both the pre- and post-sprints the average of the two best jump performances was considered.

3.4/ Blood sample analysis:

Arterialized capillary blood samples (85 µL) were taken from hyperemic ear-lobes, post warm-up and five minutes post sprint 1 (Post Sp. 1), sprint 2 (Post Sp. 2) and also at five (Post Sp. 3a) and nine minutes (Post Sp. 3b) of the recovery period following the final sprint. Samples were immediately analysed for blood pH and [HCO₃⁻] with an i-STAT dry chemistry analyser (Abbott, Les Ulis, France) demonstrated as reliable (Dascombe *et al.*, 2007). In order

to measure the blood lactate concentration [La^-_{b}], and because of the limited range of the i-STAT system (0.30–20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), additional samples (20 μL) were taken for analysis (Biosen C-line analyser, EKF Industrie, Elektronik GmbH, Barleben, Germany).

4/ Statistical analyses:

All values are reported as mean \pm SD. Blood parameters, cycling performance and jump performance were analysed with a two-way analysis of variance (effects: condition – BIC and PLA – and time). Where significance was achieved, Tukey's post hoc analysis was undertaken. Relationships between variables were analyzed by a Pearson's correlation coefficient. The level of significance was $P \leq 0.05$. Finally, Cohen's d scores (average residual/SD), for performance parameters, were calculated to categorize the magnitude of the error of estimation as large (>0.8), moderate (0.5–0.8), or small (<0.5) (Cohen, 1992).

RESULTS

1/ Blood metabolic responses

A significant Condition \times Time interaction was found for $[\text{HCO}_3^-]$ ($P=0.03$). Post warm-up values were significantly higher in the BIC condition compared to PLA (Fig. 2; BIC: 30.6 ± 4.7 mmol.l⁻¹ vs PLA: 25.3 ± 2.6 mmol.l⁻¹; $P=0.003$) demonstrating the effectiveness of the BIC supplementation. 9-min post sprints $[\text{HCO}_3^-]$ were still significantly higher in BIC condition compared to PLA (Fig. 2; BIC: 9.1 ± 1.7 mmol.l⁻¹ vs PLA: 6.5 ± 0.6 mmol.l⁻¹; $P=0.002$). All $[\text{HCO}_3^-]$ values were significantly lower compared to post warm-up values ($P<0.001$), in both conditions.

A main effect of both condition ($P<0.001$) and time ($P<0.001$) was found for pH. In BIC condition, pH values were significantly higher compared to PLA (Fig. 2). All pH values were significantly different to post warm-up values for both conditions ($P<0.001$). However no interactions were found.

A significant Condition \times Time interaction was observed for $[\text{La}^-]$ ($P<0.001$). $[\text{La}^-]$ increased in both conditions over the repeated sprints. In addition, post-test $[\text{La}^-]$ were significantly higher in the BIC condition compared to PLA (Fig. 3; 5-min post sp. 3: BIC: 24.0 ± 3.6 mmol.l⁻¹ vs PLA: 20.0 ± 2.0 mmol.l⁻¹; $P=0.033$; 9-min post sp.3: BIC: 24.1 ± 3.8 mmol.l⁻¹ vs PLA: 18.5 ± 2.7 mmol.l⁻¹; $P=0.009$).

2/ Performance:

The average velocity during each sprint and the average velocity over the all three sprints (Table 2; BIC: 17.02 ± 0.20 m.s⁻¹ vs PLA: 16.97 ± 0.18 m.s⁻¹; $P=0.60$, $ES=0.47$) were not significantly different between the two conditions. While participant #1 and 2 did not improve their 500-m cycling performance in BIC compared to PLA condition. The four other participants produced a greater average speed in the BIC condition throughout the repetition of sprints (Table 2).

A significant Condition \times Time interaction was found for SJ performance ($P=0.039$). Compared with PLA, BIC resulted in a significantly greater post-exercise squat jump performance (Fig. 4; BIC: 32.9 ± 6.5 cm vs PLA: 30.4 ± 5.7 cm; $P=0.013$, $ES=0.92$), corresponding to a $7.2\pm 3.2\%$ improvement. This positive effect of BIC supplementation

ranged between 5.4 and 13.4% with the lowest effect observed for participants 1 and 2 (+5 %).

3/ Perceived exertion:

A significant Condition \times Time interaction was found for Börg-CR10 scale ($P=0.049$). The post hoc revealed no significant differences between conditions, Börg-RPE and Börg-CR10 scales (Fig. 5; $P=0.09$ and $P=0.87$, respectively). However, for both BIC and PLA conditions, post sprint 2 and 3 scores were significantly different to post sprint 1 score for both Börg-RPE and Börg-CR10 scales (Fig. 5; $P<0.001$). Furthermore, significant negative correlations were found between pH and Börg scales during the whole training session ($r = -0.43$, $P<0.01$ for CR10; $r = -0.37$, $P<0.05$, $n=12$, for RPE), and between $[\text{HCO}_3^-]$ and Börg scales ($r = -0.44$, $P<0.01$ for CR-10; $r = -0.42$, $P<0.01$, $n=12$, for RPE).

DISCUSSION

The purpose of this study was to test the effect of bicarbonate supplementation on all-out repeated-sprint performance in world-class cyclists. Although this particular population is known to produce large levels of H^+ , results of this study showed no significant cycling performance enhancement, nevertheless there was an improved individual cycling performances in 4/6 participants. Furthermore, bicarbonate supplementation significantly minimized the post-exercise decrease in squat-jump performance.

Consistent with the literature, and without appearance of gastrointestinal distress, blood acid-base balance was significantly altered after the $NaHCO_3$ ingestion, immediately before and during the test. This study also confirms that $[La^-_b]$ is higher after single or repeated high-intensity exercise during alkalosis as compared to PLA (Fig. 3) (Gaitanos *et al.*, 1991; Bishop *et al.*, 2004a; Lindh *et al.*, 2008; Siegler & Gleadall-Siddall, 2010). This could corroborate the positive effect of BIC on the muscle lactate efflux (Lindinger *et al.*, 1990), due to increased lactate/ H^+ transporters (Bishop *et al.*, 2004a; Douroudos *et al.*, 2006). However, due to the fact that the cycling performance was not significantly improved in the present study, the potential link between increases in lactate production and performance has not yet been verified (Gaitanos *et al.*, 1991; Bishop *et al.*, 2004a; Lindh *et al.*, 2008), meaning that the increase in anaerobic energy contribution as the cause of the ergogenic effect of BIC is not confirmed for all of the participants.

This lack of global improvement in cycling performances performed with long recovery duration is in contradiction with the significant positive effect of BIC supplementation observed in SJ performances. Completed after the all-out sprints, SJ performance was taken as a cycling-independent indicator of explosive strength in the knee and hip extensors (Gorostiaga *et al.*, 2010). After 200-m and 400-m races, a 17% and 27% post-exercise height loss have been previously reported (Jiménez-Reyes *et al.*, 2013) similar to the 20% decrease observed in the present study in PLA condition.

The inconsistencies between SJ and cycling performance could be explained by their differing energetic requirements. Short-duration plyometric exercises, such as a SJ, could be more sensitive to PCr hydrolysis than glycolysis and therefore be more sensitive to the post-exercise kinetics of PCr recovery. It has been demonstrated that phosphocreatine (PCr) recovery depends on acidity (Lodi *et al.*, 1997) and this could explain why BIC ingestion

would have ergogenic effects on a SJ performed during metabolic acidosis. Moreover, the post-exercise decrease in SJ performance is smaller in BIC compared to PLA condition, potentially as a result of improved lactate and H⁺ efflux from muscles as well as an enhanced buffer capacity. One can hypothesize that this positive supplementation effect would be effective only in a short delay after the exercise in specifically trained-cyclists, who present already high levels of lactate/H⁺ transport capacity (Pilegaard *et al.*, 1994, 1999a). This may suggest that the lactate/H⁺ transport system is of importance for performance during high-intensity exercise. Indeed, an improved ability to release H⁺ from a muscle will reduce the decrease in muscle pH for a given lactate production, which may delay the development of fatigue.

However, Zabala *et al.* (Zabala *et al.*, 2011) have reported a non-significant improvement in countermovement jumps (CMJ) in BIC condition compared to PLA. This discrepancy with our results could be explained by the different jump tests used. SJ was preferred to CMJ as this test is known to be less sensitive to coordination abilities and more accurate on concentric knee and hip extension measurements (Harman *et al.*, 1990), making it more specific to pedalling tasks. This present ergogenic effect of BIC supplementation could also be explained by differences in the participants' characteristics (BMX athletes in (Zabala *et al.*, 2011) *vs* sprinters in the present experiment), e.g., muscle mass and muscle typology.

The high caliber of athletes (i.e., world class track cyclists) used in this study was deemed necessary to produce very high levels of acidosis. Conversely, this presented a challenge in observing large performance improvements. The small sample size of the present study can be the consequence of our specific hypotheses. Indeed, our 6 elite athletes were the only participants that could be recruited for this study. Nevertheless, one of the most important findings of this study is the individualized response of world-class cyclists to BIC supplementation. In this study, 4/6 participants improved sprint performance (+0.8 to +1.8%) after BIC supplementation. This improvement is consistent with the 1.7±2.0% improvement in cycling performance following BIC supplementation reported by Carr *et al.* in their review (Carr *et al.*, 2011). It is important to note that for elite athletes, a 2% improvement can be interpreted as a moderate performance enhancement (Hopkins *et al.*, 2009). Indeed, an improved velocity in the range of 0.15 to 0.32 m.s⁻¹ (as observed individually for the second 500-m bout) may be a meaningful improvement during competitions, allowing a cyclist to modify his final result, as previously mentioned (Lindh *et al.*, 2008).

Interestingly, the two participants who did not benefit from BIC in cycling performances also exhibited the lowest improvement in SJ performance (Table 2). In addition, despite similar post-warm-up metabolic values, these two participants had the lowest post-exercise pH and PCO_2 values after the first exercise. Interestingly, these two participants also presented increased post-cycling CR10 appreciation in BIC condition contrary to the four other participants who noted lesser or equivalent the CR10 appreciation. It is not clear how the central nervous system integrates these signals to the sense of exercise exertion: cardiopulmonary, metabolic and other local afferents within the body could cause the changes in perceived exertion during exercise. It has been hypothesized that an increase in perceived exertion during exercise could be caused by H^+ accumulation within the skeletal muscle (Ament & Verkerke, 2009). In support of this idea, we found a negative correlation between perceived exertions (Börg-RPE and Börg-CR10) and blood acid-base balance (pH and $[\text{HCO}_3^-]$) confirming the results presented by Price et al. during a longer intermittent exercise (Price *et al.*, 2003).

CONCLUSION

In summary, the present results indicate that when compared to PLA, BIC was effective in improving SJ performance after high-intensity exhaustive exercises in world-class track-cyclists. This may be of interest for team-sport coaches and athletes, when a player needs to combine different efforts such as multiple sprints directly followed by explosive-type actions such as single or repeated vertical extensions (i.e. basketball, handball and football). It is important to note that before to use NaHCO_3 in competition, coaches and sport scientists need to test each athlete responses as pointed out by the inter-individual variability of BIC ergogenic effect on cycling performances.

Thus, the present work highlights the necessity to further investigate the potential BIC ergogenic effects on performances, and also to test the reproducibility of the results. Depending on the reproducibility, more research is also needed to better understand the difference between BIC responders and non-responders.

Acknowledgments

The investigators thank the elite athletes and their coaches for their time and efforts. They also would like to thank James Broach for proof reading the English. This work was supported by the French Ministry of Health, Youth and Sport.

References

1. Ament, W., & Verkerke, G. J. (2009). Exercise and fatigue. *Sports Med*, 39(5), 389-422.
2. Bishop, D., Edge, J., Davis, C., & Goodman, C. (2004). Induced metabolic alkalosis affects muscle metabolism and repeated-sprint ability. *Med Sci Sports Exerc*, 36, 807-13.
3. Borg, E., & Kaijser, L. (2006). A comparison between three rating scales for perceived exertion and two different work tests. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 16(1), 57-69. doi:10.1111/j.1600-0838.2005.00448.x
4. Carr, A. J., Hopkins, W. G., & Gore, C. J. (2011). Effects of acute alkalosis and acidosis on performance: a meta-analysis. *Sports Med* (Auckland, N.Z.), 41(10), 801-814. doi:10.2165/11591440-000000000-00000
5. Cohen, J. (1992). A power primer. *Psychological Bulletin*, 112(1), 155-159.
6. Dascombe, B. J., Reaburn, P. R., Sirotic, A. C., & Coutts, A. J. (2007). The reliability of the i-STAT clinical portable analyser. *J Sci Med Sport*, 10, 135-40.
7. Douroudos, I. I., Fatouros, I. G., Gourgoulis, V., Jamurtas, A. Z., Tsitsios, T., Hatzinikolaou, A., ... Taxildaris, K. (2006). Dose-related effects of prolonged NaHCO₃ ingestion during high-intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 38(10), 1746-1753. doi:10.1249/01.mss.0000230210.60957.67
8. Fitts, R. H. (1996). Muscle fatigue: the cellular aspects. *Am J Sports Med*, 24, S9-13.
9. Gaitanos, G. C., Nevill, M. E., Brooks, S., & Williams, C. (1991). Repeated bouts of sprint running after induced alkalosis. *Journal of sports sciences*, 9(4), 355-370. doi:10.1080/02640419108729896
10. Gorostiaga, E. M., Asiáin, X., Izquierdo, M., Postigo, A., Aguado, R., Alonso, J. M., & Ibáñez, J. (2010). Vertical jump performance and blood ammonia and lactate levels during typical training sessions in elite 400-m runners. *J Strength Cond Res*, 24(4), 1138-1149. doi:10.1519/JSC.0b013e3181cf769f
11. Hanon, C., & Gajer, B. (2009). Velocity and stride parameters of world-class 400-meter athletes compared with less experienced runners. *J Strength Cond Res*, 23, 524-31.
12. Hanon, C., Rabate, M., & Thomas, C. (2011). Effect of expertise on post maximal long sprint blood metabolite responses. *J Strength Cond Res*.
13. Harman, E. A., Rosenstein, M. T., Frykman, P. N., & Rosenstein, R. M. (1990). The effects of arms and countermovement on vertical jumping. *Med Sci Sports Exerc*, 22(6), 825-833.

14. Hirche, H., Grun, D., & Waller, W. (1970). Utilization of carbohydrates and free fatty acids by the gastrocnemius of the dog during long lasting rhythmical exercise. *Pflugers Arch*, 321, 121-32.
15. Hogan, M. C., Gladden, L. B., Kurdak, S. S., & Poole, D. C. (1995). Increased [lactate] in working dog muscle reduces tension development independent of pH. *Med Sci Sports Exerc*, 27, 371-7.
16. Hollidge-Horvat, M. G., Parolin, M. L., Wong, D., Jones, N. L., & Heigenhauser, G. J. (2000). Effect of induced metabolic alkalosis on human skeletal muscle metabolism during exercise. *Am J Physiol. Endocrinology and metabolism*, 278(2), E316-329.
17. Hopkins, W. G., Marshall, S. W., Batterham, A. M., & Hanin, J. (2009). Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Med Sci Sports Exerc*, 41(1), 3-13. doi:10.1249/MSS.0b013e31818cb278
18. Jiménez-Reyes, P., Molina-Reina, M., González-Hernández, J., & González-Badillo, J. (2013). Metabolic and mechanical responses to 200-400 m races in high level sprinters. *British Journal of Sports Medicine*, 47(17), i-e4. doi:10.1136/bjsports-2013-093073.18
19. Kindermann, W., Keul, J., & Huber, G. (1977). Physical exercise after induced alkalosis (bicarbonate or tris-buffer). *Eur J Appl Physiol*, 37, 197-204.
20. Lindh, A. M., Peyrebrune, M. C., Ingham, S. A., Bailey, D. M., & Folland, J. P. (2008). Sodium bicarbonate improves swimming performance. *International journal of sports medicine*, 29(6), 519-523. doi:10.1055/s-2007-989228
21. Lindinger, M. I., Heigenhauser, G. J., & Spriet, L. L. (1990). Effects of alkalosis on muscle ions at rest and with intense exercise. *Can J Physiol Pharmacol*, 68, 820-9.
22. Lodi, R., Muntoni, F., Taylor, J., Kumar, S., Sewry, C. A., Blamire, A., ... Taylor, D. J. (1997). Correlative MR imaging and ³¹P-MR spectroscopy study in sarcoglycan deficient limb girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 7(8), 505-511.
23. Matsuura, R., Arimitsu, T., Kimura, T., Yunoki, T., & Yano, T. (2007). Effect of oral administration of sodium bicarbonate on surface EMG activity during repeated cycling sprints. *Eur J Appl Physiol*, 101(4), 409-417. doi:10.1007/s00421-007-0512-x
24. Nevill, M. E., Boobis, L. H., Brooks, S., & Williams, C. (1989). Effect of training on muscle metabolism during treadmill sprinting. *J Appl Physiol*, 67, 2376-82.
25. Nielsen, H. B. (1999). pH after competitive rowing: the lower physiological range? *Acta Physiol Scand*, 165, 113-4.

26. Nielsen, H. B., Bredmose, P. P., Stromstad, M., Volianitis, S., Quistorff, B., & Secher, N. H. (2002). Bicarbonate attenuates arterial desaturation during maximal exercise in humans. *J Appl Physiol*, 93, 724-31.
27. Parry-Billings, M., & MacLaren, D. P. (1986). The effect of sodium bicarbonate and sodium citrate ingestion on anaerobic power during intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol*, 55(5), 524-529.
28. Pilegaard, H., Bangsbo, J., Richter, E. A., & Juel, C. (1994). Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J Appl Physiol*, 77, 1858-62.
29. Pilegaard, H., Domino, K., Noland, T., Juel, C., Hellsten, Y., Halestrap, A. P., & Bangsbo, J. (1999). Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. *Am J Physiol*, 276, E255-61.
30. Price, M., Moss, P., & Rance, S. (2003). Effects of sodium bicarbonate ingestion on prolonged intermittent exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 35(8), 1303-1308. doi:10.1249/01.MSS.0000079067.46555.3C
31. Requena, B., Zabala, M., Padial, P., & Feriche, B. (2005). Sodium bicarbonate and sodium citrate: ergogenic aids? *J Strength Cond Res*, 19(1), 213-224. doi:10.1519/13733.1
32. Sahlin, K. (1992). Metabolic factors in fatigue. *Sports Med*, 13, 99-107.
33. Siegler, J. C., & Gleadall-Siddall, D. O. (2010). Sodium bicarbonate ingestion and repeated swim sprint performance. *J Strength Cond Res*, 24(11), 3105-3111. doi:10.1519/JSC.0b013e3181f55eb1
34. Vanhatalo, A., McNaughton, L. R., Siegler, J., & Jones, A. M. (2010). Effect of induced alkalosis on the power-duration relationship of « all-out » exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 42(3), 563-570. doi:10.1249/MSS.0b013e3181b71a4a
35. Zabala, M., Peinado, A. B., Calderón, F. J., Sampedro, J., Castillo, M. J., & Benito, P. J. (2011). Bicarbonate ingestion has no ergogenic effect on consecutive all out sprint tests in BMX elite cyclists. *Eur J Appl Physiol*, 111(12), 3127-3134. doi:10.1007/s00421-011-1938-8
36. Zabala, M., Requena, B., Sánchez-Muñoz, C., González-Badillo, J. J., García, I., Oöpik, V., & Pääsuke, M. (2008). Effects of sodium bicarbonate ingestion on performance and perceptual responses in a laboratory-simulated BMX cycling qualification series. *J Strength Cond Res*, 22(5), 1645-1653. doi:10.1519/JSC.0b013e318181febe

Tables and figures:

	<i>500m personal record (s) - % World record</i>	<i>Age (y)</i>	<i>Mass (kg)</i>	<i>Height (m)</i>
<i>Participant 1 (M)</i>	27.62 (89.6)	18	77	183
<i>Participant 2 (M)</i>	28.85 (89.5)	20	85	187
<i>Participant 3 (M)</i>	26.83 (92.3)	21	87	176
<i>Participant 4 (M)</i>	26.98 (91.8)	21	91	180
<i>Participant 5 (M)</i>	27.87 (88.8)	18	77	173
<i>Participant 6 (F)</i>	30.45 (96.8)	23	60	169
Mean \pm SD	28.10 \pm 1.40	20.2 \pm 1.9	79.5 \pm 11.0	178 \pm 7

Table 1: Presentation of participants' characteristics, (*M: male and F: female*).

Table 2: Presentation of individual velocities (in $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) during the 3x500-m sprints and SJ performances (in cm) for the BIC and PLA conditions, (M: male and F: female). *: denotes different to PLA ($P<0.05$); #: denotes different to post warm-up ($P<0.05$).

	<i>First 500-m</i>		<i>Second 500-m</i>		<i>Third 500-m</i>		<i>Post warm-up SJ</i>		<i>Post sprints SJ</i>	
	<i>PLA</i>	<i>BIC</i>	<i>PLA</i>	<i>BIC</i>	<i>PLA</i>	<i>BIC</i>	<i>PLA</i>	<i>BIC</i>	<i>PLA</i>	<i>BIC</i>
<i>Athlete 1 (M)</i>	16.66 ↘	16.12	17.16 ↘	16.98	17.27 ↘	17.05	36.00 ↘	35.85	29.80 ↘	28.50
<i>Athlete 2 (M)</i>	16.97 ↘	16.87	17.45 ↘	17.44	17.66 ↘	17.50	27.80 ↗	28.05	20.95 ↗	22.65
<i>Athlete 3 (M)</i>	16.83 ↗	16.96	17.31 ↗	17.55	17.92 ↗	17.93	43.40 ↘	41.85	35.45 ↗	37.05
<i>Athlete 4 (M)</i>	16.82 ↗	17.02	17.35 ↗	17.67	17.53 ↗	17.73	40.10 ↗	40.60	31.50 ↗	37.35
<i>Athlete 5 (M)</i>	16.56 ↗	16.82	16.93 ↗	17.08	17.09 ↗	17.25	46.10 ↘	43.35	36.60 ↗	39.70
<i>Athlete 6 (F)</i>	16.83 ↗	16.96	15.80 ↗	16.01	15.41 ↗	15.48	33.50 ↗	34.45	28.10 ↗	31.95
<i>Mean ± SE</i>	<i>16.78±0.15</i>	<i>16.79±0.34</i>	<i>17.00±0.61</i>	<i>17.12±0.61</i>	<i>17.15±0.90</i>	<i>17.16±0.88</i>	<i>37.70±8.54</i>	<i>37.40±5.70</i>	<i>30.40±5.66[#]</i>	<i>32.90±6.50^{#*}</i>

The arrows indicate the supplementation effect on performances, with grey arrows indicating the ineffective effect of BIC supplementation.

Figure captions

Figure 1: Presentation of protocols performed for the 3x500-m all-out sprints with 20-min of recovery between each sprint

Figure 2: pH and HCO_3^- concentration during the 3x500-m all-out sprints after either NaHCO_3 ($n=6$) or Placebo ($n=6$) ingestion, after warm-up (Post warm-up), 5-min post sprints 1 and 2 (Post sp. 1 and Post sp. 2), and 5 and 9-min post sprint 3 (Post sp. 3a and Post sp.3b, respectively). *: denotes different to PLA ($P<0.05$); #: denotes sprint effect from post warm-up ($P<0.05$)

Figure 3: Blood lactate concentration ($[\text{La}^-_{\text{b}}]$) during the 3x500-m all-out sprint test for the BIC ($n=6$) and PLA ($n=6$) conditions, after warm-up (Post warm-up), 5-min post sprints 1 and 2 (Post sp. 1 and Post sp. 2), and 5 and 9-min post sprint 3 (Post sp. 3a and Post sp.3b, respectively). *: denotes different to PLA ($P <0.05$); #: denotes sprint effect from post warm-up ($P <0.05$)

Figure 4: Squat-jump test results for the PLA ($n=6$) and BIC ($n=6$) conditions. *: denotes different to PLA ($P <0.05$); #: denotes time effect for both conditions ($P <0.05$)

Figure 5: Borg-RPE and CR10 results for the 3x500-m all-out sprints, 5-min post sprints 1, 2 and 3 (Post sp. 1, Post sp. 2, Post sp.3), ($n=6$). #: denotes sprint effect from post sprint 1 ($P<0.05$)

Figure 1: Presentation of protocols performed for the 3x500-m all-out sprints with 20-min of recovery between each sprint.

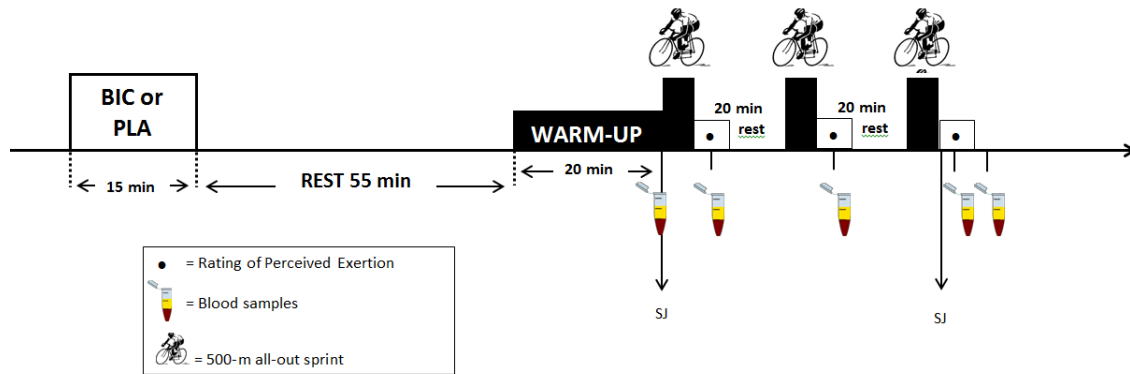


Figure 2: pH and HCO₃⁻ concentration during the 3x500-m all-out sprints after either NaHCO₃ (*n*=6) or Placebo (*n*=6) ingestion, after warm-up (Post warm-up), 5-min post sprints 1 and 2 (Post sp. 1 and Post sp. 2), and 5 and 9-min post sprint 3 (Post sp. 3a and Post sp.3b, respectively). *: denotes different to PLA (*P*<0.05); #: denotes sprint effect from post warm-up (*P*<0.05)

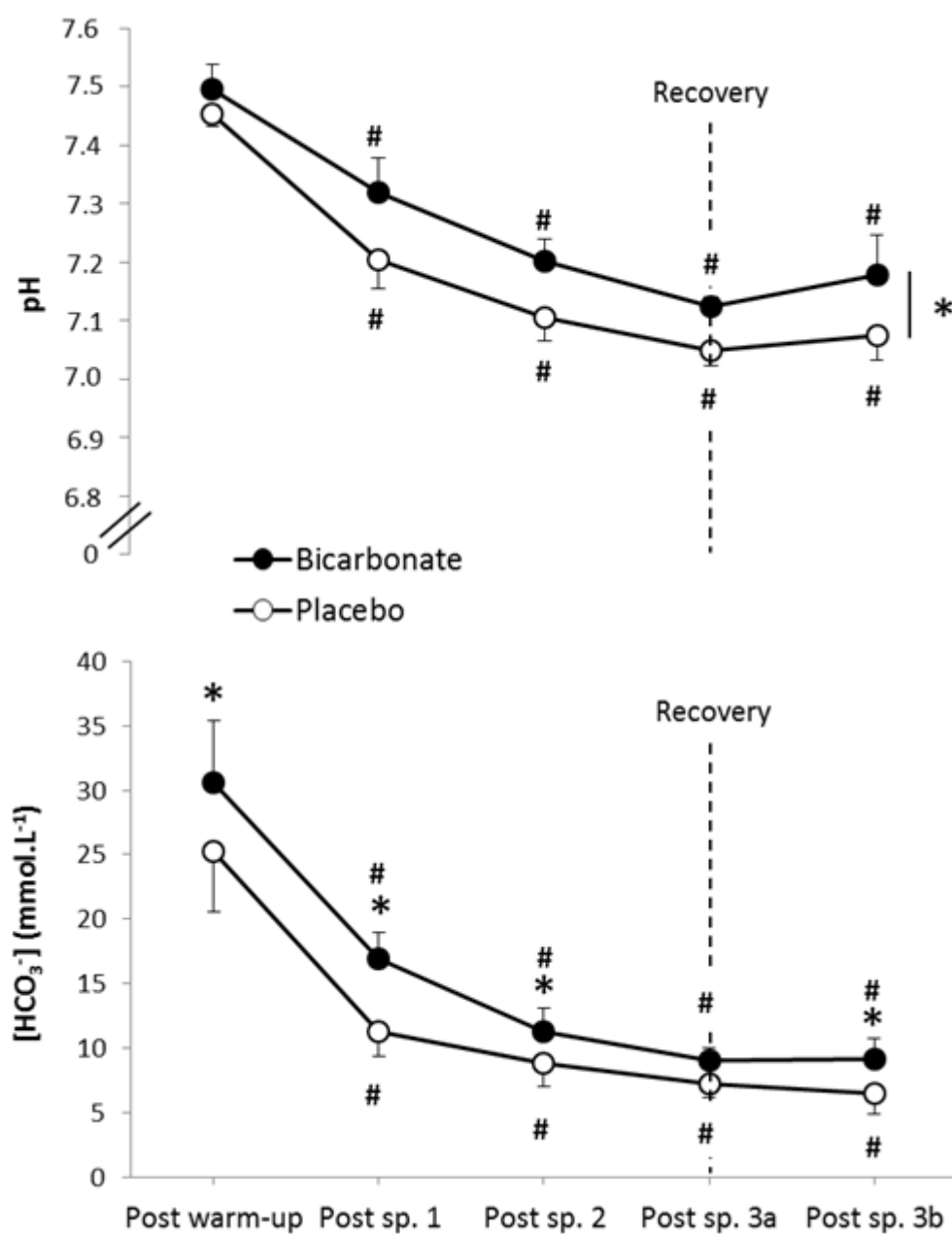


Figure 3: Blood lactate concentration ($[La^-_b]$) during the 3x500-m all-out sprint test for the BIC ($n=6$) and PLA ($n=6$) conditions, after warm-up (Post warm-up), 5-min post sprints 1 and 2 (Post sp. 1 and Post sp. 2), and 5 and 9-min post sprint 3 (Post sp. 3a and Post sp.3b, respectively). *: denotes different to PLA ($P < 0.05$); #: denotes sprint effect from post warm-up ($P < 0.05$)

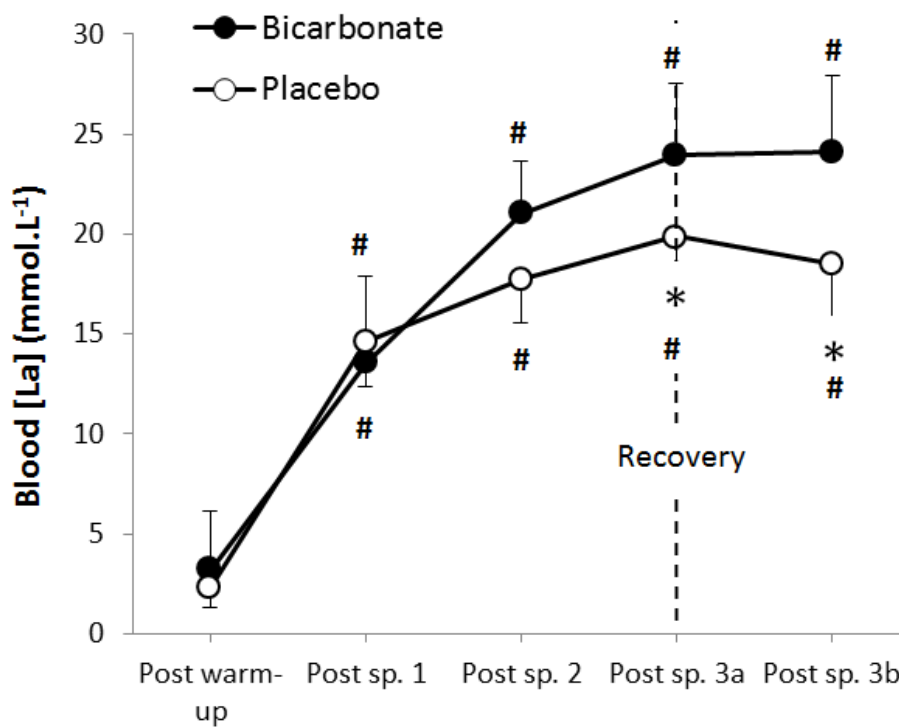


Figure 4: Squat-jump test results for the PLA ($n=6$) and BIC ($n=6$) conditions. *: denotes different to PLA ($P < 0.05$); #: denotes time effect for both conditions ($P < 0.05$)

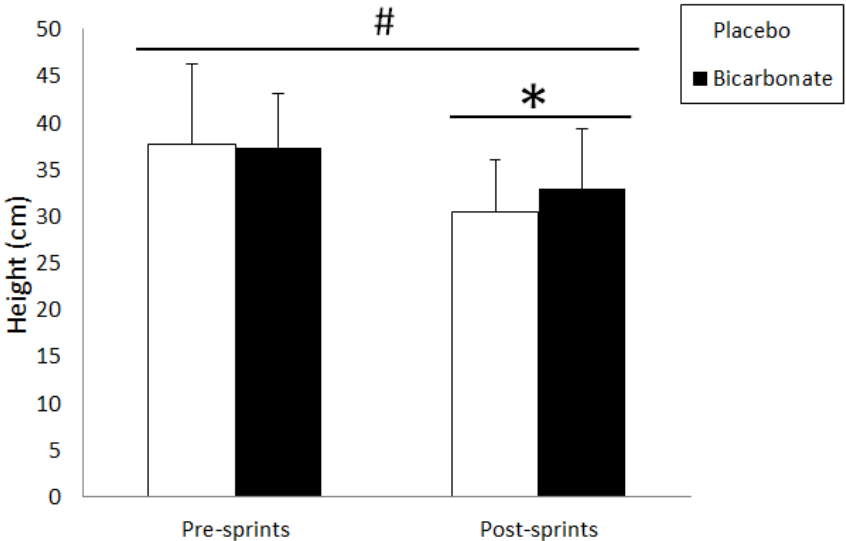
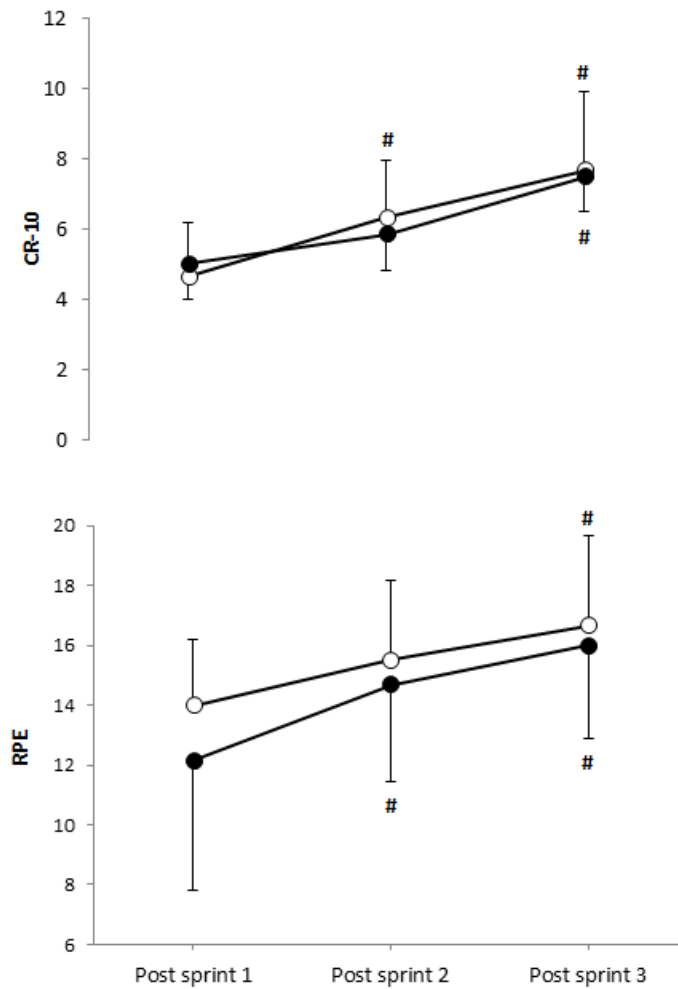


Figure 5: Börg-RPE and CR10 results for the 3x500-m all-out sprints, 5-min post sprints 1, 2 and 3 (Post sp. 1, Post sp. 2, Post sp.3), under placebo (○) or induced-alkalosis (●) ($n=6$). #: denotes sprint effect from post sprint 1 ($P<0.05$).



D. Annexe n°4.

Induced metabolic alkalosis increases MCT1, CD147, NHE1 protein abundance and reduces oxidative stress 24 h post an acute bout of maximal sprint in human skeletal muscle.

Running title: sprint exercise and sarcolemmal protein expression

Rémi DELFOUR-PEYRETHON^{1, 2, 3}

David J BISHOP^{2, 5}

Christine HANON¹

Karen LAMBERT⁴

Rodrigo S.F OLIVEIRA^{2, 5}

Cian McGINLEY⁵

Nicolas MOLINARI^{4, 6}

Claire THOMAS^{1, 4, 7}

¹ French National Institute of Sports (INSEP), Laboratory of biomechanics and physiology - 11 Tremblay Avenue, 75012 PARIS, France.

² Institute of Sport, Exercise and Active Living (ISEAL), Victoria University, Melbourne, Australia.

³ University of Nantes, Laboratory « Motricité, Interactions, Performance” (EA 4334), F-44000, Nantes, France.

⁴ INSERM, U1046 “Physiology and et Experimental Medicine of Heart and Muscles”, UM1 UM2, F-34295 Montpellier, France

⁵ College of Sport and Exercise Science, Victoria University, Melbourne, Australia

⁶ *CHU Montpellier, F-34295 Montpellier, France*

⁷ University of Evry Val d’Essonne, STAPS department. François Mitterrand Boulevard 91025 Evry, France.

Corresponding author: Claire THOMAS

INSEP, 11 Tremblay Avenue, 75012 Paris, France

Phone: + 33 1 41 74 43 55

Fax: + 33 1 41 74 45 35

e-mail : claire.thomas@univ-evry.fr

Key points

- Preexercise-induced alkalosis such as sodium bicarbonate supplementation (BIC) has beneficial effects on several proteins involved in muscle pH regulation.
- Combining BIC with an acute bout of repeated-sprints in the present study allows an up-regulation of MCT1 (lactate/proton cotransporter 1), CD147 (a protein chaperone of MCT1) and NHE1 (sodium/hydrogen exchanger 1) 24 h after the end of exercise in recreationally active participants compared to the placebo condition (PLA).
- All together these upregulations suggest a proton complex regulation between sarcolemma and mitochondria in addition to the lactate shuttle, since the level of these proteins (MCT1 and NHE1) were highly correlated with the protein expression of the cytochrome C oxidase IV (COX IV), an index of oxidative metabolism.
- We also show that muscle oxidative stress was reduced when blood acidosis was counteracted, and this suggests a deleterious effect of protein carbonylation on expression of these proteins.
- The upregulation of these proteins in BIC condition seems not to be regulated by the activity of AMPK during the first 24 h after the end of an acute bout of repeated-sprint exercise.
- Furthermore, MCT4 (lactate/proton cotransporter 4), CAII (Carbonic Anhydrase II), and NBCe1 (sodium/bicarbonate cotransporter) protein expression were not sensitive to preexercise induced alkalosis in the first 24 h after the end of exercise.
- Our results establish that metabolic alkalosis provoked by supplementation could enhance the adaptations induced by the contractile activity for some proteins involved in pH regulation and lactate transport.

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of high-intensity exercise, with or without induced blood alkalosis on sarcolemmal proteins involved in pH regulation and on oxidative stress in human skeletal muscle. We also sought to determine whether monocarboxylate transporters 1/4 (MCT1/4) mRNAs were dynamically regulated in response to both acute exercise and induced-alkalosis. Eight active men performed a 3 x 30-s cycling test following either placebo (PLA) or sodium bicarbonate (BIC) supplementation. Blood samples were analysed for pH, bicarbonate ($[\text{HCO}_3^-]$) and lactate ($[\text{La}^-]$) concentration measurements. Muscle samples were obtained at rest, immediately after exercise, 6 h, and 24 h after exercise. Cluster of differentiation 147 (CD147), monocarboxylate transporter (MCT)1/4, electrogenic sodium/bicarbonate cotransporter 1 (NBCe1), sodium/hydrogen exchanger 1 (NHE1) as well as protein carbonylation and lipid peroxidation were measured by western blotting in the *vastus lateralis*. BIC, compared to PLA, significantly increased pH and $[\text{HCO}_3^-]$ ($P < 0.05$), but no differences in $[\text{La}^-]$ were found. While no performance differences were noted between conditions, BIC significantly reduced the increase in protein carbonylation ($P < 0.05$), compared to PLA, provoked by exercise after 24 h of recovery and allowed an increase in protein expression for MCT1, CD147 and NHE1 ($P < 0.05$). No differences were reported for NBCe1 and MCT4 contents and lipid peroxidation ($P > 0.05$). No mRNA variations were recorded ($P > 0.05$). These results suggest that some protein expression were sensitive to H^+ accumulation during exercise, which could be involved in the oxidative stress activation during recovery.

Key-words: acid-base regulation, sarcolemmal transporters, acidosis, lactate, sprint exercise

Introduction

Intense muscle contractions result in an increased non-mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) turnover, contributing to the accumulation of hydrogen ions (H^+), which have been reported to affect ion regulation (Robergs et al., 2004), enzyme activity (Hollidge-Horvat et al., 2000) and oxidative phosphorylation (Jubrias et al., 2003). Removal of H^+ during intense skeletal muscle contractions occurs via in-vitro muscle buffering (Bishop et al., 2004c; Edge et al., 2006a) and via a number of different ion transport systems (Juel, 1997). In this context, the sarcolemmal monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4, which mediate lactate and proton transport, play an important role in the regulation of intracellular pH (pHi) during high-intensity exercise (Juel et al., 1994; Juel, 1996, 1997; Messonnier et al., 2007). Proton efflux is also regulated by the Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1) system, which is less important during exercise than at rest (Juel, 1998; Mohr et al., 2007), and by transport systems involving bicarbonate, such as the Na^+ /bicarbonate co-transporter (NBCe1) (Kristensen et al., 2004; Thomas et al., 2007). In addition, both NBCe1 (Becker et al., 2004) and Carbonic Anhydrase isoform II (CAII) (Becker et al., 2005) have been reported to enhance the transport activity of MCT1.

The expression of MCT1 and MCT4 seems to be dependent on innervation pattern and muscle activity level (Bergersen et al., 2006). Indeed, increases in MCT content has been reported after all-out sprint (Pilegaard et al., 1999; Bickham et al., 2006; Burgomaster et al., 2007; Mohr et al., 2007) and high-intensity interval training (Juel et al., 2004; Bishop et al., 2008a), whereas one week of detraining, after sprint training in humans, leads to a lower MCT1 and MCT4 content (Burgomaster et al., 2007). Despite limited research, it appears that both MCT1 and MCT4 belong to a class of proteins that can be rapidly affected by an acute bout of exercise. NHE1 (Juel et al., 2004; Mohr et al., 2007) and NBCe1 (Thomas et al., 2007) content is also altered in response to chronic high-intensity exercise but, to the best of our knowledge, no data are available on the effects of acute exercise on these proteins. A hypothetical time course for the response of MCT to acute exercise has been proposed (Thomas et al., 2012). After a brief decrease in protein content immediately after short exhaustive contractile activity in rats (Tonouchi et al., 2002) and in humans (Bishop et al., 2007), no change has been reported from 30 min to 1 h 20 min (Dubouchaud et al., 1999; Eydoux et al., 2000; Bickham et al., 2006), while an up-regulation has been observed between 5-24h after the beginning of exercise in rat (Coles et al., 2004). However, this model needs to be confirmed, and one might also expect a coordinated regulation of other proteins involved in muscle pH regulation after acute high-intensity exercise in humans.

A novel means to assess this hypothesis would be delay the accumulation of H^+ via the ingestion of a buffering agent [e.g., sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) taken 90–120 min before exercise] (Bishop et al., 2004a). Using this approach, it has previously been reported that rats ingesting $NaHCO_3$ before exercise training sessions had significantly greater improvements in MCT4 content after five weeks of exercise training (Thomas et al., 2007). These results raise the intriguing possibility that pH may affect the exercise-induced expression of genes and nuclear-encoded proteins that regulate skeletal muscle pH.

Based on the aforementioned studies, it was hypothesised there would be an altered expression of proteins involved in muscle pH regulation during the 24 h following an acute bout of high-intensity exercise, and that minimizing the decrease in muscle pH that occurs during this type of exercise may promote greater exercise-induced changes in genes and proteins associated with skeletal muscle pH regulation. To test these hypotheses, the metabolic and performance responses of recreationally-active participants were measured during three 30-s all-out exercise bouts performed under induced alkalosis or a placebo condition, and muscle biopsies were performed at rest, immediately post-exercise, and 6 and 24 h post-exercise in both conditions.

Methods

Subjects

Eight healthy men (age: 22 ± 4 y, height: 179.6 ± 5.7 cm, mass: 80.3 ± 13 kg, VO_2max : 44.3 ± 5.5 mL.min.kg⁻¹) volunteered to participate in this study. The participants were active students, who participated in some form of physical activity several times per week. All participants were deemed healthy based on their response to a routine medical screening questionnaire. They were all informed about the risks and requirements of the experiment before giving written informed consent. The experimental design of the study was approved by the Human Research Ethics Committee of Victoria University and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Experimental design

An initial laboratory visit was scheduled to obtain data on physical characteristics and each individual's maximal oxygen consumption, and to perform a familiarization with the supramaximal exercise test and a single Wingate test (*Session 1*). At least 48 hours later, without any intervening intense physical activities, participants returned to the laboratory for the second session (*Session 2A*) described in Figure 1. After a resting biopsy, followed by a standardized breakfast and sodium bicarbonate or placebo supplementation, participants performed three 30-s Wingate tests, each separated by 20 min of rest (3-WT). Immediately after exercise and 6 hours later, skeletal muscle biopsies were collected. Then, twenty-four hours after the end of exercise, participants returned to the laboratory for another biopsy. All participants returned 6 days later (the same day and same hour as the first resting biopsy) to perform the same testing session procedure with the alternative supplement (*Session 2B*). All exercise tests were performed in a laboratory where temperatures were ranged between 20 to 22°C. To minimize any potential exercise and/or diet-induced variability in measurements, participants were asked to refrain from vigorous activity and the ingestion of caffeine, alcohol or other drugs for 48 h before sessions 2A and 2B.

Details of experimental procedures

Session 1

Graded Exercise Test (GXT). All participants performed a graded exercise test on an electromagnetically-braked cycle ergometer (Lode Excalibur Sport V2.0; Groningen, The Netherlands). During the test, oxygen uptake (VO_2), carbon dioxide production, and minute

ventilation were measured breath by breath by means of validated (Rosdahl et al., 2013) metabolic cart (Moxus Modular VO₂ System, AEI Technologies, Pittsburgh, PA). The exercise test increments were designed to exhaust the subject within 10 to 15 min. Each stage consisted of a 1-min exercise period and increased by 20 W.

Force-Velocity Test (FVT).

After a 5-min warm-up, this test consisted of the repetition of short, maximal, cycle sprints (Lode Excalibur Sport V2.0; Groningen, The Netherlands), using different braking forces. Each sprint was completed in 5 s, corresponding to the time it takes for a healthy motivated participant to attain his maximal velocity after the starting signal. In a random order, participants started the test against the following three friction loads: 0.3, 0.6, or 0.8 N•kg⁻¹ of body mass. After at least a 5-min rest period between each sprint, participants were told to remain on the saddle and to perform the next sprint. Each participant was verbally encouraged.

These sprints allowed us to familiarize the subjects with the cycle ergometer and to calculate the optimal friction load to be used during sessions 2A and 2B. The velocity, force, and power values (averaged per half-pedal revolution) recorded during the acceleration phase of the three sprints were used to draw the individual force- and power-velocity relationships (Arsac et al., 1996). The optimal values of friction force and velocity at which the highest power output was reached were determined from these relationships.

Session 2A and 2B

3 x 30-s all-out exercises (3-WT) and NaHCO₃ supplementation. Participants performed a warm-up that began with 8 min against a load of 150 W and 2 min at 260 W. This was followed by 2 min of rest before performing three 10-s efforts at 300, 400 and 500 W – each separated by 90 s of rest. Participants then rested in the sitting position before performing the main exercise test session, which consisted of 3 x 30-s WT separated by 20 min of rest. For each sprint, the pace was not controlled, which means that participants were required to complete each 30-s effort with a maximal effort from the beginning. The resistance was set as 7.5% of the participants body mass, according to previous study protocols (Gibala et al., 2006). Strong verbal encouragement was provided to each participant during all maximal exercises. Participants were informed of the time elapsed after 15 and 20 s of exercise, and then received a 5-s countdown until the end. The mean power (P_{mean}), peak power (P_{peak}), and

end power (P_{end}) outputs were determined. The fatigue index (FI) of the all-out test was calculated as: $[(P_{\text{max}} - P_{\text{end}}) / P_{\text{max}}] \times 100$.

Supplementation.

Ninety minutes before the start of this exercise test session, participants ingested either $0.3\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of NaHCO_3 (BIC) or $0.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of calcium carbonate (PLA) contained within gelatine capsules. Ingestion took place during 20 minutes, and with water ad libitum (Edge et al., 2006b). However, for both conditions, subjects were required to drink the same quantity of water. Treatment was assigned in a counterbalanced, randomized, double-blind manner.

Rate of Perceived Exertion.

Immediately after each 30-s effort, and before getting off the bike and sitting down for the 20-min rest period, participants were required to provide a rating of their perceived exertion (RPE) using two scales. The first was a 15-point (6 to 20) scale estimating cardio-respiratory exertion, where a rating of 6 reflects exercise that is very, very easy and a rating of 20 reflects maximum exercise. The second scale (CR10) was an 11-point (0 to 10) scale estimating muscular pain, where 0 reflects no pain and 10 reflects a maximum pain (Borg & Kaijser, 2006).

Blood analyses

Capillary blood samples (85 μL) were only taken during the 3-WT at rest, post warm-up, and at 3, 5 and 9 min after each sprint from a hyperemized fingertip in order to immediately measure the blood lactate concentration ($[\text{La}^-]$) using a lactate analyser (2300 STAT Plus, YSI Inc., Yellow Springs, OH), pH and bicarbonate concentration ($[\text{HCO}_3^-]$) using an automated blood gas analyser (Rapidpoint 405, Siemens Healthcare, Melbourne, Australia).

Skeletal muscle analyses

Skeletal muscle biopsies. During each session, four muscle biopsies were performed by an experienced medical practitioner at rest, immediately after the end of the third exercise test (within 10 s following the completion of the exercise bout), and 6 h and 24 h later (at rest) in both conditions. Before any incision was made in the skeletal muscle, the skin and fascia overlying the vastus lateralis muscle were anaesthetized using 5 mL of 1% Xylocaine. For the first biopsies (on day 1), two incisions were made: one to be used immediately for the rest

biopsy and the other was closed with a Steri-Strip and was used immediately after the third sprint. Other biopsies were taken approximately 1 cm from the previous biopsy site. The muscle was taken from the vastus lateralis (halfway between the knee and the hip) of each participant using the 5 mm Bergström needle technique modified with suction (Evans et al., 1982). Muscle samples were blotted free of any visual blood on a filter paper. The muscle samples were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until subsequent analysis.

Muscle pH and $[H^+]$. Freeze-dried muscle samples (~2 mg dry mass) were dissected free of visible blood, fat, and connective tissue and homogenised on ice for 3 x 30s in a 10 mM solution of the glycolytic inhibitor NaF (30 mg d.m per 1 mL of NaF). pH measurements were performed at 37°C with a microelectrode (MI-410, Microelectrodes, Bedford, NH) connected to a pH meter (Lab 850, Schott Instruments GmbH, Mainz, Germany). After allowing 5 min for the sample to equilibrate to temperature, pH measurements were recorded every minute for 5 min and the average of values from 3-5 min taken as the pH of the sample.

Sample preparation for western blotting. Samples of muscles homogenates (20 µg of proteins) and a prestained molecular mass marker (Euromedex 06P-0211, 10-250kDa) were separated on Nupage 4 to 12% BisTris gels of 1.5 mm (200V for 60 min – NP0335BOX) with the Novex system (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) in buffer B (MOPS-SDS [1 M MOPS, 1 M Tris Base, 69.3 mM SDS, 20.5 mM EDTA, DDI H₂O to adjust to the right dilution, pH 7.7]). We used a large, single sample of a human biopsy as an internal standard to serve as a control for all gels. Proteins were transferred from the gels to nitrocellulose membranes (101 mA for 75 min), and membranes were then incubated on a shaker for 90 min in a blocking buffer at room temperature (Odyssey® Blocking Buffer; LI-COR, Cat. #927-40000; phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% sodium azide; Euromedex). The membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (1:500) in blocking buffer (MCT1 and MCT4: personal antibodies (Thomas et al., 2005), CD147: sc-9757 SantaCruz, NHE1: MAB3140 Millipore, NBCe1: AB3212 Millipore, CAII: sc-25596 SantaCruz, COX IV: 4844S Cell signaling, AMPK: 2532S Cell signaling, pAMPK: 2531S Cell signaling), followed by three 5-min washes in PBS-Tween buffer (PBS 1x [140 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.14 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4] + 0.25% Tween 20) and one 5-min wash in PBS 1x buffer. Then, membranes were incubated for 45 min with the secondary antibody in blocking buffer. Membranes were washed again as previously

described, and protein expression was detected by enhanced immunofluorescence (Odyssey Infrared Imaging System LI-COR Biosciences, ScienceTec, Courtabœuf, France). Alpha-tubulin (T6074 Sigma-Aldrich, 1:2000) was used as a loading control for each protein density quantification. Protein band densities were calculated from the sum of the peak intensities by using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). No gamma transformation was applied for the calculation. Results were expressed in arbitrary optical density units as previously used (Thomas et al., 2005).

mRNA and q-PCR. Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, Fisher Scientific). To avoid genomic DNA contamination and amplification during PCR, RNAs were treated with DNase-RNase free (Euromedex, Souffelweyersheim, France) before RT. Briefly, 5 mg of total RNA was denatured at 70°C and then reverse transcribed at 42°C for 120 min following the manufacturer's instructions. Amounts of cDNA were adjusted for each primer pair to be in the linear amplification range and to give the same quantity of amplified cDNA with eukaryotic elongation factor 1 α (EEF1 α) primers.

To quantify expression of genes of MCT1 and MCT4, cDNAs were used as templates in SYBR Green I Master real-time q-PCR assays on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France), in a total volume of 10 μ L. Sample data were analyzed according to the comparative cycle threshold method and were normalized by stable reference gene of EEF1 α .

Indices of oxidative stress.

Total protein oxidation. 5 μ L of 12% SDS were added to each previously homogenized sample (5 μ L) containing 15 μ g of protein. All samples were then reduced in 2,4 DNP (2,4-Dinitrophenol) after a 15-minute incubation period in 10 μ L of 2,4 DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazine) (Oxyblot) ("regular sample"). In the same time, a "negative control" sample was prepared similarly, but DNPH was replaced by 10 μ L of a standard reduction solution (Oxyblot). After 15 minutes at room temperature, 7.5 μ L of neutralization buffer (Oxyblot) were added to each sample with a 5% volume of β -mercaptoethanol. Then, the "regular sample" and the "negative control" were both run on Nupage 4 to 12% BisTris gels of 1.5 mm (200V for 60 minutes – NP0335BOX) and transferred on nitrocellulose membranes. Membranes were first saturated in blocking buffer (Odyssey® Blocking Buffer; LI-COR, Cat. #927-40000; phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% sodium azide; Euromedex) for 1 hour at room temperature and then incubated with the first antibody (Oxyblot) (1:150) overnight at 4°C in blocking buffer. After 4 washes (same protocol as

describe for western blots), membranes were incubated for 45 min with the second antibody (Oxyblot) (1:300) coupled with HRP (horseradish peroxidase) at room temperature. The densities of all bands in a given column were added together and considered as the Oxyblot value for the sample.

Total lipid peroxidation. The 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE: sc-130083 SantaCruz) analysis is based on exactly the same principle used for classic western blots, with a dilution of the first antibody equal to 1:500 and to 1:1000 for the second antibody. The densities of all bands in a given column were added together and considered as the 4-HNE value for the sample.

Statistical analyses

All data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test and are reported as means and standard error (mean \pm SE). Data were analysed using a two-way repeated-measures ANOVA (effects: condition – NaHCO₃ supplementation and placebo – and time). Where significance was achieved, Tukey's *post hoc* analysis was undertaken. Relationships between variables were analysed by a Pearson's correlation coefficient. Significance was taken at the level of $P < 0.05$. All analyses were performed by a senior statistician using SigmaPlot (Systat Software, Inc., San Jose, California, USA). The Department of Statistics of the University of Montpellier Hospital performed statistical analysis.

Results

Blood parameters in response to exercise and induced alkalosis

The ingestion of NaHCO₃ had the expected effect on blood acid–base status. The repeated-measures ANOVA revealed a significant interaction effect (time x condition) on blood pH values ($P < 0.001$; Figure 2A) as well as a significant effect for condition ($P < 0.001$) and time ($P < 0.001$). As shown in Figure 2A, the pH values measured at rest, were 7.39 ± 0.01 and 7.44 ± 0.01 for PLA and BIC respectively ($P < 0.05$). Also, PLA pH values remained significantly lower until the end of exercise (PLA: 7.14 ± 0.03 vs BIC: 7.27 ± 0.04 ; $P < 0.001$). At the start of the 3-WT, blood [HCO₃⁻] was 16.90 ± 1.41 mmol.L⁻¹ in PLA and 22.11 ± 2.14 mmol.L⁻¹ in BIC ($P < 0.01$; Figure 2B). There was also a significant effect on blood [HCO₃⁻] across condition ($P < 0.01$) and time ($P < 0.001$). No significant effect across time or condition was noted for [La⁻] ([La⁻]_{max}: PLA: 10.9 ± 0.7 vs BIC: 11.7 ± 1.1 mmol.L⁻¹; $P > 0.05$, Figure 3).

Muscle pH and [H⁺] in response to exercise and induced alkalosis

For both muscle pH and [H⁺], there were no significant differences between PLA and BIC for all time points (rest pH: PLA: 6.88 ± 0.06 vs BIC: 6.88 ± 0.04 ; post-exercise pH: PLA: 6.56 ± 0.09 vs BIC: 6.59 ± 0.09 ; $P > 0.05$, Figure 4). However, for both parameters and both conditions, immediately post-exercise values were significantly different from rest values ($P < 0.001$), with no differences between +6 h and +24 h to resting values ($P < 0.001$; Figure 4). Immediately post-exercise [H⁺] increased twofold in both conditions, which corresponded to a 0.3 decrease in pH values.

Mechanical performances and psycho-physical scores

Table 1 reports the parameters of performance during the 3-WT exercises. No significant time or condition effects were measured between PLA and BIC condition during the whole 3-WT for P_{peak} (PLA: 863 ± 25 vs BIC: 833 ± 29 W; $P > 0.05$), P_{mean} (PLA: 655 ± 9 vs BIC: 637 ± 2 W; $P > 0.05$), P_{end} (PLA: 313 ± 21 vs BIC: 381 ± 11 W; $P > 0.05$) or FI (PLA: $50.8 \pm 1.6\%$ vs BIC: $45.7 \pm 2.2\%$; $P > 0.05$). There were no significant effects for the whole 3-WT between PLA and BIC for both RPE scales (Borg = PLA: 15.6 ± 0.1 vs BIC: 16 ± 0.4 ; $P > 0.05$; CR10 = PLA: 7.8 ± 0.1 vs BIC: 7.2 ± 0.02 ; $P > 0.05$). No significant

correlations were observed between performance or fatigue indices and the values for muscle protein content described below.

Effects of exercise and induced-alkalosis on skeletal muscle oxidative stress

Several oxidized protein bands in the *vastus lateralis* muscle of our participants were detected. There was a significant interaction (time x condition) for relative abundance of total proteins oxidized ($P < 0.05$). As shown in Figure 6, oxidized protein were 23.8% higher in PLA condition 24 h after the end of exercise compared to immediately post-exercise ($P < 0.01$). Furthermore, values were significantly lower in BIC condition compared to PLA condition 24 h after the end of exercise (-30%; $P < 0.01$). There was no condition or time effect for both conditions when looking at the level of lipid peroxidation (i.e., 4-HNE) ($P > 0.05$, Figure 6).

Effects of exercise and induced-alkalosis on skeletal muscle protein abundance

MCT4. There was no significant time effect from rest to 24 h after the 3-WT exercise for MCT4 content in PLA, and a large variability was observed between subjects (Figure 5). In the BIC condition, there was no significant condition or time effect from rest to 24 h after exercise, even if MCT4 expression increased by 42.5% from 6 to 24 h post-exercise in BIC compared to only a 5.3% increase in PLA ($P > 0.05$; Figure 5). MCT4 gene expression was not significantly different for all time points between conditions.

MCT1. Muscle MCT1 content tended to decrease in PLA immediately, +6 h and +24 h after the 3-WT exercise, compared to resting condition, but there were no significant time effects ($P > 0.05$; Figure 5). In the BIC condition, MCT1 content tended to increase 6 and 24 h after exercise, but again there were no significant time effects ($P > 0.05$). However, there was a main condition effect for MCT1 content such that it was significantly higher in BIC condition compared to PLA condition 6 (+21.6%) and 24 h (+23.7%) after the end of exercise ($P < 0.01$; Figure 5). MCT1 gene expression was not significantly different for all time points between conditions. However, MCT1 gene expression was 24.5% and 35.2% higher in BIC compared to PLA 6 h and 24 h after exercise respectively ($P > 0.05$).

CD147. The content of the MCT1 chaperone protein CD147 was significantly lower after both 6 and 24 h of recovery compared to rest (-78.8% and -74.5% respectively; $P <$

0.01). There was also a significant interaction for CD147 content ($P < 0.05$; Figure 5). As per MCT1 content, CD147 content was significantly higher in BIC compared to PLA after 6 h (+70.3%) and 24 h (+70.4%) of recovery ($P < 0.01$; Figure 5).

NHE1. The muscle content of NHE1 remained unchanged immediately post-exercise and 6 h after exercise, but was significantly decreased 24 h after exercise in BIC. MCT1 and NHE1 content were respectively positively related at rest ($r = 0.64$, $P = 0.09$), immediately after exercise ($r = 0.89$, $P < 0.01$), and 6 h after exercise ($r = 0.89$; $P < 0.01$) in the PLA condition. After 24 h of recovery, the relative abundance of NHE1 was 57.7% higher ($P < 0.01$; Figure 5) compared to the rest values in BIC condition, and was 58.7% higher in BIC compared to PLA ($P < 0.01$; Figure 5).

COX IV. No significant time or conditions effects were observed after the 3-WT exercise for all time points for COX IV relative abundance ($P > 0.05$). However, MCT1 and COX IV contents were positively related at each time point in PLA, at rest ($r = 0.89$, $P < 0.01$), immediately after exercise ($r = 0.83$, $P < 0.01$), 6 h ($r = 0.62$, $P < 0.05$), and 24 h after exercise ($r = 0.73$, $P < 0.05$). As both NHE1 and COX IV content was related to MCT1 content, we also tested the relationship between these proteins. NHE1 and COX IV content was positively related at rest ($r = 0.75$, $P < 0.05$), immediately after exercise ($r = 0.74$, $P < 0.05$), 6 h ($r = 0.79$, $P < 0.05$), and 24 h after exercise ($r = 0.73$, $P < 0.05$) in the PLA condition. Furthermore, pre-exercise alkalosis did not affect the relationship between MCT1 content and oxidative capacity, observed in the PLA condition, since MCT1 and COX IV contents were still positively correlated immediately post-exercise ($r = 0.72$; $P < 0.05$), after 6 h ($r = 0.81$; $P < 0.05$), and after 24 h post-exercise ($r = 0.83$; $P < 0.01$).

NBCe1 and CAII. No significant difference was observed after the 3-WT across conditions (BIC vs PLA) and biopsy time points NBCe1 and CAII relative abundances ($P > 0.05$) in the PLA and BIC conditions. Resting NBCe1 content was however related to resting MCT1 content ($r = 0.63$, $P < 0.01$).

AMPK and pAMPK. No significant changes were observed for either total AMPK and pAMPK relative abundance ($P > 0.05$) or the ratio pAMPK/AMPK in response to exercise in both conditions.

Discussion

Main results

This was the first study to examine the effects of three 30-s all-out exercise bouts and pre-exercise alkalosis on the expression of proteins involved in muscle pH regulation in human skeletal muscle. Compared to the PLA condition, pre-exercise, induced alkalosis significantly reduced the increase in protein carbonylation provoked by exercise after 24 h of recovery and allowed an increase in protein expression for MCT1, its chaperone protein CD147, and NHE1. These differences in protein expression between the PLA and BIC condition 24 h after the end of exercise were not explained by an activation of AMPK in the BIC condition. Furthermore, MCT4, NBCe1, CAII and COX IV protein expression during the recovery were neither significantly sensitive to an acute bout of exercise nor to pre-exercise induced alkalosis. The present data provide novel insights into the time-course dependent changes of the different skeletal muscle proteins, such as MCT1, CD147, and NHE1 involved in muscle pH regulation after an acute three-repeated sprint exercise involving high muscle metabolic perturbations (PLA condition) or which are counteracted by pre-exercise induced-alkalosis (BIC condition).

Methodology

Supplementation. To test the hypothesis that pre-exercise alkalosis could alter exercise-induced protein expression during 24 h of recovery, we used a loading dose of 0.3 g•kg⁻¹ body mass of NaHCO₃ in our experimental design. Consistent with earlier studies (Hollidge-Horvat et al., 2000; Bishop et al., 2004), this resulted in a significant higher blood pH and [HCO₃⁻] before, during and after the three-repeated sprints (Figure 2), compared to the PLA condition. However, NaHCO₃ ingestion did not affect the immediate post-exercise muscle pH compared to PLA condition. This was consistent with the results of other studies in humans (Stephens et al., 2002; Bishop et al., 2004). Indeed, the greater extracellular buffer concentration, increasing H⁺ efflux from the muscles into the blood, would alter the muscle pH during recovery (Lindinger et al., 1999).

Exercise test. In the present study, the participants presented a power profile during the three 30-s all-out exercises that is classically observed in sprint athletes, with a large decrease in mean power output during the three repetitions in both conditions, and characterized by fatigue indices of 45 to 50 % (Granier et al., 1995; Hunter et al., 2003). No difference in

power output decrease was observed between the two conditions (Table 1), which was consistent with the results of other studies using pre-exercise alkalosis in humans (Vanhatalo et al., 2010; Zabala et al., 2011). Consequently, any differences in protein expression or protein carbonylation between conditions could not be explained by differences in power output

*Effect of high-intensity exercise on the expression of proteins involved in pH regulation.
Effects of acute exercise on MCT and CD147 content.*

We chose a timing of biopsies which allowed us to determine the early (0 and 6 h post-exercise) and mid-term (24 h) responses after an acute typical cycling training session of repeated sprints, according to our hypothetical time-course based from different studies for MCT1 and MCT4 contents (Thomas et al., 2012). A novel finding of the present work was that MCT1 content was significantly higher 6 h and 24 h post-exercise, compared to rest values, in the BIC condition. In contrast, MCT4 was not significantly altered by exercise in both conditions. These findings are divergent from previously reported results. Indeed, it has been observed that both MCT1 and MCT4 increase in the acute stages following endurance exercise in rats (Coles et al., 2004), and up to 4 days post a single exhaustive bout in humans (Green et al., 2002). However, a supramaximal running test to exhaustion provoked a short-term increase only in MCT1 content 2 h after exercise in humans, but not in MCT4 content (Bickham et al., 2006).

Regarding MCT4 content, we reported a large variability in protein expression as previously observed in humans (Pilegaard et al., 1999; Juel et al., 2004; Burgomaster et al., 2007; Mohr et al., 2007; Bishop et al., 2008b). There was no increase in MCT4 content at the conclusion of the 24 h post-exercise, possibly indicating that, at least in human participants, acute (Bickham et al., 2006) and chronic (Bickham et al., 2006; Bishop et al., 2008b; Gunnarsson et al., 2013) sprint exercise does not significantly up-regulate MCT4 protein levels. This may also be linked to the different time course of acute regulation between humans (present study) and animals (Coles et al., 2004). Furthermore, the failure to observe any significant high-intensity contraction-induced changes in both MCT1 and MCT4 in PLA condition during the first 24 h following the end of exercise could be likely attributable to the different timing of the biopsies used in the different studies, but also to the blood metabolic response induced by the type of exercise.

If we consider the kinetics taking into account the time from the beginning of exercise when the biopsy was performed, our results were therefore in accordance with this model.

Indeed, 40 min after the beginning of the repeated-sprints exercise (i.e. immediately post-exercise), we did not observe any changes in MCT1 and MCT4 content. Due to the timing, we were unable to highlight the potential increase in MCT1 2 h post-exercise in human population as observed by Bickham et al. (2006). However, we reported an acute up-regulation in MCT1 at the same timing of 6 h and 24 h post-exercise than Coles et al. (2004), but only in BIC condition. These data suggested that high-intensity exercise, with its concomitant large changes in pH, delayed or counteracted the increase MCT1 density, and that endurance exercise, which causes only moderate pH changes, could be sufficient to change MCT1 content.

This is in accordance with previous studies on training effects, who have reported that different types of contractile activity (force / endurance) could increase MCT1 content (Bonon et al., 1998; Pilegaard et al., 1999; Dubouchaud et al., 2000; Juel et al., 2004; Burgomaster et al., 2007; Mohr et al., 2007). However, this was also in line with sprint-training inducing high-level of muscle and blood metabolic perturbations, which did not report some changes in MCT1 content (Bishop et al., 2008b; Gunnarsson et al., 2013). Furthermore, Mohr et al. (2007) observed an increase in MCT1 content after two types of different sprint training and suggested that the degree of lactate and proton accumulation were not the main factor which stimulate protein synthesis. However, one can note that the muscle pH values were around ≈ 7 in their two types of sprint training (Mohr et al., 2007), whereas muscle pH value measured immediately post-exercise in the present study was lower than 6.6, which suggests that high-level of H^+ accumulation could alter the protein expression by stimulating signaling pathways, in particular for MCT1.

CD147. Although the protein abundance of MCTs 1–4 can be regulated at the genetic level, MCT1 content is correctly targeted into the membrane by the action of its chaperone CD147 (Kirk et al., 2000; Philp et al., 2003; Wilson et al., 2005). CD147 is an ancillary protein required for the expression of MCTs and the interaction between CD147 and MCT1 or MCT4 may be required for their translocation and correct localization to plasma membrane (Schneiderhan et al., 2009). This chaperone protein, which in the present study was quantified for the first time in human muscle in association with acute exercise, was significantly decreased after 24 h of recovery in PLA condition. Although not significant, MCT1 content was also decreased in 7/8 participants at the same time-point in the PLA condition. This result was in favor of a coregulation of MCT1 and CD147 in response to both contractile activity, as previously observed in diabetes rats (Nikooie et al., 2013). Consequently, the degree of H^+ accumulation may both transiently stimulate protein degradation of CD147 (and probably

MCT1) and delay the synthesis of these proteins in response to contractile activity during a short period of 24 h post-exercise.

NHE1. For the first time, in the current study, it has been shown that a significant increase in NHE1 content was observed 24 h after the end of acute sprint exercise combined with pre-exercise induced alkalosis.

MCT1 and NHE1 content was significantly related at the different time points of recovery in the PLA condition, which suggests a concomitant regulation of the expression of these proteins at rest and during recovery. In addition, both MCT1 and NHE1 contents were related to COX IV in the PLA condition. These findings all together are consistent with the concept of the lactate shuttle that proposes a complex lactate and pH regulation between sarcolemma and mitochondria. Further study is needed to determine the colocalisation of MCT1 and NHE1 in skeletal muscle and their cooperation for H⁺ and lactate regulation between sarcolemma and mitochondria.

It has previously been shown that NBCe1 content increased by interval training in rat muscles (soleus) (Thomas et al., 2007). In the present study, acute exercise had no effect on NBCe1 protein expression during the first 24 h of recovery. As NBCe1 content was investigated in vastus lateralis in our study, and that NBC content has already been shown to be negatively correlated with type I muscle fibers (Kristensen et al., 2004), it is possible that an up-regulation may have been observed in muscle predominantly constituted with fast-twitch fibers. Furthermore, CAII, a protein that has been found to significantly enhance both NBC (Pushkin et al., 2004; Becker & Deitmer, 2007; Schueler et al., 2011) and MCT1 (Becker et al., 2005, 2011; Becker & Deitmer, 2008; Stridh et al., 2012) activities, was not up-regulated here by acute exercise. However, in the present study, NBCe1 and MCT1 contents were significantly correlated at rest, which is in line with the results of Thomas et al. (2007), who have found a moderate positive correlation between these two proteins in oxidative muscle after training. Together, these results seem to indicate that, despite interactions between CAII, MCT1 and NBC (Schueler et al., 2011; Becker et al., 2011; Stridh et al., 2012; Deitmer & Becker, 2013), their regulation kinetics during the first 24 h of recovery following three all-out sprints are not exactly the same.

In summary, in response to 3-WT there was either a decrease or no change in the expression of proteins associated with skeletal muscle pH regulation. However when combined with induced-alkalosis, acute exercise was associated with a significant increase in

the protein content of MCT1, CD147 and NHE1. Although no significant, there was a 35.8% increase in MCT4 24 h post the 3-WT.

Effect of both high-intensity exercise and pre-exercise induced alkalosis on the regulation of protein expression of MCT1, CD147 and NHE1: effect of oxidative stress

From the present study, it appears that the difference in MCT1, CD147 and NHE1 protein expression between PLA and BIC conditions begins 6 h after the end of exercise (for MCT1 and CD147) and was maintained at least until 24 h post-exercise. It has been reported that oxidative damage often occurs after a single bout of exercise, which may limit the adaptive response (Radak et al., 2013). In the present study, whereas we did not observe lipid peroxidation during the recovery, muscle protein carbonylation, a well-used marker for oxidative stress, significantly increased 24 h after the end of exercise in the PLA condition, which was reduced by pre-exercise induced alkalosis. Protein carbonylation is a type of protein oxidation that can be promoted by reactive oxygen species, and is an irreversible post-translational modification that often leads to the loss of protein function, and could affect protein expression. In the present study, one could note that the absence of sprint training history of our subjects may influence the adaptive response of the carbonylation of the proteins to acute bouts of exercise (Coffey et al., 2006) compared to high-level athletes. Indeed, our recreational subjects were not involved in regular sprint exercise, and could produce higher levels of reactive oxygen species (ROS) at the given intensity than those who are currently trained in sprint (Radak et al., 2001). Therefore, physical exercise like this type of repeated-bout exercise could be detrimental to our poorly trained subjects in sprint. Consequently, this oxidative stress could explain both the absence of protein synthesis in PLA condition during the first 24 h of recovery for MCT1, CD147 and NHE1 and/or the significant decrease in CD147 content and the trend in 7/8 participants for MCT1, which may reflect in contrast the stimulation of protein degradation.

From data of the present study, the up-regulation of these proteins in BIC condition compared to the PLA condition seems not to be regulated by the activity of AMPK during the first 24 h after the end of acute bout of repeated-sprint exercise. Indeed, total AMPK and p-AMPK were unchanged in this timing of biopsies, which were consistent with findings of Gibala et al. (2009) after repeated 30-s all-out exercise with 4 min of recovery. Furthermore, because our population had not exactly the same training levels (1 to 3 physical activities per week) and was not especially involved in sprint cycling, it is possible that some of the inter-individual variations noted in MCT4 or AMPK protein abundances may have been reduced

with participants who have exactly the same cycling training status.

Future studies

While the experiments presented in this study provide clear evidence that both three 30-s all-out exercise bouts and pre-exercise induced alkalosis are involved in the protein expression responsible for skeletal muscle pH regulation in human within 24 h, other studies remain necessary to investigate all the mechanisms by which these proteins are regulated. Future inclusion of additional participants, additional exercise sessions and more biopsies in more trained participants are planned. Nonetheless, despite the small sample size, the use of a study design spread in two weeks with repeated-measures allowed each individual to serve as his own control and afforded substantial rigor in our interpretation of these novel findings in protein expression. Finally, it seems relevant, for future studies, to analyze the protein expression of MCT1, CD147, NHE1 and oxidized proteins 48 h after the end of exercise, for example, to determine if they have returned to pre-exercise values or not, but also to analyze the training effects associated with PLA vs BIC supplementation on the regulation of these proteins.

Summary of main conclusions

Our results indicated significant differences in blood metabolic response during the interval of recovery with a higher blood bicarbonate concentration and a lower blood pH values in BIC condition. In summary, we report dynamic alterations in the levels of protein expression involved in pH regulation following both an acute high-intensity exercise and induced-alkalosis for MCT1, CD147 and NHE1. This up-regulation could result from the lower exercise-induced oxidative stress in BIC condition measured 24 h after the end of exercise, but did not seem to be induced by the activation of AMPK. Furthermore, NBCe1, CAII and COX IV proteins expression was not significantly sensitive to these stimuli. Future studies will be required to define the potential use of MCT1, CD147 and NHE1 as biomarkers of exercise adaptation and pH regulation and to better understand their mechanistic role in the control of H⁺ and lactate regulation.

Acknowledgements

The authors thank the subjects for their time and efforts, and are grateful to the French Ministry of Health, Youth and Sport for their financial support and Gael Guilhem as well as Jessica Lees for their technical assistance.

References

- Arsac LM, Belli A & Lacour JR (1996). Muscle function during brief maximal exercise: accurate measurements on a friction-loaded cycle ergometer. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 74, 100–106.
- Becker HM, Broer S & Deitmer JW (2004). Facilitated lactate transport by MCT1 when coexpressed with the sodium bicarbonate cotransporter (NBC) in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 86, 235–247.
- Becker HM & Deitmer JW (2007). Carbonic anhydrase II increases the activity of the human electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 282, 13508–13521.
- Becker HM & Deitmer JW (2008). Nonenzymatic proton handling by carbonic anhydrase II during H⁺-lactate cotransport via monocarboxylate transporter 1. *J Biol Chem* 283, 21655–21667.
- Becker HM, Hirnet D, Fecher-Trost C, Sultemeyer D & Deitmer JW (2005). Transport activity of MCT1 expressed in *Xenopus* oocytes is increased by interaction with carbonic anhydrase. *J Biol Chem* 280, 39882–39889.
- Becker HM, Klier M, Schüler C, McKenna R & Deitmer JW (2011). Intramolecular proton shuttle supports not only catalytic but also noncatalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 3071–3076.
- Bento LMA, Carvalheira JBC, Menegon LF, Saad MJA & Gontijo JAR (2005). Effects of NH₄Cl intake on renal growth in rats: role of MAPK signalling pathway. *Nephrol Dial Transplant* 20, 2654–2660.
- Bergersen LH, Thomas M, Jóhannsson E, Waerhaug O, Halestrap A, Andersen K, Sejersted OM & Ottersen OP (2006). Cross-reinnervation changes the expression patterns of the monocarboxylate transporters 1 and 4: An experimental study in slow and fast rat skeletal muscle. *Neuroscience* 138, 1105–1113.
- Bickham DC, Bentley DJ, Le Rossignol PF & Cameron-Smith D (2006). The effects of short-term sprint training on MCT expression in moderately endurance-trained runners. *Eur J Appl Physiol* 96, 636–643.
- Bishop D, Edge EJ, Mundel T, Hawke E, Leikis M & Pilegaard H (2008a). Metabolic acidosis reduces exercise-induced up-regulation of PGC1α mRNA. *Med Sci Sports Exerc* 40, S655.
- Bishop D, Edge J, Davis C & Goodman C (2004). Induced metabolic alkalosis affects muscle metabolism and repeated-sprint ability. *Med Sci Sports Exerc* 36, 807–813.
- Bishop D, Edge J & Goodman C (2004c). Muscle buffer capacity and aerobic fitness are associated with repeated-sprint ability in women. *Eur J Appl Physiol* 92, 540–547.
- Bishop D, Edge J, Thomas C & Mercier J (2007). High-intensity exercise acutely decreases the membrane content of MCT1 and MCT4 and buffer capacity in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102, 616–621.
- Bishop D, Edge J, Thomas C & Mercier J (2008b). Effects of high-intensity training on muscle lactate transporters and postexercise recovery of muscle lactate and hydrogen ions in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1991–1998.
- Bonen A, McCullagh KJ, Putman CT, Hultman E, Jones NL & Heigenhauser GJ (1998). Short-term training increases human muscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. *Am J Physiol* 274, E102–107.
- Borg E & Kaijser L (2006). A comparison between three rating scales for perceived exertion and two different work tests. *Scand J Med Sci Sports* 16, 57–69.
- Burgomaster KA, Cermak NM, Phillips SM, Benton CR, Bonen A & Gibala MJ (2007). Divergent response of metabolite transport proteins in human skeletal muscle after sprint interval training and detraining. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1970–6.

Coffey VG, Shield A, Canny BJ, Carey KA, Cameron-Smith D & Hawley JA (2006). Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E849–855.

Coles L, Litt J, Hatta H & Bonen A (2004). Exercise rapidly increases expression of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 in rat muscle. *J Physiol* 561, 253–261.

Deitmer JW & Becker HM (2013). Transport metabolons with carbonic anhydrases. *Front Physiol* 4, 291.

Dela F, Holten M & Juel C (2004). Effect of resistance training on Na,K pump and Na⁺/H⁺ exchange protein densities in muscle from control and patients with type 2 diabetes. *Pflugers Arch* 447, 928–933.

Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC & Brooks GA (2000). Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E571–9.

Dubouchaud H, Eydoux N, Granier P, Prefaut C & Mercier J (1999). Lactate transport activity in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles after acute exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 87, 955–961.

Edge EJ, Bishop D, Hill-Haas S, Dawson B & Goodman C (2006a). Comparison of muscle buffer capacity and repeated-sprint ability of untrained, endurance-trained and team-sport athletes. *Eur J Appl Physiol* 96, 225–234.

Edge J, Bishop D & Goodman C (2006b). Effects of chronic NaHCO₃ ingestion during interval training on changes to muscle buffer capacity, metabolism, and short-term endurance performance. *J Appl Physiol* 101, 918–925.

Evans WJ, Phinney SD & Young VR (1982). Suction applied to a muscle biopsy maximizes sample size. *Med Sci Sports Exerc* 14, 101–102.

Eydoux N, Dubouchaud H, Py G, Granier P, Prefaut C & Mercier J (2000). Lactate transport in rat sarcolemmal vesicles after a single bout of submaximal exercise. *Int J Sports Med* 21, 393–399.

Gibala M (2009). Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 34, 428–432.

Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, Raha S & Tarnopolsky MA (2006). Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol (Lond)* 575, 901–911.

Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ & Hargreaves M (2009). Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 106, 929–934.

Granier P, Mercier B, Mercier J, Anselme F & Préfaut C (1995). Aerobic and anaerobic contribution to Wingate test performance in sprint and middle-distance runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 70, 58–65.

Green H, Halestrap A, Mockett C, O'Toole D, Grant S & Ouyang J (2002). Increases in muscle MCT are associated with reductions in muscle lactate after a single exercise session in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E154–160.

Gunnarsson TP, Christensen PM, Thomassen M, Nielsen LR & Bangsbo J (2013). Effect of intensified training on muscle ion kinetics, fatigue development, and repeated short-term performance in endurance-trained cyclists. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305, R811–821.

Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K & Brooks GA (2007). Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J* 21, 2602–2612.

Hollidge-Horvat MG, Parolin ML, Wong D, Jones NL & Heigenhauser GJ (2000). Effect of induced metabolic alkalosis on human skeletal muscle metabolism during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E316–329.

Hunter AM, St Clair Gibson A, Lambert MI, Nobbs L & Noakes TD (2003). Effects of supramaximal exercise on the electromyographic signal. *Br J Sports Med* 37, 296–299.

Iaia FM, Thomassen M, Kolding H, Gunnarsson T, Wendell J, Rostgaard T, Nordborg N, Krstrup P, Nybo L, Hellsten Y & Bangsbo J (2008). Reduced volume but increased training intensity elevates muscle Na⁺-K⁺ pump alpha1-subunit and NHE1 expression as well as short-term work capacity in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R966–974.

Jubrias SA, Crowther GJ, Shankland EG, Gronka RK & Conley KE (2003). Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J Physiol (Lond)* 553, 589–599.

Juel C (1996). Lactate/proton co-transport in skeletal muscle: regulation and importance for pH homeostasis. *Acta Physiol Scand* 156, 369–374.

Juel C (1997). Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 77, 321–358.

Juel C (1998). Skeletal muscle Na⁺/H⁺ exchange in rats: pH dependency and the effect of training. *Acta Physiol Scand* 164, 135–140.

Juel C (2000). Expression of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform NHE1 in rat skeletal muscle and effect of training. *Acta Physiol Scand* 170, 59–63.

Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krstrup P, Mohr M & Bangsbo J (2004). Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E245–51.

Juel C, Kristiansen S, Pilegaard H, Wojtaszewski J & Richter EA (1994). Kinetics of lactate transport in sarcolemmal giant vesicles obtained from human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 76, 1031–1036.

Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN & Halestrap AP (2000). CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 19, 3896–3904.

Kitaoka Y, Takahashi Y, Machida M, Takeda K, Takemasa T & Hatta H (2014). Effect of AMPK activation on monocarboxylate transporter (MCT)1 and MCT4 in denervated muscle. *J Physiol Sci* 64, 59–64.

Kristensen JM, Kristensen M & Juel C (2004). Expression of Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter proteins (NBCs) in rat and human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 182, 69–76.

Lindinger MI, Franklin TW, Lands LC, Pedersen PK, Welsh DG & Heigenhauser GJ (1999). Role of skeletal muscle in plasma ion and acid-base regulation after NaHCO₃ and KHCO₃ loading in humans. *Am J Physiol* 276, R32–43.

Messonnier L, Kristensen M, Juel C & Denis C (2007). Importance of pH regulation and lactate/H⁺ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *J Appl Physiol*.

Mohr M, Krstrup P, Nielsen JJ, Nybo L, Rasmussen MK, Juel C & Bangsbo J (2007). Effect of two different intense training regimens on skeletal muscle ion transport proteins and fatigue development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1594–602.

Nikooie R, Rajabi H, Gharakhanlu R, Atabi F, Omidfar K, Aveseh M & Larijani B (2013). Exercise-induced changes of MCT1 in cardiac and skeletal muscles of diabetic rats induced by high-fat diet and STZ. *J Physiol Biochem* 69, 865–877.

Perez-Schindler J, Philp A & Baar K (2009). Sodium bicarbonate increases glucose uptake and mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes potentially via the transcriptional co-activator PGC-1 α . *Proc Physiol Soc* 14, PC44, King's College London.

Philp NJ, Ochrietor JD, Rudoy C, Muramatsu T & Linser PJ (2003). Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1305–1311.

Pilegaard H, Domino K, Noland T, Juel C, Hellsten Y, Halestrap AP & Bangsbo J (1999). Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 276, E255–61.

Pushkin A, Abuladze N, Gross E, Newman D, Tatishchev S, Lee I, Fedotoff O, Bondar G, Azimov R, Ngyuen M & Kurtz I (2004). Molecular mechanism of kNBC1-carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells. *J Physiol (Lond)* 559, 55–65.

Radak Z, Taylor AW, Ohno H & Goto S (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 7, 90–107.

Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H & Atalay M (2013). Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* 18, 1208–1246.

Robergs RA, Ghiasvand F & Parker D (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R502–516.

Rosdahl H, Lindberg T, Edin F & Nilsson J (2013). The Moxus Modular metabolic system evaluated with two sensors for ventilation against the Douglas bag method. *Eur J Appl Physiol* 113, 1353–1367.

Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann K-H, Marx M, Gschwend JE, Bucholz M, Gress TM, Seufferlein T, Adler G & Oswald F (2009). CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. *Gut* 58, 1391–1398.

Schueler C, Becker HM, McKenna R & Deitmer JW (2011). Transport activity of the sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is enhanced by different isoforms of carbonic anhydrase. *PLoS ONE* 6, e27167.

Stathopoulou K, Beis I & Gaitanaki C (2008). MAPK signaling pathways are needed for survival of H9c2 cardiac myoblasts under extracellular alkalosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H1319–H1329.

Stephens TJ, McKenna MJ, Canny BJ, Snow RJ & McConell GK (2002). Effect of sodium bicarbonate on muscle metabolism during intense endurance cycling. *Med Sci Sports Exerc* 34, 614–621.

Stridh MH, Alt MD, Wittmann S, Heidtmann H, Aggarwal M, Riederer B, Seidler U, Wennemuth G, McKenna R, Deitmer JW & Becker HM (2012). Lactate flux in astrocytes is enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J Physiol (Lond)* 590, 2333–2351.

Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T & Mercier J (2007). Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E916–22.

Thomas C, Bishop DJ, Lambert K, Mercier J & Brooks GA (2012). Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4 contents in human skeletal muscles: current status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302, R1–14.

Thomas C, Perrey S, Lambert K, Hugon G, Mornet D & Mercier J (2005). Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. *J Appl Physiol* 98, 804–809.

Tonouchi M, Hatta H & Bonen A (2002). Muscle contraction increases lactate transport while reducing sarcolemmal MCT4, but not MCT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E1062–9.

Vanhatalo A, McNaughton LR, Siegler J & Jones AM (2010). Effect of induced alkalosis on the power-duration relationship of “all-out” exercise. *Med Sci Sports Exerc* 42, 563–570.

Wilson MC, Meredith D, Fox JEM, Manoharan C, Davies AJ & Halestrap AP (2005). Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem* 280, 27213–27221.

Zabala M, Peinado AB, Calderón FJ, Sampedro J, Castillo MJ & Benito PJ (2011). Bicarbonate ingestion has no ergogenic effect on consecutive all out sprint tests in BMX elite cyclists. *Eur J Appl Physiol* 111, 3127–3134.

Figure 1: Protocol presentation of the 3 x 30-s all-out exercise interspaced with 20-m of recovery. Biopsies were taken at rest, immediately post-exercise, and 6 and 24 h post-exercise. Blood samples were taken at rest, and 3, 5 and 9 minutes after each sprint. Between the first biopsy and the first blood sample, all participants had a standardized breakfast and either PLA or BIC supplementation.

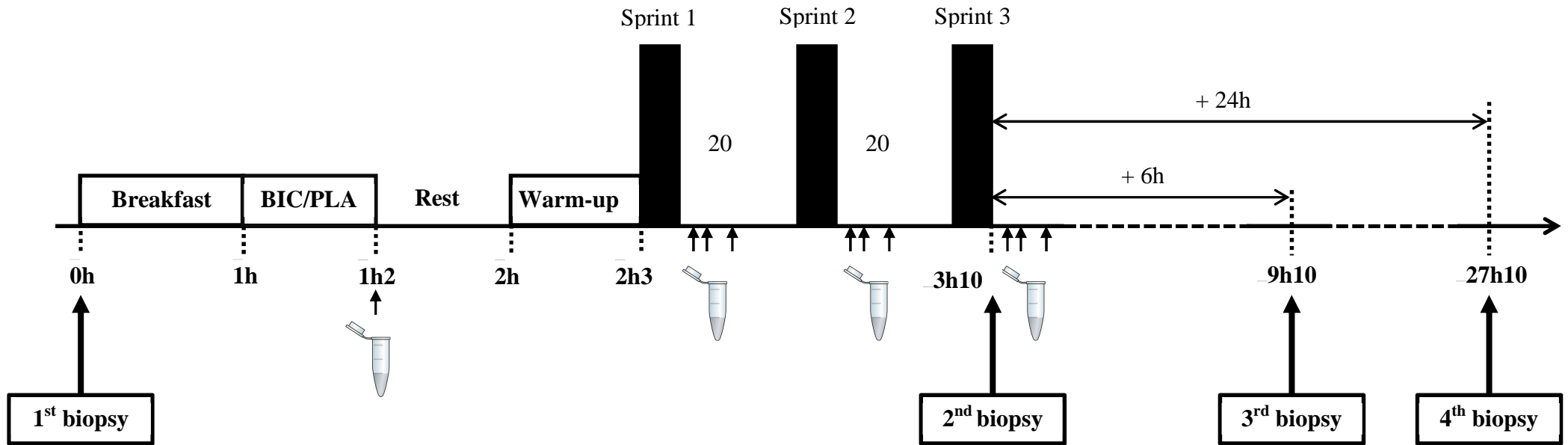


Figure 2: Blood pH (A) and $[\text{HCO}_3^-]$ (B) kinetic during the repeated sprints after either BIC (●) or PLA (○) supplementation. *, **, *** Denote significant differences from PLA ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively); # denotes sprint effect from post warm-up ($P < 0.001$). ($n=8$).

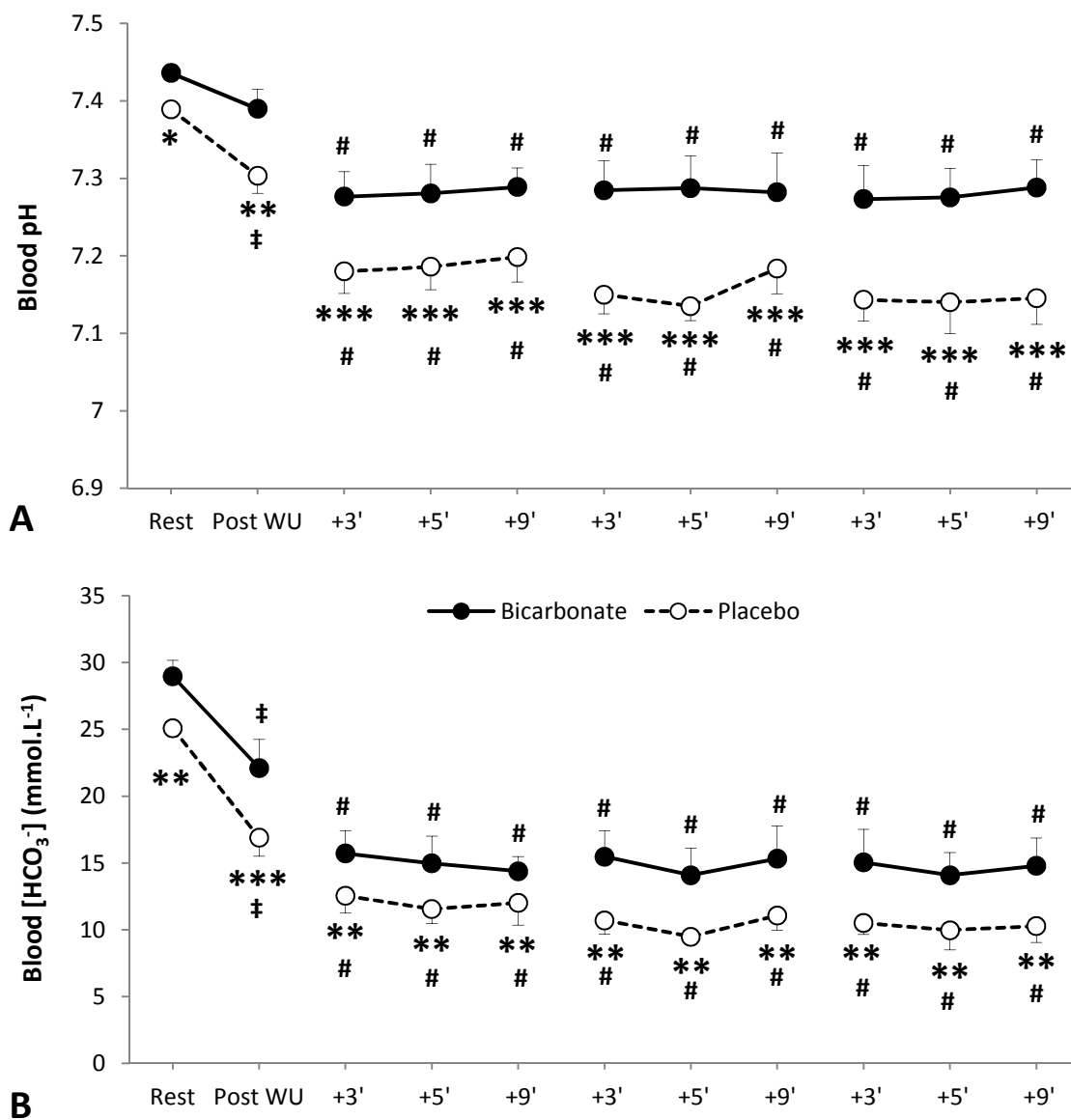


Figure 3: Blood [La⁻] kinetic during the repeated sprints after BIC (●) and PLA (○) supplementation. # denotes sprint effect from post warm-up ($P < 0.001$), ($n=8$).

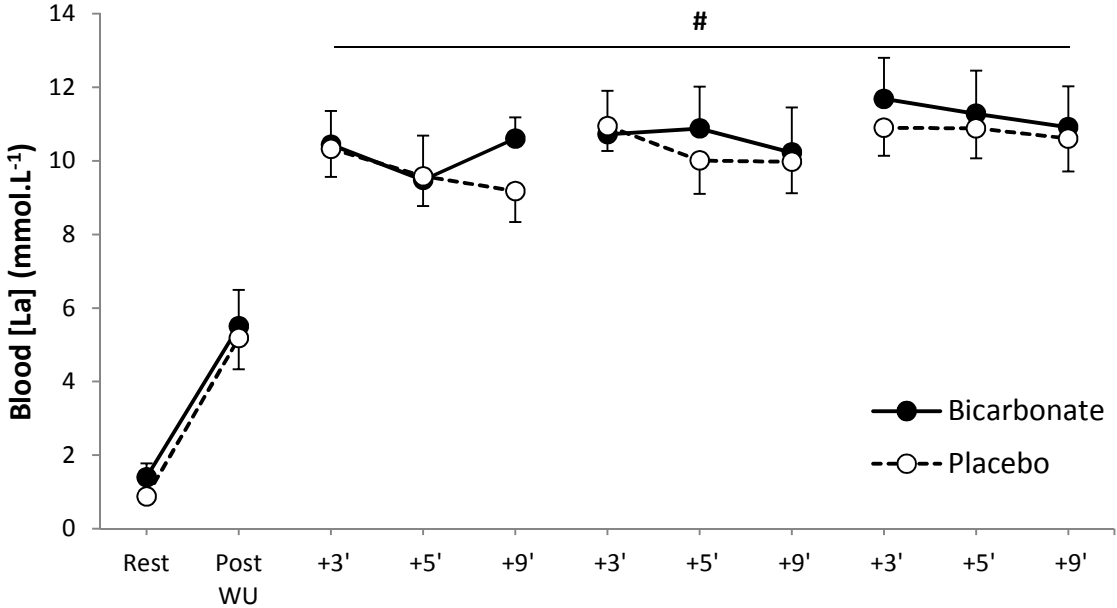


Figure 4: Muscle pH kinetic during the repeated sprints after BIC (●) and PLA (○) supplementation. # denotes sprint effect from pre-exercise ($P < 0.001$), ‡ denotes sprint effect from post-exercise ($P < 0.001$), ($n=7$).

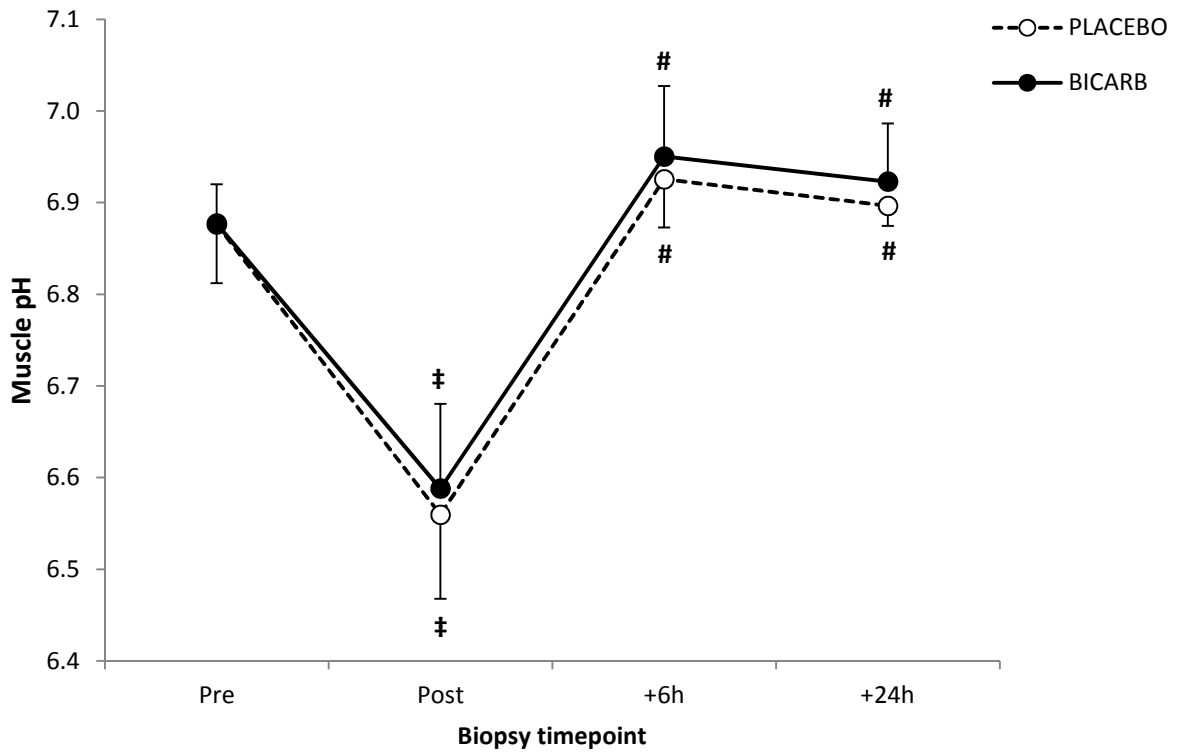


Figure 5: Comparison of protein relative abundance relative to an internal standard (in arbitrary units), between (●) and PLA (○) conditions. ******Denotes significant differences from PLA ($P < 0.01$), **#** denotes significant differences from rest ($P < 0.01$) ($n=8$).

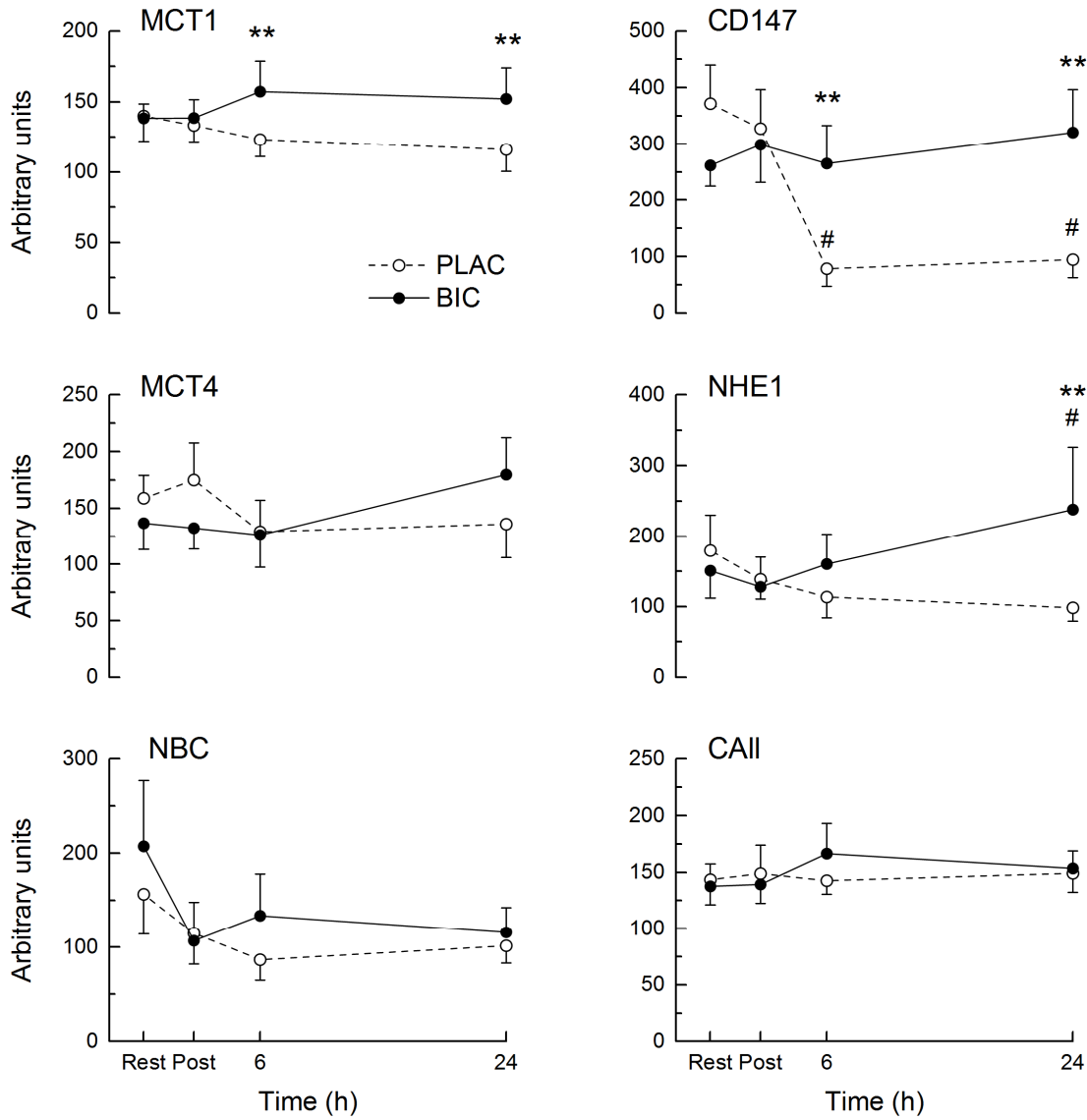


Figure 6: Comparison of protein carbonylation and lipid peroxidation evolution relative to an internal standard (in arbitrary units) between BIC (●) and PLA (○) conditions. ****Denotes significant differences from PLA ($P < 0.01$), # denotes significant differences from rest ($P < 0.01$) ($n=8$).**

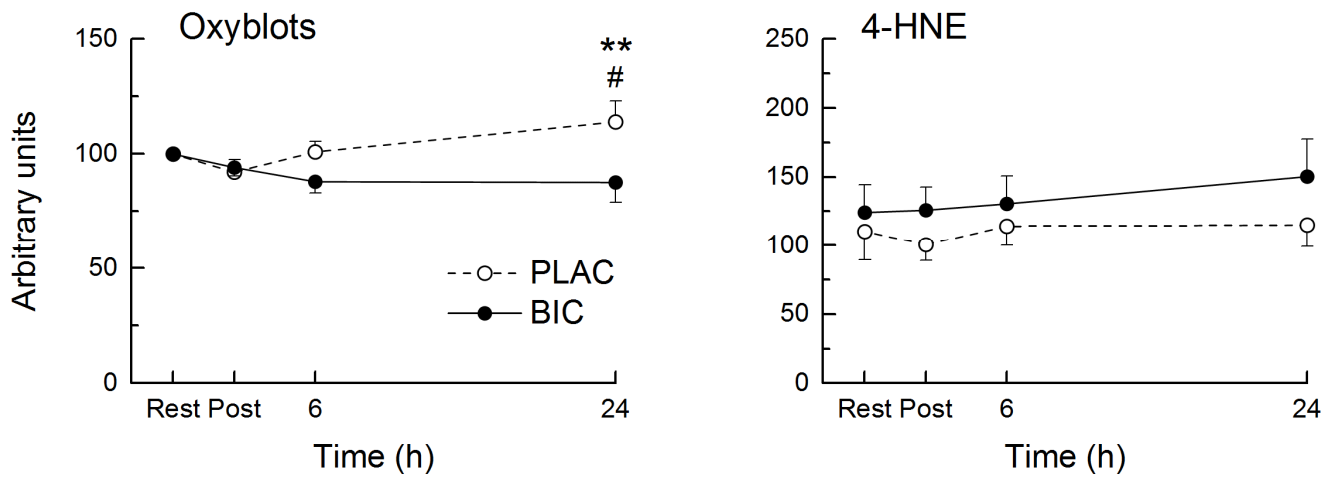


Table 1: Performance parameters for the 3x30-s Wingate Test. ($n=8$, $Mean \pm SE$)

	Wingate number	Maximal Power-Output (W)	Mean Power-Output (W)	Minimum Power-Output (W)	Fatigue Index (%)
BIC	1 st	876 ± 74.6	660 ± 56.9	395 ± 46.2	49.3 ± 2.2
	2 nd	767 ± 71.2	620 ± 58.4	404 ± 34.2	39.8 ± 3.9
	3 rd	856 ± 103.5	633 ± 58.7	344 ± 36.0	48.1 ± 4.8
	Mean ± SE	833 ± 29	637 ± 1.6	381 ± 10.6	45.7 ± 2.2
PLA	1 st	885 ± 113.4	664 ± 56.2	350 ± 19.7	50.1 ± 4.6
	2 nd	825 ± 83.9	645 ± 45.4	342 ± 33.8	46.8 ± 3.5
	3 rd	879 ± 104.9	657 ± 51.6	248 ± 45.0	55.5 ± 2.6
	Mean ± SE	863 ± 24.8	655 ± 8.8	313 ± 20.8	50.8 ± 1.6

Effets de l'acidose métabolique mis en exergue par une alcalose induite, sur la performance et les réponses physiologiques, cellulaires et moléculaires du muscle strié squelettique au cours d'exercices de haute-intensité.

Effects of metabolic acidosis highlighted by induced-alkalosis, on performance and physiological, cellular and molecular responses of the skeletal muscle during high-intensity exercises.

Résumé :

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général de la physiologie énergétique, et comprend trois études, qui vont de l'exploration globale de l'Homme en mouvement (tests de terrain chez des athlètes de l'Equipe de France de Cyclisme, explorations à l'effort en laboratoire chez des cyclistes entraînés) jusqu'à des études du métabolisme musculaire par des techniques d'investigations cellulaires et moléculaires chez des sujets actifs. Ce travail a porté sur l'exercice de haute intensité générant de hauts niveaux de fatigue musculaire et sur les réponses adaptatives qui en résultent au niveau cardio-respiratoire et musculaire. La prise de bicarbonate de sodium contre placebo a permis d'étudier précisément le rôle de l'accumulation de protons au cours de séances de sprints en cyclisme. Grâce à ces travaux, nous avons pu montrer que si une alcalose induite n'améliorait pas systématiquement les performances de sprint en cyclisme, une perturbation importante du pH conduisait à des modifications du transport de l'oxygène pendant l'exercice, du fonctionnement des mitochondries après 24h de récupération, mais également de l'expression de certaines protéines impliquées dans la régulation du pH, à savoir le cotransporteur lactate/proton (MCT1) et sa protéine chaperonne CD147, ainsi que l'échangeur sodium/proton (NHE1). Ces modifications étaient en lien avec une réduction du stress oxydatif par l'alcalose induite, suggérant un rôle délétère de la carbonylation des protéines sur l'expression de ces protéines. Ces résultats permettent d'avoir un nouveau regard sur le rôle de l'acidose dans les mécanismes de régulation au niveau physiologique, cellulaire et moléculaire chez l'Homme.

Mots clés: équilibre acido-basique, pH, lactate, bicarbonate de sodium, cyclisme, sprints, protéines de transport, stress oxydatif, respiration mitochondriale

Abstract:

This thesis falls within the general framework of the energetic physiology, and includes three studies, ranging from global exploration of the humans in motion (field tests with athletes of the French Cycling Team, laboratory exploration during exercise on trained cyclists) to studies of muscle metabolism by techniques of cellular and molecular investigations in active subjects. This work has focused on high-intensity exercise generating high levels of muscle fatigue and the resulting adaptive cardiorespiratory and muscular responses. Supplementation of sodium bicarbonate against placebo was used to study the precise role of the accumulation of protons during sprint cycling sessions. Through this work, we have shown that, if an induced alkalosis did not systematically improve sprint cycling performances, a significant disruption of the pH led to changes in oxygen transport during exercise, in mitochondrial function after 24h of recovery, but also in the expression of some proteins involved in pH regulation (i.e., lactate/proton co-transporter (MCT1) its chaperone protein CD147, and the sodium/proton exchanger (NHE1)). These changes were related to a reduction of the oxidative stress induced by alkalosis, suggesting a harmful role of the carbonylation in these protein expressions. These results provide a new perspective on the role played by acidosis in the regulatory mechanisms at physiological, cellular and molecular levels in humans.

Key words: acid-base balance, pH, lactate sodium bicarbonate, cycling, sprints, transport proteins, oxidative stress, mitochondrial respiration