

**GILLES BEAUDIN**

**L'ANHYDRASE CARBONIQUE III DU MUSCLE SQUELETTIQUE HUMAIN**

Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)

Division de kinésiologie  
Département de médecine sociale et préventive  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL

Janvier 1998

© Gilles Beaudin, 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-31676-9

**Canada**

## RÉSUMÉ

L'anhydrase carbonique III (AC III) est l'enzyme ayant la plus grande concentration au niveau du cytosol des cellules musculaires de type I. Nous nous sommes donc intéressés au rôle que pourrait jouer cette protéine dans l'obésité humaine et à la possibilité de modifier son contenu en réponse à une augmentation chronique de l'activité contractile musculaire. Nous avons remarqué que le contenu en AC III variait en fonction de la composition corporelle des individus, plus il était élevé et plus la masse de graisse s'avérait importante. D'autre part, un protocole de stimulation électrique de basse fréquence (8 Hz), appliqué 3 heures par jour pendant 6 semaines sur les muscles extenseurs du genou, n'avait pas d'effet sur le contenu en AC III. Toutefois, lorsque la durée de la stimulation fut augmentée à 8 heures par jour, le contenu en AC III fut significativement augmenté. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une augmentation majeure de l'activité contractile de muscle est nécessaire pour induire des changements dans le contenu en AC III. Compte tenu de la fonction potentielle de l'AC III dans le muscle squelettique et des données présentées ainsi que des questions soulevées dans ce mémoire, il est certain que d'autres efforts de recherche, incluant des avenues jusqu'à maintenant inexploitées, devront être consentis chez l'humain.

## AVANT-PROPOS

L'écriture de ce mémoire est l'aboutissement de deux années d'acquisition de connaissances à l'aide de cours, de lectures personnelles, de discussions et d'expérimentation. Tout ceci aurait été impossible sans le support de mon directeur, Jean-Aimé Simoneau. Il a su me guider tout au long de mon cheminement pour qu'il soit le plus enrichissant au point de vue intellectuel et personnel. Je me dois aussi de remercier Marcel Boulay pour son implication à titre de co-directeur et de m'avoir permis d'élargir mes connaissances sur les diverses modalités de l'entraînement physique. Je suis également reconnaissant envers Yves Gélinas et Guylaine Perrault pour avoir patiemment répondu à mes questions d'ordre technique. Un merci bien spécial à Mike Johnson, mon comparse et ami pendant ces deux années, avec qui les discussions furent très enrichissantes. Je ne peux passer sous silence l'apport de mes collègues et compagnons du Laboratoire des sciences de l'activité physique qui ont animé mon environnement de travail durant mon séjour. Et évidemment mes parents, sans qui cette aventure aurait été impossible. Ils m'ont entre autre appris à vivre au jour le jour et de ne pas avoir peur de foncer. Ils ont également toujours appuyer mes choix, aussi farfelus soient-ils.

À mes parents

## TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
RÉSUMÉ.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	v
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2: PROBLÉMATIQUE DES TRAVAUX.....	5
CHAPITRE 3: PREMIERE ÉTUDE.....	23
CHAPITRE 4: DEUXIEME ÉTUDE.....	50
CHAPITRE 5: CONCLUSIONS.....	69
CHAPITRE 6: RÉFÉRENCES DES CHAPITRES 1 ET 2.....	72

## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

L'organisme humain possède des caractéristiques métaboliques particulières qui lui permettent de réaliser des efforts physiques volontaires pouvant être très variés en intensité et en durée. Que ce soit de vouloir franchir en courant le plus rapidement possible une distance de 100 mètres ou de 42 kilomètres ou de presser sur les nombreuses touches d'un clavier afin de rédiger un texte portant sur un sujet particulier, ces tâches exigent une succession plus ou moins complexe de réactions métaboliques qui assurent aux muscles squelettiques de pouvoir produire l'effort demandé. La vitesse de ces réactions métaboliques est en bonne partie attribuable à la présence de nombreuses protéines spécialisées, appelées enzymes, qui ont pour tâche de faciliter la modification d'une molécule afin de la rendre éventuellement métabolisable par une autre réaction. De nombreux volumes ont été rédigés afin de faire état de ces nombreuses réactions enzymatiques et, grâce à l'avancement technologique qui a été réalisé au cours des dernières années au plan de la communication électronique, il est maintenant possible de retracer les détails d'une réaction enzymatique en consultant, par exemple, une adresse électronique telle que <http://expasy.hcuge.ch/sprot/enzyme.html>. S'intéresser à l'une d'entre elles en particulier dépend de sa fonction précise et surtout du rôle qu'elle peut



jouer lorsque son contenu varie ou est modifié dans un tissu particulier à la suite d'un traitement expérimental quelconque. Ce mémoire de maîtrise a été rédigé pour, premièrement, faire état des travaux qui ont été réalisés afin d'élucider la fonction physiologique la plus probable de l'anhydrase carbonique (AC), deuxièmement, de vérifier si le contenu plus ou moins grand de l'un des isoformes présent dans le muscle squelettique peut contribuer à expliquer les différences métaboliques que présentent les individus ayant des propensions différentes à stocker de la graisse dans leur corps et, troisièmement, de vérifier s'il est possible de moduler son contenu à l'aide d'un modèle expérimental reconnu comme pouvant modifier de façon substantielle les caractéristiques métaboliques et fonctionnelles du muscle squelettique chez l'humain.

Au cours des 30 dernières années, la structure et le fonctionnement des isoformes de l'AC ont été beaucoup étudiés. Malgré ces recherches, le rôle physiologique de ces isoformes demeure encore incertain. La majorité des travaux ayant porté sur le principal isoforme du muscle squelettique, i.e. l'AC III, a surtout été effectuée chez des petits mammifères tels que le rat et la souris alors que d'autres, moins nombreux chez l'humain, ont été réalisés afin d'étudier son contenu dans le muscle squelettique de sujets sains. La plupart des travaux réalisés chez l'humain avaient comme objectif de décrire la localisation précise de l'AC III dans les différentes fibres musculaires, et ce souvent à l'aide de techniques immunohistochimiques. Bien qu'une étude réalisée chez le rat se soit intéressée à la possibilité que le contenu en anhydrase carbonique dans divers tissus tels que le muscle, le tissu adipeux et le foie puisse être anormal chez des animaux obèses,

une recherche exhaustive de la littérature scientifique révèle qu'aucune étude ne s'est intéressé à cette problématique, du moins dans le muscle squelettique chez l'humain. Sur la base de cette recherche de la littérature scientifique, aucune étude ne semble avoir été réalisée afin de démontrer si le contenu de cette enzyme dans le muscle squelettique humain pouvait être altéré en réponse à une augmentation chronique de son activité contractile. Afin de combler ces lacunes, les objectifs du présent mémoire sont 1) de vérifier si le contenu en AC III du tissu musculaire chez l'humain est relié ou non à la composition corporelle des individus et 2) de mesurer les effets d'une augmentation chronique de l'activité contractile musculaire, comme celle qui peut être induite par plusieurs semaines de stimulation électrique transcutanée de basse fréquence, sur le contenu en AC III du muscle squelettique humain.

## **CHAPITRE 2**

### **PROBLÉMATIQUE DES TRAVAUX**

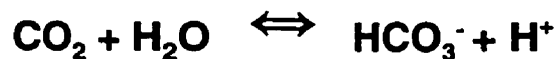
## PROBLÉMATIQUE DES TRAVAUX

### 1. Les anhydrases carboniques

#### 1.1 Les fonctions probables de l'anhydrase carbonique

La découverte de l'anhydrase carbonique (AC) a plus de 60 ans. La première forme fut détectée à l'intérieur des globules rouges et, depuis ce temps, de nombreuses études se sont penchées sur ce sujet. À ce jour, sept isoformes différents d'AC ont été identifiés et sont détectables tant au niveau d'organismes unicellulaires qu'au niveau des différents tissus de mammifères. Les formes les plus métaboliquement actives, comme l'AC II, sont considérées comme étant parmi les plus efficaces du domaine des enzymes et sont connues principalement pour leur capacité à catalyser la réaction réversible de l'hydratation du dioxyde de carbone et de la déshydratation du bicarbonate.

**CA**



Cette étape enzymatique contribue fort probablement à faciliter la diffusion du  $\text{CO}_2$  qui

est, sans contredit, l'un des éléments les plus importants dans l'étude du métabolisme énergétique de tous les organismes dépendant de l'utilisation de l'oxygène. Selon les isoformes, elles peuvent aussi posséder des activités phosphatase et/ou estérase. L'AC II, qui possède l'activité d'hydratation la plus élevée de tous les isoformes, se retrouve principalement dans les érythrocytes pour faciliter le transport du  $\text{CO}_2$  par le sang (sous la forme d'ions bicarbonates), des tissus au poumons. De 60 à 80% du  $\text{CO}_2$  produits par les tissus passent par ce processus (fig. 1). Pour que le  $\text{CO}_2$  soit expiré, l'ion  $\text{HCO}_3^-$  doit passer l'étape de déshydratation, cette dernière étant limitante quant au transport du  $\text{CO}_2$  au travers d'une membrane (Henry, 1996).

L'AC semble également servir dans la balance acido-basique des tissus. Le système  $\text{CO}_2$  -  $\text{HCO}_3^-$  est un tampon interstitiel très important (Geers et al., 1991) qui agit lors d'exercices physiques entraînant une augmentation importante d'acide lactique et une diminution du pH (Linderman et Fahey, 1991). L'AC liée à la membrane plasmique serait en jeu à ce moment là. On peut toutefois se questionner sur les bienfaits de l'hydratation du  $\text{CO}_2$  en  $\text{HCO}_3^-$  dans le milieu intracellulaire d'un tissu tel que le muscle squelettique puisque les ions bicarbonates passent difficilement au travers de sa membrane (Guyton, 1986). Au niveau des reins, l'AC participe à la réabsorption des ions bicarbonates (Carter et Jeffery 1985). L'activité de l'AC peut être remarquée à bien des niveaux et, tel que rapporté par Henry (1996), plusieurs évidences supportent le rôle de l'AC dans des processus allant de la respiration cellulaire au métabolisme énergétique intermédiaire.

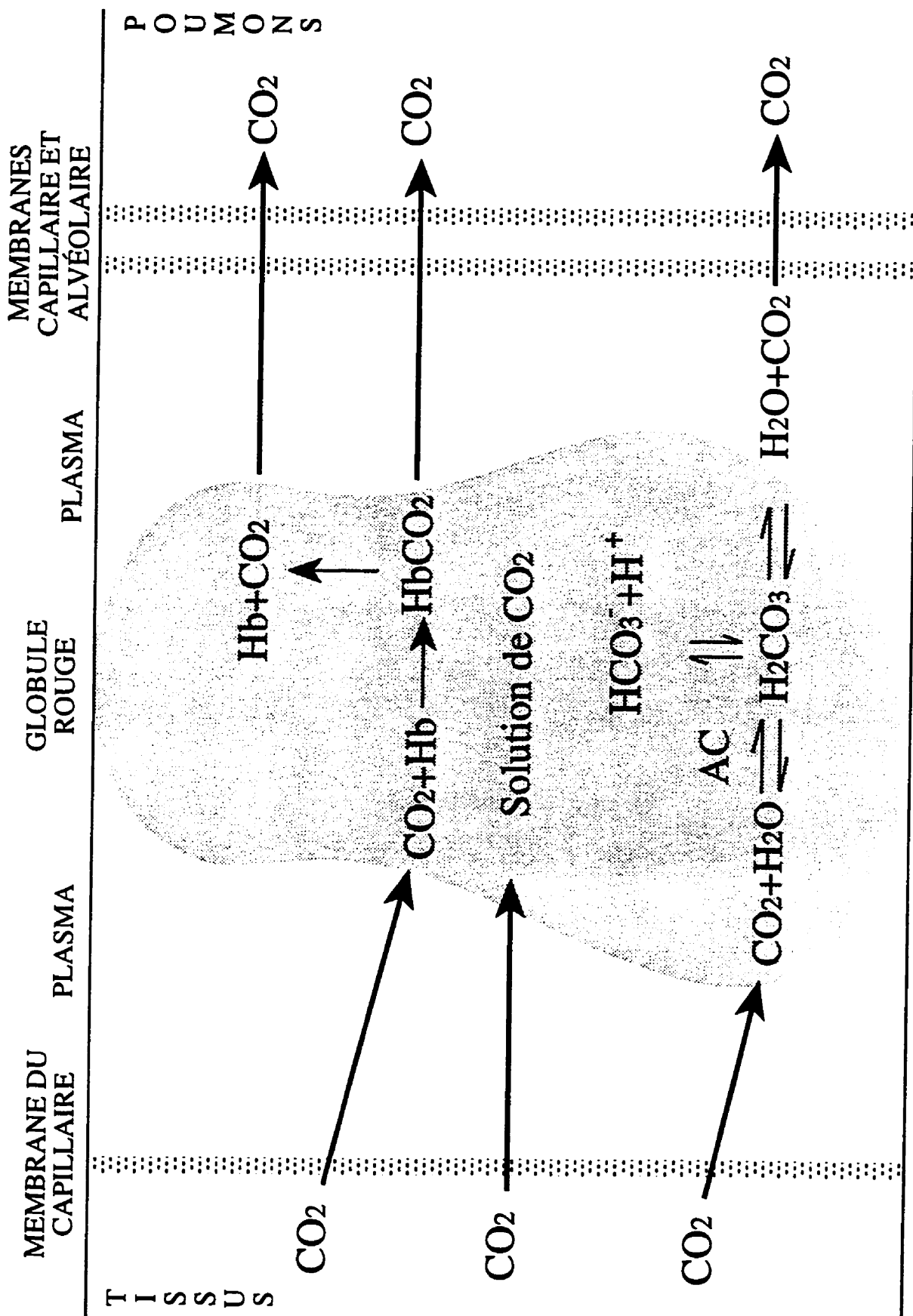


Figure 1. Transport du CO<sub>2</sub> des tissus aux poumons (adapté de McArdle et al 1987)

Des activités hydratase, estérase et phosphatase ont été attribuées à l'AC III, la dernière étant unique à cet isoforme. L'activité phosphatase est régulée par la glutathiolation, réaction chimique qui se produit en réponse à un stress oxydatif (Cabiscol et Levine, 1996). Ce troisième isoforme est connu pour avoir une activité hydratase plus basse que l'AC I, en fait elle ne représente que 1% de l'activité totale de cette dernière (Carter et Jeffery, 1985). D'autre part, l'activité estérase est très peu documentée et son rôle est inconnu. Chez l'humain, comme pour le rat, il n'y a pas de substrat à ce jour connu pour permettre aux fonctions estérase et phosphatase de se manifester, ce qui rend négligeable le rôle de ces fonctions chez ces espèces. Compte tenu de son rôle métabolique, certaines fonctions physiologiques ayant lieu lors des processus de la contraction musculaire peuvent être influencées par la concentration d'AC III. Certaines études se sont arrêtées aux conséquences physiologiques de l'inhibition de l'AC III musculaire. Elles ont entre autre rapporté une diminution dans la force de contraction (Frémont et al., 1991; Geers et al., 1988, 1990; Côté et al., 1993, 1997). Ces auteurs ont remarqué que lorsque l'AC III est inhibée, le temps nécessaire pour atteindre la force optimale, la force maximale ainsi que le temps de relaxation lors d'une secousse musculaire, sont altérés. La consommation d'oxygène normalement requise lors d'un tel test est également augmentée, suggérant ainsi qu'un des rôles de l'AC III est d'exercer un certain contrôle sur les processus métaboliques en réduisant la consommation d'oxygène intracellulaire (Geers et al., 1995). Ce processus permettrait au fibre pourvu d'AC III de fonctionner de façon plus économique. D'autre part, Côté et al. (1992; 1993; 1997) ont rapporté qu'au cours d'un protocole de stimulation électrique musculaire induisant une

baisse importante de force, une accumulation du contenu intracellulaire d'hexosemonophosphates et une plus grande utilisation de glycogène étaient présentes lorsque des muscles soléaires étaient exposés à de la methazolamide, un inhibiteur de l'activité de l'AC III. Ces résultats suggèrent que l'AC III influence les processus des métabolismes glycolytique et glycogénolytique du muscle. L'implication de l'AC III dans des processus du métabolisme énergétique, autre que l'hydratation du  $\text{CO}_2$ , est soupçonnée à cause de sa fonction potentielle de phosphatase (Frémont et al., 1987; Tashian, 1989; Geers et al., 1995) qui demeure, toutefois, à être expérimentalement démontrée. Il est également important de spécifier que le produit de l'hydratation du  $\text{CO}_2$ , i.e. l'ion bicarbonate, sert comme substrat à l'enzyme acétyl CoA carboxylase. Cette enzyme sert à fabriquer le malonyl CoA, une molécule reconnue comme ayant le potentiel d'influencer le métabolisme des lipides à cause de sa capacité à inactiver l'action de la carnitine palmitoyl transférase I, l'enzyme clé de l'entrée des acides gras liés à l'acétyl CoA dans la mitochondrie (McGarry, 1997).

Outre ses rôles métaboliques, l'AC III peut aussi servir de marqueur du dommage musculaire comme l'ont rapporté Osterman et al., (1985) dans le cas de certaines maladies, ainsi que Väänänen et al., (1986) et Takala et al., (1989) après des exercices intenses réalisés en endurance. Puisque la quantité d'AC III détectée au niveau du sérum indique le niveau de dommage et que cette enzyme se trouve principalement dans le cytoplasme des fibres musculaires de type I, sa présence sérique fût proposée comme pouvant être un indicateur du stress induit aux fibres à contraction lente par une activité



contractile intense.

## **1.2 Caractéristiques moléculaires des anhydrases carboniques**

Les AC ont des poids moléculaires variant entre 28 et 30 kD. Elles sont des métalloenzymes car elles possèdent un atome de zinc au sein de leur structure moléculaire. Au site actif, l'atome de zinc est lié à des acides aminés histidines localisés aux positions 94, 96 et 119 de la séquence protéique. Les gènes des isoformes I, II et III ont la même position chromosomique, soit le chromosome 8, tandis que les gènes de l'AC VI et VII sont sur les chromosomes 1 et 16, respectivement (Tashian, 1989). Entre l'isoforme la plus métaboliquement active (AC II) et la moins métaboliquement active (AC III), les séquences d'acides aminés sont identiques à 62% (Tu et al., 1994). Ces trois isoformes sont également similaires au niveau de leur forme tri-dimensionnelle.

Selon les recherches, les variations dans l'activité hydratase de ces trois isoformes sont dues à la présence d'acides aminés différents dans la région du site actif de l'enzyme. Tu et al., (1994) rapportent que l'AC III possède des acides aminés lysine, arginine et phénylalanine en position 64, 67 et 198, respectivement, alors que l'AC II possède les acides aminés histidine, asparagine et leucine à ces trois positions. La substitution d'un acide aminé lysine par une histidine en position 64 pourrait expliquer la faible activité hydratase de l'AC III puisqu'il a été rapporté que c'est l'acide aminé histidine qui est impliqué dans le transfert de proton (Carter et Jeffery, 1985). Cependant, le fait de changer un acide

aminé histidine pour un acide aminé lysine en position 64 de la structure de l'AC II n'apporte pas de réduction dans l'activité hydratase de cette isoforme (Tashian, 1989). Une étude de Ren et al., (1991) a démontré que le simple fait de changer un acide aminé phénylalanine pour un acide aminé leucine en position 198 avait pour effet de multiplier par 50 la capacité d'hydratation du CO<sub>2</sub> du troisième isoforme de l'AC. L'unique caractéristique de résistance aux sulfonamides de l'AC III peut aussi être associée aux acides aminés particulièrement localisés au site actif de l'enzyme.

### **1.3 La localisation des anhydrases carboniques**

Les molécules d'AC sont très répandues dans l'organisme. Il est possible de trouver, quoiqu' à des concentrations variables, un ou plusieurs isoformes d'AC dans les différents tissus de mammifères (Tableau 1). Les recherches ont démontré que l'AC I se trouve principalement dans les globules rouges du sang, l'épithélium gastro-intestinal et l'endothélium vasculaire alors que l'AC II est présente dans presque tous les tissus (Tashian, 1989). Certaines cellules, comme les érythrocytes, contiennent à la fois les isoformes I et II de l'AC. Parmi les hypothèses qui expliqueraient cette co-expression est le fait qu'une déficience dans l'expression de l'un de ces isoformes, qui se traduit par des conséquences physiologiques différentes, pourrait être compensée par la présence de l'autre isoforme (Tashian, 1989).

Tableau 1. Distribution des isoformes d'AC dans les tissus de mammifères.

#	Isoformes Localisation	Activité mol/sec.	Distribution
I	Cytosolique	Moyenne ( $1 \times 10^5$ )	Erythrocytes Épithélium gastrointestinal Endothélium vasculaire
II	Cytosolique	Elevée ( $1 \times 10^6$ )	Épithélium sécréteur Épithélium d'absorption Certaines cellules de tous les tissus
III	Cytosolique	Basse ( $1 \times 10^4$ )	Muscles squelettiques Hépatocytes (non-primates) Adipocytes
IV	Membranaire	Elevée	Poumons Reins
V	Mitochondriale	Basse	Reins Hépatocytes
VI	Sécrétée	Elevée et basse	Glandes salivaires
VII	Cytosolique	?	Glandes salivaires

Adapté de Tashian (1989)

La présence d'AC dans le muscle squelettique, différente des deux premières isoformes, fût établie au milieu des années 70 et dénommée AC III (Holmes, 1977). L'AC III se retrouve en assez grande quantité dans certains muscles et est localisée dans le cytoplasme de la cellule musculaire (Moyle et al., 1984; Carter et Jeffery, 1985) (Figure 2). L'ensemble des travaux réalisés chez l'animal et l'humain ont démontré que cette protéine est parmi les protéines cytosoliques les plus abondantes des fibres musculaires de type I (Väänänen et al., 1986). Frémont et al., (1988) ont rapporté, à partir d'images captées par microscopie électronique, que l'AC III ne montrait aucune association avec les organelles ou la structure de la cellule musculaire. Chez le rat, elle compte pour presque 4% du contenu protéique du muscle soléaire (Väänänen et al., 1986), un muscle majoritairement formé de fibres musculaires de type I (Rice et al., 1988). Au départ, les chercheurs croyaient que l'AC III était spécifique au muscle squelettique, mais cette croyance s'est avérée inexacte puisque cet isoforme fut détecté, quoiqu'en très faible quantité, dans d'autres tissus tels que les poumons, les muscles lisses et les cellules musculaires cardiaques (Jeffery et al., 1980). Cependant, tel que rapporté par Geers et al. (1992), le muscle cardiaque de lapin serait dépourvu d'activité AC cytosolique mais en posséderait une au niveau membranaire. Chez le rat, cet isoforme est non seulement présent dans le muscle mais également dans le foie et le tissu adipeux (Spicer et al., 1990). Lynch et al. (1993), ont suggéré que c'est dans les adipocytes d'un rat maigre qu'il est possible de trouver la concentration la plus élevée en AC III de tout le monde animal. Dans ce tissu et cette espèce, l'AC III compte pour 24% des protéines cytosoliques. Ces auteurs ont aussi rapporté que le contenu en AC III des hépatocytes du rat était nettement

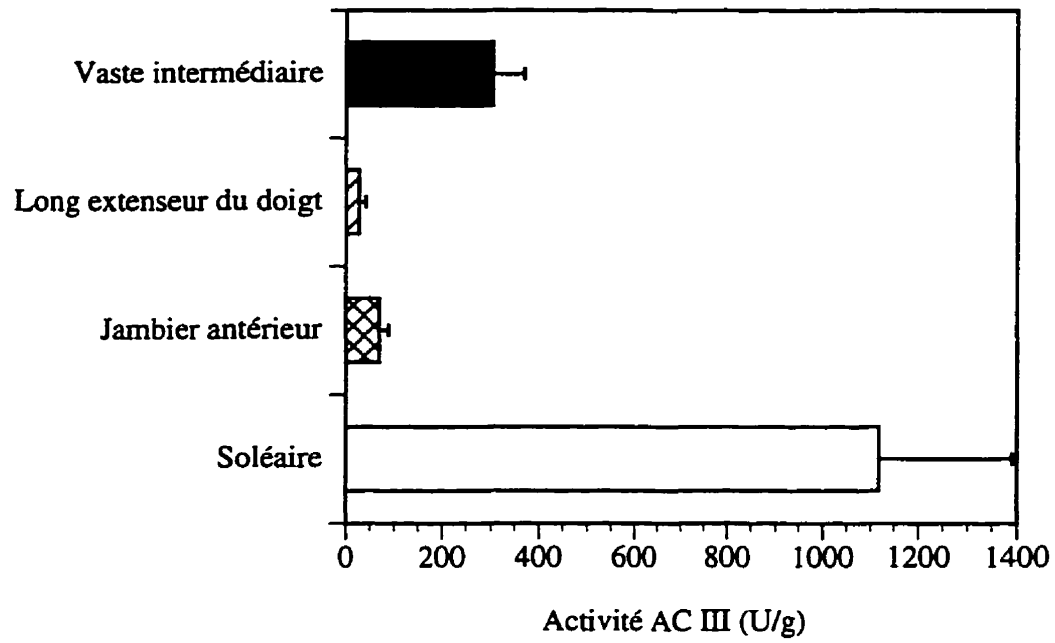


Figure 2. Activité de l'AC III au niveau de certains muscles de rat. Les valeurs sont exprimées selon moyenne  $\pm$  écart-type. (Adapté de Geers et al., 1992)

supérieur à celui des rattes; une observation qui a amené ces auteurs à proposer l'hypothèse que les hormones androgènes pouvaient avoir une action régulatrice de l'expression de cette protéine (Lynch et al., 1993).

Les hormones thyroïdiennes semblent aussi avoir une influence sur le contenu en AC III du tissu musculaire. Gagnon et al. (1985) ont en effet rapporté que la présence d'une molécule de 30 kD dans le muscle squelettique était influencée par des concentrations variables d'hormone thyroïdienne. Cette protéine fût identifiée comme étant AC III. Les résultats de Frémont et al. (1987) ont démontré que l'hyperthyroïdie avait pour effet de diminuer le contenu en AC III du muscle soleus alors que celui du muscle vaste externe du rat augmentait. Ceci est un autre exemple de l'effet des hormones sur le contenu musculaire en AC III. Ces auteurs ont de plus avancé l'idée que l'AC III serait associée à l'appareil contractile et non pas au potentiel oxydatif du muscle squelettique. Plus récemment, toutefois, Côté et al. (1997) ont rapporté que l'AC III pourrait être impliqué dans les processus de captation du glucose dans le muscle squelettique en réponse à des contractions musculaires vigoureuses.

Chez l'humain, le muscle squelettique est le tissu qui possède la plus grande concentration en AC III. Par contre l'AC III semble être distribuée plus spécifiquement dans les fibres musculaires de type I. Väänänen et ses collaborateurs ont démontré à la fois chez le rat (1982) et chez l'humain (1985), qu'il n'y avait pas d'activité d'AC III à l'extérieur de ce type de fibres musculaires. Ces chercheurs ont même proposé que l'identification

des fibres de type I et II d'une coupe d'un échantillon musculaire fixé dans de la paraffine pouvait être établie à partir d'une coloration immuno-histochimique révélant la présence de l'AC III. Jeffery et al. (1990) en sont venus à la même conclusion puisqu'ils ont révélé que le niveau de l'AC III était exprimé de façon proportionnelle avec le contenu en chaîne lourde de myosine lente de fibres musculaires. Ceci est contraire aux données de Frémont et al. (1989) puisque ceux-ci ont émis comme hypothèse que l'AC III pouvait également être présente dans les fibres de type II. Cette hypothèse est en accord avec les données publiées par Zheng et al. (1992) puisqu'en utilisant une technique d'immunofluorescence sensible, ils ont rapporté que la concentration relative d'AC III dans les fibres musculaires de type IIA et IIB étaient à 24% et 10% de celle présente dans les fibres musculaires de type I dans le muscle psoas humain. Bien que ces données suggèrent qu'un muscle ayant une prévalence de fibres musculaires de type I possède une plus grande quantité d'AC III, les données publiées par Jeffery et al. (1980) démontrent au contraire qu'il ne semble pas y avoir, du moins dans le muscle humain, de corrélation significative entre la proportion des fibres musculaires de type I et le niveau en AC III.

Pour ce qui est des autres isoformes, la présence d'une enzyme ayant les particularités biochimiques d'une AC IV fut détectée au niveau de la membrane des cellules de poumons et de reins ainsi que dans le sarcolemme et le réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires (Sender et al., 1994). Finalement, parmi les 7 isoformes actuellement découverts se trouve l'AC V, qui est connue comme étant l'isoforme mitochondriale, et les isoformes AC VI et AC VII qui sont, respectivement, les isoformes sécrétées et cytosoliques

des glandes salivaires.

## **2.0 Le métabolisme musculaire et l'obésité chez l'humain.**

L'obésité est un problème très répandu dans notre société contemporaine. Plusieurs éléments comme la génétique, les habitudes alimentaires, un déséquilibre hormonal et le manque d'activité physique peuvent entrer en jeu dans l'apparition de l'obésité. Une des détériorations métaboliques importantes résultant d'une accumulation excessive de graisse dans le corps d'un individu se manifeste non seulement au niveau du métabolisme du glucose mais également au niveau du métabolisme des lipides. De nombreux travaux se sont penchés sur cette problématique de recherche et une des terminologies employées pour décrire cet état métabolique est la résistance à l'insuline. Cet état se détecte assez facilement puisqu'à la suite d'une surcharge de glucose (soit induite par une ingestion alimentaire ou de façon expérimentale), l'individu doit sécréter une plus grande concentration d'insuline afin de métaboliser adéquatement le glucose. Compte tenu du fait que le muscle représente une masse importante du corps et que celui-ci est le site majeur de l'action de l'insuline, de par sa sensibilité, plusieurs caractéristiques typiques de ce tissu furent, et sont encore, étudiées afin d'élucider quels pourraient être les mécanismes à l'origine de cette perturbation métabolique.

Simoneau et Bouchard (1995) ont rapporté que la proportion des différents types de fibres musculaires n'était pas un facteur déterminant pouvant expliquer la variation inter-



individuelle au niveau de l'adiposité. Par contre, parmi les facteurs les plus probables est un déséquilibre entre les capacités métaboliques glycolytique et oxydative du muscle, tel que reflété par un rapport élevé entre l'activité de la phosphofructokinase et l'activité de la citrate synthase (Simoneau et al., 1995; 1997). D'autres résultats ont également révélé qu'en plus du dérangement au niveau de ces sentiers métaboliques présents chez les individus obèses et résistants à l'insuline, le profil métabolique lipidique est dans un état tel que le catabolisme des acides gras n'est également pas favorable au plan du muscle squelettique (Colberg et al., 1995). Cette observation fut confirmée encore tout récemment en évaluant le quotient respiratoire (QR) des muscles de la jambe lors de conditions basales et stimulées chez des sujets présentant des degrés divers d'obésité (Kelley et al., 1997). Ces résultats révélèrent que le QR basal du muscle, mesuré à jeûn, était supérieur chez les sujets obèses comparativement aux individus de poids normal. Sur le plan physiologique, le quotient respiratoire (QR) est un indicateur de l'utilisation préférentielle des substrats énergétiques puisqu'il est le reflet des échanges gazeux entre le  $\text{CO}_2$  produit et l' $\text{O}_2$  utilisé par l'organisme. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Zurlo et al. (1990) puisque ces auteurs observèrent qu'un QR élevé prédisposait les individus à avoir un gain de poids avec le temps. Plutôt que d'être oxydées, les graisses prises dans l'alimentation s'achemineraient donc vers d'autres tissus, plus particulièrement, les adipocytes afin d'être emmagasinées de façon excessive.

### **3.0 Effets de la stimulation électrique sur le muscle squelettique.**

Les effets de la stimulation électrique de basse fréquence (SEBF) sur le muscle squelettique sont largement documentés chez les petits mammifères mais un peu moins chez l'humain. Cette procédure expérimentale est connue pour induire des changements significatifs dans de nombreuses propriétés, qu'elles soient métaboliques, fonctionnelles ou moléculaires, au niveau des muscles stimulés (Pette et Vrbová, 1992; Pette et Staron, 1997). La stimulation électrique permet de stimuler de façon égale toutes les unités motrices, et ce sans l'intervention du système nerveux central. Au contraire, lors de contractions volontaires normales, il est impossible d'activer toutes les unités motrices en même temps puisqu'elles sont recrutées de façon hiérarchique.

Les effets aigus de la stimulation électrique neuromusculaire ont été étudiés à l'aide de protocoles expérimentaux variés et l'un de ceux-ci consiste à vérifier les changements métaboliques intracellulaires (par exemple en quantifiant la présence du glycogène) qui surviennent à la suite d'un tel protocole. Des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que la stimulation électrique neuromusculaire de haute (Johnson et al., 1995) et de basse fréquence (Dufour et al., 1994; Néron et al., 1997) diminuent significativement le contenu en glycogène des trois principaux types de fibres musculaires (I, IIA et IIB). Ces données suggèrent ainsi qu'il n'y a pas de recrutement préférentiel des fibres musculaires lors d'un tel protocole chez l'humain et que les trois types sont recrutés de façon équitable.

Des recherches également effectuées dans notre laboratoire (Gauthier et al., 1992; Thériault et al., 1994; Thériault et al., 1997) ont démontré, à la suite de plusieurs semaines de stimulation électrique transcutanée au niveau des muscles extenseurs du genou de sujets sédentaires, une augmentation significative de l'activité de certains marqueurs enzymatiques du potentiel oxydatif, une diminution quoique faible de l'activité de certains marqueurs du potentiel glycolytique et des changements dans la proportion des différents types de fibres du muscle, particulièrement au sein des fibres de type II. De plus, Thériault et al. (1994) ont rapporté une amélioration de la résistance à la fatigue des muscles stimulés à la suite d'efforts physiques répétés, une observation fréquente lorsqu'un muscle est stimulé de façon chronique et à l'aide d'une basse fréquence (Pette et Vrbová, 1992).

Bien que de nombreux facteurs contribuent au phénomène de la résistance à la fatigue d'un muscle squelettique (Green, 1990; Westerblad, 1991), des études assez récentes ont rapporté qu'une inhibition de l'activité de l'anhydrase carbonique III dans le muscle avait également comme conséquence d'améliorer la résistance à la fatigue d'un muscle tel que le soléaire chez le rat (Côté et al., 1993, 1997; Frémont et al., 1991). Certaines études réalisées chez l'animal ont tenté de démontrer l'effet de la stimulation électrique de basse fréquence sur le contenu en AC III du muscle (Jeffery et al., 1990). Les résultats révélèrent que même si le potentiel oxydatif du muscle avait, comme prévu, été substantiellement augmenté à la suite de plusieurs semaines de stimulation électrique, le contenu en AC III demeura inchangé. Puisque chez le rat, le contenu de cette enzyme est principalement retrouvé au sein des fibres musculaires de type I et que la proportion de ce

type de fibres ne change pas chez cette espèce après un tel stimulus, les auteurs suggérèrent que l'absence de changement dans le contenu en AC III était attribuable à l'absence de changement dans la proportion des fibres de type I (Jeffery et al., 1990). Des résultats contraires à cette observation ont été rapportés chez le lapin puisque les muscles rapides de cette espèce ont démontré une augmentation à la fois dans le contenu d'AC III et dans la proportion des fibres de type I suite à un protocole de stimulation électrique chronique (Brownson et al., 1988). Chez l'humain, Kim et al (1995) ont rapporté qu'à la suite d'une brève période (4 semaines) de stimulation électrique transcutanée de haute fréquence (50 Hz), à raison d'une heure à chaque séance, aucun changement ne fut observé au plan du contenu de cette enzyme ainsi qu'au plan de la proportion des différents types de fibres musculaires. Cependant, il est important de souligner qu'à la suite du protocole expérimental utilisé par ces auteurs, l'augmentation de l'activité contractile imposée au muscle était loin d'être comparable aux études réalisées chez le petit mammifères et même l'activité de certains marqueurs métaboliques importants, tel que la citrate synthase, demeura inchangée. Ainsi, il est encore à ce jour impossible de dire, en utilisant des conditions expérimentales qui imitent davantage celles d'un protocole d'entraînement physique en endurance, si le contenu en anhydrase carbonique III du muscle squelettique chez l'humain peut être altéré.

## **CHAPITRE 3**

### **PREMIÈRE ÉTUDE**

## Carbonic anhydrase III in skeletal muscle of human obese subjects

Gilles Beaudin<sup>1</sup>, Claude H. Côté<sup>2</sup>, David E. Kelley<sup>3</sup>, Jean-Aimé Simoneau<sup>1</sup>

Division of Kinesiology, Department of Social and Preventive Medicine<sup>1</sup> and Lipid Research Center, Laval University Hospital Research Center<sup>2</sup>, Laval University, Ste-Foy, Québec, Canada, and Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine<sup>3</sup>, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania.

Running head: Skeletal muscle carbonic anhydrase and obesity

Address Correspondence and reprint request to: Jean-Aimé Simoneau, Ph. D. Associate Professor of Medicine; Division of Kinesiology, Department of Social and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Ste-Foy, Québec, G1K 7P4, Canada (418-656-2392 phone; 418-656-2441 fax; Jean-Aime.Simoneau@kin.msp.ulaval.ca; email).

**ABSTRACT**

Because carbonic anhydrase (CA) is a central enzyme to both transport and metabolic processes at the cellular level, the purpose of the current study was to test the hypothesis that the content of this enzyme within skeletal muscle is altered in human obesity. A total of 52 lean and obese nondiabetic subjects, from 18 to 40 years of age, participated to this study. The percentage of total body fat was obtained from measurements of whole body fat mass and fat-free mass, assessed either by dual energy X-ray absorptiometry or hydrostatic weighing. To obtain skeletal muscle for measurements of CA III content and activities of phosphofructokinase (PFK) and citrate synthase (CS) enzymes, a percutaneous muscle needle biopsy of the vastus lateralis was performed. For determination of CA III, 0.25  $\mu$ g of total proteins were spotted on a PVDF membrane and immunodecorated with an affinity purified polyclonal antibody directed against CA III. PFK and CS enzyme activities were spectrophotometrically assayed. The activity level of PFK was not significantly different between individuals having a normal ( $20.3\pm 4.8\%$ ) or a high ( $38.2\pm 5.8\%$ ) percentage of total body fat while the activity level of CS was significantly less in the obese compared to the lean group ( $9.1\pm 2.0$  U/g vs  $10.7\pm 1.9$  U/g;  $p<0.01$ ). Contrary to the activity level of CS, CA III content was significantly higher in the obese compared to the lean group ( $980\pm 286$  AU/g vs  $729\pm 253$  AU/g;  $p<0.01$ ). There was also a significant and positive correlation between obesity (% body fat) and CA III content within skeletal muscle ( $r=0.42$ ,  $p<0.005$ ). In conclusion, the present study demonstrates that there is an obesity-related upregulation of skeletal muscle CA III content in humans. Considering the potential

role of CA III, these results suggest that an increased content of muscle CA III is a metabolic perturbation that may contribute to the postabsorptive decreased uptake of FFA across the leg as well as to the increased amount of fat within skeletal muscle found in insulin resistant obese individuals.

**Key Words:** human skeletal muscle, obesity, carbonic anhydrase, enzymes, metabolic capacity.



## INTRODUCTION

Recent studies from our laboratories have demonstrated that during fasting conditions obese subjects had increased fasting leg respiratory quotient (RQ) compared to lean individuals (12). Considering that RQ is the determination of the ratio of CO<sub>2</sub> produced to O<sub>2</sub> consumed, these results suggest that under postabsorptive and basal conditions, muscle tissue of obese individuals are exposed to an excess of CO<sub>2</sub> production compared to lean subjects. In a metabolically active tissue such as muscle, carbonic anhydrase (CA) in the cytoplasm has been traditionally considered to be important in facilitating CO<sub>2</sub> transport out of the cell but evidence that it can function as a true metabolic enzyme in biosynthetic pathways exists (9). Indeed, another putative role of CA is that it may play a role in metabolic processes requiring carbon fixations since the hydrated form of CO<sub>2</sub>, bicarbonate, is a necessary substrate in carbon fixing reactions, such as those catalyzed by pyruvate carboxylase and acetyl-CoA carboxylase (23). In rats, CA III has been shown to influence carbohydrate metabolism of the type I soleus muscle under both basal and contracting conditions (2, 3).

It has previously been reported that both the concentration and activity of CA III were lower in two lipogenic tissues, such as liver and white fat, of obese rats compared to lean rats (17). These authors concluded that the obesity-related decrease in CA III activity was found in a tissue-specific fashion, since, contrary to liver and white fat, the activity of that enzyme appeared to be almost doubled in soleus muscle of obese rats compared to that

of lean rats. Because CA is a central enzyme to both transport and metabolic processes at the cellular level, the purpose of the current study is to test the hypothesis that the content of CA III in skeletal muscle is altered in human obesity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Subjects.* A total of 62 lean (15 women and 21 men) and obese (12 women and 14 men) nondiabetic subjects, from 20 to 46 years of age, participated to this study. Subjects were recruited by advertisement and potential volunteers had a medical examination prior to participation. Those with medical illness were excluded. The percentage of total body fat was obtained from measurements of whole body fat mass (FM) and fat-free mass (FFM), assessed either by dual energy X-ray absorptiometry (5) or hydrostatic weighing (31). An additional inclusion criteria was that volunteers were sedentary, which was determined by interview at the time of screening. The protocol was approved by the Medical Ethics Committee of Laval University and the University of Pittsburgh Institutional Review Board, and subjects gave written informed consent prior to their participation.

*CA III content and enzyme activity measurements in skeletal muscle.* To obtain skeletal muscle for measurements of carbonic anhydrase (CA III; E.C. 4.2.1.1) content and activities of phosphofructokinase (PFK; E.C. 2.7.1.11) and citrate synthase (CS; E.C. 4.1.3.7) enzymes, a percutaneous muscle needle biopsy of the vastus lateralis was performed as previously described (26). Muscle samples (about 10 mg), frozen in liquid nitrogen at the time of the biopsy, were homogenized in a glass-glass Duall homogenizer with 40 vol. of ice-cold extracting medium (0.1 M Na-K-Phosphate, 2 mM EDTA, pH=7.2). The homogenate was sonicated 6 times for 5 sec at 20 watts, with pauses of 85 sec between pulses, and used for determination of CAIII content and PFK and CS activity levels ( $V_{max}$ ).

For determination of CAIII (done in triplicate for each subject), 0.25  $\mu$ g of total proteins (Bio-Rad protein assay) were spotted on a polyvinylidene fluoride membrane with the use of a Bio-Rad dot blot apparatus (Mississauga, ON, Can) and immunodecorated with an affinity purified polyclonal antibody (dilution of 1:50,000) directed against CAIII. The antibody-antigen complex was visualized with the use of an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (dilution of 1:10,000) according to the manufacturer specifications (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). The reaction product of dot blots (as exemplified in Fig. 1) was scanned (Scan Jet 4C, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) and each spot was analyzed twice with the use of the NIH Image analysis software. Standard amounts of human latissimus dorsi muscle served as internal control on each blot. CAIII content was expressed as arbitrary units per g of wet weight tissue (AU/mg). PFK and CS enzyme activities were assayed spectrophotometrically according to methods previously used (28) and expressed in Units of micromoles of substrate per minute, per gram of wet weight tissue (U/g).

Insert Figure 1 about here

*Statistics.* Unpaired Student t-tests were used to verify if anthropometric and muscle metabolic characteristics were different between obese and lean subjects. Pearson correlation coefficients were calculated to determine to which extent obesity and CA III content within skeletal muscle were related. All statistics were performed using the SigmaStat statistical software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

## RESULTS

### *Range of skeletal muscle glycolytic and aerobic-oxidative capacities, and CA III content.*

Among all subjects, and as expected, there was a 2.5- to 3.5-fold difference between the lowest and highest values of skeletal muscle CS (from 5.9 to 14.2 U/g ww) or PFK (from 25 to 94 U/g ww) enzyme activities whereas as much as an 8-fold difference was observed between the lowest and highest values of skeletal muscle CA III content (from 196 to 1696 AU/mg). The activity level of PFK was not significantly different between individuals having a low ( $20.3 \pm 4.8\%$ ) or a high ( $38.2 \pm 5.8\%$ ) percentage of total body fat while the activity level of CS was significantly less in the obese compared to the lean group ( $9.1 \pm 2.0$  U/g ww vs  $10.7 \pm 1.9$  U/g ww;  $p < 0.01$ ) (Fig. 2). Contrary to the activity level of CS, CA III content was significantly higher in the obese compared to the lean group ( $980 \pm 286$  AU/mg vs  $729 \pm 253$  AU/mg;  $p < 0.01$ ) (Fig. 2). Because of these differences, there was an increase in the CA III/CS ratio in the obese compared to the lean subjects. This ratio revealed that the relative expression of CA III compared to CS, a strong marker of the mitochondrial content of skeletal muscle, was about 1.5-fold higher in obese than in lean individuals (not shown).

Insert Figure 2 about here

*Relation of skeletal muscle CA III and obesity.* There was a significant and positive correlation between obesity (% body fat) and CA III content within skeletal muscle (Fig. 3;  $r=0.42$ ,  $p<0.005$ ).

Insert Figure 3 about here

## DISCUSSION

A biochemical characteristic of muscle in obesity is insulin resistance in pathways of glucose metabolism. However, according to recent findings, part of the expression of insulin resistance in obesity can also be linked to an impaired capacity for utilization of plasma FFA (12). This defect in fatty acid utilization seems to be related to a reduced activity of regulatory enzymes of skeletal muscle lipid metabolism (1) and to an imbalance between the glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle (29). These alterations appear to favor fat accumulation in muscle, a phenotype that has been recently described as being another important determinant of insulin sensitivity in humans (5). The present study represents another effort aimed at determining more precisely which skeletal muscle metabolic perturbations can explain why some individuals have a greater propensity than others to store fat rather than to oxidize it since this tissue appears to have a primary role in the genesis of obesity (30). Confirming previous findings (13, 16, 27, 28), the activity level of PFK within skeletal muscle was not different while the activity level of CS was significantly less in the obese individuals compared to the lean group.

Although its function is not well understood, the interest to look at the content of CA III in skeletal muscle is twofold since that enzyme may be important in facilitating  $\text{CO}_2$  transport out of the cell (7), and because the hydrated form of  $\text{CO}_2$ , bicarbonate, is a necessary substrate in carbon fixing reactions, such as that catalyzed by acetyl-CoA carboxylase. The results of the present study demonstrate that CA III content in skeletal

muscle of obese individuals is upregulated compared to normal weight individuals and is positively correlated with adiposity. These results are consistent with those of a previous study that has reported that CAIII activity was about twice higher (although it did not reach significance from analyses performed in 4 different animals) in the soleus muscle of obese Zucker rat compared to their lean counterpart (17).

The upregulation of CA III content in skeletal muscle of obese individuals may be required to favorably clear the relative excess of  $\text{CO}_2$  produced within muscle cells, an excess caused by the particular and selective oxidation of substrates they possess under resting and basal conditions. As schematically shown in Figure 4, another possible consequence of this upregulation of CA III is its potential influence on the processes of lipid utilization or storage within skeletal muscle. Malonyl-CoA, the first committed intermediate produced during fatty acid synthesis, is recognized to act as a regulator of fatty acid oxidation in lipogenic tissues (19). Although skeletal muscle is not normally considered to be a lipogenic tissue, measurable amounts of malonyl-CoA have been detected in skeletal muscle of different species, including human subjects (22). Malonyl-CoA is formed in the cytosol by an enzymatic reaction involving bicarbonate, i.e. the hydrated form of  $\text{CO}_2$ , and acetyl CoA as substrates, and the enzyme acetyl CoA carboxylase. It is also a potent inhibitor of carnitine palmitoyl transferase I, the key regulatory enzyme responsible for the transfer of fatty acyl-CoA to the mitochondria for beta-oxidation (18). According to this hypothesis, high malonyl-CoA concentrations inhibit the uptake of fatty acids in the mitochondria, limiting the substrate availability for beta-oxidation. Therefore, in the



proposed scheme, CA III in muscle would favor storage of triglycerides which are precious substrates during sustained and prolonged exercise in healthy subjects. Interestingly, type I fibers, which have the highest CA III content compared to the other fiber types, also have triglyceride content about 2-fold higher than type II fibers in humans (25) which supports the previous suggestion. As a very large proportion of fat oxidized during exercise comes from the intracellular pool, such high levels of triglycerides can partially explain why type I fibers are so remarkable at sparing their glycogen store in healthy and more particularly in endurance trained subjects (6).

Among the effects that malonyl-CoA can have on FFA utilization by muscle is a potential diversion of FFA toward increased synthesis of triglyceride, either for fat storage in other tissues, where other isoforms of carbonic anhydrase can also play a role (8), or within the skeletal muscle tissue itself. Using a mouse model of obesity, Saha et al. (24) demonstrated that the concentrations of malonyl-CoA and triglycerides were increased in muscle of the insulin resistant KKA<sup>y</sup> mice compared to lean C57 BL control mice. Interestingly, it was recently reported that insulin resistant women with increased visceral fat content were found to have decreased uptake of FFA across the leg during postabsorptive conditions as well as low level of skeletal muscle carnitine palmitoyl transferase enzyme activity (1) and an increased amount of low density muscle tissue on computed tomography (presumably fat) within skeletal muscle (28).

Whether the upregulation of CA III content in skeletal muscle of obese individuals is an

inherited characteristic or has been acquired over time is actually unknown. Among the factors that can be at the origin of an increased expression of CA III is the relative proportion of type I fibers within skeletal muscle. CA III is highly concentrated in type I muscle fibers of human subjects (33). By using a more sensitive technique, Zheng et al. (34) have shown that the relative concentrations of CA III in type IIA and IIB fibers of human psoas muscle to be, respectively, 24% and 10% of that of type I fibers. Accordingly, a muscle possessing a high proportion of type I fibers may also have a high concentration of CA III. Although this seems to be a consistent finding in skeletal muscle of rat (e.g. CA III content in soleus muscle is 4- to 8-fold higher than in vastus lateralis muscle (4)), it does not seem to be case for all species, particularly for horses and humans (11, 20). Notwithstanding the potential striking differences in CA III content that may exist between muscle fiber types, it has been reported that the relative proportion of type I fibers are slightly lower (10, 13, 15) or similar (14, 27) in obese compared to lean human subjects. It is therefore most likely that fiber type proportion is not contributing to the observed difference in CA III. Based on studies that have looked at the regulation of adipose and hepatic CA III in obesity (17, 32), it cannot be excluded that the expression of CA III may be hormonally mediated (e.g. by insulin). However, contrary to the major reduction seen in a lipogenic tissue such as the liver in response to streptozotocin-induced diabetes (21), it was reported that such a treatment had no effect on the concentration of CA III in rat skeletal muscle. Further investigations are clearly needed to better understand what is originally the causes of the upregulation in the content of skeletal muscle CA III in obesity.

In conclusion, the present study has demonstrated that there is an obesity-related upregulation of skeletal muscle CA III content in humans. Considering that the hydrated form of CO<sub>2</sub>, bicarbonate, is a necessary substrate in carbon fixing reactions, such as that catalyzed by acetyl-CoA carboxylase, and that the product of this enzymatic reaction is malonyl-CoA, a potent inhibitor of carnitine palmitoyl transferase I, it is tempting to suggest that an increased content of CA III within skeletal muscle is a metabolic perturbation that may contribute to the decreased uptake of FFA across the leg observed during postabsorptive conditions as well as to the increased amount of fat within skeletal muscle that are found in insulin resistant obese individuals.

## Acknowledgments

This research was supported by National Institutes of Health grant DK49200 and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors would also like to thank Yves Gélinas for his technical assistance.

## REFERENCES

1. **Colberg, S. R., J.-A. Simoneau, F. L. Thaete, and D. E. Kelley.** Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J. Clin. Invest.* 95: 1846-1853, 1995.
2. **Côté, C., H. Riverin, B. J. Barras, R. R. Tremblay, P. Frémont, and J. Frenette.** Evidence that carbonic anhydrase can influence the fatiguability of type I muscle through an effect on substrate utilization. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 277-283, 1993.
3. **Côté, C. H., G. Perreault, and J. Frenette.** Carbohydrate utilization in rat soleus muscle is influenced by carbonic anhydrase III activity. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 42: R1211-R1218, 1997.
4. **Frémont, P., P.-M. Charest, C. Côté, and P. A. Rogers.** Carbonic anhydrase III in skeletal muscle fibers: an immunocytochemical and biochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 775-782, 1988.
5. **Goodpaster, B. H., F. L. Thaete, J.-A. Simoneau, and D. E. Kelley.** Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 46: 1579-1585, 1997.
6. **Green, H. J., D. Smith, P. Murphy, and I. Fraser.** Training-induced alterations in muscle glycogen utilization in fibre-specific types during prolonged exercise. *Can. J. Appl. Physiol.* 68: 1372-1376, 1990.
7. **Gros, G., W. Moll, H. Hoppe, and H. Gros.** Proton transport by phosphate diffusion - a mechanism of facilitated CO<sub>2</sub> transfer. *J. Gen. Physiol.* 67: 773-790, 1976.

8. **Hazen, S. A., A. Waheed, W. S. Sly, K. F. Lanoue, and C. J. Lynch.** Differentiation-dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB J.* 10: 481-490, 1996.
9. **Henry, R. P.** Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 523-538, 1996.
10. **Hickey, M. S., J. O. Carey, J. L. Azevedo, J. A. Houmard, P. W.J., R. G. Israel, and G. L. Dohm.** Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am. J. Physiol.* 268: E453-E457, 1995.
11. **Jeffery, S., Y. Edwards, and N. Carter.** Distribution of CA-III in fetal and adult human tissues. *Biochem. Genet.* 18: 843-849, 1980.
12. **Kelley, D. E., J.-A. Simoneau, B. Goodpaster, J. H. Veerkamp, and F. Troost.** Defects of skeletal muscle fatty acid metabolism in obesity. *Obes. Res.* 5: 21S, 1997.
13. **Kriketos, A. D., D. A. Pan, S. Lillioja, G. J. Cooney, L. A. Baur, M. N. Milner, J. R. Sutton, A. B. Jenkins, C. Bogardus, and L. H. Storlien.** Interrelationships between muscle morphology, insulin action, and adiposity. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 38: R1332-R1339, 1996.
14. **Krotkiewski, M., A.-C. Bylund-Fallenius, J. Holm, P. Björntorp, G. Grimby, and K. Mandroukas.** Relationship between muscle morphology and metabolism in obese women: the effects of long-term physical training. *Eur. J. Clin. Invest.* 13: 5-12, 1983.
15. **Lillioja, S., A. A. Young, C. L. Culter, J. L. Ivy, W. G. H. Abbot, J. K. Zawadzki, H. Yki-Järvinen, L. Christin, T. W. Secomb, and C. Bogardus.** Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *J. Clin.*

*Invest.* 80: 415-424, 1987.

16. **Lindgärde, F., K.-F. Eriksson, H. Lithell, and B. Saltin.** Coupling between dietary changes, reduced body weight, muscle fibre size and improved glucose tolerance in middle-aged men with impaired glucose tolerance. *Acta Med. Scand.* 212: 99-106, 1982.
17. **Lynch, C. J., W. A. Brennan, T. C. Vary, N. Carter, and S. J. Dodgson.** Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 27: E621-E630, 1993.
18. **McGarry, J. D., and N. F. Brown.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244: 1-14, 1997.
19. **McGarry, J. D., S. E. Mills, C. S. Long, and D. W. Foster.** Observations on the affinity for carnitine, and malonyl CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase-I in animal and human tissues. *Biochem. J.* 214: 21-28, 1983.
20. **Nishita, T., T. Goto, H. Kimura, and M. Asari.** Carbonic anhydrase III content in various equine muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 199-202, 1993.
21. **Nishita, T., S.-I. Igarashi, and M. Asari.** Determination of carbonic anhydrase-III by enzyme-immunoassay in liver, muscle and serum of male rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 4: 359-364, 1995.
22. **Odland, L. M., G. J. F. Heigenhauser, G. D. Lopaschuk, and L. L. Spriet.** Human skeletal muscle malonyl CoA at rest and during prolonged submaximal exercise. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 33: E541-E544, 1996.
23. **Rubio, V.** Enzymatic HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> fixation: a common mechanism for all enzymes involved. *Biocsi. Rep.* 6: 335-347, 1986.

24. **Saha, A. K., T. G. Kurowski, J. R. Colca, and N. B. Ruderman.** Lipid abnormalities in tissues of the KKA<sup>y</sup> mouse: effects of pioglitazone on malonyl-CoA and diacylglycerol. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 30: E95-E101, 1994.
25. **Saltin, B., and P. D. Gollnick.** Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: *Handbook of Physiology. Sect. 10. Skeletal Muscle*, edited by L. D. Peachy, R. H. Adrian and S. R. Gieger. Bethesda: American Physiology Society, 1983, p. 555-631.
26. **Simoneau, J.-A., and C. Bouchard.** Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *Am. J. Physiol.* 20: E567-E572, 1989.
27. **Simoneau, J.-A., and C. Bouchard.** Skeletal muscle metabolism and body fat content in men and women. *Obes. Res.* 3: 23-29, 1995.
28. **Simoneau, J.-A., S. R. Colberg, F. L. Thaete, and D. E. Kelley.** Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *FASEB J.* 9: 273-278, 1995.
29. **Simoneau, J.-A., and D. E. Kelley.** Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J. Appl. Physiol.* 83: 166-171, 1997.
30. **Simoneau, J.-A., and D. E. Kelley.** Skeletal muscle and obesity. In: *Handbook of Obesity*, edited by G. A. Bray, C. Bouchard and W. P. T. James. New York: Marcel Dekker, Inc, 1997, p. 539-553.
31. **Siri, W. E.** The gross composition of the body. *Adv. Biol. Med. Phys.* 4: 239-280, 1956.
32. **Stanton, L. W., P. A. Ponte, R. T. Coleman, and M. A. Snyder.** Expression of CA



III in rodent models of obesity. *Mol. Endocrinol.* 5: 860-866, 1991.

33. **Väänänen, H. K., M. Paloniemi, and J. Vuori.** Purification and localization of human carbonic anhydrase III. Typing of skeletal muscle fibers in paraffin embedded sections. *Histochemistry* 83: 231-235, 1985.

34. **Zheng, A., P. Rahkila, J. Vuori, S. Rasi, T. Takala, and H. K. Väänänen.** Quantification of carbonic anhydrase III and myoglobin in different fiber types of human psoas muscle. *Histochemistry* 97: 77-81, 1992.

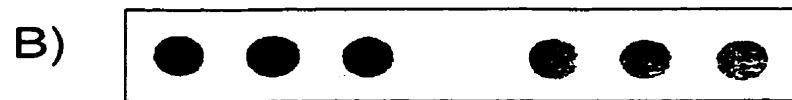
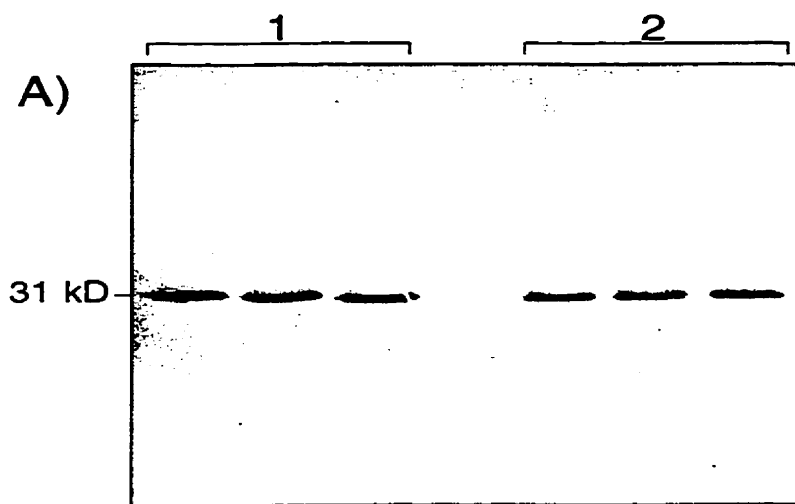
## FIGURE HEADINGS

Fig. 1. Western and dot blots revealing the content of CA III in skeletal muscle. The migration of the detected bands (triplicate from 2 different subjects) has stopped at a molecular weight of about 30 kD. The CA III antibody-antigen complex was visualized with the use of an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody according to the manufacturer specifications.

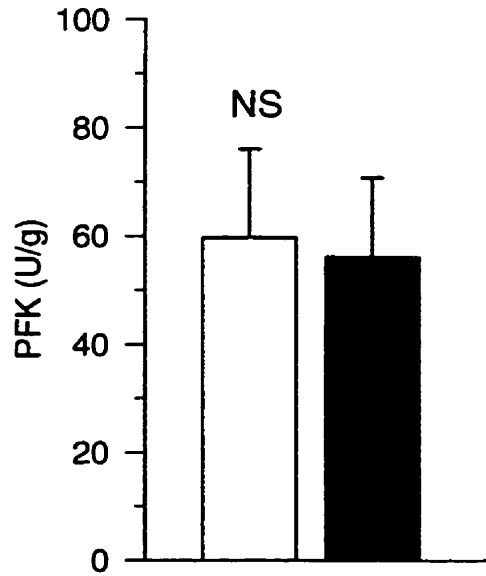
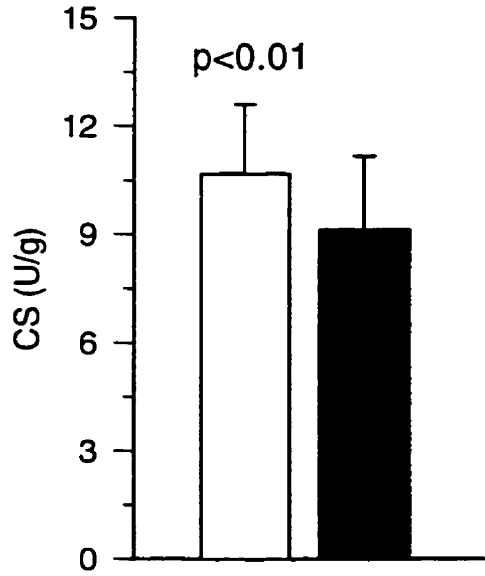
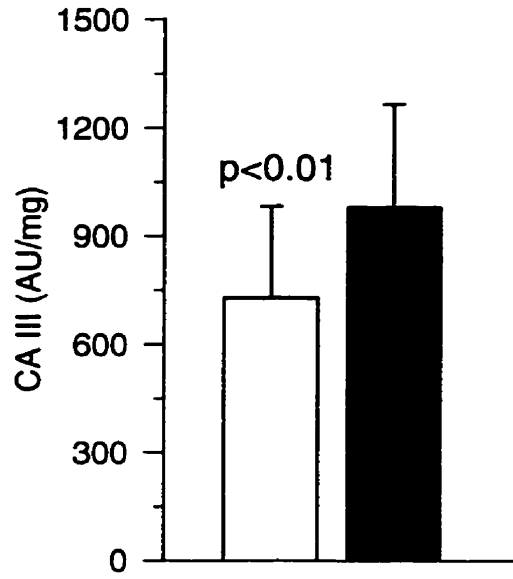
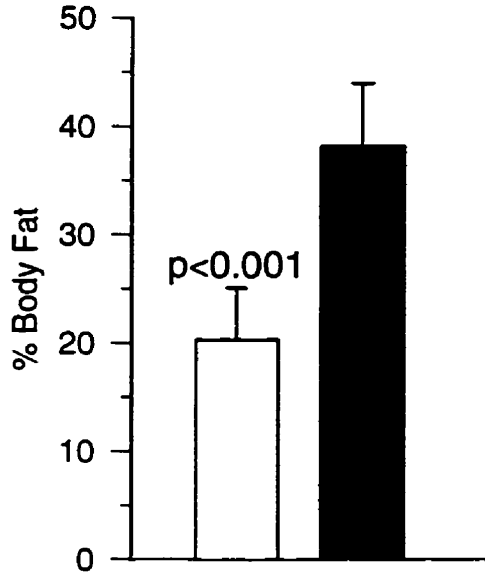
Fig. 2. Percent body fat, and CA III content, CS, and PFK muscle enzyme activities in lean and obese subjects.

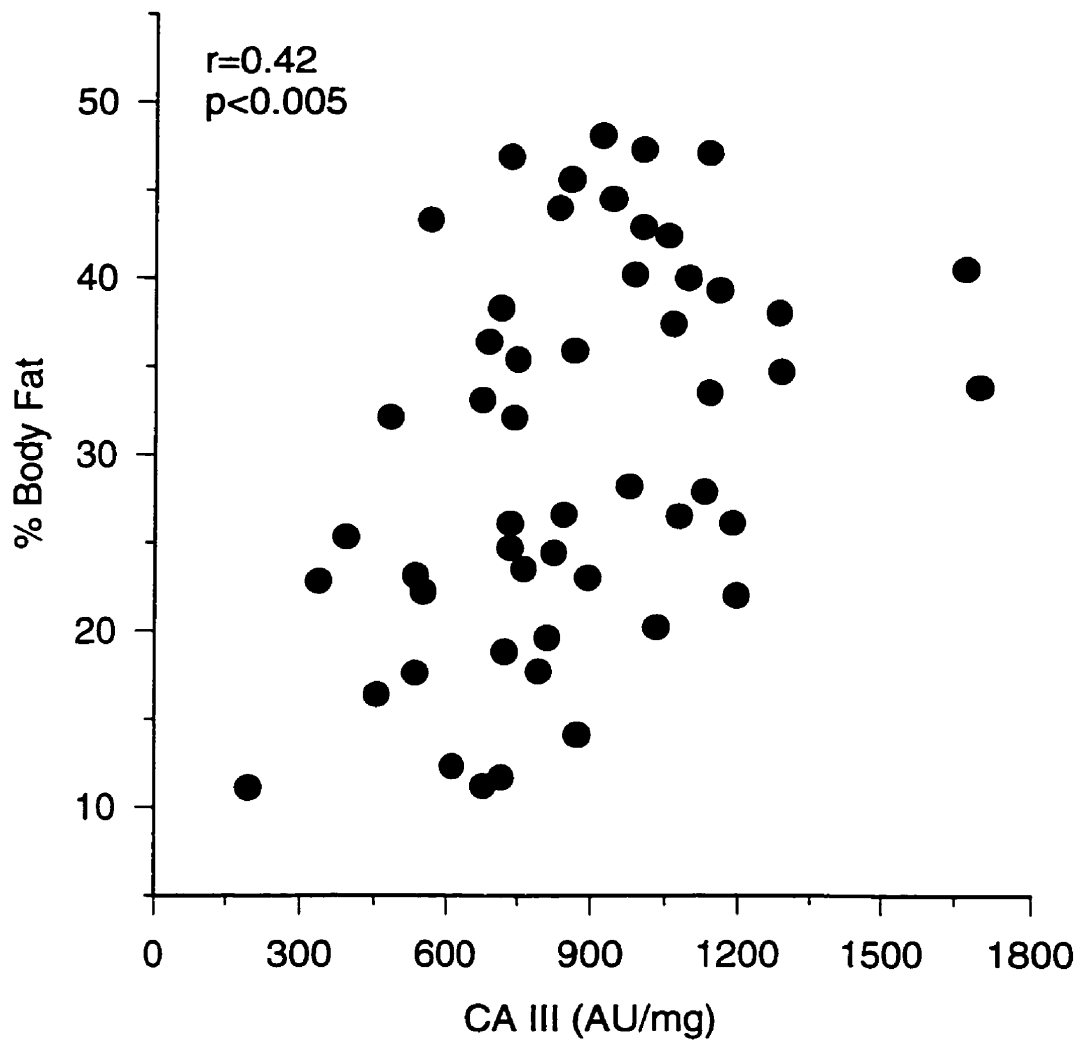
Fig. 3. Relationship between percent body fat and skeletal muscle CA III content.

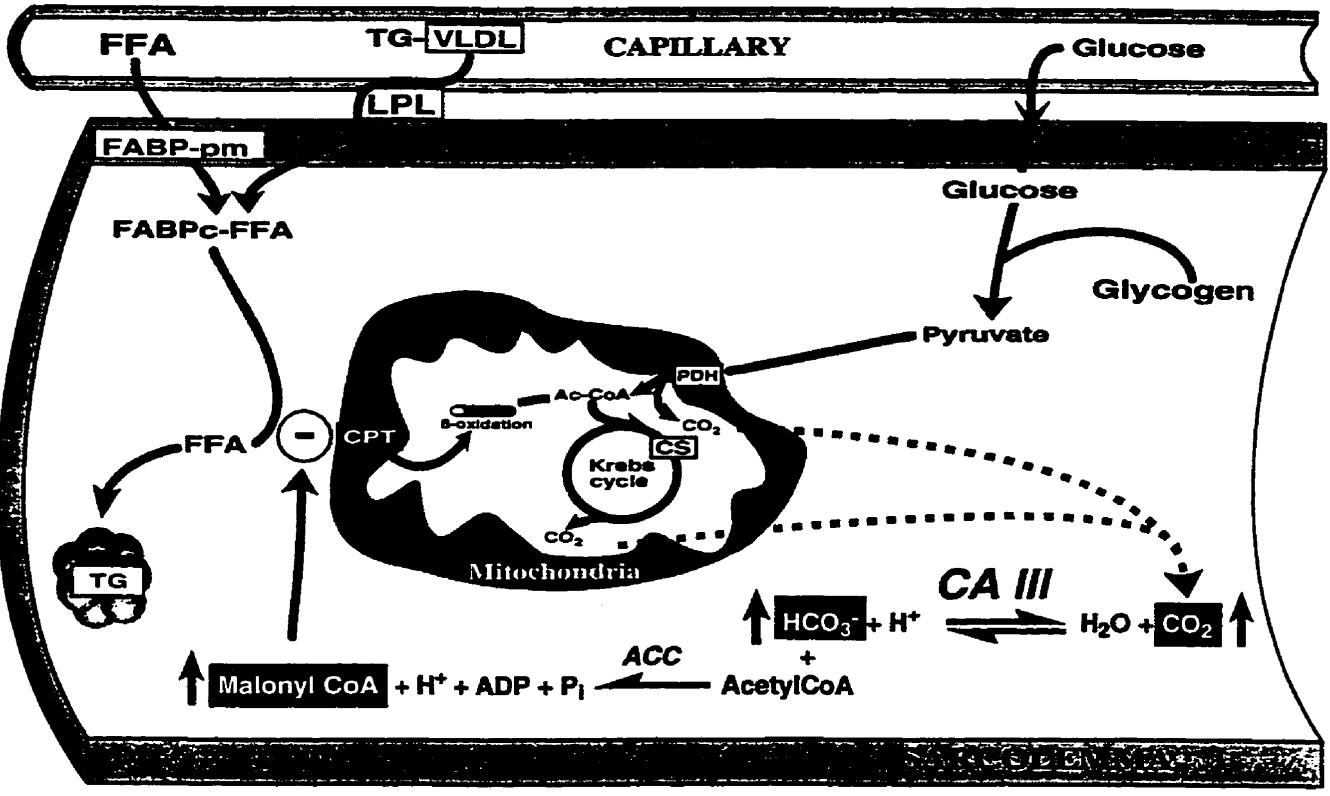
Fig 4. Schematic representation of the potential role of CA III in skeletal muscle of obese individuals.



Lean  
Obese







## **CHAPITRE 4**

### **DEUXIÈME ÉTUDE**

EFFECTS OF CHRONIC LOW-FREQUENCY ELECTRICAL STIMULATION ON  
CARBONIC ANHYDRASE III LEVEL IN HUMAN SKELETAL MUSCLE.

Gilles Beaudin<sup>1</sup>, Claude H. Côté<sup>2</sup>, Rémy Thériault<sup>1</sup>, Jean-Aimé Simoneau<sup>1</sup>

Division of Kinesiology, Department of Social and Preventive Medicine<sup>1</sup> and Lipid  
Research Center, Laval University Hospital Research Center<sup>2</sup>, Laval University, Ste-  
Foy, Québec, Canada,

**Running title:** Electrical stimulation and muscle CA III level

Address Correspondence and reprint request to: Jean-Aimé Simoneau, Ph. D. Associate  
Professor of Medicine; Division of Kinesiology, Department of Social and Preventive  
Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Ste-Foy, Québec, G1K 7P4, Canada (418-  
656-2392 phone; 418-6562441 fax; Jean-Aime.Simoneau@kin.msp.ulaval.ca; email).



## RÉSUMÉ

L'anhydrase carbonique III (AC III) est une des enzymes cytosoliques les plus abondantes au niveau des fibres de type I. Cependant on ignore si le niveau de cette enzyme peut être influencé par des facteurs environnementaux. Cette étude a pour but d'étudier les effets chroniques d'une augmentation de l'activité contractile musculaire sur le niveau d'AC III du muscle squelettique chez l'humain. Une stimulation électrique de basse fréquence (8 Hz) fut appliquée aux muscle extenseurs du genou, 6 jours par semaine. Trente-deux sujets sédentaires (19 hommes et 13 femmes) ont reçu 3 heures de stimulation par jour (S3H) pendant 6 semaines alors que 9 autres sujets (7 hommes et 2 femmes) ont reçu 8 heures de stimulation par jour (S8H), pendant 4 semaines. Le contenu en AC III, exprimé en unités arbitraires par mg de muscle frais (UA/mg), fut déterminé à l'aide d'une technique d'immunobuvardage en utilisant des homogénats d'échantillons musculaires obtenus par biopsie avant et après les protocoles de stimulation. Aucun changement significatif ne fut observé au niveau du contenu en AC III à la suite du protocole S3H ( $881 \pm 227$  vs  $934 \pm 179$  UA/mg,  $p=0.10$ ) alors qu'une altération significative fut détectée à la suite du protocole S8H ( $856 \pm 173$  vs  $1070 \pm 218$  UA/mg,  $p<0.005$ ). Cette étude démontre que le niveau d'AC III du muscle squelettique humain reste inchangé à la suite d'un protocole de stimulation électrique de 3 heures par jour alors qu'il augmente lorsque la stimulation électrique délivrée au muscle à chaque journée devient substantielle (8 heures par jour). Compte tenu du rôle métabolique potentiel de l'anhydrase carbonique, les changements rapportés dans cette étude pourraient contribuer à expliquer pourquoi une

plus grande quantité de graisse est habituellement observée dans les fibres musculaires d'un muscle ayant été chroniquement stimulé.

Mots clés: muscle humain, anhydrase carbonique, profil métabolique, stimulation électrique

**ABSTRACT**

Carbonic anhydrase III (CA III) is the most abundant enzyme in the cytosol of type I muscle fibers. It is not well known, however, to which extent the content of this protein can be altered by increased contractile activity. The purpose of the present study was to investigate the effects of a chronic increase in muscular contractile activity on the level of expression of CA III in human skeletal muscle. Transcutaneous low-frequency (8Hz) electrical stimulation was delivered 6 days per week to the knee extensor muscles (KEM) of men and women with the use of a portable stimulator and adhesive electrodes. Stimulation was applied 3 hours per day (S3H) for 6 weeks on KEM of 32 healthy sedentary subjects (19 men and 13 women) and 8 hours per day (S8H) for 4 weeks on KEM of 9 healthy subjects (7 men and 2 women). CA III content was determined by an immunoblot technique from homogenates of skeletal muscle samples taken from the vastus lateralis before and after the stimulation protocols and expressed in arbitrary units per mg of wet weight tissue (AU/mg). S3H did not change the content of CA III ( $881 \pm 227$  vs  $934 \pm 179$  AU/mg,  $p=0.10$ ) whereas S8H caused a significant increase in CA III level of the stimulated muscles ( $856 \pm 173$  vs  $1070 \pm 218$  AU/mg,  $p<0.005$ ). This investigation demonstrate that CA III content of human skeletal muscle can be increased in response to low-frequency electrical stimulation, although a substantial increase in contractile activity (8 hours per day) is required to generate this adaptation. Considering the metabolic function of CA in muscle, these results may contribute to explain why stimulated muscles have an increased amount of intramyocellular lipid content.

**Key words:** electrical stimulation, carbonic anhydrase, metabolic capacity, adaptation.

## INTRODUCTION

Carbonic anhydrase (CA; EC 4.2.1.1) is found in every mammalian tissues and, to date, seven isoforms have been found. Among them, CA I, II, III, and VII are located into the cytosol of the cells and one of their metabolic function is to catalyze the hydration of carbon dioxide into bicarbonate (19). CA III is the isoform predominantly present in skeletal muscle cells (11) and is known to have the lowest hydratase activity compared to the other isoforms (19). The presence of CA III within skeletal muscle does not seem, however, to be equally distributed in all muscle fiber types. A study by Väänänen et al. (21) reported that this isoform was mainly concentrated in type I muscle fibers and absent in type II fibers of human skeletal muscle. By using a more sensitive technique, Zheng et al. (22) have shown that the relative concentrations of human CA III in type IIA and IIB fibers of psoas muscle to be, respectively, 24% and 10% of that of type I fibers. Accordingly, a muscle possessing a high proportion of type I fibers may also have a high concentration of CAIII. Although this seems to be a consistent finding in skeletal muscle of rat (e.g. CA III content in soleus muscle is 4- to 8-fold higher than in vastus lateralis muscle (3)), it does not seem to be case for all species, particularly for horses and humans (6, 12). The content of CA III within human skeletal muscle has been shown to vary substantially between individuals and this variation was found to be largely independent of the proportion of type I fibers (6). To which extent the variation in CA III content within human skeletal muscle can be influenced by environmental factors such as increased contractile muscular activity has, however, never been systematically investigated.

As reviewed by Pette and Vrbová (15) and Pette and Staron (14), chronic low-frequency electrical stimulation can induce significant changes in several properties of skeletal muscle. Among these changes are the striking alterations induced in the metabolic profile of skeletal muscle. There are some contradiction in the literature concerning the stimulation-induced changes in skeletal muscle CA III content since Jeffery et al. (7) reported no significant changes in the content of that protein in stimulated muscle of rat while Brownson et al. (1) have shown that in rabbit the expression of CA III was upregulated in response to chronic low-frequency stimulation. With the use of a protocol involving four weeks of 3 times per week of high frequency (50 Hz) electrical stimulation sessions (1 hour per session) applied on knee extensor muscles, Kim et al. (8) reported no significant changes in citrate synthase, phosphofructokinase, myoglobin as well as in CA III content. The stimulation sessions used were, however, most likely too brief to generate significant alterations at the level of the metabolic profile of skeletal muscle (i.e. a total of 12 hours of stimulation over 4 weeks). Investigations from our laboratory have shown that both 3 hours per day (4) or 8 hours per day (20) of low-frequency electrical stimulation were adequate to modify the activity level of glycolytic and aerobic-oxidative enzymes in human skeletal muscle. The purpose of the present study was, therefore, to determine the influence of such protocols on the level of expression of CA III within human skeletal muscle.

## **METHODS**

**Subjects.** All participants gave their written informed consent to procedures that were approved by the Medical Ethics Committee of our institution. Thirty-two subjects (19 men and 13 women) participated in protocol 1 (S3H) while nine subjects (7 men and 2 women) have agreed to participate in protocol 2 (S8H). All subjects were healthy and normal weight individuals and were requested to maintain their normal life activities during the experiment.

**Stimulation procedures.** The S3H and S8H stimulation procedures were as previously described by Gauthier et al. (1992) and Thériault et al. (1995), respectively. Briefly, in the S3H protocol, both knee extensor muscles (KEM) of the subjects were submitted to either 3 hours per day of transcutaneous neuromuscular electrical stimulation, 6 days per week for 6 weeks. In the S8H protocol, KEM were stimulated 8 hours per day, 6 days per week for 4 weeks. Transcutaneous electrical stimulation was delivered at a frequency of 8 Hz to knee extensor muscles using a portable battery-powered stimulator (Respond II) and 3-inch diameter round and adhesive electrodes.

**Muscle biopsies and homogenates.** The needle biopsy technique was used to obtain a muscle sample from the middle part of the right vastus lateralis (Simoneau and Bouchard, 1989) prior to and at the end of both protocols. A small part of the muscle samples (about 10 mg), frozen in liquid nitrogen at the time of the biopsy and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ , was homogenized in a glass-glass Duall homogenizer with 40 vol. of ice-cold extracting medium (0.1 M Na-K-Phosphate, 2 mM EDTA,  $\text{pH}=7.2$ ). The homogenate was sonicated 6 times

for 5 sec at 20 watts, with pauses of 85 sec between pulses, and used for determination of CAIII content.

**CA III determination.** For determination of CAIII (done in triplicate for each subject), 0.25  $\mu$ g of total proteins (Bio-Rad protein assay) were spotted on a polyvinylidene fluoride membrane with the use of a Bio-Rad dot blot apparatus (Mississauga, ON, Can) and immunodecorated with an affinity purified polyclonal antibody (dilution of 1:50,000) directed against CAIII. The antibody-antigen complex was visualized with the use of an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (dilution of 1:10,000) according to the manufacturer specifications (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). The reaction product of dot blots was scanned (Scan Jet 4C, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) and each spot was analyzed twice with the use of the NIH Image analysis software. Standard amounts of human latissimus dorsi muscle served as internal control on each blot. CAIII content was expressed as arbitrary units per mg of wet weight tissue (AU/mg).

**Statistical analysis.** Unpaired-t tests were used to test whether the level of muscle CA III differed between men and women while paired-t tests were used to verify if there were significant stimulation-induced changes in the content of CA III within skeletal muscle. All statistical analysis were realised using SigmaStat software (Jandel Scientific software).

## RESULTS

No significant difference was noted in the level of CA III within skeletal muscle of men and women ( $947 \pm 217$  AU/mg in men vs  $837 \pm 226$  AU/mg in women,  $p=0.24$ ). These results are in agreement with previous data reported in small mammals since no sex-dependent expression was observed in CA III content of rat soleus (2). Since values of CAIII were similar in men and women, stimulation-induced changes of men and women were analyzed together.

Figure 1 displays values of skeletal muscle CA III content measured within muscle samples taken before and after both stimulation protocols. Muscle CA III contents measured in both groups at the beginning of the experiment were not significantly different. S3H did not significantly change the content of CA III ( $881 \pm 227$  vs  $934 \pm 179$  AU/mg,  $p=0.10$ ) whereas S8H caused a significant increase in CA III level of the stimulated muscles ( $856 \pm 173$  vs  $1070 \pm 218$  AU/mg,  $p<0.005$ ).

Insert Figure 1 about here



## DISCUSSION

The results of the present study have clearly demonstrated that it is possible to increase the content of CA III within skeletal muscle when an appropriate, although substantial, amount of increased muscular contractile activity is imposed to knee extensor muscles of human subjects. The absence of significant changes in CA III reported in the present study when 3 hours per day of low-frequency electrical stimulation were applied to the knee extensor muscles of the subjects is in agreement with the results reported by Kim et al. (8). These results are suggesting that a minimum amount of increased muscular contractile activity is required to produce significant alterations in CA III content of skeletal muscle.

The results obtained in response to the protocol of 8 hours per day are contrary to those reported in rat but are in agreement with those reported in rabbit, even though skeletal muscles of these two species were stimulated during 60 days with the use of a rather similar protocol of chronic low-frequency electrical stimulation (1, 5, 7). These species differences may be related to the fact that the skeletal muscle fiber type proportions of rat, rabbit and human muscle are not similar at the beginning of the experiment as well as that the type II to type I muscle fiber transition does not occur in every species in response to chronic low-frequency electrical stimulation. In rat, normal tibialis anterior muscle has an undetectable amount of myosin heavy chain I isoform and this isoform still remains undetectable on silver-stained gel electrophoresis even after 56 days of stimulation (7). This lack of myosin heavy chain I isoform, or of type I muscle fibers, as well as of response to

stimulation may explain why CA III content, mainly found in type I fibers (21), was not increased in the stimulated muscle of that species. In rabbit, normal tibialis anterior muscle has also an undetectable amount of myosin heavy chain I isoform but, contrary to rat, the content of this isoform is substantially increased after 56 days of stimulation (14). The large increase in CA III content reported in the stimulated muscle of that species (5) is most likely explained by the abrupt change in the proportion of type I muscle fibers. In human, it was the vastus lateralis that was investigated in response to chronic low-frequency electrical stimulation. It was previously shown, based on large cohorts of subjects, that the vastus lateralis of healthy men and women contains about 45% of type I fibers (17, 18), but this percentage do not change in response to the protocol used in the context of the present study (20). It can be hypothesized that the significant increase in CA III content observed in the present study can be most likely explained by an increased amount of CA III within the existant type I muscle fibers. Further experiments, combining immunohistochemistry and image analyses of single fibers, are needed to confirm this hypothesis.

The increase in CA III content observed in response to the S8H stimulation protocol may have particular metabolic consequences. Among them is the increased intramyofibrillar lipid content that occurs when skeletal muscle is chronically stimulated. Although its metabolic function is not well understood, there is an interest to look at the content of CA III in skeletal muscle because the hydrated form of  $\text{CO}_2$ , bicarbonate, is a necessary substrate in carbon fixing reactions, such as that catalyzed by acetyl-CoA carboxylase. The consequence of the upregulation of CA III observed in the present study is its potential influence on the

processes of lipid utilization or storage within skeletal muscle. Malonyl-CoA, the first committed intermediate produced during fatty acid synthesis, is recognized to act as a regulator of fatty acid oxidation in lipogenic tissues (10). Although skeletal muscle is not normally considered to be a lipogenic tissue, measurable amounts of malonyl-CoA have been detected in skeletal muscle of different species, including human subjects (13). Malonyl-CoA is formed in the cytosol by an enzymatic reaction involving bicarbonate, i.e. the hydrated form of  $\text{CO}_2$ , and acetyl CoA as substrates, and the enzyme acetyl CoA carboxylase. It is also a potent inhibitor of carnitine palmitoyl transferase I, the key regulatory enzyme responsible for the transfer of fatty acyl-CoA to the mitochondria for beta-oxidation (9). According to this hypothesis, high malonyl-CoA concentrations inhibit the uptake of fatty acids in the mitochondria, limiting the substrate availability for beta-oxidation.

In the proposed scheme, CA III in muscle would then favor storage of triglycerides which are precious substrates during sustained and prolonged exercise in healthy subjects. Interestingly, type I fibers, which have the highest CA III content compared to the other fiber types, also have a triglyceride content about 2-fold higher than that of type II fibers in humans (17) which supports the previous suggestion. It is of interest to mention that, with the use of ultrastructural analyses of electron microscopic images captured from control and stimulated rabbit tibialis anterior muscles, the intramyocellular content of lipids at least doubled after 4 weeks of low-frequency electrical stimulation (16), reinforcing the possibility that CA III indirectly contributes to this process. Although such analyses were not

performed on muscle samples taken from the subjects participating in the S8H protocol of the present study, it cannot be excluded that this adaptation also occurs in the stimulated muscles of these subjects.

The increase in CA III content observed in response to the S8H stimulation protocol may have also particular functional consequences. It is generally assumed that skeletal muscle exhibiting a predominant proportion of type I fibers has a greater ability for sustained contractile activity compared to skeletal muscle predominantly equipped of type II muscle fibers, and that type I muscle fibers contain a high concentration of CA III. Although the mechanism has not been yet elucidated, it seems that the variation in CA III within skeletal muscle may contribute to the fatigue properties of skeletal muscle, higher would be the CA III content, better would be the ability to withstand fatigue. We have previously reported that voluntary dynamic performance of the knee extensor muscle could improve in response to chronic low-frequency stimulation (20), a finding which fits with the possibility that part of this adaptation may be attributed to the observed increase in muscle CA III content.

In conclusion, the present investigation has demonstrated that CA III content of human skeletal muscle is increased in response to low-frequency electrical stimulation, although a substantial amount in muscular contractile activity (8 hours per day) is required to generate this adaptation. Considering the metabolic function of CA in muscle, these results may explain why stimulated muscles have an increased amount of intramyocellular lipid content and improved ability to withstand fatigue.

## Acknowledgments

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors would also like to thank Yves Gélinas for his technical assistance.

## References

1. **Brownson, C., H. Isenberg, W. Brown, S. Salmons, and Y. Edwards.** Changes in skeletal muscle gene transcription induced by chronic stimulation. *Muscle & Nerve* 11: 1183-1189, 1988.
2. **Carter, N. D.** Hormonal and neural control of carbonic anhydrase III gene expression in skeletal muscle. In: *The carbonic anhydrases: Cellular physiology and molecular genetics.*, edited by S. J. Dodgson, R. S. Tashian, G. Gros and N. D. Carter. New York: Plenum Press, 1991, p. 247-256.
3. **Frémont, P., P.-M. Charest, C. Côté, and P. A. Rogers.** Carbonic anhydrase III in skeletal muscle fibers: an immunocytochemical and biochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 775-782, 1988.
4. **Gauthier, J. M., R. Thériault, G. Thériault, Y. Gélinas, and J.-A. Simoneau.** Electrical stimulation-induced changes in skeletal muscle enzymes of men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 1252-1256, 1992.
5. **Gros, G., and S. J. Dodgson.** Velocity of CO<sub>2</sub> exchange in muscle and liver. *Annu. Rev. Physiol.* 50: 669-694, 1988.
6. **Jeffery, S., Y. Edwards, and N. Carter.** Distribution of CA-III in fetal and adult human tissues. *Biochem. Genet.* 18: 843-849, 1980.
7. **Jeffery, S., C. D. Kelly, M. Kaufmann, A. Termin, and D. Pette.** Chronic stimulation-induced effects point to a coordinated expression of carbonic anhydrase III and slow myosin heavy chain in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 262: 225-227, 1990.

8. **Kim, C. K., T. E. S. Takala, J. Seger, and J. Karpakka.** Training effects of electrically induced dynamic contractions in human quadriceps muscle. *Aviat. Space Environ. Med.* 66: 251-255, 1995.
9. **McGarry, J. D., and N. F. Brown.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244: 1-14, 1997.
10. **McGarry, J. D., S. E. Mills, C. S. Long, and D. W. Foster.** Observations on the affinity for carnitine, and malonyl CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase-I in animal and human tissues. *Biochem. J.* 214: 21-28, 1983.
11. **Moyle, S., S. Jeffery, and N. D. Carter.** Localization of human muscle carbonic anhydrase isozymes using immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 1262-1264, 1984.
12. **Nishita, T., T. Goto, H. Kimura, and M. Asari.** Carbonic anhydrase III content in various equine muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 199-202, 1993.
13. **Odland, L. M., G. J. F. Heigenhauser, G. D. Lopaschuk, and L. L. Spriet.** Human skeletal muscle malonyl CoA at rest and during prolonged submaximal exercise. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 33: E541-E544, 1996.
14. **Pette, D., and D. Staron.** Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytology* 170: 143-223, 1997.
15. **Pette, D., and G. Vrbová.** Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 120: 115-202, 1992.

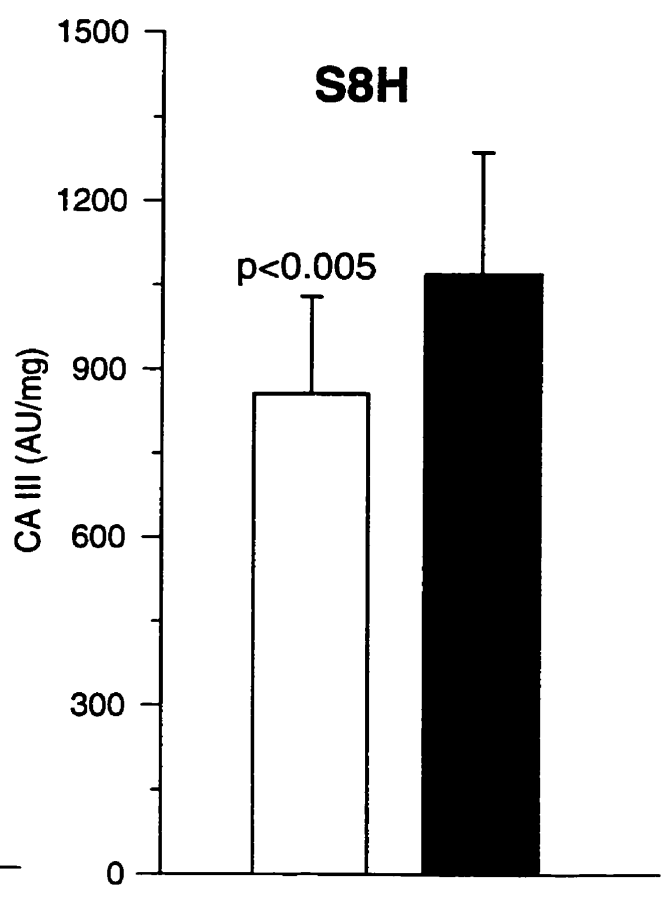
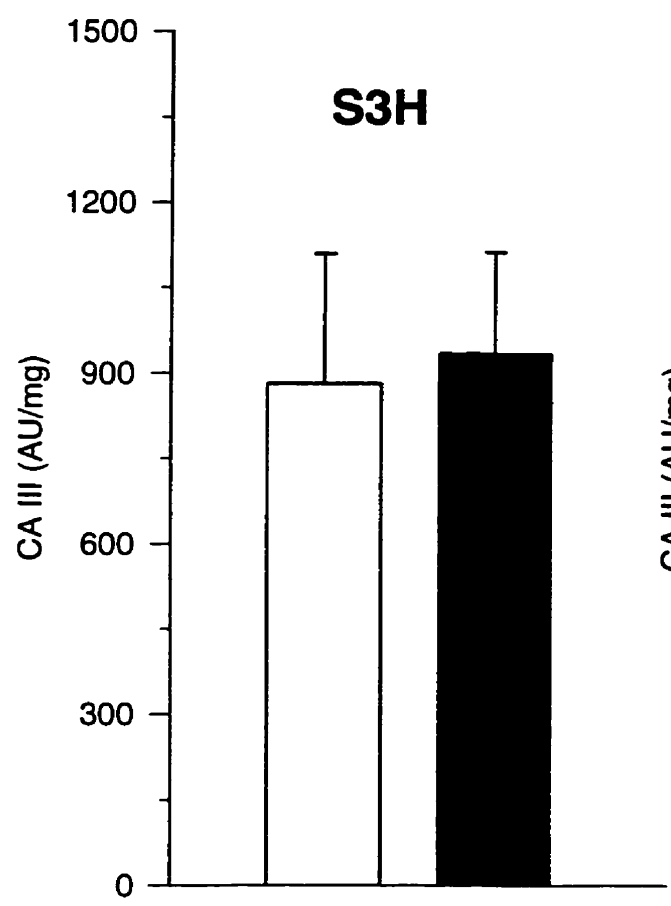
16. **Reichmann, H., H. Hoppeler, O. Mathieu-Costello, F. V. Bergen, and D. Pette.** Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. *Pflügers Archiv.* 414: 1-9, 1985.
17. **Saltin, B., and P. D. Gollnick.** Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: *Handbook of Physiology. Sect. 10. Skeletal Muscle*, edited by L. D. Peachy, R. H. Adrian and S. R. Gieger. Bethesda: American Physiology Society, 1983, p. 555-631.
18. **Simoneau, J.-A., and C. Bouchard.** Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *Am. J. Physiol.* 20: E567-E572, 1989.
19. **Tashian, T. E.** The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *BioEssays* 10: 186-192, 1989.
20. **Thériault, R., G. Thériault, and J.-A. Simoneau.** Human skeletal muscle adaptation in response to chronic low-frequency electrical stimulation. *J. Appl. Physiol.* 77: 1885-1889, 1994.
21. **Väänänen, H. K., M. Paloniemi, and J. Vuori.** Purification and localization of human carbonic anhydrase III. Typing of skeletal muscle fibers in paraffin embedded sections. *Histochemistry* 83: 231-235, 1985.
22. **Zheng, A., P. Rahkila, J. Vuori, S. Rasi, T. Takala, and H. K. Väänänen.** Quantification of carbonic anhydrase III and myoglobin in different fiber types of human psoas muscle. *Histochemistry* 97: 77-81, 1992.



## Figure legend

Figure 1. Values of CA III content in human skeletal muscle before and after 3 hours (6 weeks, S3H) or 8 hours (4 weeks, S8H) per day of transcutaneous low-frequency electrical stimulation. Values are expressed as mean $\pm$ SD.

PRE  
POST



## **CHAPITRE 5**

## **CONCLUSIONS**

## 5

**Conclusions**

Depuis la découverte du premier isoforme de l'anhydrase carbonique, cette enzyme a fait l'objet de nombreuses recherches ayant pour but de tenter de mieux comprendre son fonctionnement. Ces travaux ont permis de démontrer qu'il existe, entre autre, 7 isoformes différents, chacun ayant une certaine spécificité quant à sa localisation tissulaire. Il fut également démontré qu'un ou plusieurs de ces isoformes se retrouvent dans tous les tissus de mammifères. Bien que sa localisation soit maintenant assez bien décrite, la fonction de certains de ces isoformes demeure, encore à ce jour, incertaine.

Parmi les isoformes qui ont été plus récemment découverts, l'AC III revêt un intérêt particulier dans les secteurs de la biochimie et physiologie musculaire puisque sa présence au sein de la cellule musculaire se retrouve principalement dans les fibres de types I, des fibres reconnues comme étant hautement résistante à la fatigue et possédant des caractéristiques métaboliques également très particulières. À cause de son implication possible tant au plan métabolique que fonctionnel, les objectifs principaux de ce mémoire de maîtrise avaient pour but de vérifier si le contenu en AC III du tissu musculaire chez l'humain est relié ou non avec la composition corporelle des individus et de mesurer les

effets d'une augmentation chronique de l'activité contractile musculaire, comme celle qui peut être induite par plusieurs semaines de stimulation électrique transcutanée de basse fréquence, sur le contenu en AC III du muscle squelettique humain.

Les résultats des expérimentations qui ont été réalisées afin de répondre à ces questions révèlent que le contenu en AC III variait en fonction de la composition corporelle des individus. La relation observée était telle que plus le contenu en AC III était élevé et plus la masse de graisse des individus s'avérait importante. D'autre part, un protocole de stimulation électrique de basse fréquence (8 Hz), appliquée 3 heures par jour pendant 6 semaines sur les muscles extenseurs du genou, n'avait pas d'effet sur le contenu en AC III. Toutefois, lorsque la durée de la stimulation fut augmentée à 8 heures par jour, le contenu en AC III fut significativement augmenté. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une augmentation majeure de l'activité contractile de muscle est nécessaire pour induire des changements dans le contenu en AC III.

Compte tenu de la fonction potentielle de l'AC III dans le muscle squelettique et des données présentées ainsi que des questions soulevées dans ce mémoire, il est certain que d'autres efforts de recherche, incluant des avenues jusqu'à maintenant inexploitées, devront être consentis chez l'humain.

**RÉFÉRENCES DES CHAPITRES 1 ET 2**

**RÉFÉRENCES DES CHAPITRES 1 ET 2**

1. Abemethy, P.J., R. Thayer et A.W. Taylor. Acute and chronic responses of skeletal muscle to endurance and sprint exercise. A Review. *Sports Med.* 10: 365-389, 1990.
2. Brownson, C., H. Isenberg, W. Brown, S Salmons et Y. Edwards. Changes in skeletal muscle gene transcription induced by chronic stimulation. *Muscle & Nerve.* 11: 1183-1189, 1988
3. Cabiscol, E. et R.L. Levine. The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 4170-4174, 1996.
4. Carter, N. et S. Jeffery. Carbonic anhydrase: update and new horizons. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 531-533, 1985.
5. Colberg, S.R., J.-A. Simoneau, F.L. Thaete et D.E. Kelley. Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J. Clin. Invest.* 95: 1846-1853, 1995.
6. Côté, C.H., H. Riverin, M.-J. Barras, R.R. Tremblay et P. Frémont. Effects of carbonic anhydrase III inhibition on substrate utilization and fatigue in rat soleus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 277-283, 1992.

7. Côté, C.H., N. Jomphe, A. Odeimat et P. Frémont. Carbonic anhydrase in mouse skeletal muscle and its influence on contractility. *Biochem. Cell. Biol.* 72: 244-249, 1993.
8. Côté, C. H., G. Perreault, et J. Frenette. Carbohydrate utilization in rat soleus muscle is influenced by carbonic anhydrase III activity. *Am. J. Physiol* 42: R1211-1218, 1997.
9. Dufour, B., G. Lortie, G. Thériault et J.-A. Simoneau. Glycogen depletion of human skeletal muscle fiber type I, IIa and IIb in response to two hours of low-frequency electrical stimulation (abstract). *Can. J. Appl. Physiol.* S19: 13, 1994.
10. Felber, J.P., K.J. Acheson et L. Tappy. *From obesity to diabetes*. England: John Wiley & Sons, 1993, 302 p.
11. Frémont, P., C. Lazure, R.R. Tremblay, M. Chrétien et P.A. Rogers. Regulation of carbonic anhydrase by thyroid hormone: opposite modulation in slow- and fast-twitch skeletal muscle. *Biochem. Cell. Biol.* 65: 790-797, 1987.
12. Frémont, P., P.M. Charest, C. Côté et P.A. Rogers. Carbonic anhydrase III in skeletal muscle fibers: an immunocytochemical and biochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 775-782, 1988.
13. Frémont, P., S. Boudriau, R.R. Tremblay, C. Côté et P.A. Rogers. Acetazolamide-sensitive and resistant carbonic anhydrase activity in rat and rabbit skeletal muscles of different fiber type composition. *Int. J. Biochem.* 21: 143-147, 1989.



14. Gagnon, J., M.A. Ho-Kim, C. Champagne, R.R. Tremblay et P.A. Rogers.  
Modulation of a major 30-kDa skeletal muscle protein by thyroid hormone. *FEBS Lett.* 180: 335-340, 1985.
15. Gauthier, J.M., R. Thériault, G. Thériault, Y. Gélinas et J.-A. Simoneau. Electrical stimulation-induced changes in skeletal muscle enzymes of men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 1252-1256, 1992.
16. Geers, C., G. Gros, et A. Gärtner. Extracellular carbonic anhydrase of skeletal muscle associated with the sarcolemma. *J. Appl. Physiol.* 59:548-558, 1985.
17. Geers, C., et G. Gros. Effects of carbonic anhydrase inhibitors on contraction, intracellular pH and energy-rich phosphates of rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 423:279-297, 1990.
18. Geers, C., P. Wetzel et G. Gros. Is carbonic anhydrase required for contraction of skeletal muscle? *News Physiol. Sci.* 6: 78-81, 1991.
19. Geers, C., Krüger, D., Siffert, W., Schmid, A., Bruns, W. et Gros, G. Carbonic anhydrase in skeletal and cardiac muscle from rabbit and rat. *Biochem J.* 282: 165-171, 1992.
20. Geers, C., K. Benz et G. Gros. Effects of carbonic anhydrase inhibitors on oxygen consumption and lactate accumulation in skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A: 111-117, 1995.
21. Guyton, A.C. *Textbook of Medical Physiology (Seventh Edition)*. Toronto: W.B. Saunders Company, 1986, 1057 p.

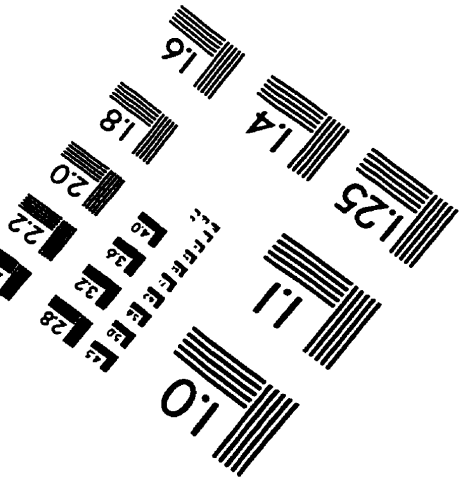
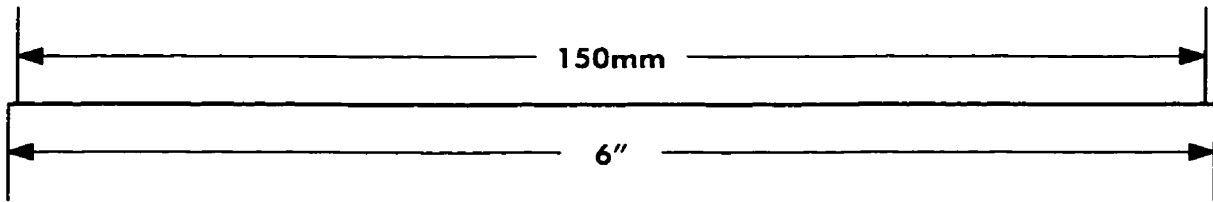
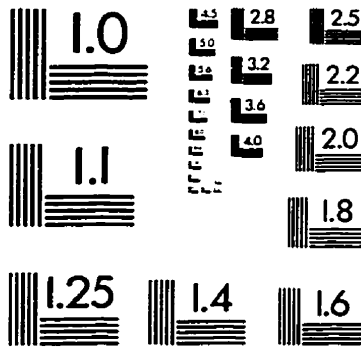
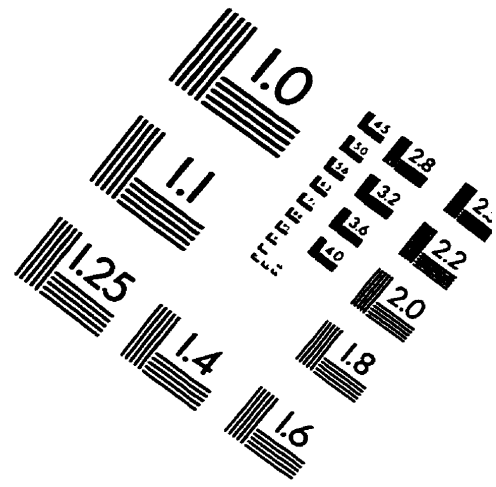
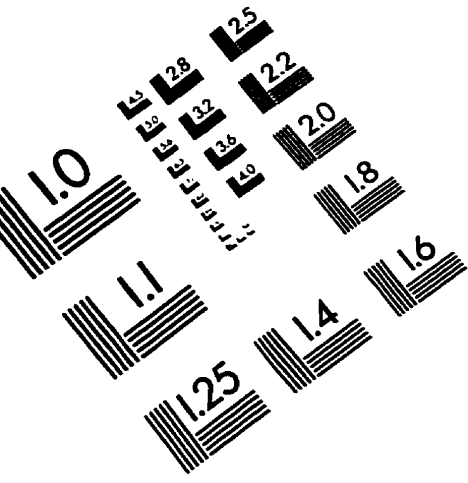
22. Henry, R.P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 523-538, 1996.
23. Jeffery, S., Y. Edwards et N. Carter. Distribution of CA III in fetal and adult human tissue. *Biochem. Genet.* 18: 843-849, 1980.
24. Jeffery, S., C.D. Kelly, N. Carter, M. Kaufmann, A. Termin et D. Pette. Chronic stimulation-induced effects point to a coordinated expression of carbonic anhydrase III and slow myosin heavy chain in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 262: 225-227, 1990.
25. Johnson, M., G. Lortie, J.-A. Simoneau. Glycogen depletion of human skeletal muscle fibers in response to high-frequency electrical stimulation. *Can J Appl Physiol.* 20:25P, 1995 (abstract).
26. Kelley, D. E., J.-A. Simoneau, B. Goodpaster, J. Veerkamp, F. Troost. Defects of skeletal muscle fatty acid metabolism in obesity. *Obesity Res.* 5: 21S, 1997 (abstract).
27. Kim C.K., T.E.S. Takala, J. Seger et J. Karpakka. Training effects of electrically induced dynamic contraction in human quadriceps muscle. *Aviat. Space Environ. Med.* 66: 251-255, 1995.
28. Linderman, J. et T.D. Fahey. Sodium bicarbonate ingestion and performance. An update. *Sports Med.* 11: 71-77, 1991.
29. Lynch, C.J., W.A. Brennan Jr., T.C. Vary, N. Carter et S.J. Dodgson. Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 264: E261-E630, 1993.
30. McArdle, W.D., F. Katch et V. Katch. *Physiologie de l'Activité Physique: Énergie, Nutrition et Performance.* Paris: Vigot, 1987, 536 p.

31. McGarry, J. D., et N. F. Brown. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244: 1-14, 1997.
32. Moyle, S., S. Jeffery et N.D. Carter. Localization of human muscle carbonic anhydrase isozymes using immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 1262-1262, 1984.
33. Néron, J.-F., M.R. Boulay, G. Thériault, G. Lortie et J.-A. Simoneau. Glycogen depletion in single muscle fiber types during low-frequency electrical stimulation and endurance exercise in trained cyclists (abstract). *Med. Sci. Sports Exerc.* 28: S97, 1997.
34. Osterman, P.O., H. Askmark et P.J. Wistrand. Serum carbonic anhydrase III in neuromuscular disorders and in healthy persons after a long-distance run. *J. Neuro. Sci.* 70: 347-357, 1985.
35. Pette, D., et R.S. Staron. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytology* 170: 143-223, 1997.
36. Pette, D. et G. Vrbová. Adaptation of mammalian skeletal muscle to electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 120: 115-202, 1992.
37. Ren, X., B.-H. Jonsson et S. Lindskog. Some properties of site-specific mutants of human carbonic anhydrase II having active-site residues characterizing carbonic anhydrase III. *Eur. J. Biochem.* 210: 417-420, 1991.
38. Rice, C.L., F.P. Pettigrew, E.G. Noble et A.W. Taylor. The fibre composition of skeletal muscle. *Med. Sport Sci.* 27: 22-39, 1988.
39. Sender, S., G. Gros, A. Waheed, G.S. Hageman et W.S. Sly. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase IV in capillaries of rat and human skeletal muscle.

- J. Histochem Cytochem. 42: 1229-1236, 1994.
40. Simoneau, J.-A., G. Lortie, M.R. Boulay, M. Marcotte, M.-C. Thibault et C. Bouchard. Effects of two high-intensity intermittent training programs interspaced by detraining on human skeletal muscle and performance. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56: 516-521, 1987.
41. Simoneau, J.-A. Adaptation of human skeletal muscle to exercise-training. *Int. J. Obes.* 19: S9-S13, 1995.
42. Simoneau, J.-A. et C. Bouchard. Skeletal muscle metabolism and body fat content in men and women. *Obes. Res.* 3: 23-29, 1995.
43. Spicer, S. S., Z. H. Ge, R. E. Tashian, D. J. Hazen-Martin et B. A. Schulte. Comparative distribution of carbonic anhydrase isozymes III and II in rodent tissues. *Am. J. Anat.* 187:55-64, 1990.
44. Takala. T.E.S., J.J. Vuori, P.J. Rahkila, E.O. Hakala, J.A. Karpakka, M.J. Alen, Y.S. Orava et H.K. Väänänen. Carbonic anhydrase III and collagen markers in serum following cross-country skiing. *Med. Sci. Sports Exerc.* 21: 593-597, 1989.
45. Tashian, R.E. The carbonic anhydrase: widening perspectives on their evolution, expression and function. *BioEssays.* 10: 186-192, 1989.
46. Thériault, R., G. Thériault et J.-A. Simoneau. Human skeletal muscle adaptation in response to chronic low-frequency electrical stimulation. *J. Appl. Physiol.* 77: 1885-1889, 1994.
47. Tremblay, A., J.-A. Simoneau et C. Bouchard. Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. *Metabolism* 43: 814-818, 1994.

48. Tu C., X. Chen, X. Ren. P.V. LoGrasso, D.A. Jewell, P.J. Laipis et D.N. Silverman. Interactions of acti-site residues and catalytic activity of human carbonic anhydrase III. J. Biol. Chem. 269: 23002-23006, 1994.
49. Väänänen, H.K., T. Kumpulainen et L.K. Korhonen. Carbonic anhydrase in the type I skeletal muscle fibers of the rat. J. Histochem. Cytochem. 30: 1109-1113, 1982.
50. Väänänen, H.K., M. Paloniemi et J. Vuori. Purification and localization of human carbonic anhydrase III. Typing of skeletal muscle fibers in paraffin embedded sections. Histochem. 83: 231-235, 1985.
51. Väänänen, H.K., M. Leppilampi, J. Vuori et T.E.S. Takala. Liberation of muscle carbonic anhydrase serum during extensive exercise. J. Appl. Physiol. 61: 561-564, 1986.
52. Wilmore, J.H. et D.L. Costill. Physiology of sport and exercise. Champaign, IL: Human Kinetics, 1994, 549 p.
53. Zheng, A., P. Rahkila, J. Vuori, S. Rasi, T. Takala, et H. K. Väänänen. Quantification of carbonic anhydrase III and myoglobin in different fiber types of human psoas muscle. Histochemistry 97: 77-81, 1992.
54. Zurlo, F., S. Lillioja, A. Esposito-Del Puente, B.L. Nyomba, I. Raz, M.F. Saad, B.A. Swinburn, W.C. Knowler, C. Bogardus et E. Ravussin. Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ. Am. J. Physiol. 259: E650-E657, 1990.

# IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



**APPLIED IMAGE . Inc**  
1653 East Main Street  
Rochester, NY 14609 USA  
Phone: 716/482-0300  
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc.. All Rights Reserved

