



Dysfonction musculaire périphérique et réhabilitation respiratoire dans la BPCO : intérêt d'une supplémentation en antioxydants

Jonathan Maury

► To cite this version:

Jonathan Maury. Dysfonction musculaire périphérique et réhabilitation respiratoire dans la BPCO : intérêt d'une supplémentation en antioxydants. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTT023 . tel-01413964

HAL Id: tel-01413964

<https://theses.hal.science/tel-01413964>

Submitted on 12 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par
L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER



Préparée au sein de :
Ecole doctorale Sciences du Mouvement Humain, SMH

INSERM U1046 – CNRS UMR9214 – Université de Montpellier,
Physiologie & Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles –
PhyMedExp

Spécialité : **Physiologie de l'exercice**

Présentée par **Jonathan MAURY**

**Dysfonction musculaire périphérique et
réhabilitation respiratoire dans la BPCO :
intérêt d'une supplémentation en antioxydants**

Soutenue publiquement le **11 Décembre 2015,**

devant le jury composé de :

Mme Esther Barreiro, Docteur, Université Barcelone
Mr Frédéric Costes, PU-PH, Université Clermont-Ferrand
Mme Claudine Fabre, Professeur, Université Lille
Mr Joël Pincemail, Professeur, Université Liège
Mr Jacques Mercier, Professeur, Université Montpellier
Mme Nelly Héraud, Docteur, Fontalvie
Mr Christian Préfaut, Professeur, Université Montpellier
Mr Maurice Hayot, PU-PH, Université Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Co-encadrante
Co-directeur
Directeur

Remerciements

Ce travail de thèse et l'écriture du présent manuscrit est le fruit d'une implication à la fois personnelle mais aussi (et surtout) collective. À travers les quelques mots qui vont suivre, je tenais donc à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont permises de mener ce projet à son terme dans les meilleures conditions possibles.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le **Professeur Maurice HAYOT**, pour son soutien, sa disponibilité et ses conseils tout au long de ce travail, tout en me laissant une grande liberté. Vous avez sû me guider parfaitement pour mes premiers pas dans la recherche et pour cela je vous en suis très reconnaissant.

Merci également au **Professeur Christian PREFAUT**, pour avoir accepté de co-diriger mes travaux de thèse et transmis votre expérience et passion pour la réhabilitation respiratoire.

Je remercie le **Professeur Jacques MERCIER** pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de votre laboratoire INSERM U1046 - CNRS UMR9214 - PhyMedExp – durant ces années de thèse.

Dans ce laboratoire, je faisais parti du groupe « BPCO » qui m'a beaucoup aidé, épaulé quand j'en avais besoin, tout en travaillant dans la joie, la bonne humeur et la convivialité. Merci à **Pascal, Farès, François, Bronia et Marine**. J'ai grandement apprécié de travailler à vos côtés, les futurs étudiants ont de la chance et peuvent venir les yeux fermés dans cette équipe.

Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire et plus particulièrement à **Dalila** pour ses précieux conseils en matière de stress oxydant. Merci aussi à **Annick** pour le temps passé sur certains aspects plus méthodologiques de ces travaux de thèse.

En ce qui concerne le groupe Fontalvie, je tiens à remercier le **Docteur Jacques DESPLAN**, pour m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse au sein de votre établissement.

Je remercie également le **Professeur Alain VARRAY** pour l'ensemble de vos conseils et m'avoir donné le goût pour l'enseignement universitaire à travers la confiance que vous m'avez accordé.

Merci au **Docteur Dominique BOURGOUIN** pour vos conseils et éclairages durant les comités de recherche.

Un grand merci au **Docteur Nelly HERAUD** pour m'avoir fait confiance, suivi et aidé tout au long de ce travail de thèse et dans la rédaction que ce soit des articles scientifiques mais aussi du présent manuscrit.

Merci également à l'ensemble des membres du comité de recherche et plus particulièrement à **Emilie** pour m'avoir écouté et conseillé à de nombreuses reprises.

Un grand merci à la Clinique du Souffle La Solane, notamment aux deux **Phillipe, DESNOT et DE RIGAL** mais aussi à **Magali, Adriana, Anna et Luc** ainsi que leurs formidables équipes pour avoir fait en sorte que mes très nombreux déplacements à la montagne se fassent toujours avec le sourire. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Il m'est impossible de ne pas remercier **l'ensemble des patients** qui ont participé à ces travaux de thèse avec beaucoup d'intérêt.

Je tiens à remercier sincèrement le **Docteur Esther BARREIRO** ainsi que le **Professeur Frédéric COSTES**, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de mes travaux de thèse. Votre expertise et remarques ont permis non seulement d'améliorer le manuscrit mais aussi d'envisager ce travail sous un autre angle.

Merci également au **Professeur Claudine FABRE** pour avoir accepté d'expertiser mon travail de thèse lors de ma soutenance.

Un grand merci au **Professeur Joël PINCEMAIL**, pour m'avoir fait l'honneur d'être dans mon jury de thèse. Votre œil d'expert sur le stress oxydant et vos précieux conseils tout au long de nos nombreuses discussions m'auront bien aidé afin d'appréhender ce vaste et complexe champ scientifique.

Toutes ces personnes constituent le côté « professionnel » de ce travail de thèse. Pour utiliser une métaphore, nous pouvons les assimiler aux molécules oxydantes de l'organisme. Comme

décrit dans ce manuscrit, pour que ces molécules soient bénéfiques, il est indispensable d'avoir un très bon système antioxydant. Et j'ai la chance d'en avoir un excellent grâce à la présence de mes parents, ma famille et mes amis.

Un grand merci à **mes parents et mon frère** sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Votre soutien, votre présence et vos encouragements m'ont été précieux tout au long de ces longues années d'études. Je vous en serai éternellement reconnaissant. Merci également à l'ensemble de **ma famille** sur laquelle je peux toujours compter.

J'ai une pensée aussi pour mes amis : **Nico, la Rèle, Julien, Gégé, Fifou, la Davery, les potes du BLAC...**c'est toujours un bonheur de vous retrouver et de pouvoir poser le cerveau l'espace de quelques heures, vous êtes au top. Merci à chacun d'entre vous pour ce que vous m'apportez, ne changez rien !

Mes derniers remerciements vont à **Noémie**, sans qui cette expérience n'aurait certainement pas été pareille. Merci pour ton soutien, ta patience et pour m'avoir soutenu quand cela allait moins bien. Ce n'est pas le lieu pour exprimer ce que je ressens et toute l'estime que j'ai pour toi mais je ne pouvais pas ne pas avoir une pensée pour la personne qui me supporte et me rend heureux au quotidien.

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE (Convention Industrielle pour la Formation et la Recherche en Entreprise). Cette convention était définie par un partenariat entre la Clinique du Souffle « La Solane », du groupe Fontalvie, située à Osséja (66340) et le laboratoire « PhyMedExp- Physiologie et Médecine expérimentale du cœur et des muscles » au CHU Arnaud de Villeneuve (INSERM U1046, CNRS UMR9214, Université de Montpellier), au sein de l'équipe travaillant sur la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Depuis plus de 20 ans, la collaboration entre ces deux partenaires a fait l'objet de nombreuses publications d'articles scientifiques et cette thèse s'inscrit donc dans la continuité de ces précédents travaux.

Forte de son expérience, la Clinique du Souffle « La Solane » a développé le concept de réhabilitation respiratoire. Ce concept est axé autour d'un programme de réentraînement à l'effort individualisé complété par des suivis diététiques, psychologiques ou encore de l'éducation thérapeutique. Cette technique est jugée comme une thérapeutique très efficace dans le traitement des maladies chroniques et notamment la BPCO (Grade A : Evidence Based Medicine) (Ries *et al.* 2007). Animée par un souci constant d'optimisation de la prise en charge et de la qualité de vie des patients, son activité de recherche vise à améliorer plus particulièrement les bénéfices de la réhabilitation respiratoire au niveau musculaire.

Dans ce sens, au sein du laboratoire « PhyMedExp », les orientations scientifiques générales de l'équipe travaillant plus spécifiquement sur la BPCO portent sur l'identification et la compréhension des mécanismes impliqués dans la dysfonction musculaire périphérique contribuant à la diminution de la capacité d'exercice des patients. Parmi l'ensemble des

mécanismes, les précédents travaux de notre équipe ont notamment permis de mettre en évidence l'existence d'un stress oxydant systémique et musculaire directement impliqué dans l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO. Néanmoins, malgré plus de 10 ans de travaux par des équipes de recherche internationalement reconnues, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de thérapeutique efficace permettant de diminuer le stress oxydant et d'optimiser les bénéfices de la réhabilitation respiratoire chez des patients BPCO.

Ainsi, ce travail de thèse s'est inscrit dans la problématique générale de la caractérisation de l'atteinte musculaire périphérique et des mécanismes sous-jacents, plus particulièrement le stress oxydant, ainsi que l'identification d'outils permettant d'améliorer l'ensemble de ces paramètres.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une revue complète de la littérature permettant d'identifier les questions scientifiques qui restent en suspens dans ce domaine et de définir des objectifs de recherche à la fois originaux et pertinents d'un point de vue clinique.

Dans la seconde partie, nous présenterons les méthodologies ainsi que les résultats issus de la mise en place de protocoles de recherche permettant de répondre aux objectifs définis et qui ont donné lieu à des publications acceptées ou soumises.

Enfin, nous terminerons par une discussion visant à synthétiser nos résultats et de déterminer les perspectives ouvertes par ces travaux.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
AVANT-PROPOS	4
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
1^{ERE} PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	10
INTRODUCTION GENERALE.....	11
I/ LA BPCO : UNE MALADIE COMPLEXE A POINT DE DEPART RESPIRATOIRE	13
1) <i>Facteurs de risque et diagnostic</i>	13
2) <i>Mécanismes physiopathologiques de l'atteinte respiratoire</i>	16
a) Atteinte des grosses et petites voies aériennes.....	16
b) Atteinte du parenchyme pulmonaire.....	17
c) Altération des échanges gazeux.....	18
3) <i>Une maladie évolutive : entre hétérogénéité et comorbidités</i>	19
II/ L'ATTEINTE MUSCULAIRE PERIPHERIQUE : UNE REPERCUSSION SYSTEMIQUE MAJEURE DANS LA BPCO	23
1) <i>Caractéristiques cliniques de l'atteinte musculaire périphérique</i> :.....	23
a) Définitions et diagnostics de la dysfonction musculaire périphérique	23
b) Définition et diagnostic de l'atrophie musculaire	26
c) Impact sur la tolérance à l'effort et les facteurs pronostiques de la BPCO	29
2) <i>Caractéristiques physiopathologiques de l'atteinte musculaire périphérique</i> :	32
a) Aspect qualitatif : altération structurale du muscle périphérique	32
b) Aspect quantitatif : déséquilibre de la balance atrophie/hypertrophie musculaire	35
c) Atteinte de la composante centrale de la fonction musculaire périphérique	38
3) <i>Facteurs étiologiques</i> :	41
a) La réduction de l'activité physique : un rôle majeur mais.....	41
b) D'autres facteurs impliqués : vers l'étude du stress oxydant ?.....	42
III/ LE STRESS OXYDANT : UN ROLE CLE DANS L'ATTEINTE MUSCULAIRE PERIPHERIQUE	45
1) <i>Espèces oxygénées réactives et stress oxydant : entre adaptations « physiologiques » et effets délétères</i>	46
a) Espèces oxygénées réactives : différentes formes et sources	46
b) Un système antioxydant complexe	49
c) Déséquilibre de la balance : dommages cellulaires	54
d) Régulation des EOR : un stress oxydant « physiologique » ?	57
2) <i>Qu'en est-il du stress oxydant dans la BPCO ?</i>	61
a) Espèces oxygénées réactives et dommages oxydatifs cellulaires	61

b)	Défenses en antioxydants : des données discordantes	63
c)	Comment expliquer ces discordances dans la BPCO ?	67
d)	Implication dans l'atteinte musculaire périphérique	69
3)	<i>Comment lutter contre l'atteinte musculaire périphérique et le stress oxydant dans la BPCO ?</i>	75
a)	La réhabilitation respiratoire	75
b)	Supplémentation en antioxydants : un équilibre complexe	80
c)	Effets d'une supplémentation en antioxydants combinée au REE	84
2^{EME}	PARTIE : CONTRIBUTION PERSONNELLE	88
I/	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	89
II/	METHODOLOGIE GENERALE	91
III/	CONDUITE DES RECHERCHES ET RESULTATS	94
1)	<i>Liste des publications et communications</i>	94
2)	<i>Travaux personnels</i>	96
a)	Etude 1 : « Hétérogénéité des profils du stress oxydant systémique dans la BPCO : un rôle potentiel du genre »	96
b)	Etude 2: « Valeurs de références pour la taille et la proportion des fibres du vaste latéral chez des sujets sains âgés de plus de 40 ans : une revue systématique et méta-analyses »	100
c)	Etude 3 : « Supplémentation en antioxydants chez les patients BPCO : une solution pertinente pour optimiser les effets de la réhabilitation respiratoire sur l'atteinte musculaire périphérique »	103
	DISCUSSION & PERSPECTIVES	197
	CONCLUSION GENERALE	206
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	208
	RESUME	231

Liste des abbréviations

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive
GOLD : Global initiative for chronic obstructive lung disease
ATS : American thoracic society
ERS : European respiratory society
LIN : limite inférieure de la normale
LSN : limite supérieure de la normale
REE : réentraînement à l'effort
PR : programme de réhabilitation respiratoire
ANC : apport nutritionnel conseillé
VEMS : volume expiratoire maximale au cours de la 1^{ère} seconde
CV : capacité vitale
O₂ : oxygène
PaO₂ : pression artérielle en oxygène
SpO₂ : saturation artérielle en oxygène
IRC : insuffisance respiratoire chronique
HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
FMIV : force maximale isométrique volontaire
IMC : indice de masse corporelle
MM : masse maigre
IMM : indice de masse maigre
Tlim : temps limite d'endurance
BIA : impédancemètre bioanalytique
SSt : surface de section transversale
Wsl : puissance maximale aérobie
Vo_{2sl} : consommation maximale d'oxygène – symptômes limités
SV_I : seuil ventilatoire 1
TDM6 : test de marche de 6 minutes
EFx : épreuve d'effort maximale
PPAR : peroxisome proliferator activated receptor
PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
ATP : adénosine triphosphate
MAPKs : mitogen-activated protein kinases
VEGF-A : vascular endothelial growth factor
TSP-1 : thrombospondine 1
CS : citrate synthase
CoX : cytochrome c oxydase
Tfam : mitochondrial transcription factor A

NF-κB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Atrogin-1 : muscle atrophy F-box
MuRF1 : muscle-specific ring finger 1
Nedd4 : neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
UPS : ubiquitin-proteasome system
MSTN : myostatin
FOXO : forkhead box O
IGF-1 : insulin-like growth factor-1
PI-3K : phosphatidylinositol 3-kinases
Akt : serine/threonine protein kinase Akt
mTOR : mammalian target of rapamycin
P70S6K : ribosomal protein S6 kinase
GSK3 β : glycogen synthase kinase 3β
EOR : espèce oxygénée réactive
ADN : acide désoxyribonucléique
Redox : balance pro-oxydant/antioxydant
 $O_2^{\bullet -}$: anion superoxyde
 $OH^{\bullet}$: radical hydroxyle
RL : radical libre
 H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
 Fe^{2+} : fer
 O_3 : ozone
 $NO^{\bullet}$: monoxyde d'azote
 $ONOO^{\bullet}$: peroxydite
 $NO_2^{\bullet}$: dioxyde d'azote
SOD : superoxyde dismutase
GPx : glutathion peroxydase
 Cu^{2+} : cuivre
Zn : zinc
Se : sélénium
Mn : manganèse
GSH : glutathion réduit
GSSH : glutathion oxydé
Gr : glutathion reductase
Fonction -OOH : hydroperoxydes lipidiques
MDA : malondialdéhyde
4-HNE : 4-hydroxynonanal
TBAR : acide thiobarbiturique
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
NAC : N-acétylcystéine

1^{ère} Partie : REVUE DE LA LITTERATURE

Introduction générale

A l'heure actuelle, le tabac est considéré comme l'un des principaux facteurs de risque des maladies chroniques non transmissibles, dont l'une d'entre elles, encore trop peu connue du grand public, est **la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)**. La BPCO touche environ 9% de la population mondiale de plus de 45 ans et représente la 4^{ème} cause de mortalité avec 3 millions de décès par an (Murray and Lopez 2013 ; Vestbo *et al.* 2013). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, contrairement à d'autres pathologies comme les coronaropathies ou les accidents vasculaires cérébraux, la BPCO est la seule cause de mortalité en constante progression ce qui en fait un **problème majeur de santé publique**. Dans ce sens, il a été mis en place en France entre 2005 et 2010, un plan afin de « connaître, prévenir et mieux prendre en charge la BPCO ». Par manque de connaissance et de prise en considération des premiers symptômes de la maladie (toux, essoufflement), la BPCO est encore sous-diagnostiquée (Soriano *et al.* 2009 ; Hvidsten *et al.* 2010) ce qui laisse présager des données épidémiologiques plus inquiétantes dans les années à venir.

Au-delà de ces chiffres, comme son nom l'indique, la BPCO est une **maladie chronique** qui évolue plus ou moins rapidement au fil des années. Avec le terme « chronique », nous pouvons aussi associer les concepts de maladie « **hétérogène** » et « **composite** ». En effet, la BPCO ne se résume pas à l'atteinte primaire bronchique, puisque son évolution peut induire l'apparition de différentes comorbidités (e.g. maladie cardiovasculaire, syndrome d'apnée du sommeil, troubles métaboliques etc.) ou des répercussions systémiques telles que la perte de poids et la dysfonction musculaire périphérique contribuant à accroître l'importante hétérogénéité décrite dans cette maladie. Ainsi, la BPCO se caractérise par la présence de déficiences fonctionnelles à différents niveaux de l'organisme, réduisant les capacités d'exercices et la participation sociale des personnes atteintes. Il est bien admis que **d'ici 2020, la BPCO sera placée au 5^{ème} rang des causes de handicap** (Murray and Lopez 2013). L'amélioration et la prise en charge de ces comorbidités par des interventions efficaces constitue un réel enjeu notamment économique puisque la BPCO se situerait également en 2020 au 5^{ème} rang des pathologies les plus coûteuses au niveau mondial (Murray and Lopez 2013).

Parmi l'ensemble des répercussions systémiques, la présence d'une **atteinte musculaire périphérique** est clairement établie dans la BPCO. Elle se caractérise par une diminution d'au moins une des deux principales fonctions du muscle : la force et l'endurance musculaire. La production de force dépend essentiellement de la masse musculaire alors que l'endurance est déterminée par les capacités du métabolisme oxydatif du muscle. Ces deux fonctions peuvent être évaluées en pratique clinique à partir de différents outils présentés au cours du présent manuscrit. Cette atteinte musculaire périphérique joue un rôle majeur dans l'évolution de la sévérité de la maladie de par son impact sur la tolérance à l'effort mais aussi sur le pronostic vital des patients atteints de BPCO (Celli *et al.* 2015). De nombreux facteurs liés notamment aux comportements de santé tels que l'inactivité physique, la nutrition ou encore le tabagisme peuvent modifier les paramètres musculaires des patients (Celli *et al.* 2015). Cependant, des données rapportent que ces facteurs liés au mode de vie ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des altérations musculaires observées. Par exemple, le réentraînement à l'effort, inclus dans un programme complet de réhabilitation respiratoire, est considéré comme un outil indispensable afin d'améliorer l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO mais les bénéfices restent limités. Ainsi, même si l'idée fait toujours débat, le concept de « myopathie », avancé dans la littérature, suggère des atteintes musculaires intrinsèques spécifiques de la BPCO (Couillard et Préfaut 2005 ; Maltais *et al.* 2014). Parmi ces mécanismes physiopathologiques sous-jacents, le **stress oxydant** est non seulement considéré comme ayant un rôle clé (Koechlin *et al.* 2004) mais aussi comme étant un mécanisme commun à l'ensemble des facteurs étiologiques identifiés (Gea *et al.* 2013). Face à la complexité du stress oxydant, une meilleure caractérisation et compréhension des mécanismes d'action restent nécessaires. Cette nouvelle compréhension permettra à terme de proposer des interventions thérapeutiques adaptées susceptibles de diminuer l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO.

I/ La BPCO : une maladie complexe à point de départ respiratoire

1) Facteurs de risque et diagnostic

- *Facteurs de risque :*

Comme son nom l'indique, la BPCO est avant tout une maladie pulmonaire et les bronches constituent le premier organe atteint. Même si les causes précises ne sont pas totalement connues, les données récentes de la littérature permettent d'avancer le fait que cette maladie résulte de l'interaction entre des facteurs de risque irritant les bronches et des prédispositions génétiques.

En première ligne, **le tabagisme** constitue le principal facteur de risque puisqu'il serait en cause chez 80 à 90% des patients (Amigo *et al.* 2006). De part sa composition en agents irritants et en radicaux libres de l'oxygène, le tabac va directement altérer la paroi bronchique. Ces risques sont aussi mis en évidence chez les fumeurs passifs (Eisner *et al.* 2010). De plus, le tabac est non seulement un facteur causal mais aussi un facteur aggravant la BPCO avec notamment des relations étroites entre la quantité/l'ancienneté des consommations et la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Lokke *et al.* 2006). Comme précisé en introduction, la prévalence de la BPCO ne cesse d'augmenter. Historiquement la BPCO était considérée comme une maladie essentiellement masculine mais depuis une trentaine d'années, il est observé une **augmentation de la prévalence et du taux de mortalité chez les femmes** en lien avec une augmentation de la consommation de tabac (Gan *et al.* 2006). Le **sevrage tabagique** représente d'ailleurs la thérapeutique la plus efficace pour prévenir et limiter la progression de l'atteinte pulmonaire de cette maladie (Vestbo *et al.* 2013).

Cependant, le tabac n'est pas le seul responsable puisque d'autres facteurs environnementaux (Vestbo *et al.* 2013) ont été identifiés tels que :

- **la combustion de biomasse** utilisée notamment dans les pays en voie de développement
- **les polluants d'origine professionnelle** comme l'amiante, le charbon, les solvants...
- **la pollution atmosphérique** (gaz d'échappement, fumées d'usine etc.) est également mise en cause.

Par ailleurs, il est bien admis qu'il existe une importante variabilité dans la susceptibilité aux irritants bronchiques, notamment au tabac, puisque l'on considère que seulement 25 à 50% des fumeurs vont développer une BPCO (Lundback *et al.* 2003). Ces données suggèrent plus particulièrement l'existence de **prédispositions génétiques** (Silverman *et al.* 2011). A l'heure actuelle, seul un déficit en α -1 anti-trypsine a été clairement identifié comme facteur génétique (Ekeowa *et al.* 2009) mais ce déficit est rare car il concerne seulement 1 à 3% des cas de BPCO. Les recherches dans ce domaine n'en sont qu'à leur début car même si certains gènes tels que le STAT1, HHIP ou FAM13A ont été identifiés, leurs implications dans le développement de la BPCO restent à prouver.

Pour expliquer cette variabilité de réponse aux facteurs étiologiques de la BPCO, le genre semble être aussi un paramètre à prendre en compte. De façon intéressante, Dransfield *et al.* (2006) ont montré que les femmes BPCO que ce soit d'origine Africaine ou Américaine, présentent une sévérité, une précocité de l'atteinte pulmonaire et une mortalité plus importante que les hommes à consommation tabagique égale.

- *Diagnostic :*

Que ce soit pour les hommes ou les femmes, même s'ils apparaissent à des âges et des intensités différents, les premiers signes cliniques évocateurs de la maladie sont similaires et « insidieux ». En effet, les premiers symptômes tels que la toux ou encore les expectorations liées à l'irritation des bronches sont bien souvent négligés par les patients. Ainsi, au fil des années l'obstruction bronchique va se mettre en place entraînant l'apparition du principal signe clinique de la BPCO : **la dyspnée**.

D'un point de vue médical, l'évaluation des symptômes, notamment de la dyspnée (e.g. échelles du Medical Research Council (MRC) ou son adaptation Française, l'échelle de Sadoul), combinée à l'analyse de l'exposition aux différents facteurs de risques constituent une première étape vers le diagnostic final de la BPCO.

Selon la définition des sociétés savantes (ATS : American Thoracic Society et ERS : European Respiratory Society) et la Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD), la composante respiratoire de la BPCO est caractérisée par « **une limitation persistante et progressive des débits bronchiques associée à une réponse inflammatoire anormale des voies aériennes et du poumon à des particules ou des gaz nocifs** » (Vestbo *et al.* 2013).

Cette limitation des débits bronchiques est mise en évidence à l'aide d'une **épreuve fonctionnelle respiratoire : la spirométrie**. Lors de cet examen, l'existence d'un déficit ventilatoire obstructif est défini lorsque le rapport entre le Volume Expiratoire Maximal au cours de la 1^{ère} seconde (VEMS) et la capacité vitale (CV) est inférieur à 70%. Ce rapport VEMS/CV est aussi appelé le **rapport de Tiffeneau**. Le diagnostic final de la BPCO est posé seulement après un test de réversibilité (inhalation d'un bronchodilatateur bêta-2 adrénergique) et un rapport de Tiffeneau toujours inférieur à 70%.

La sévérité de l'atteinte pulmonaire est répartie en 4 stades définis selon la GOLD (Vestbo *et al.* 2013) en fonction du VEMS exprimé en pourcentage de la valeur prédite. Les 4 stades sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous :

Stades	Obstruction Bronchique	EFR
Obstruction : VEMS/CV < 70%		
1	Légère	VEMS/Th $\geq$ 80%
2	Modérée	$50\% \leq \text{VEMS/Th} < 80\%$
3	Sévère	$30\% \leq \text{VEMS/Th} < 50\%$
4	Très sévère	VEMS/Th < 30% ou VEMS/Th $\leq$ 50% + insuffisance respiratoire chronique

Tableau 1. Classification GOLD de la sévérité de l'obstruction bronchique dans la BPCO (Vestbo *et al.* 2013) selon le volume expiratoire maximal au cours de la 1^{ère} seconde rapporté à sa valeur théorique (VEMS/Th).

2) Mécanismes physiopathologiques de l'atteinte respiratoire

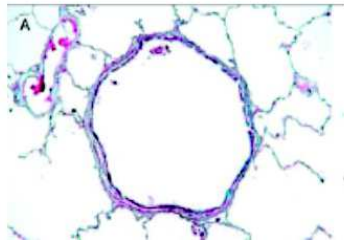
Même si l'ensemble des mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore connus, une « **réponse inflammatoire anormale** » semble être à l'origine d'un remodelage et d'altérations irréversibles des bronches (Decramer *et al.* 2012). En effet, les lésions tissulaires causées par les irritants bronchiques favorisent la perméabilité des parois aux particules exogènes provoquant ainsi un recrutement important de cellules inflammatoires (Barnes et Celli, 2009). Comparativement à des sujets sains, il est observé dans la BPCO, une augmentation des marqueurs de l'inflammation au niveau pulmonaire (e.g. lymphocytes CD8, neutrophiles, macrophage etc.) corrélés à la sévérité de la maladie (Hogg *et al.* 2004).

Les atteintes structurales sont retrouvées à **tous les niveaux de l'arbre bronchique**, et leurs natures varient non seulement d'un patient à un autre mais aussi en fonction du territoire lésé.

a) Atteinte des grosses et petites voies aériennes

Chez les patients BPCO, que ce soit au niveau des grosses ou des petites voies aériennes, la réponse inflammatoire induit une **hypersécrétion de mucus** liée à une augmentation du nombre de cellules calciformes (productrices de mucus), une diminution des cellules ciliées (transport du mucus) et une hypertrophie des glandes de la sous-muqueuse bronchique (Zhu *et al.* 2004). Au niveau des grosses voies aériennes, cette hypersécrétion de mucus peut être évacuée par la toux et l'expectoration qui sont les premiers symptômes de la maladie. Mais les limitations respiratoires du patient BPCO (mises en évidence lors de la spirométrie) sont essentiellement liées au **remodelage des petites voies aériennes** et ce dès les stades précoces de la maladie (Similowski *et al.* 2004). En effet, au niveau des petites voies aériennes, l'accumulation de mucus (ne pouvant pas être évacué par la toux et l'expectoration) combinée à une fibrose et un épaissement de la paroi musculaire lisse entraîne une **diminution progressive de la lumière bronchique** et donc des flux respiratoires (Hogg *et al.* 2004) (cf. Figure 1).

Bronche « normale »



Obstruction

*Limitation progressive
des débits bronchiques*

Bronche BPCO



Figure 1 Illustration anatomique du remodelage et des altérations au niveau des voies aériennes causées par la réponse inflammatoire chez les patients BPCO (à droite) comparativement à des sujets sains (à gauche). Chez les patients BPCO, la muqueuse et la paroi sont épaissies de façon irrégulière contribuant à la diminution de la lumière bronchique et donc à l'obstruction bronchique.

b) Atteinte du parenchyme pulmonaire

Lorsque la réponse inflammatoire induit des lésions anatomiques au niveau du parenchyme pulmonaire, on parle d'**emphysème**. Cette maladie secondaire à la BPCO, se caractérise par une augmentation permanente du volume des espaces aériens distaux, associée à une **destruction des parois alvéolaires ainsi que des structures péri-alvéolaires** (réseaux capillaires) (Hogg and Timens, 2009). Les poumons des patients qui atteignent ce stade, perdent de leur élasticité et de leur efficacité dans la mécanique ventilatoire. De façon simplifiée, ces atteintes du parenchyme pulmonaire vont conduire à une limitation plus spécifique de la mécanique expiratoire et ce même au repos. Ainsi, l'air inspiré par le patient n'est pas totalement expiré ce qui entraîne une augmentation du volume d'air contenu dans les voies aériennes après une expiration spontanée (augmentation de la capacité résiduelle fonctionnelle). Ce phénomène est appelé **hyperinflation statique** ou distension thoracique. Il en résulte une diminution progressive des espaces aériens disponibles conduisant donc à une altération des échanges gazeux. A noter que l'hyperinflation peut se manifester lors d'un effort nécessitant une augmentation de la ventilation, on parle alors d'**hyperinflation dynamique**.

c) Altération des échanges gazeux

L'ensemble des altérations décrites à tous les niveaux de l'appareil pulmonaire et même de sa vascularisation (Peinado *et al.* 1999), contribuent à perturber les échanges gazeux qui résultent de 4 phénomènes : 1) **la ventilation alvéolaire** (quantité de gaz atteignant les alvéoles), 2) **la diffusion alvéolo-capillaire**, 3) **la perfusion des alvéoles** (écoulement sanguin dans les capillaires irriguant les alvéoles) et 4) **le rapport ventilation/perfusion** (adéquation entre la ventilation alvéolaire et la perfusion pulmonaire)

Ces altérations des échanges gazeux peuvent induire chez certains patients une diminution anormale du contenu artériel en O₂ : c'est l'**hypoxémie**, qui peut être **chronique ou seulement induite par l'effort**. L'hypoxémie est évaluée à partir de la mesure de la pression artérielle en O₂ (PaO₂) obtenue par un prélèvement artériel ou à défaut capillaire sur sang et d'une analyse des gaz du sang (gazométrie). Cette technique étant invasive, il est possible d'obtenir une mesure indirecte du contenu artériel en O₂ grâce à un saturomètre/oxymètre (SpO₂). Cet outil est principalement utilisé dans le cadre de programmes de réentraînement à l'effort afin de mettre en évidence des **désaturations induites par l'exercice**.

Dans la littérature, la définition des degrés d'hypoxémie est très variable selon les auteurs mais de façon simplifiée, il apparaît qu'un patient BPCO est atteint d'hypoxémie chronique modérée lorsque sa PaO₂ de repos est comprise entre 60 et 70 mmHg. En dessous de 60mmHg, l'hypoxémie chronique est considérée comme sévère. Cette forme d'hypoxémie est considérée comme une des atteintes les plus sévères de la maladie conduisant le patient au stade d'insuffisance respiratoire chronique (IRC) (PaO₂ < 55 mmHg). Pour autant, la répétition des hypoxémies induites par l'exercice peut entraîner des répercussions systémiques similaires aux hypoxémies chroniques. En effet, ces hypoxémies peuvent entraîner une diminution de l'apport d'O₂ (hypoxie tissulaire), contribuant au développement d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Barbera *et al.* 2000), d'une insuffisance cardiaque (Barbera *et al.* 2003) ou encore une altération des fonctions cognitives (Grant *et al.* 1982). La littérature rapporte également des répercussions au niveau de la **fonction musculaire périphérique** (cf 1^{ère} partie : II.3.b du présent manuscrit).

A l'heure actuelle, concernant la prise en charge des hypoxémies, les sociétés savantes (Qaseem *et al.* 2011) recommandent l'utilisation d'une oxygénothérapie de longue durée seulement chez les BPCO présentant une insuffisance respiratoire chronique (PaO₂ ≤

55mmHg ou $SpO_2 \leq 88\%$ au repos) du fait des bénéfices démontrés notamment sur le pronostic vital des patients (Geddes *et al.* 2008). En revanche, il n'existe pas de consensus concernant la correction des hypoxémies induites par l'exercice en lien avec les nombreux effets controversés reportés par la littérature.

3) Une maladie évolutive : entre hétérogénéité et comorbidités

Au niveau pulmonaire, l'évolution de la maladie est caractérisée par un **déclin progressif du VEMS**. Même si avec l'âge, la décroissance de cette fonction respiratoire est aussi observée chez des sujets sains, il est bien admis que ce processus est accéléré chez les patients BPCO (Fletcher et Peto, 1977). Cependant, la classification de la sévérité de la maladie uniquement par rapport au VEMS ne permet pas de mettre en évidence l'ensemble des profils de la maladie. Ainsi, depuis une vingtaine d'années, la vision des chercheurs a aussi évolué passant d'un point

de vue où le VEMS était LE facteur pronostic clé à un point de vue plus global considérant la BPCO comme une **maladie hétérogène et composite** (cf. figure 2). Cela signifie que la BPCO se caractérise par des différences interindividuelles que ce soit au niveau de l'atteinte pulmonaire ou des autres conséquences systémiques de la maladie. Dans ce sens, il a été récemment proposé une nouvelle classification de la

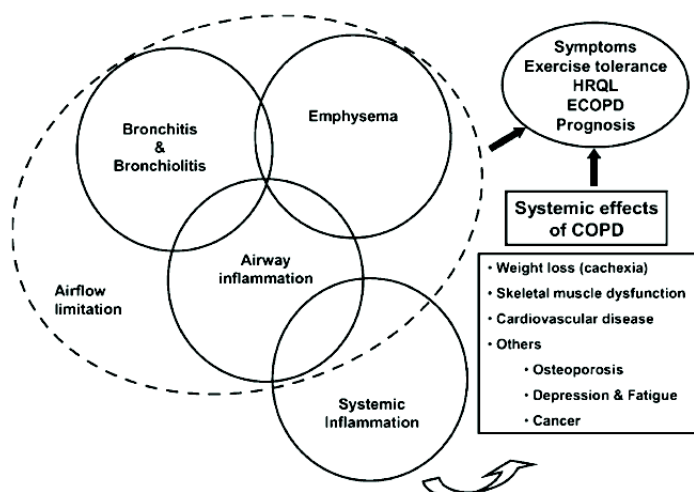


Figure 2. Représentation schématique du caractère composite de la BPCO. La partie gauche du schéma représente les différentes atteintes pulmonaires et la partie droite représente les répercussions systémiques de la BPCO. HRQL=Health-related quality of life (qualité de vie) ; ECOPD= Exacerbation COPD. (Agusti *et al.* 2011)

BPCO (catégories A à D) prenant en compte non seulement l'obstruction bronchique mais aussi l'évaluation des symptômes (échelle de dyspnée ou questionnaire de l'état de santé en 8 items) et le nombre d'exacerbations au cours de la dernière année. Cependant, les sociétés savantes européennes restent perplexes quant à son utilisation, du fait notamment de sa

complexité et de l'absence de considération des comorbidités, et attendent d'avantages d'études de validation prospective (Zysman et al, 2014)

Cette hétérogénéité de la BPCO a tout d'abord été identifiée au **niveau pulmonaire** car comme nous l'avons vu précédemment, la réponse inflammatoire peut se faire à différents étages. L'évolution des techniques d'imagerie, des explorations fonctionnelles respiratoires a permis de « confirmer » l'existence de **sous-groupes de patients BPCO** avec des caractéristiques physiopathologiques différentes non discernables par l'évaluation simple du VEMS. Cela a donc mené à la distinction clinique classique des patients dit « pink-puffer » et des patients dit « blue-boater » (Burrows *et al.* 1966). Les patients « pink-puffer » sont ainsi caractérisés par la présence d'un emphysème diminuant les possibilités d'échanges gazeux entre les poumons et la circulation sanguine. Chez ces patients, il est décrit une dyspnée plus importante notamment en lien avec les mécanismes d'hyperventilation permettant de compenser les altérations. En revanche, les patients « blue-boater » sont atteints plus particulièrement au niveau des bronches (hypersécrétion et accumulation de mucus) et caractérisés par la présence plus importante d'hypoxémie et d'exacerbations.

Cette identification de sous-groupes reflétant en partie l'hétérogénéité de la BPCO est à l'origine du concept de **phénotype** avancé depuis quelques années dans cette maladie. Selon Han *et al.* (2010), le concept de phénotype se définit de la façon suivante : une seule ou une combinaison de caractéristiques de la maladie permettant de décrire des différences entre les patients BPCO et qui sont reliées (évolution de la maladie, exacerbations, symptômes, réponse à un traitement etc.). L'intérêt de cette approche est donc d'identifier des sous-groupes de patients relativement « homogènes », c'est-à-dire avec des caractéristiques cliniques similaires, permettant d'optimiser la prise en charge des patients BPCO grâce à la mise au point de thérapeutiques adaptées.

Mais l'hétérogénéité décrite dans la BPCO n'est pas seulement la conséquence des différentes formes d'atteintes pulmonaires. Comme illustré dans la figure 2, de part sa chronicité et sa physiopathologie, la BPCO induit des **répercussions systémiques** qui entraînent à la fois une augmentation des effets délétères de l'atteinte pulmonaire (augmentation symptômes, diminution VEMS), mais aussi une diminution de la qualité de vie ainsi que du pronostic vital des patients (Barnes et Celli, 2009 ; Mannino *et al.* 2008). En cela, ces répercussions systémiques constituent de véritables **comorbidités**. Cette notion est retrouvée dans la

définition même de la BPCO (Vestbo *et al.* 2013) : « **une maladie que l'on peut traiter et prévenir, avec la présence de comorbidités contribuant à sa sévérité** ». La prise en charge de ces comorbidités constitue un élément clé afin notamment de limiter la progression de la maladie (Rabe *et al.* 2007). Par ailleurs, outre le fait qu'elles apparaissent indépendamment de la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Sin *et al.* 2006), elles sont plus fréquentes chez les BPCO que chez les sujets sains (Agusti *et al.* 2011). Dans une étude récente (Vanfleteren *et al.* 2013), ayant évalué la prévalence de 13 comorbidités connues dans la BPCO (cohorte de 213 patients), seulement 2,3% des patients ne présentent aucune comorbidité alors que plus de 50% en comptent au moins 4 (cf. Figure 3). Comme les auteurs le rapportent dans leur papier, les prévalences varient en fonction des comorbidités mais aussi d'une étude à une autre (Barnes et Celli 2009). Parmi l'ensemble des comorbidités, les prévalences les plus importantes sont retrouvées au

niveau des **pathologies cardiaques** (cardiopathie ischémique, insuffisance cardiaque, hypertension etc.).

Ces comorbidités cardiaques sont d'autant plus importantes qu'elles sont considérées comme les principales causes de décès chez les patients BPCO légers et modérés (Sin *et al.* 2006). Compte tenu des relations anatomiques et

fonctionnelles existantes entre le poumon et le cœur, ces atteintes cardiaques peuvent s'expliquer en partie par l'HTAP causée par l'inflammation, l'hypoxémie et l'hyperinflation pulmonaire (Barbera *et al.* 2000). Indépendamment du tabagisme, la BPCO constitue donc un réel facteur de risque des pathologies cardiaques qui dans certaines formes, comme la dysfonction ventriculaire gauche, peuvent multiplier par 2 le risque de mortalité (Macchia *et al.* 2007).

Par ailleurs, la BPCO peut aussi se caractériser par la présence chez certains patients de comorbidités à différents niveaux de l'organisme tels que le cancer pulmonaire, l'ostéoporose, le syndrome d'apnée du sommeil, les troubles métaboliques (obésité, diabète) ou encore les troubles cognitifs (anxiété, dépression) (Barnes et Celli 2009 ; Vanfleteren *et al.* 2013) :

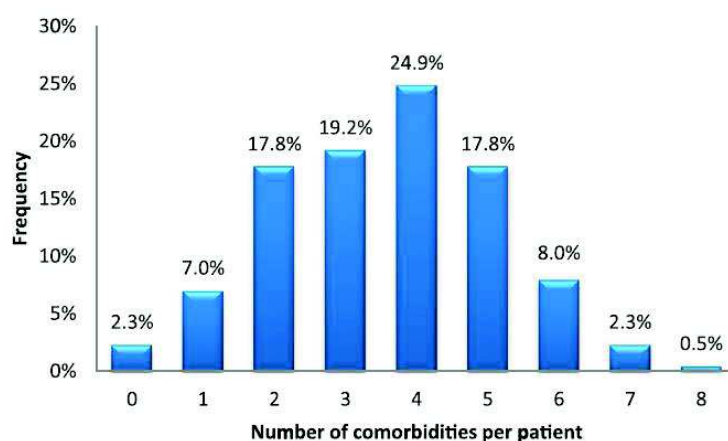


Figure 3. Nombre et prévalence de comorbidités par patient BPCO (Vanfleteren *et al.* 2013)

Enfin, la BPCO se traduit aussi par des répercussions au niveau des muscles périphériques (cf. Figure 3). Chez les patients BPCO, ces répercussions se caractérisent par la présence d'une **dysfonction associée ou non à une perte de masse musculaire** (Maltais *et al.* 2014). Regroupées sous le terme **d'atteinte musculaire périphérique**, ces répercussions systémiques ont particulièrement intéressé les scientifiques depuis quelques années du fait de leur rôle majeur dans la tolérance à l'effort (Seymour *et al.* 2010), la qualité de vie (Mostert *et al.* 2000) et le risque de mortalité des patients BPCO (Marquis *et al.* 2002 ; Swallow *et al.* 2007). Dans la suite de cette revue de la littérature, nous nous sommes attachés à caractériser cette atteinte musculaire périphérique chez les patients BPCO.

Ce qu'il faut retenir :

- La BPCO résulte de l'interaction entre des **facteurs environnementaux** (e.g. tabac, pollution etc.) et des **prédispositions génétiques**.
- La BPCO se caractérise par une **limitation progressive et persistante des débits bronchiques**. L'évaluation de l'obstruction bronchique est évaluée à partir de la mesure du VEMS.
- Des lésions et remodelages des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire contribuent à **altérer les échanges gazeux**. Ces atteintes sont à l'origine de l'**apparition** et de la **progression** de l'obstruction bronchique pouvant aboutir à l'insuffisance respiratoire chronique dans sa forme la plus sévère.
- La BPCO est une maladie **hétérogène** et **composite** dont une des principales comorbidités est l'**atteinte musculaire périphérique**.

II/ L'atteinte musculaire périphérique : une répercussion systémique majeure dans la BPCO

Comme décrit au niveau pulmonaire, la littérature rapporte une importante **hétérogénéité des atteintes au niveau des muscles périphériques** (Gosselink *et al.* 2000 ; Seymour *et al.* 2010). Cette hétérogénéité est non seulement retrouvée d'un patient à un autre mais aussi d'un muscle à un autre ce qui complexifie la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués. Ainsi, parmi l'ensemble des muscles squelettiques, les muscles des membres inférieurs semblent présenter une atteinte plus sévère que les muscles des membres supérieurs dans la BPCO (Bernard *et al.* 1998 ; Gosselink *et al.* 2000 ; Man *et al.* 2005). Chez les patients BPCO, la plupart des études ont porté jusqu'à présent sur l'analyse du quadriceps du fait de son implication majeure notamment dans la locomotion et de sa facile accessibilité par biopsie musculaire du vaste latéral externe du quadriceps plus spécifiquement. Ainsi, nous avons focalisé notre analyse de la littérature sur ce muscle afin de caractériser et déterminer les mécanismes impliqués dans l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO.

1) Caractéristiques cliniques de l'atteinte musculaire périphérique :

a) Définitions et diagnostics de la dysfonction musculaire périphérique

Selon Gea *et al.* (2001), cette atteinte musculaire intègre tout d'abord la présence d'une dysfonction musculaire caractérisée par une diminution d'au moins une des deux principales fonctions du muscle : **l'endurance et/ou la force musculaire** (Gea *et al.* 2001). Outre ces paramètres, même si la littérature est moins dense à ce sujet, nous discuterons de la **fatigue musculaire** décrite également chez les patients BPCO. A noter que la fatigue musculaire renvoie d'avantage à un phénomène transitoire alors que la diminution de l'endurance et de la force musculaire intègre la notion de chronicité. De plus, cette dysfonction musculaire périphérique peut être associée ou non à une **atrophie musculaire** chez certains patients BPCO.

- *La force musculaire*

La force musculaire peut se définir comme la **capacité d'un muscle à développer une brève contraction maximale**. Afin d'évaluer la force du quadriceps, il est possible d'utiliser différents outils tels que le dynamomètre portatif (Stone *et al.* 2011) ou encore la force « maximale sur une répétition » (1-RM). Mais pour ces techniques d'évaluation, certaines limites ont été mises en évidence (e.g. dépendant de l'expérience de l'évaluateur, de la machine utilisée, de la position du patient etc.) pouvant induire une variabilité et une mauvaise reproductibilité des résultats. Pour pallier ces limites, la mesure de la **force maximale isométrique volontaire du quadriceps (FMIV)** évaluée par un système de jauge de contrainte ou par un dynamomètre isocinétique informatisé, constitue une technique fiable, reproductible et retrouvée dans les dernières recommandations internationales (Maltais *et al.* 2014). De plus, il est important de noter que la mesure de la FMIV doit prendre en compte la distance du bras de levier constituant un paramètre important dans la production de force et plus particulièrement un couple de force exprimé en Newton-mètre (Nm) et non en kilogrammes (Kg).

NB : La méthodologie d'évaluation de la FMIV par un système de jauge de contrainte est présentée dans la partie « Contribution Personnelle » du présent manuscrit.

Indépendamment des outils d'évaluation utilisés, la littérature rapporte une diminution moyenne de la FMIV comprise entre 20 et 30% chez les patients BPCO, comparativement à des groupes contrôles de sujets sains (Bernard *et al.* 1998 ; Allaire *et al.* 2004). Cependant, la comparaison avec un groupe contrôle ne permet pas le diagnostic individuel d'une faiblesse musculaire. Afin d'établir ce diagnostic, il existe différentes équations prédictives déterminées à partir de données chez des sujets sains. Mais ces équations présentent certaines limites dont notamment l'absence de considération de la longueur du bras de levier lors de l'évaluation de la FMIV. En conséquence, Seymour *et al.* (2010) ont développé une équation (à partir d'une population de sujets sains) permettant de calculer la valeur prédite pour chacun des patients en fonction de l'âge, la taille, la masse maigre (MM) et le sexe identifiés comme des facteurs associés à la FMIV.

NB : $56.2 - (0.30 \times \text{âge}) + (0.68 \times \text{MM en Kg}) - (0.15 \times \text{taille en cm}) - (3.42 \text{ pour les femmes})$

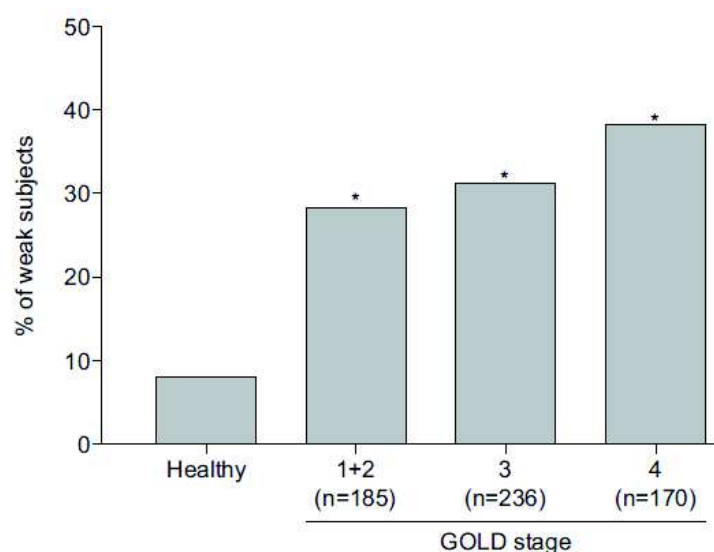


Figure 4. *Prévalence de faiblesse musculaire chez 212 sujets sains et 591 patients BPCO en fonction du stade de sévérité GOLD. La prévalence est augmentée dans l'ensemble des stades GOLD comparativement aux sujets sains. *: $p < 0.05$ par rapport au groupe « Healthy » (Seymour et al. 2010)*

Même si l'utilisation de cette équation prédictive est discutable notamment par le fait qu'elle n'explique que la moitié de la variance de la FMIV, cette étude reste à l'heure actuelle une référence dans le diagnostic de la faiblesse musculaire chez les patients BPCO. Dans cet article, les auteurs ont déterminé un seuil, à partir d'un intervalle de confiance fixé à 95%, permettant de comparer les mesures de FMIV effectuées chez chacun des patients par rapport aux valeurs prédites. Ainsi, cette étude rapporte une **faiblesse musculaire chez**

approximativement 30% des patients BPCO (cf. Figure 4). Nous pouvons voir sur la Figure 5 que cette faiblesse musculaire est présente à tous les stades de sévérité GOLD (basé sur le VEMS) de la maladie sans différence au niveau des prévalences.

- *L'endurance et la fatigue musculaire*

L'endurance musculaire se définit comme la capacité d'un muscle à **maintenir une charge sous-maximale pendant une période prolongée**. Dans la BPCO, de nombreuses méthodologies ont été utilisées pour évaluer l'endurance musculaire du quadriceps. Ces méthodologies varient notamment selon le type de contraction (isométrique, dynamique) et l'intensité de l'exercice (30, 40, 50 ou 60% de la FMIV). Une revue récente de la littérature a montré que le temps d'endurance limite du quadriceps (Tlim) était réduit chez les patients BPCO comparativement à des sujets sains contrôles indépendamment du protocole d'évaluation utilisé (Evans et al. 2015).

L'ensemble des études rapportent une diminution du Tlim allant de 30 à 75% (Serres et al. 1998 ; Couillard et al. 2003 ; Koechlin et al. 2004 ; Allaire et al. 2004 ; Van den Borst et al.

2012). Ainsi, même s'il n'existe pas de valeurs de référence pour déterminer la prévalence de patients BPCO ayant un Tlim faible, les pourcentages de réduction sont supérieurs à ceux retrouvés pour la force (entre 20 et 30%). De plus, la diminution du Tlim n'est pas forcément concomitante à une diminution de la FMIV (Vilaro *et al.* 2009 ; Allaire *et al.* 2004 ; Natanek *et al.* 2013). Ces données suggèrent donc que la mesure seule de la FMIV peut sous-estimer la prévalence d'une dysfonction musculaire périphérique chez les patients BPCO.

Par ailleurs, il est classiquement décrit chez les patients BPCO une **fatigue musculaire périphérique** (Mador *et al.* 2000). Cette fatigue se définit comme une réduction, induite par l'exercice, de la capacité du muscle à maintenir un niveau de charge donné (Barry et Enoka, 2007). La fatigue musculaire est un processus physiologique normal, mais pour un même exercice donné, il a été rapporté chez les patients BPCO une fatigue du quadriceps plus importante que celle retrouvée chez des sujets sains (Mador *et al.* 2003). Cette fatigue musculaire périphérique a été objectivée chez les patients BPCO notamment à partir de techniques telles que la stimulation magnétique ou l'électromyographie (Mador *et al.* 2000 ; Gosselink *et al.* 2003). De plus, cette fatigue musculaire est aussi traduite par une **diminution temporaire de la FMIV** rapportée chez 48 à 58% des patients BPCO suite à un exercice global (Mador *et al.* 2003 ; Saey *et al.* 2003).

b) Définition et diagnostic de l'atrophie musculaire

L'atrophie musculaire se définit simplement par une diminution du volume musculaire mais nous allons voir dans cette partie que son diagnostic apparaît plus complexe. Chez les patients BPCO, la masse musculaire est évaluée à partir de différentes techniques allant de l'estimation de la masse maigre totale à la mesure de la surface de section spécifique des fibres musculaires. Pour les méthodes d'évaluations globales ou « indirectes », il existe des valeurs seuils permettant de définir une situation de perte de masse musculaire regroupée sous le terme d'**atrophie**. Tout d'abord, pour évaluer la masse maigre (considérée comme un « reflet » de la masse musculaire), l'utilisation d'un impédancemètre bioanalytique (BIA) a été validée chez les patients BPCO (Schols *et al.* 1991). Par rapport aux valeurs seuils définies chez les patients BPCO (Schols *et al.* 1993), une masse maigre faible est déterminée pour un index de masse maigre (IMM) inférieur à 16 kg/m² pour les hommes et 15 kg/m² pour les femmes atteints de BPCO. Mais ces valeurs seuils présentent un certain nombre de

limites comme la détermination à partir d'un faible échantillon, composé uniquement de patients BPCO, sans prise en compte de l'âge et de l'IMC des sujets. Récemment, Franssen *et al.* (2014) ont établi des normes de référence de l'IMM plus satisfaisantes puisque définies à partir d'une large cohorte de sujets sains et intégrant les critères d'âge et d'IMC.

Plus spécifiquement, à partir de l'estimation de la masse maigre par BIA, Janssen *et al.* (2000) ont déterminé une équation permettant d'estimer la masse musculaire totale. Cette masse musculaire peut être aussi évaluée à partir d'autres outils d'évaluation comme la DEXA. Malgré les différences existantes entre les techniques d'évaluation et les « cut-off » utilisés, il est bien admis que 20 à 40% des patients BPCO présentent une atrophie musculaire (Jones *et al.* 2015 ; Vanfleteren *et al.* 2013 ; Mathur *et al.* 2014). Mais l'utilisation de ces paramètres « indirects » présente certaines limites. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, face à la répartition hétérogène des atteintes musculaires, il apparaît important d'évaluer l'atrophie musculaire plus spécifiquement au niveau local et notamment du quadriceps. Ainsi par des techniques de tomographie informatisée (Bernard *et al.* 1998) ou d'imagerie par résonance magnétique (Hajghanbari *et al.* 2011), les études rapportent une réduction de la surface de section transversale de la cuisse moyenne de 30% chez les patients BPCO comparativement à des sujets sains de même âge. Enfin, l'évaluation de l'atrophie musculaire peut aussi se faire par une mesure directe de la **surface de section transversale (SSt) des fibres musculaires** à partir de biopsies réalisées avec la technique de Bergström

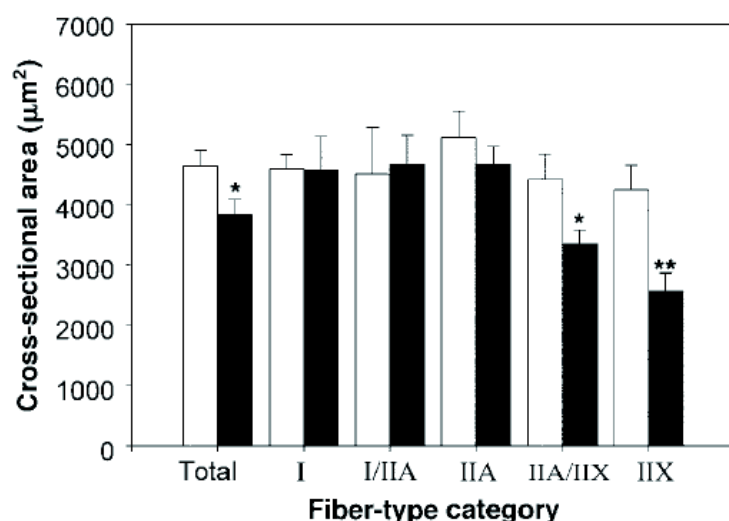


Figure 5. Surface de section par type de fibre chez des patients BPCO (barres noires) et des sujets sains (barres blanches) (Gosker *et al.* 2002)

(sur le vaste latéral externe du quadriceps) (1975). Comme illustré sur la figure 5, de nombreux auteurs retrouvent une diminution de la SSt des fibres musculaires des patients BPCO, qui semble atteindre plus particulièrement les fibres de type IIX du vaste latéral du quadriceps (Gosker *et al.* 2002 ; Natanek *et al.* 2013). Dans le contexte d'hétérogénéité décrit dans la BPCO, tous les patients ne

présentent pas une réduction de la SSt des fibres musculaires. Deux études récentes ont mis en

évidence un **phénotype de patients BPCO « atrophique »** caractérisé notamment par une diminution importante de la SSt des fibres musculaires du quadriceps (Gouzi *et al.* 2013 ; Natanek *et al.* 2013). Par ailleurs, dans leur étude, Natanek *et al.* (2013) mettent en avant que l'évaluation de l'atteinte musculaire périphérique et plus particulièrement de l'atrophie musculaire des patients BPCO ne peut se faire sans l'analyse de biopsies musculaires. En effet, les auteurs ont montré que les patients BPCO atrophiques, déterminés à partir de la mesure générale de l'IMM, ne présentaient aucune différence au niveau de la SSt de l'ensemble des types de fibres musculaires par rapport à des patients sans atrophie musculaire. Une catégorisation des patients basée uniquement sur des mesures indirectes et générales de la masse musculaire n'est pas le reflet des atteintes au niveau cellulaire et constitue une limite importante notamment dans l'analyse des mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire. Cela peut aussi expliquer certaines discordances décrites dans la littérature (cf. 1^{ère} Partie : II.2.a). Ces observations mettent en avant l'intérêt d'évaluer l'atrophie musculaire à partir d'une méthode de mesure directe de la SSt des fibres musculaires du quadriceps chez les patients BPCO. **Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de valeurs seuils spécifiques à la SSt des fibres musculaires du quadriceps permettant de définir précisément une situation d'atrophie musculaire dans cette population.**

L'atrophie musculaire est considérée comme l'un des principaux facteurs impliqués dans la faiblesse musculaire (Maltais *et al.* 2014). Outre les corrélations retrouvées entre la masse musculaire et la force du quadriceps (Seymour *et al.* 2010), certaines études ont montré que lorsque cette dernière est normalisée sur la masse musculaire (ou surface de section de la cuisse), il n'y a plus de différences entre les patients BPCO et des sujets sains (Bernard *et al.* 1998 ; Franssen *et al.* 2005). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les fibres de type IIx qui sont les plus atteintes chez les patients BPCO, or il est bien admis que ce type de fibres (dites fibres rapides ou glycolytiques) permettent de développer une force musculaire plus importante comparativement aux fibres de type I (dites lentes ou oxydatives) (Botinelli *et al.* 1996). L'ensemble de ces données mettent en avant une implication au moins partielle de l'atrophie musculaire dans la faiblesse musculaire et donc l'importance majeure de la précision de son diagnostic. A noter que nous verrons dans la suite de ce manuscrit que l'atrophie musculaire ne constitue pas le seul paramètre explicatif de l'atteinte musculaire périphérique et notamment de la faiblesse musculaire (cf. 1^{ère} Partie : II.2.c).

c) Impact sur la tolérance à l'effort et les facteurs pronostiques de la BPCO

- *Conséquences sur la tolérance à l'effort :*

Chez les patients BPCO, il est classiquement rapporté une diminution de la tolérance à l'effort caractérisée par des valeurs réduites de puissance maximale aérobie (W_{peak} ou W_{sl}) et de consommation maximale d'oxygène-symptômes limités (Vo_{2sl}) par rapport à des sujets sains (Vogiatzis *et al.* 1999). De façon similaire, la distance au test de marche de 6 minutes (TDM6) est aussi plus faible chez les patients BPCO comparativement à des sujets sains (Poulain *et al.* 2003). Comme décrit par Préfaut en 1995 à travers le concept du « cercle vicieux du déconditionnement », la tolérance à l'effort des patients BPCO a une **origine respiratoire mais aussi musculaire**.

Il a été ainsi montré que la **faiblesse musculaire est associée à la tolérance à l'effort des patients BPCO**. En effet, des études récentes rapportent que les patients BPCO présentant une faiblesse musculaire (Seymour *et al.* 2010) ou répondant aux caractéristiques d'un phénotype « atrophique » (Gouzi *et al.* 2013) ont une tolérance à l'effort plus faible (diminution distance au TDM6, W_{peak} ou W_{sl} et de la Vo_{2sl}) que ce soit par rapport à des patients BPCO sans atteinte musculaire périphérique ou des sujets sains.

Par ailleurs, il est considéré qu'entre 40 et 45% des patients décrivent une **fatigue musculaire ressentie dans les jambes comme leur cause d'arrêt de l'effort** (Killian *et al.* 1992). Ainsi la littérature rapporte une relation entre la Vo_{2sl} et la fatigue musculaire induite précocement au cours d'une Efx (Mador *et al.* 2000). Cette fatigue musculaire est elle-même associée à des anomalies de l'excitabilité et de l'activation des muscles périphériques pouvant intervenir avant l'apparition des limitations ventilatoires (Gosselink *et al.* 2000). Ces observations ont été faites que ce soit après un exercice sur cycloergomètre mais aussi à la marche. En effet, Marquis *et al.* (2009) ont montré des activités musculaires identiques entre les patients BPCO et des sujets sains mais les premiers avaient des valeurs de distance réalisées au TDM6 plus faibles.

- *Impact sur la qualité de vie et le pronostic vital*

Outre les conséquences sur la tolérance à l'effort, l'atteinte musculaire périphérique semble contribuer à **diminuer la qualité de vie** (Mostert *et al.* 2000) et **augmenter le**

recours aux soins de santé (Decramer *et al.* 1997) mais aussi **la mortalité** (Swallow *et al.* 2007 ; Marquis *et al.* 2002) bien que les relations de cause à effet n'ont pas été prouvées dans la BPCO. Mostert *et al.* (2000) ont notamment montré que les patients BPCO présentant des valeurs faibles d'index de masse maigre (inférieur à 15 Kg/m² pour les femmes et 16 Kg/m² pour les hommes) avaient des scores au « Saint George's Respiratory Questionnaire » plus élevés que les patients sans atteinte de la masse maigre.

Il a également été montré que des paramètres physiologiques musculaires comme la réduction

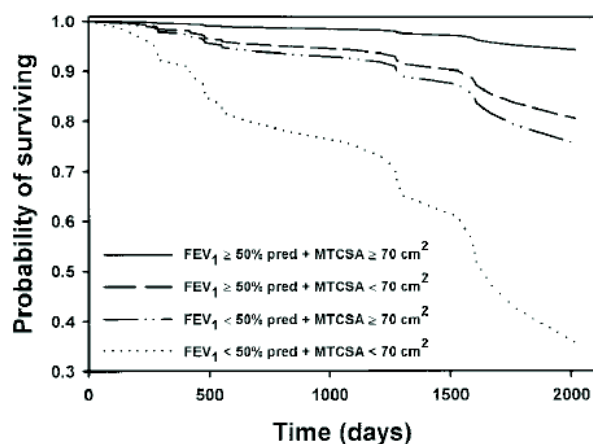


Figure 6. Courbes de survies établies chez 4 sous-groupes de patients BPCO déterminés en fonction du VEMS et de la CSA de la cuisse (Marquis *et al.* 2004)

de la SSt de la cuisse et la FMIV du quadriceps peuvent prédire la mortalité des patients BPCO et ce indépendamment de la sévérité de l'obstruction bronchique (cf. Figure 6). Les auteurs rapportent que chez des patients BPCO ayant un VEMS inférieur à 50% de la valeur prédite, ceux qui ont une SSt de la cuisse inférieure à 70 cm² ont une probabilité de survie à 5 ans de 35 % contre 80% pour les autres.

De la même façon, Swallow *et al.* (2007) rapportent que les patients BPCO ayant une faiblesse musculaire, définie comme un ratio force du quadriceps (en Kg) sur l'IMC inférieur à 120%, ont une probabilité de survie à 4 ans diminuée de 30% par rapport aux patients ayant une force du quadriceps « normale ».

Ce qu'il faut retenir :

- L'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO se caractérise fonctionnellement par une **diminution de la force**, de l'**endurance** et de la **masse musculaire** ainsi qu'une apparition précoce de la **fatigue contractile**.
- **L'importante hétérogénéité** de ces paramètres rapportée par la littérature chez les patients BPCO soulève l'intérêt de définir et de pouvoir identifier les patients ayant une atteinte musculaire périphérique par des **outils de diagnostic adaptés**.
- Plus spécifiquement, il apparaît indispensable **d'identifier les patients BPCO atrophiques** à partir de marqueurs cellulaires. Cependant, l'absence de **valeurs de références pour la SSt des fibres musculaires** du vaste latéral externe du quadriceps limite les approches thérapeutiques actuelles.
- Considérant les **répercussions** au niveau de la **tolérance à l'effort, la qualité de vie et l'espérance de vie** des patients BPCO, les mécanismes impliqués dans l'atteinte musculaire périphérique sont d'autant plus importants à comprendre et à prendre en considération.

2) Caractéristiques physiopathologiques de l'atteinte musculaire périphérique:

a) Aspect qualitatif : altération structurale du muscle périphérique

- *Remodelage typologique dans le quadriceps des patients BPCO*

Contrairement aux effets « classiques » du vieillissement, la dysfonction musculaire des patients BPCO se caractérise par un shift des fibres de type I vers les fibres de type II. En effet, plusieurs travaux ont montré une **réduction de la proportion des fibres de type I** au détriment d'une **augmentation de la proportion des fibres de type II** (Gosker *et al.* 2002 ;

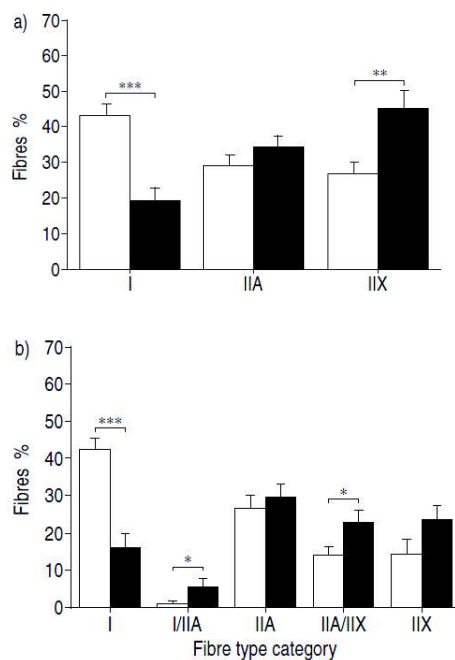


Figure 7. Répartition de la proportion de chaque type de fibres dans le quadriceps des patients BPCO (barres noires) et les sujets sains contrôles (barres blanches) (Gosker *et al.* 2002)

Van den Borst *et al.* 2012) (cf Figure 7). Plus spécifiquement, les auteurs suggèrent une transformation progressive chez les patients BPCO du fait de l'identification de fibres musculaires hybrides (type I/IIa et IIa/IIx) (Gosker *et al.* 2002).

De façon intéressante, Allaire *et al.* (2004) rapportent une corrélation positive et significative entre la proportion de fibres de type I du vaste latéral du quadriceps et le Tlim mais aussi avec le VEMS et la tolérance à l'effort évalués chez des patients BPCO (Gosker *et al.* 2007 ; Vogiatzis *et al.* 2011).

Même si les mécanismes moléculaires précis de ce remodelage typologique restent inconnus, certaines voies de signalisation ont été identifiées chez la souris ou chez des sujets sains mais restent au statut d'hypothèses chez les patients BPCO (Caron *et al.* 2009 ; Levine *et al.* 2013).

Tout d'abord, la famille des récepteurs nucléaires de peroxisome proliferator activated receptors (PPAR), et plus précisément **PGC1- α** (Coactivateur- α du récepteur- γ activé par les proliférateurs de peroxyssome) jouerait un rôle majeur dans la régulation du métabolisme oxydatif (Remels *et al.* 2008). Dans le quadriceps de patients BPCO, il a été montré une diminution de l'expression de PGC1- α

comparativement à des sujets sains contrôles et associée à la proportion de fibres de type I (Van den Borst *et al.* 2012 ; Remels *et al.* 2007).

D'autre part, la voie de signalisation des **protéines kinases MAPK** et notamment **ERK1/2** constituent aussi une hypothèse explicative du shift typologique observé chez les BPCO. Nous avons vu précédemment que ces protéines étaient surexprimées dans le quadriceps des patients BPCO (Debigaré *et al.* 2010 ; Doucet *et al.* 2007). Une étude expérimentale menée chez la souris a montré que le blocage de la voie de signalisation des protéines kinases MAPK induisait une augmentation de la proportion des fibres de type I ; en revanche, une surexpression de ERK1/2 entraîne les effets inverses (Chi *et al.* 2008).

Au même titre que la voie de $PG1-\alpha$ et la voie des MAPK, d'autres voies de signalisation telles que FoxO1 (Kamei *et al.* 2004) ou encore la calcineurine (Dunn *et al.* 2000 ; Nataneek *et al.* 2013) semblent constituer de potentielles cibles thérapeutiques pour limiter le shift des fibres de type I vers les types II retrouvé chez les patients BPCO mais les mécanismes restent encore peu clairs dans la BPCO.

▪ *La capillarisation musculaire*

La capillarisation (perfusion sanguine des fibres musculaires) des muscles est un facteur important dans la fonction musculaire périphérique. En effet, la capillarisation permet d'assurer l'apport en O_2 et en substrats énergétiques nécessaires à la cellule musculaire et notamment la mitochondrie afin de produire l'énergie suffisante sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), pour établir la contraction musculaire. Dans la BPCO, il a été rapporté une diminution du nombre de capillaires par fibre musculaire du quadriceps par rapport à des sujets sains contrôles (Gouzi *et al.* 2013) mais lorsque ce ratio est normalisé sur la SSt des fibres musculaires, il n'y a plus de différences entre les deux groupes. Cependant, Eliason *et al.* (2010), ont mis évidence une réelle **perturbation de l'interface capillaires/fibres** dans le muscle des patients BPCO. De façon intéressante, Gouzi *et al.* (2013) ont mis en évidence une corrélation positive entre le ratio capillaires/fibres et la Vo_{2sl} des patients BPCO. La formation (angiogénèse) ou l'altération des vaisseaux sanguins irriguant le muscle sont régulées par la balance entre les facteurs pro (VEGF-A : vascular endothelial growth factor A) et anti-angiogénique TSP-1 : Thrombospondine 1) (Hepple *et al.* 2000). Peu d'études se sont intéressées à ces marqueurs de la balance angiogénique dans la BPCO et les données rapportées sont controversées (Barreiro *et al.* 2008 ; Gouzi *et al.* 2013). D'avantage d'études

sont donc nécessaires afin de démontrer le rôle des facteurs impliqués dans la réduction de la capillarisation rapportée chez les patients BPCO.

▪ *Atteinte mitochondriale et des enzymes oxydatives*

A l'heure actuelle, même si la présence d'une réelle dysfonction mitochondriale reste controversée dans la BPCO (Rabinovich *et al.* 2007; Picard *et al.* 2008; Puente-Maestu *et al.* 2009), la littérature rapporte certaines anomalies qui peuvent contribuer à l'altération du métabolisme oxydatif (Maltais *et al.* 2000). Concernant la structure même des mitochondries, seuls Gosker *et al.* (2007) ont rapporté une **diminution de la densité mitochondriale** (nombre et surface des mitochondries) dans le quadriceps de patients BPCO par rapport à un groupe de sujets sains.

En revanche, de nombreuses études ont montré dans le quadriceps de patients BPCO, une diminution de **l'activité d'enzymes oxydatives** associée à une diminution du Tlim (cf. Figure

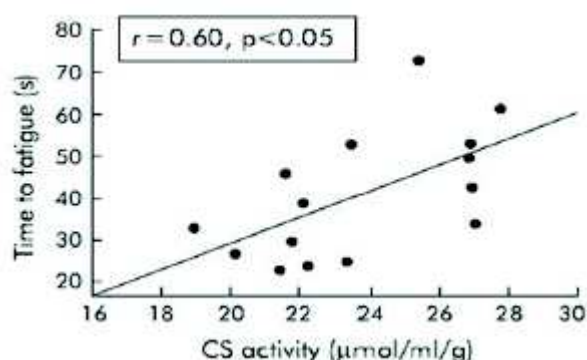


Figure 8. *Corrélation entre l'activité de la citrate synthase et l'endurance du quadriceps chez les patients BPCO (Allaire et al. 2004)*

8), comme la citrate synthase (CS) intervenant dans le cycle de Krebs, et la 3-hydroxyacyl-CoAdéshydrogénase (HADH), spécifique à la bêta-oxydation des lipides (Maltais *et al.* 2000 ; Green *et al.* 2008). Concernant la Cytochrome c oxydase (COX), enzyme terminale dans le transport des électrons au niveau de la chaîne mitochondriale, les données rapportées par la littérature sont plus contradictoires avec même certaines

études rapportant une suractivation de cette enzyme (Puente-Maestu *et al.* 2009 ; Maltais *et al.* 2000). De plus, Remels *et al.* (2007) ont montré une diminution chez des patients BPCO de l'expression de facteurs de transcriptions (et co-activateurs) mitochondriaux tels que PGC1- α ou encore Tfam (mitochondrial transcription factor A) suggérant une limitation de la biogénèse mitochondriale.

Concernant les enzymes glycolytiques comme la phosphofructokinase et le lactate déshydrogénase, leur activité ne semble pas altérée dans le quadriceps des patients BPCO (Van den Borst *et al.* 2013 ; Gosker *et al.* 2003) et est même parfois décrite comme augmentée (Green *et al.* 2008). Ainsi lorsque les études ont considéré le rapport enzymes

oxydatives/glycolytiques, une prédominance du métabolisme glycolytique s'exprime dans le quadriceps des patients BPCO (Green *et al.* 2008). Ces données vont dans le sens d'un **recours précoce aux mécanismes anaérobies** chez les patients BPCO mis en évidence que ce soit lors d'un effort maximal ou sous-maximal (Saey *et al.* 2011 ; Steiner *et al.* 2005).

Pour résumer, les patients BPCO présentent une altération du métabolisme oxydatif caractérisé par un shift des fibres de type I vers les fibres de type II, des déficits au niveau de la capillarisation et des capacités mitochondriales. Ces atteintes concourent donc plus spécifiquement à expliquer la diminution de l'endurance musculaire et de la tolérance à l'effort décrites chez les patients BPCO.

b) Aspect quantitatif : déséquilibre de la balance atrophie/hypertrophie musculaire

Au niveau cellulaire, la régulation de la masse musculaire est déterminée par **l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines**. Lorsque cette balance penche en faveur de la protéolyse (dégradation des protéines) sans qu'il n'y ait d'adaptations des mécanismes de synthèse protéique (régénération), cela entraîne une atrophie musculaire. De plus, la littérature met en avant un rôle additionnel de la balance entre l'apoptose et le recrutement (e.g. à partir des cellules satellites) des noyaux des myofibrilles (Langen *et al.* 2013). Du fait de la complexité des méthodes permettant de déterminer par des mesures directes les taux de dégradation/synthèse des protéines, les études chez les patients BPCO se sont intéressées essentiellement aux facteurs de régulation de ces voies de signalisation à partir de biopsies du vaste latéral du quadriceps. L'ensemble des facteurs et voies de signalisation étudiés dans la BPCO sont résumés dans la Figure 9 ci-dessous issue du papier de Langen *et al.* (2013). L'analyse des données de la littérature met en évidence une hétérogénéité des marqueurs des voies de signalisation de l'équilibre synthèse/dégradation des protéines. Ainsi, même si les critères « indirects » de détermination de l'atrophie musculaire utilisés dans la littérature présentent certaines limites, les résultats présentés ci-dessous correspondent aux différences observées au niveau du quadriceps (vaste latéral) chez des patients BPCO présentant une « atrophie » musculaire comparativement à un groupe contrôle soit de sujets sains et/ou des patients BPCO sans « atrophie » musculaire. Parmi les systèmes protéolytiques existant, **la voie Ubiquitine-Protéasome** constitue le principal mécanisme impliqué dans l'atrophie des patients BPCO (Lemire *et al.* 2012 ; Plant *et al.* 2010 ; Doucet *et al.* 2007 ; Fermoselle *et al.* 2012 ; Puig-Vilanova *et al.* 2015). Ce système fonctionne en deux

grandes étapes dans la protéolyse. La première étape est le marquage (ubiquitylation) des protéines à dégrader par trois types d'enzymes (des ligases) : Atrogin-1, MuRF1 et Nedd4. Le marquage se répète plusieurs fois, aboutissant à une chaîne d'ubiquitines. Ainsi, la protéine cible marquée par une chaîne polyubiquitinée d'au moins quatre unités est reconnue par le protéasome 26S qui va dégrader la protéine, constituant ainsi la seconde étape. Chez les patients BPCO présentant une perte de masse musculaire, il a été montré une augmentation de la quantité et l'expression d'atrogin-1 (Lemire *et al.* 2012 ; Plant *et al.* 2010 ; Fermoselle *et al.* 2012) et de l'expression de Nedd4 (Plant *et al.* 2010). Concernant MuRF1, les résultats sont plus controversés même si certaines études (Doucet *et al.* 2007 ; Fermoselle *et al.* 2012 ; Puig-Vilanova *et al.* 2015) rapportent une augmentation de la quantité mais pas de l'expression. Ces ligases sont régulées notamment par les 3 facteurs de transcription suivants : NF- κ B, FOXO-1 et 3 et les protéines kinases (MAPK : p38, ERK1/2 et JNK) (Glass *et al.* 2005). La littérature rapporte des niveaux augmentés chez les patients BPCO atrophiques que ce soit en termes de quantité ou d'expression (Debigaré *et al.* 2010 ; Doucet *et al.* 2007 ; Puig-Vilanova *et al.* 2015).

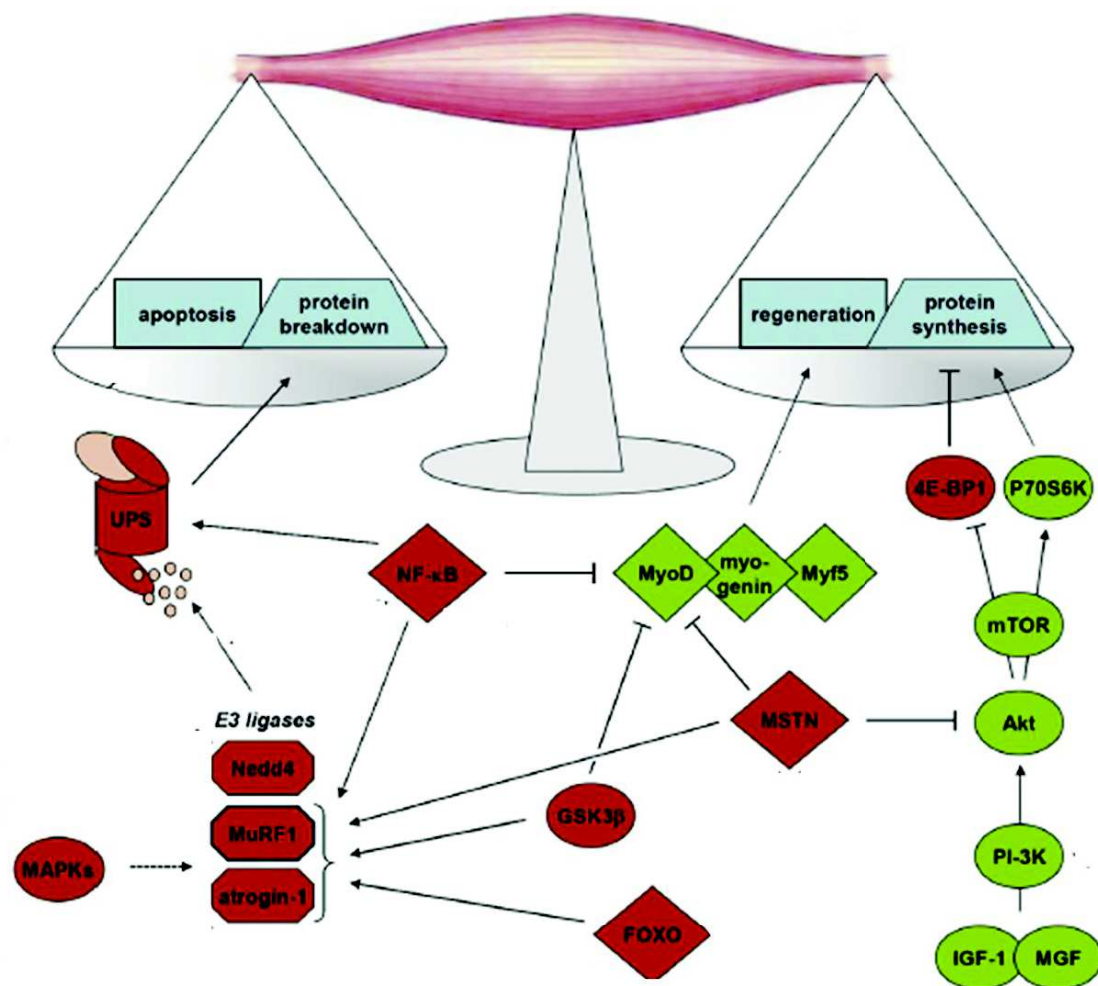


Figure 9. Représentation schématique des principales voies de signalisations impliquées dans la perte de masse musculaire chez les patients BPCO (Langen et al. 2013). Définition des abréviations : mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB), muscle atrophy F-box (atrogin-1), muscle-specific ring finger 1 (MuRF1), neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (Nedd4), ubiquitin-proteasome system (UPS), myostatin (MSTN), forkhead box O (FOXO), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), mechano growth factor (MGF), phosphatidylinositol 3-kinases (PI-3K) serine/threonine protein kinase Akt (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1), ribosomal protein S6 kinase (P70S6K), glycogen synthase kinase 3β (GSK3 β). (d'après Langen et al. 2013)

Concernant les autres systèmes protéolytiques, très peu d'études ont été réalisées chez les patients BPCO. Au niveau des systèmes des **calpaines et des caspases**, seul Gosker *et al.* (2003) n'ont rapporté aucune différence entre des patients BPCO sans signes d'atrophie musculaire et des sujets sains. En revanche, au niveau du système **autophagie-lysosome**, la seule étude réalisée à notre connaissance chez les patients BPCO, montre une augmentation

du nombre d'autophagosomes et de l'enzyme initiateur LC3B (Guo *et al.* 2013) comparativement à des sujets sains.

Au niveau de la **régulation de la synthèse protéique**, la voie IGF-1/Akt semble avoir un rôle important non seulement par une action d'anabolisme mais aussi d'inhibition de la protéolyse. Tout d'abord, il a été montré une augmentation de l'expression d'IGF-1 chez les patients BPCO ayant une perte de masse musculaire (Vogiatzis *et al.* 2010). En ce qui concerne Akt, les données sont plus hétérogènes car seul Doucet *et al.* (2007) rapportent une augmentation de la forme phosphorylée d'Akt (forme active) et d'un de ces effecteurs, 4E-BP1, signifiant une augmentation de l'activité de cette voie en réponse à la présence d'atrophie musculaire chez les BPCO. Les auteurs interprètent ce résultat comme une tentative d'adaptation cellulaire afin de restaurer la masse musculaire des patients atrophés. Toutefois, à ce jour, l'existence d'une augmentation de la synthèse protéique au niveau musculaire n'a jamais été démontrée dans la BPCO (Remels *et al.* 2013).

En revanche, même si les mécanismes d'activation et de prolifération des cellules satellites (régénération musculaire) ne semblent pas altérés chez les patients BPCO que ce soit *in vivo* (Menon *et al.* 2012) ou *in vitro* dans un modèle de culture cellulaire (Pomiès *et al.* 2015), les facteurs de différenciation myogénique et de fusion des myoblastes (étapes essentielles dans la formation des fibres musculaires) apparaissent diminués chez des patients BPCO atrophiques. Ainsi certains auteurs rapportent une diminution de l'expression de MyoD et myogenin (Fermoselle *et al.* 2012 ; Vogiatzis *et al.* 2010 ; Puig-Vilanova *et al.* 2015). De plus, il a été montré que la myostatine, une protéine limitant la croissance musculaire, est augmentée chez les patients BPCO ayant une perte de masse musculaire (Plant *et al.* 2010 ; Hayot *et al.* 2011).

c) **Atteinte de la composante centrale de la fonction musculaire périphérique**

La production d'une contraction musculaire que ce soit lors d'un effort d'endurance ou pour l'évaluation d'une force maximale dépend à la fois du **système musculaire périphérique** (lié aux caractéristiques intrinsèques du muscle décrites dans les sections précédentes) mais aussi à l'activation du **système nerveux central** (Clark et Manini, 2008). Or dans la BPCO, l'hypothèse d'une implication de la **composante centrale volontaire** dans

la dysfonction musculaire périphérique a été établie à partir du fait que la perte de masse musculaire ne pouvait constituer la seule explication de la faiblesse musculaire. En effet, dans une étude récente (Shrikrishna *et al.* 2012), il a été mis en évidence une diminution significative de la FMIV du quadriceps chez les patients BPCO de stade GOLD IV comparativement aux patients du stade I sans pour autant qu'il y ait de différences au niveau de la surface de section du muscle droit fémoral (un des 4 chefs du quadriceps). De plus, comme illustré sur la figure 10, Jones *et al.* (2015) ont montré que les patients présentant une diminution de la fonction musculaire (incluant une faiblesse du quadriceps), ne présentaient pas forcément de diminution de l'index de masse musculaire. Bien que cette étude utilise une méthode globale d'estimation de la masse musculaire, ces données laissent

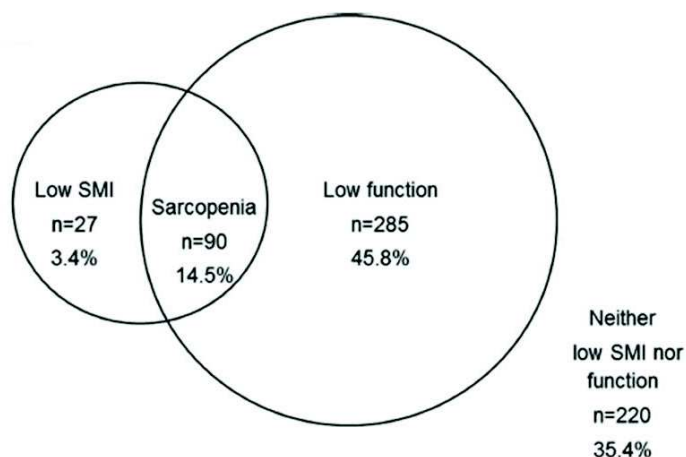
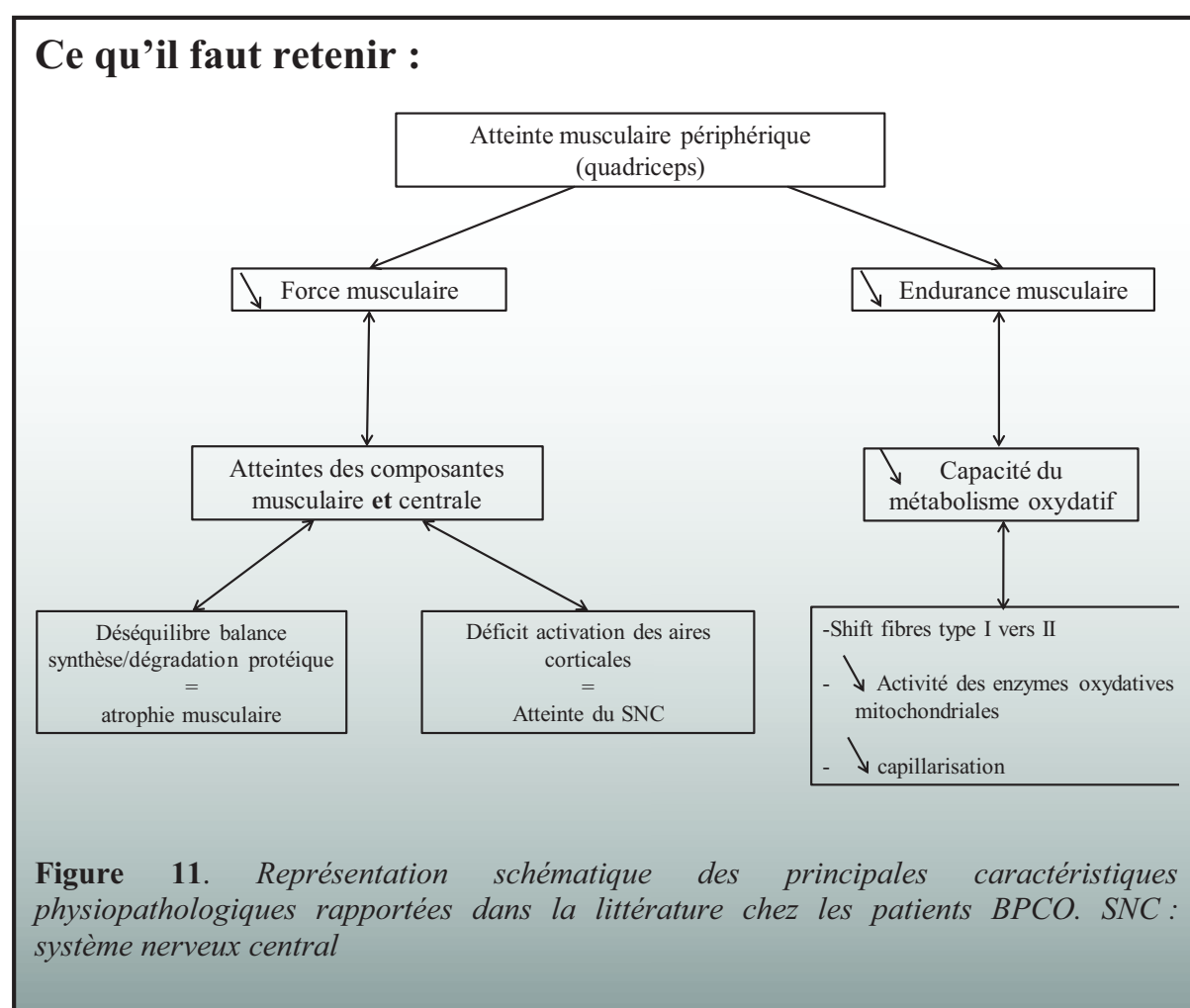


Figure 10. Prévalence des patients BPCO (n=622) ayant un faible index de masse musculaire (SMI), une sarcopénie et une faiblesse musculaire incluant une diminution de la FMIV du quadriceps (Jones *et al.* 2015).

suggérer l'implication de mécanismes physiopathologiques différents de la masse musculaire pour expliquer la diminution de la force musculaire retrouvée chez certains patients BPCO.

En parallèle à ces données, certains auteurs ont décrit une altération des structures nerveuses (aires cérébrales motrices) et cortico-spinales chez les patients BPCO comparativement à des sujets sains (Karakas *et al.* 2013 ; Zhang *et al.* 2013). Même si les répercussions au niveau de la fonction musculaire périphérique n'ont jamais été étudiées dans la BPCO, l'hypothèse d'une potentielle implication est recevable. Ces altérations de la commande centrale volontaire peuvent induire des déficits au niveau du recrutement des unités motrices, de l'excitabilité des motoneurones α (innervant les fibres musculaires) et de l'activation supraspinale/corticale volontaire (Clark et Manini, 2008). Même si les résultats sont controversés, certaines études ont mis en évidence un déficit d'activation volontaire du système nerveux central, par une technique de stimulation supramaximale du nerf fémoral, chez les patients BPCO lors de la réalisation d'une FMIV (Vivodtzev *et al.* 2008 ; Seymour *et al.* 2012). Pour aller plus loin dans la compréhension de ces mécanismes sous-jacents, une

étude récente menée par Alexandre *et al.* (2014) a montré par une technique plus spécifique d'imagerie cérébrale (Spectroscopie du proche infrarouge fonctionnel : fNIRS), un **déficit spécifique d'activation des aires corticales primaires motrices et sensitives** notamment associée à une diminution de force musculaire chez des patients BPCO. Ces travaux ouvrent donc des perspectives de recherches complémentaires à celles de la perte de masse musculaire dans la compréhension de la faiblesse musculaire des patients BPCO.



3) Facteurs étiologiques :

a) La réduction de l'activité physique : un rôle majeur mais...

Actuellement, l'activité physique est considérée comme un élément central dans l'expression musculaire périphérique de la BPCO (Watz *et al.* 2014). En effet, **la réduction de l'activité physique**, décrite chez les patients BPCO (Gouzi *et al.* 2011) a été le premier facteur impliqué dans la dysfonction musculaire périphérique des patients BPCO. Serres *et al.* (1998) ont notamment rapporté une corrélation positive et significative entre le Tlim (endurance du quadriceps) et le score au questionnaire de quantification de l'activité physique développé par Voorrips *et al.* (1991). Plus récemment, certains auteurs ont montré l'existence de corrélations entre les niveaux d'activité physique, la force et la masse musculaire (Shrikrishna *et al.* 2012).

De plus, les atteintes musculaires périphériques décrites dans la partie précédente sont similaires à celles décrites dans des situations de déconditionnement musculaire (e.g. modèles d'immobilisation « Bed rest ») (Hortobagyi *et al.* 2000). Cependant, tout en prenant en considération l'hétérogénéité des atteintes musculaires périphériques, l'amplitude des anomalies musculaires décrites dans la littérature chez les patients BPCO est plus importante que celles retrouvées chez des sujets sédentaires comme illustré sur la Figure 12 ci-dessous (Couillard et Préfaut, 2005).

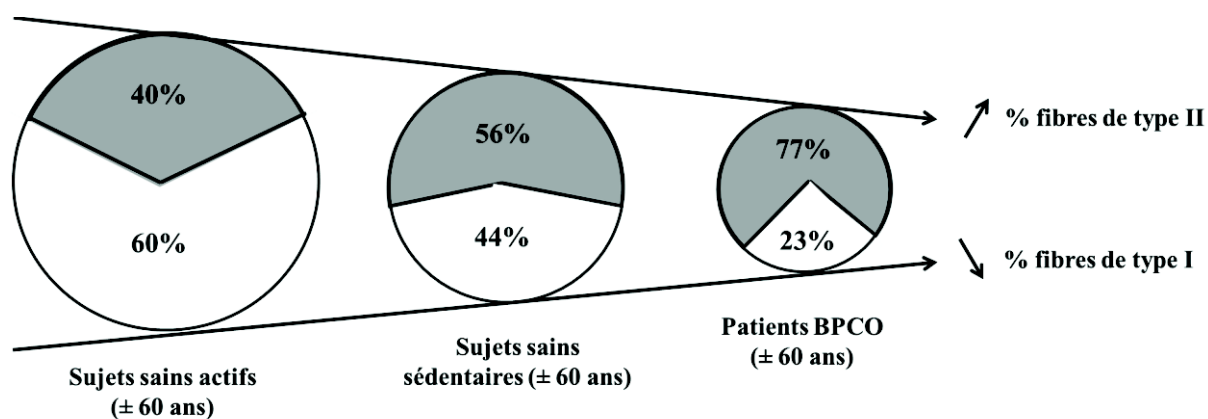


Figure 12. Représentation schématique de la taille (surface du cercle) et de la proportion moyenne de fibres musculaires de type I et II chez des sujets sains actifs, sédentaires et des patients BPCO (d'après Couillard et Préfaut, 2005).

Même si la réduction de l'activité physique constitue un élément clé dans l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO, il ne semble pas être le seul. En effet, d'autres facteurs étiologiques ont été identifiés (Gea *et al.* 2013). Ces facteurs étiologiques participent à l'hétérogénéité de l'atteinte musculaire périphérique décrite dans la littérature (Maltais *et al.* 2014 ; Couillard et Préfaut 2005).

b) D'autres facteurs impliqués : vers l'étude du stress oxydant ?

Il a été montré que la **consommation de tabac** (un des principaux facteurs étiologiques de la BPCO) seule pouvait induire des modifications, des altérations musculaires (Degens *et al.* 2015 ; Gosker *et al.* 2009) pouvant ainsi prédisposer le patient BPCO au développement d'une dysfonction musculaire périphérique (Barreiro *et al.* 2011 ; Van den Borst *et al.* 2011). Cependant, il ne semble pas constituer un facteur majeur car dans plusieurs études, des différences musculaires persistent entre les patients BPCO et les sujets sains même lorsque la consommation de tabac des deux populations est contrôlée.

De part sa composition, le tabac contribue aussi à l'augmentation des marqueurs de **l'inflammation systémique**, comme la C-réactive protéine, le fibrinogène ou encore plusieurs cytokines pro-inflammatoires (Gan *et al.* 2004) décrites chez les patients BPCO. Plusieurs études, notamment chez l'animal, ont montré que l'inflammation systémique pouvait induire une perte de masse musculaire via une augmentation de l'activité du système ubiquitine-protéasome ou encore des facteurs de transcription NF- κ B et FOXO (Reid *et al.* 2009). Cependant, cette implication de l'inflammation n'a jamais été clairement démontrée. En effet, la présence d'une augmentation des marqueurs de l'inflammation au niveau du quadriceps de patients BPCO est controversée, même chez les patients présentant une perte de masse musculaire (Barreiro *et al.* 2008 ; Debigaré *et al.* 2008).

Par ailleurs, cette inflammation systémique est augmentée en cas **d'exacerbations** chez les patients BPCO (Spruit *et al.* 2003 ; Perera *et al.* 2007). Ces phénomènes d'exacerbations ont clairement démontré un impact sur l'atteinte musculaire périphérique avec notamment une diminution importante ($\pm$ 20%) de la FMIV combinée à une récupération très lente de ces fonctions musculaires (Spruit *et al.* 2003). Même si certaines hypothèses ont été avancées, les mécanismes sous-jacents de ces épisodes d'exacerbations restent encore mal connus.

D'autres facteurs tels que des anomalies de l'échange gazeux, notamment l'**hypoxémie** (Gosker *et al.* 2002 ; Puente-Maestu *et al.* 2009 ; Costes *et al.* 2015), ou encore la prise de **corticostéroïdes au long cours** (Decramer *et al.* 1994) peuvent contribuer à l'atteinte

musculaire périphérique des patients BPCO. L'ensemble de ces paramètres rajoutent de l'hétérogénéité et sont donc à prendre en compte lors de l'étude des mécanismes impliqués dans l'atteinte musculaire périphérique de ces patients.

Enfin, **la dénutrition** apparaît être un phénomène important dans la BPCO. En effet, une étude récente a montré que près de 50% des patients BPCO stables ont une alimentation déséquilibrée (malnutrition) avec une prévalence plus élevée chez les femmes (Odenrants *et al.* 2013). Ce **déficit d'apport alimentaire**, souvent décrit chez les patients BPCO (Van de Bool *et al.* 2014 ; McKeever *et al.* 2008), ne permettrait pas de compenser l'ensemble des dépenses énergétiques des patients BPCO (Schols *et al.* 1991 ; King *et al.* 2008). Ainsi, il a été mis en avant que des déséquilibres d'apports alimentaires pouvaient induire une perte de poids, notamment de masse maigre, et une réduction de la force musculaire (Vermeeren *et al.* 2006). L'hypothèse d'un lien avec le déséquilibre de la balance synthèse/dégradation des protéines pour expliquer ces résultats est avancée mais reste non démontrée dans la littérature (Schols *et al.* 2014).

De façon intéressante, lorsque nous faisons l'analyse de la littérature, le **stress oxydant** apparaît être un mécanisme potentiel commun à l'ensemble des facteurs étiologiques présentés ci-dessus (Gea *et al.* 2013) (cf. Figure 13). Ce mécanisme est très étudié depuis une quinzaine d'années dans la BPCO mais face à sa complexité et son hétérogénéité, le champ scientifique reste ouvert à de nombreuses interrogations. Dans la prochaine partie, nous allons donc faire l'état de l'art sur les connaissances scientifiques actuelles relatives au stress oxydant dans la BPCO en le définissant, le caractérisant et en analysant son implication dans l'atteinte musculaire périphérique.

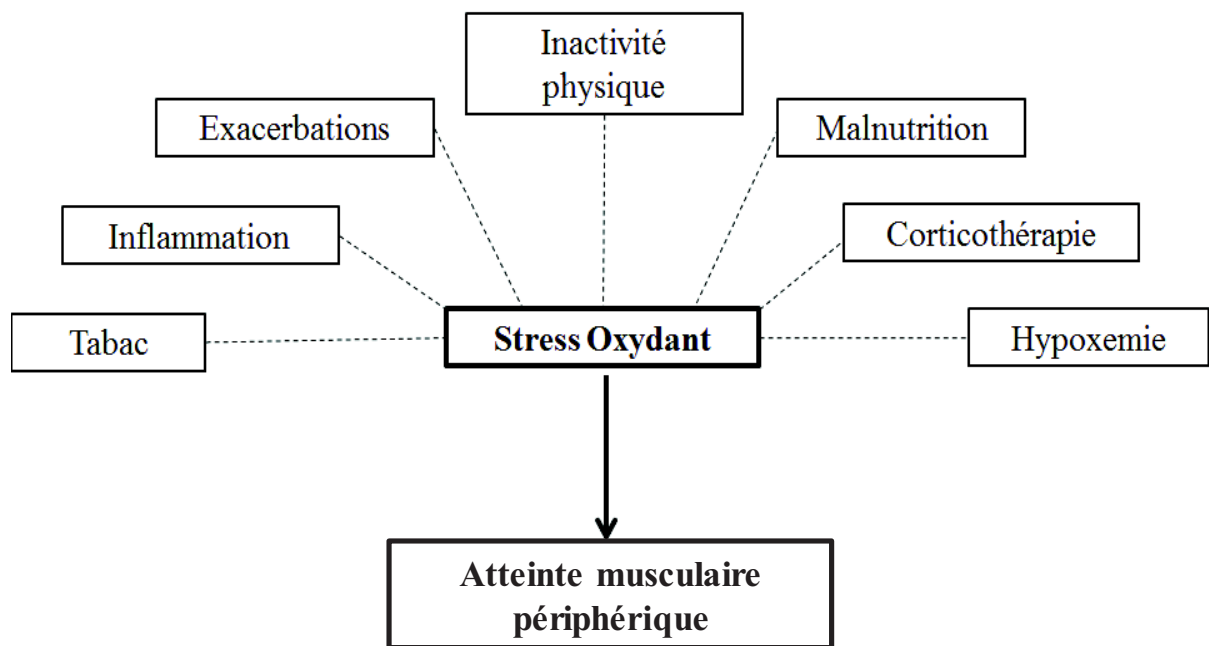


Figure 13. Représentation schématique des relations entre les facteurs étiologiques, le stress oxydant et l'atteinte musculaire périphérique chez les patients BPCO (adapté de Gea et al. 2013).

III/ Le Stress Oxydant : un rôle clé dans l'atteinte musculaire périphérique

Sous la notion de stress oxydant, les termes « délétère » ou « toxique » sont bien souvent associés. Ces notions viennent du fait que les radicaux libres, principalement issus du métabolisme de l'O₂ (e.g. espèces oxygénées réactives : EOR), peuvent entraîner l'oxydation de divers composants tels que les lipides, les protéines ou encore l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cependant, il ne faut pas oublier que la **production d'EOR est avant tout « physiologique »** car elle est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme et peut participer à divers processus vitaux tels que : la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes, le fonctionnement de certaines enzymes ou encore la contractilité musculaire. Ainsi, ayant besoin d'une certaine quantité d'EOR, **l'organisme ne cherche pas à éliminer mais à contrôler leur niveau pour en éviter les effets délétères**. Pour cela, la production d'EOR est contrôlée par un vaste réseau de **molécules antioxydantes** qui peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques. Pour maintenir les effets bénéfiques des EOR, la balance pro-oxydant/antioxydant (nommée aussi balance « redox ») doit être à l'équilibre. Ainsi, lorsque les capacités antioxydantes de la cellule ne peuvent plus faire face à la production d'EOR, qui peut être augmentée par divers facteurs physiopathologiques ou environnementaux comme le tabac, la **balance « redox » est déséquilibrée : c'est le stress oxydant** (Bloomer *et al.* 2008) (cf. Figure 14).

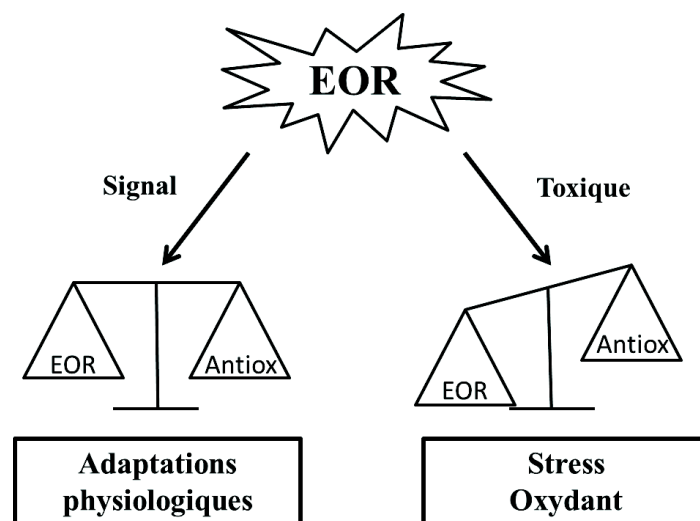


Figure 14. Représentation schématique illustrant les deux mécanismes d'action potentiels des EOR ainsi que la définition du stress oxydant.

1) Espèces oxygénées réactives et stress oxydant : entre adaptations « physiologiques » et effets délétères

a) Espèces oxygénées réactives : différentes formes et sources

L'O₂ est une molécule bi-radicalaire formée de deux atomes présentant deux électrons non appariés. L'O₂ est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit et ainsi être à l'origine de **la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR)**. L'appellation EOR inclut tout d'abord les **radicaux libres de l'oxygène** comme **l'anion superoxyde (O₂^{•-})** ou encore le **radical hydroxyle (OH[•])**. Un radical libre (RL) est une entité chimique (atome, molécule, fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un mécanisme d'oxydation. Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voire quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (e.g. OH[•]) (Sayre *et al.* 2008). Sous le terme EOR, nous retrouvons également certains dérivés oxygénés non radicalaires, de taille plus petite que les RL mais dont la toxicité est importante (Halliwell, 2007). Le plus connu et le plus étudié est le **peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**.

L'anion superoxyde (O₂^{•-}) est le premier RL, chargé négativement, formé au sein de la cellule et provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. Même s'il est considéré comme peu réactif comparativement aux autres EOR, il peut réagir rapidement avec d'autres RL constituant ainsi la majeure source de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (cf. Figure 15).

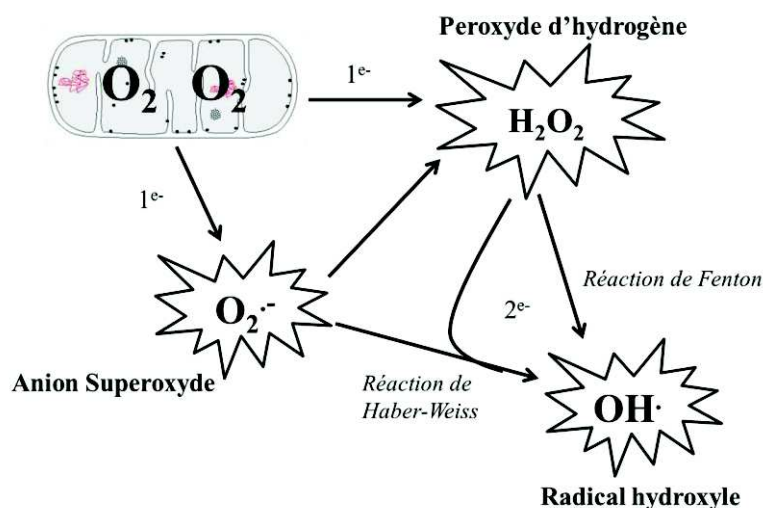


Figure 15. Schéma des principales formes d'EOR décrites dans la littérature et de leur principale source : la mitochondrie.

L' H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, l' H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) [$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$] (Van Helden *et al.* 2009). Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui régénère Fe^{3+} en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss [$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$]. Ainsi, la présence simultanée de H_2O_2 , de $O_2^{\bullet-}$ et de fer permet la production de $OH^{\bullet}$.

L' $OH^{\bullet}$, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' $OH^{\bullet}$ apparaît ainsi comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des EOR (Halliwell, 2007).

Il existe de nombreuses autres EOR comme l'oxygène singulet, l'acide hypochloreux ($HOCl$), et l'ozone (O_3). Les EOR incluent aussi les RL issus du métabolisme de l'azote comme le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) et ses dérivés, le peroxynitrite ($ONOO^-$) et le dioxyde d'azote ($NO_2^{\bullet}$) jouant un rôle plus spécifique au niveau des cellules endothéliales (Munzel *et al.* 2005)

Comme mentionné précédemment, la production d'EOR est « physiologique ». Ainsi, il est estimé selon certains auteurs que 2 à 5% de l'ensemble de l'O₂ consommé est transformé en O₂⁻ (St-Pierre *et al.* 2002). Dans l'organisme et notamment au niveau des fibres musculaires, il existe de nombreuses sources d'EOR dont les principales sont **la xanthine oxydase, la NADPH oxydase** ainsi que **la chaîne respiratoire de la mitochondrie** (cf. Figure 16).

La **xanthine oxydase** est une enzyme ubiquitaire se situant au niveau du cytoplasme de la

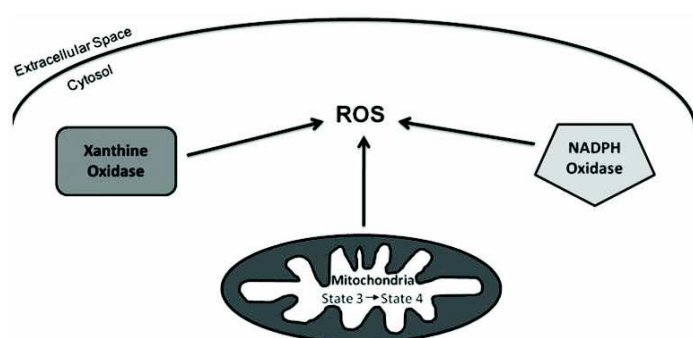


Figure 16. Schéma simplifié illustrant les voies capables de produire des EOR (ROS : Reactive Oxygen Species) notamment au sein des fibres musculaires (Powers *et al.* 2011)

cellule. Cette enzyme a pour rôle de catalyser l'hypoxanthine en acide urique (métabolisme des purines). Dans cette réaction, l'O₂ agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l'O₂⁻. Cependant le rôle de cette enzyme reste peu clair et spéculatif en étant essentiellement basé sur l'effet de l'allopurinol (inhibiteur de la xanthine oxydase) notamment au

niveau musculaire (Powers et Jackson, 2008)

La **NADPH oxydase** est une enzyme membranaire jouant un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Babior, 1999). En effet, lors du processus de phagocytose, il y a un emballement oxydatif (augmentation de la consommation d'O₂), le « respiratory burst », par les cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages) contenant la NADPH oxydase qui va ainsi catalyser la formation d'O₂⁻ (Wang *et al.* 2009).

Cependant, il apparaît que 90% des EOR sont produites au sein de la **chaîne respiratoire mitochondriale** (Balaban *et al.* 2005). Les mitochondries sont les organites responsables de la plus grande partie de la production de l'énergie (sous forme d'ATP) nécessaire au fonctionnement cellulaire à partir notamment de la combustion des substrats énergétiques par l'O₂. Ainsi, au cours de la respiration mitochondriale comprenant 4 complexes, la production

d'EOR, plus spécifiquement d'O₂^{•-} semble se situer au niveau des **complexes I et III** (Turrens, 2003).

La production d'EOR au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matriciel ainsi que dans l'espace inter-membranaire (Turrens, 2003). Que ce soit dans la matrice ou l'espace inter-membranaire, l'O₂^{•-} généré est catalysé par la superoxyde dimutase mitochondriale (Mn-SOD), l'H₂O₂ alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'à l'ensemble des constituants de la mitochondrie ainsi que le cytoplasme de la cellule.

De plus, la mitochondrie constitue aussi une des principales cibles des EOR ayant des conséquences directes sur son activité. En réagissant avec NO[•], l'O₂^{•-} peut induire une inhibition de la chaîne respiratoire (Shiva *et al.* 2004). Dans des conditions pathologiques telles que la BPCO, différents composants mitochondriaux (complexes de la chaîne respiratoire, lipides membranaires, ADN,...) pourraient être la cible de l'oxydation par les EOR (Barreiro et Hussain, 2010), altérant ainsi la fonction mitochondriale.

b) Un système antioxydant complexe

Comme mentionné en introduction de cette partie, la production d'EOR doit être régulée afin d'induire des adaptations « physiologiques », (i.e. non toxiques) au sein de l'organisme. Cette régulation est assurée par un vaste système complexe d'**antioxydants enzymatiques et non enzymatiques** (Powers et Lennon, 1999) (cf. Figure 17). Afin d'assurer la protection des cellules, et notamment des fibres musculaires, face aux potentiels effets délétères des EOR, l'ensemble des antioxydants est réparti de façon compartimentée que ce soit au niveau du cytoplasme, des mitochondries ou encore dans les espaces extracellulaires et vasculaires (Powers et Jackson, 2007). De façon générale, les antioxydants enzymatiques ont pour rôle de neutraliser les EOR en les transformant en molécules stables, alors que les antioxydants non-enzymatiques (principalement apportés par l'alimentation) vont permettre de limiter les effets toxiques des EOR mais aussi d'agir comme substrats essentiels à l'activité des enzymes antioxydantes. Dans le paragraphe suivant, nous nous focaliserons sur les principaux antioxydants identifiés dans la littérature et étudiés plus spécifiquement dans la BPCO (cf. Figure 16).

- *Système antioxydant enzymatique*

La **superoxyde dismutase (SOD)** constitue la première ligne de défense contre les EOR. En effet, elle permet l'élimination de 2 molécules d'O₂^{•-} en catalysant sa transformation en O₂ et H₂O₂.

La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Miller, 2004). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire (Sturtz *et al.* 2001). Dans le muscle, la littérature rapporte que 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouve dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. De plus, il semblerait que l'activité de la SOD soit plus importante dans les fibres de type I, dites oxydatives, comparativement aux fibres de type II (Powers *et al.* 1994).

Son activité antioxydante est incomplète sans l'action d'enzymes telles que **la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase**, qui permettent de « détoxifier », de réduire l'H₂O₂.

La GPx et la catalase agissent donc en synergie avec la SOD puisqu'elles permettent d'accélérer la dismutation notamment de l'H₂O₂ en H₂O et O₂ (Powers et Lennon, 1999). La GPx utilise comme substrat le glutathion réduit (GSH), qui est le donneur d'hydrogène, et de cette réaction est formé le glutathion oxydé (GSSG) :



Le GSH sert donc de substrat à la GPx pour former du GSSG et un oxydant désactivé par réduction. Du fait de l'importance de l'activité de la GPx pour maintenir l'équilibre « redox » des cellules, les niveaux de GSH doivent être maintenus pour être en permanence disponible. La régénération du GSSG en GSH est assurée par la **glutathion réductase (GR)** avec l'aide de NADPH correspondant au donneur d'hydrogène.

La catalase est une enzyme dépendante du fer (Fe²⁺). Bien qu'elle partage le même substrat que la GPx, la catalase a une affinité plus faible pour l'H₂O₂ lorsque celle-ci est en faible quantité comparativement à la GPx (Sayre *et al.* 2008). Ainsi, l'évaluation de son activité est

non seulement dépendante de l'activité même de ses protéines mais aussi des niveaux d' H_2O_2 entraînant des biais d'interprétation des données (Powers et Jackson, 2007).

Tout comme la SOD, l'activité de la GPx et de la catalase est plus importante dans les fibres oxydatives de type I (Powers *et al.* 1994) ce qui est un élément important à prendre en considération notamment chez des patients présentant une majorité de fibres de type II comme cela peut être le cas dans la BPCO.

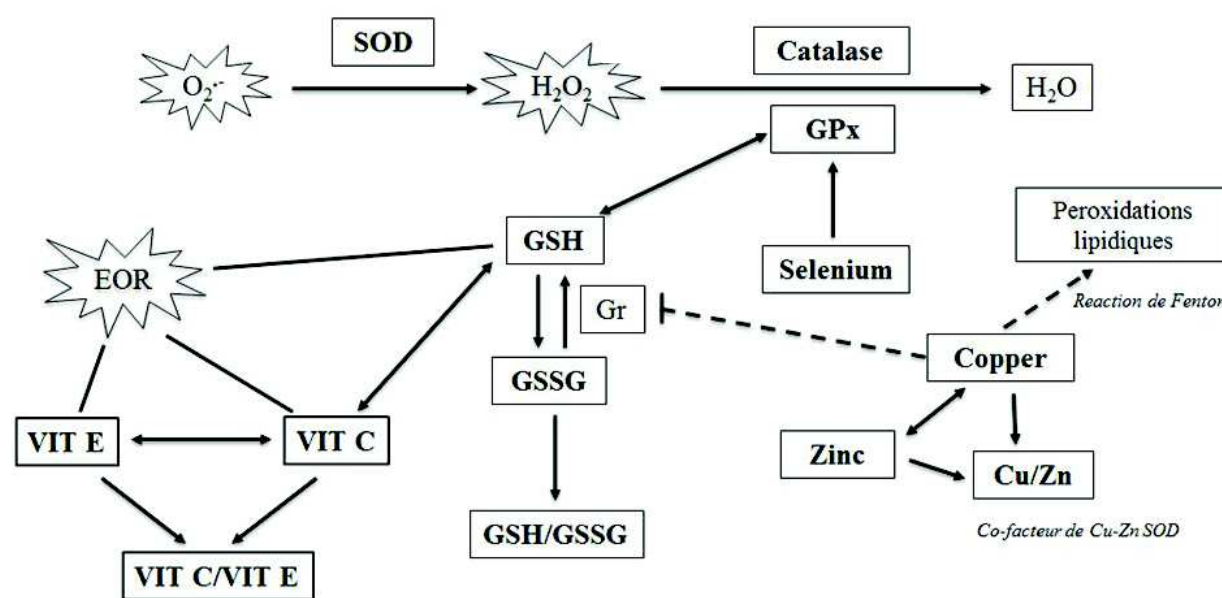


Figure 17. Représentation schématique du fonctionnement et interactions entre les principaux antioxydants étudiés dans la littérature notamment chez les patients BPCO (adapté de Ji, 1995). ---- : relations retrouvées chez l'animal mais non vérifiées chez l'homme (d'après Laoudj-Chenivresse ; non publié).

- *Système antioxydant non-enzymatique*

Comme illustré dans la Figure 17 ci-dessus, le système antioxydant enzymatique ne peut pas fonctionner « seul » pour éliminer les EOR. Le système antioxydant non-enzymatique est composé de très nombreuses molécules apportées par l'alimentation comme le GSH, des oligo-éléments (cuivre, zinc et sélénium), des vitamines notamment C et E, mais aussi d'autres qui ne sont pas présentées ici telles que les polyphénols, les caroténoïdes qui peuvent induire la vitamine A, l'ubiquinone, l'acide urique ou encore les protéines thiols. Le

point important mis en avant par la littérature, et illustré sur cette figure est **la complémentarité d'action entre l'ensemble des antioxydants dans la régulation de la production d'EOR**. Par exemple, si l'organisme présente un déficit en GSH, cela aura des répercussions aussi bien au niveau de la GPx mais aussi au niveau de la régénération de la vitamine C.

Un des antioxydants non-enzymatiques est le **GSH**. Cet antioxydant est synthétisé dans un premier temps au niveau du foie puis il est transporté aux autres organes par la circulation sanguine. Le contenu en GSH dépend de la fonction de l'organe. Comme pour les antioxydants enzymatiques, le GSH va être retrouvé en quantité beaucoup plus importante dans les fibres musculaires de type I par rapport à celles de type II (Leeuwenburgh *et al.* 1997). Dans la cellule, le GSH va avoir 3 rôles principaux :

- 1) réagir directement avec plusieurs formes d'EOR pour les stabiliser en donnant un atome d'hydrogène,
- 2) agir en tant que substrat de la GPx, comme décrit précédemment, pour éliminer H_2O_2 ,
- 3) régénérer les formes oxydées des vitamines C et E en formes actives.

Dans ces 3 cas de figure, lorsque le GSH va réagir, il est transformé en GSSG avant d'être régénéré par la Gr et le NADPH comme mentionné précédemment. Le rapport **GSH/GSSG** est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important plus le GSH est consommé et le GSSG augmenté (Ji, 1995). Ainsi, un ratio GSH/GSSG faible peut être interprété comme le reflet d'une activité antioxydante importante afin de lutter contre une production excessive d'EOR (marqueur de l'équilibre « redox »).

La vitamine C ou acide L-ascorbique est hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman *et al.* 1999). Son action est à la fois directe et indirecte : elle agit directement sur les EOR (superoxydes, hydroxyle, singulet oxygène, radicaux lipidiques...) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH. L'organisation spatiale de la vitamine C lui permet de se lier à la phase aqueuse de la vitamine E oxydée dans la membrane cellulaire, et de rapidement lui céder son électron. Après avoir cédé son électron, la vitamine C forme un radical très peu réactif, qui sera ensuite reconverti en vitamine C par le GSH (Fisher-Wellman *et al.* 2009). La vitamine C est principalement antioxydante, mais en doses trop élevées et dans le processus de défense immunitaire, elle peut exercer une action pro-oxydante au travers de son habilité à réduire l'ion

ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) qui est un puissant catalyseur de plusieurs réactions redox comme la réaction de Fenton/Haber-Weiss, et donc stimuler la production d' $\text{OH}^\bullet$ (Sayre *et al.* 2008).

La vitamine E est un terme générique pour désigner notamment tous les tocophérols dont l' α -tocophérol est le plus abondant et possède la plus grande capacité antioxydante. La vitamine E agit directement sur une grande variété d'EOR pour former un RL peu réactif. Par la suite, la vitamine E oxydée pourra être régénérée principalement par la vitamine C, mais également par d'autres composés comme le GSH. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes, en particulier celles des mitochondries, et peut ainsi séquestrer les radicaux libres et empêcher la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Traber, 2007).

En ce qui concerne **les oligo-éléments**, le cuivre (Cu^{2+}), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe^{2+}) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un co-facteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de Mn, la SOD cytosolique de Cu^{2+} et de Zn, la catalase de Fe^{2+} et la GPx de Se. Ainsi, une diminution de l'activité d'un antioxydant peut être liée à un déficit d'apport d'un de ces cofacteurs, comme cela a été décrit notamment pour le Se et le Zn (Wei *et al.* 2001 ; Pannala *et al.* 2014). Cependant, certains oligoéléments, notamment le Fe^{2+} et le Cu^{2+} , lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro-oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Gaetke *et al.* 2003). Dans ce sens, certains auteurs ont mis en évidence une étroite corrélation entre les taux sanguins de Cu^{2+} et de peroxydes lipidiques (Pincemail *et al.* 2007 ; Passerieux *et al.* 2014). L'activité du Cu^{2+} étant régulée par le Zn, l'analyse du rapport Cu/Zn apparaît plus pertinente.

Nous venons donc de voir que le maintien de l'équilibre « redox » résulte d'interactions complexes entre de nombreux antioxydants nécessaires pour réguler la production d'EOR. Comme mentionné en introduction de la présente partie, lorsque le système antioxydant est dépassé par la production d'EOR, cela peut entraîner l'altération de molécules biologiques essentielles au bon fonctionnement de l'organisme telles que les lipides, les protéines ou encore l'ADN.

c) Déséquilibre de la balance : dommages cellulaires

Initialement, le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant en faveur du premier. En raison de la complexité associée à l'évaluation de l'équilibre « redox » cellulaire, la description d'un état de stress oxydant doit intégrer la description des détails moléculaires de ce déséquilibre et non la simple comparaison entre oxydants et antioxydants. Ainsi, Jones (2006) a proposé que ce terme soit redéfini par **"une perturbation de la signalisation et du contrôle redox"**. Pour évaluer le stress oxydant, que ce soit au niveau sanguin ou musculaire, cela implique la mesure d'une molécule sensible aux variations de l'équilibre « redox » et possédant au moins un des 4 critères suivants (Powers et Jackson 2008) : 1) chimiquement unique et détectable, 2) augmente ou diminue pendant les périodes de stress oxydant, 3) possède une demi-vie relativement longue, 4) pas d'impact d'autres processus cellulaires.

De nombreuses molécules ont été identifiées afin d'évaluer le stress oxydant mais chacune présente des limites pour l'interprétation des résultats en ne répondant pas à un ou plusieurs des critères ci-dessus. Ainsi, comme l'évaluation d'un seul marqueur ne semble pas pertinente, il apparaît nécessaire d'avoir **une approche globale pour étudier le stress oxydant** dans un système biologique en utilisant plusieurs marqueurs qui peuvent être regroupés en 4 catégories : 1) les molécules pro-oxydantes comme les EOR, 2) les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, 3) la balance « redox » cellulaire dont le marqueur principal est le ratio GSH/GSSG, 4) les molécules modifiées par oxydation.

Concernant cette dernière catégorie des marqueurs du stress oxydant, il est bien admis qu'une augmentation de la production d'EOR au-delà des capacités antioxydantes de l'organisme peut induire l'oxydation de certaines molécules comme les lipides, les protéines ou encore l'ADN.

Les lipides qui sont notamment des constituants essentiels des membranes cellulaires semblent être **une des principales cibles des EOR**. Ces attaques des lipides membranaires ou encore des lipoprotéines circulantes se caractérisent par une altération oxydative des doubles liaisons des acides gras notamment polyinsaturés (Pour revue : Ayala *et al.* 2014). L'oxydation des lipides peut entraîner une désorganisation générale de la membrane cellulaire

caractérisée par des altérations de l'intégrité, de la fluidité ou encore de l'excitabilité membranaire (e.g. transfert des ions etc.).

L'interaction entre les EOR et les lipides se fait par un mécanisme de réaction en chaîne et implique 3 étapes : initiation, propagation et terminaison. Au cours de ces 3 étapes, des produits primaires puis secondaires des peroxydations lipidiques seront ainsi formés. Les produits primaires résultant des phases d'initiation et de propagation sont essentiellement des diènes conjugués et des **hydroperoxydes lipidiques (fonction –OOH)**. D'après la littérature, le dosage des hydroperoxydes semble être à la fois le plus simple (e.g. ; par spectrophotométrie) et le plus reproductible (Lamprecht *et al.* 2004 ; Ayala *et al.* 2014). D'autres marqueurs, comme les F2-isoprostanes considérés comme des marqueurs efficaces des peroxydations lipidiques, peuvent être dosés mais ils sont le reflet des dérivés d'un seul acide gras ce qui ne représente donc pas la totalité des oxydations lipidiques (e.g. les isoprostanes sont dérivées de l'acide arachidonique) (Lamprecht *et al.* 2004).

De plus, le clivage des hydroperoxydes lipidiques par des métaux ou même la vitamine C, sert de base à la formation des produits secondaires. Ainsi, ces hydroperoxydes évoluent en peroxyde cyclique dont la coupure peut libérer différents aldéhydes toxiques comme le **dialdéhyde malonique (malondialdéhyde MDA)**, le **4-hydroxynonenal (4-HNE)** ou encore la lipofuscine, correspondant aux produits finaux de la peroxydation lipidique. Les MDA peuvent être dosés de façon indépendante par HPLC mais la technique la plus utilisée correspond à sa réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBAR) pour produire des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui sont également utilisées comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Lefèvre *et al.* 1998). Les MDA sont considérés comme des marqueurs plus précis de la peroxydation lipidique que les TBARS, car les TBARS incluent des aldéhydes qui ne sont pas de provenance lipidique. Les MDA ont également des limitations car tous les produits de la peroxydation lipidique ne génèrent pas des MDA et ceux-ci pourraient être produits par différentes réactions (Lamprecht *et al.* 2004).

A noter que ces produits finaux de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Sayre *et al.* 2008).

Sous l'action des EOR sur certains acides aminés, **les protéines**, qui sont des constituants essentiels des cellules de l'organisme, peuvent elles aussi être oxydées. Ces oxydations provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation catalysées par des métaux comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} (réaction de Fenton) peuvent être classées en deux catégories : 1) les réactions qui cassent les liaisons peptidiques

et modifient la chaîne protéique, 2) les réactions induisant des modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique, notamment HNE et MDA. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une fragmentation ou la formation d'agglomérats de protéines susceptibles à la protéolyse, soit *via* le système ubiquitine-protéasome soit par des protéases intracellulaires (Levine, 2002 ; Sayre *et al.* 2008). Cependant, ces processus sont également sujets à l'attaque et l'oxydation des EOR, limitant leur action d'élimination ce qui conduit à une accumulation des produits issus de l'oxydation des protéines dans les tissus en cas de stress oxydant important. L'accumulation de protéines oxydées est souvent mesurée par leurs contenus en carbonyles. Actuellement, **l'évaluation des protéines carbonylées** constitue la technique la plus utilisée pour déterminer l'oxydation des protéines (Barreiro et Hussain, 2010)

Que ce soit dans les noyaux des cellules ou dans les mitochondries, l'**ADN**, qui constitue l'essentiel du génome, apparaît être aussi une cible importante des EOR. De par sa localisation proche des principales sources d'EOR, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter et al, 1988). Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs pouvant provoquer une augmentation de la production d'EOR, une diminution de la synthèse d'ATP mais aussi engager la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose (e.g. déséquilibre de la balance synthèse/dégradation des protéines). Au sein de l'ADN et de l'ARN, ce sont les guanines qui sont préférentiellement la cible des EOR et le produit de leur dégradation peut être détecté par le dosage de la 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), notamment dans le sang, par différentes techniques de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Lamprecht *et al.* 2004).

Il est important de noter que ces dommages peuvent intervenir indépendamment les uns des autres. Ainsi, comme pour les autres marqueurs du stress oxydant, l'évaluation d'un seul produit des dommages cellulaires ne permet pas de conclure à la présence ou non d'un stress oxydant.

d) Régulation des EOR : un stress oxydant « physiologique » ?

Comme nous venons de le voir, le déséquilibre de la balance « redox » se caractérise dans la majorité des cas par des dommages causés au niveau cellulaire. Cependant, il est actuellement bien admis que les EOR peuvent agir comme des messagers, des signaux capables d'activer plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de fonctions physiologiques de l'organisme (Gomez-Cabrera *et al.* 2005). Tout d'abord, il a été montré que les EOR peuvent réguler l'activité de certains facteurs de transcription tels que NF- κ B, NFAT (nuclear factor of activated T-cell), PG1- α ou encore certaines MAPKs qui permettent notamment de contrôler la croissance cellulaire ou l'angiogenèse (Jackson, 2015). De plus, les EOR, *via* la régulation d'AP-1 et p53 qui induisent l'expression de gènes spécifiques, permettent d'améliorer les processus de réponse immunitaire et l'apoptose des cellules endommagées (Hehner *et al.* 2000 ; Sablina *et al.* 2005).

Au niveau musculaire, les adaptations liées aux EOR ont été étudiées plus spécifiquement dans des conditions d'exercice, de contraction musculaire. Ce champ scientifique a été ouvert il y a plus de 30 ans avec l'observation chez l'homme d'une **augmentation des peroxydations lipidiques suite à un exercice aigu** (Dillard *et al.* 1978). Cette augmentation des marqueurs du stress oxydant suite à un exercice se caractérise notamment par une augmentation de la production d'EOR (Bailey *et al.* 2007). De plus, il est clairement admis que suite à un exercice, il y a une diminution des capacités antioxydantes, avec notamment un ratio GSH/GSSG diminué, associé à une augmentation des dommages cellulaires notamment lipidiques et protéiques que ce soit au niveau sanguin ou musculaire (pour revue, Fisher-Wellman *et al.* 2009). A noter que les différences retrouvées entre certaines études peuvent être expliquées par les variations des modalités, de l'intensité (aérobie ou anaérobie) et de la durée des exercices utilisés (Fisher-Wellman *et al.* 2009). En effet, il a été rapporté que la production d'EOR au cours d'un effort est corrélée à la consommation d'O₂ par l'organisme (Lamprecht *et al.* 2004).

Cependant, basé sur les résultats de différents travaux antérieurs, Reid (2001) a développé un modèle mettant en évidence un **rôle physiologique des EOR au cours d'une contraction musculaire**. Comme illustrée sur la figure 18 ci-dessous, la production d'EOR à l'état basal

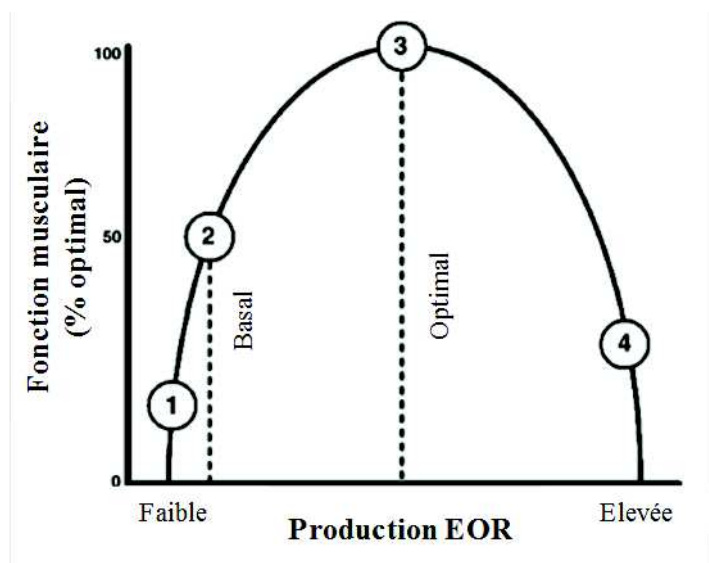


Figure 18. Schéma du modèle théorique de Reid décrivant l'effet biphasique des EOR sur la fonction musculaire). Le point 3 représente le niveau de production d'EOR pour lequel la fonction musculaire est optimale (adapté de Reid, 2001).

est indispensable pour assurer le bon fonctionnement musculaire (point 2, Figure 18) (Reid *et al.* 1993). Dans ce sens, il a été montré qu'un ajout d'antioxydant induisait une diminution de la production d'EOR à l'état basal ce qui avait pour conséquence de diminuer la fonction musculaire (caractérisé par une diminution de

la force) (Point 1, Figure 18) (Reid *et al.* 1993). Enfin, l'exposition du muscle à des doses croissantes d'EOR a permis de

mettre en évidence un effet dose-réponse (Points 3 et 4, Figure 18). Lorsque les niveaux d'EOR deviennent trop importants, une diminution de la fonction musculaire a été observée (Reid *et al.* 1993). Même si les mécanismes restent encore peu clairs, les EOR semblent réguler les mécanismes de contraction *via* notamment la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} régulant le couplage excitation-contraction musculaire (Favero *et al.* 1995 ; Oba *et al.* 1996). Comme indiquée dans le modèle de Reid, l'accumulation d'EOR peut avoir les effets inverses en induisant une fatigue musculaire, constituant ainsi un facteur limitant à l'exercice. De plus, la littérature semble mettre en avant qu'une supplémentation en antioxydants et notamment en N-acétylcystéine (NAC), utilisé comme précurseur du GSH, permet de diminuer les peroxydations lipidiques et d'améliorer la performance musculaire lors d'exercices d'endurance globaux ou locaux (McKenna *et al.* 2006 ; Medved *et al.* 2004).

Malgré ces observations, le débat reste ouvert pour déterminer si l'augmentation des EOR induit par l'exercice, et donc l'augmentation des dommages cellulaires, représente un stimulus nécessaire ou délétère aux adaptations physiologiques. Des éléments de réponse sont donnés par l'étude de l'exercice chronique (entraînement) sur les marqueurs du stress oxydant avec de plus en plus d'études suggérant que la production d'EOR, notamment au cours d'un

effort, répond au **principe d'hormèse** allant dans le même sens que le modèle de Reid (Gomez-Cabrera *et al.* 2008 ; Radak *et al.* 2008). Ce principe désigne une réponse biologique à une exposition répétée à des facteurs de stress comme les EOR, induisant des adaptations favorables afin d'améliorer les performances physiologiques. Cela traduit le fait que les EOR peuvent avoir des effets opposés suivant les niveaux de production au sein des cellules. Ainsi, il a été montré que la production d'EOR au cours d'un entraînement, notamment à intensité modérée, constitue un élément indispensable à l'augmentation des capacités antioxydantes associées, et à la diminution de la production des EOR et des dommages oxydatifs cellulaires pour un exercice donné (Gomez-Cabrera *et al.* 2008 ; Ji, 2008). Ces adaptations du système antioxydant, caractérisées notamment par l'augmentation de l'activité de certains antioxydants enzymatiques, semblent être consécutives à une stimulation de facteurs de transcriptions tel que NF-κB par les EOR (Ji, 2008). De plus, l'augmentation des EOR au cours d'un entraînement permettrait d'activer certaines voies de signalisation impliquées dans les processus d'angiogenèse, de biogénèse mitochondriale ou encore dans la balance synthèse/dégradation des protéines (Gomes *et al.* 2012). De façon générale, il semble donc y avoir un niveau optimal de production d'EOR pour induire des adaptations biologiques bénéfiques. Dans ce sens, il est bien admis que l'adaptation des défenses antioxydantes ne permet pas d'éliminer totalement les dommages cellulaires mais simplement de réduire les potentiels dommages futurs induits par l'effort (Radak *et al.* 2008).

L'ensemble de ces données peuvent constituer des éléments explicatifs des effets controversés des supplémentations en antioxydants qui peuvent interférer avec les adaptations physiologiques liées à l'entraînement chez des sujets sains (Gross et Baum, 2015 ; Gomez-Cabrera *et al.* 2008).

NB : Les effets des supplémentations en antioxydants combinés à l'entraînement seront abordés de façon plus détaillée dans la partie III.3.c de la présente revue de la littérature.

Cependant, il est important de noter que ces observations ont été faites chez des populations de sujets sains. Or, chez des sujets présentant une pathologie comme une maladie cardiovasculaire, le diabète, l'obésité ou encore la BPCO, le stress oxydant semble être majoré, que ce soit au repos ou après un exercice, ce qui peut potentiellement entraîner des adaptations physiologies différentes. Dans la prochaine partie, nous allons donc faire le point sur les différentes caractéristiques du stress oxydant chez les BPCO que ce soit à l'état basal ou après un effort.

Ce qu'il faut retenir :

- La production d'EOR est **physiologique** et il existe différentes sources dont la principale source est la mitochondrie.
- Pour **réguler la production d'EOR**, l'organisme est constitué d'un vaste système de défenses en **antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques** qui agissent de façon **complémentaire**.
- Le **stress oxydant** correspond à un déséquilibre de la **balance Redox** qui se caractérise notamment par une augmentation des **dommages cellulaires oxydatifs** au niveau lipidiques, protidiques et de l'ADN.
- L'augmentation des EOR peut induire des **adaptations physiologiques** au niveau cellulaire répondant au **principe d'hormèse**.

2) Qu'en est-il du stress oxydant dans la BPCO ?

a) Espèces oxygénées réactives et dommages oxydatifs cellulaires

Les patients BPCO sont exposés à des facteurs tels que le tabac, l'inactivité physique ou encore l'altération des échanges gazeux, connus pour induire une augmentation de la production d'EOR qui peut être à l'origine d'un déséquilibre de la balance « redox » (Valko *et al.* 2007). En effet, de nombreuses études ont décrit des **niveaux plus élevés d'EOR à l'état basal chez les patients BPCO** comparativement à des sujets sains (Couillard *et al.* 2002). Plus particulièrement, les études montrent une élévation des niveaux d'O₂^{•-} ou d'H₂O₂ que ce soit dans le sang mais aussi dans le muscle (vaste latéral du quadriceps) des patients BPCO par rapport aux sujets sains (Puente-Maestu *et al.* 2012 ; Picard *et al.* 2008). Comme identifié dans la partie précédente, le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale est aussi une des principales sources de production des EOR chez les patients BPCO, et même à ce niveau-là, la production d' H₂O₂ est majorée par rapport à des sujets sains (Puente-Maestu *et al.* 2012 ; Picard *et al.* 2008).

Mais la mitochondrie n'est pas seulement une source de production d'EOR, elle en est aussi la cible. En 2005, Barreiro *et al.* ont montré des taux d'oxydations de plusieurs protéines mitochondriales plus élevés par rapport à des sujets sains, comme la créatine kinase, contribuant à la présence d'une dysfonction mitochondriale chez les patients BPCO. Plus généralement, ces observations sont décrites au niveau musculaire par une élévation **des taux de protéines carbonylées** chez les patients BPCO (Couillard *et al.* 2003 ; Barreiro *et al.* 2003 ; Fermoselle *et al.* 2012).

Chez les patients BPCO, le déséquilibre de la balance « redox » est décrit plus largement par une **augmentation des peroxydations lipidiques** que ce soit au niveau sanguin ou musculaire par rapport à des sujets sains. La littérature rapporte ainsi des taux élevés, indépendamment de la sévérité de l'obstruction bronchique des patients BPCO, à l'état basal, de plusieurs produits issus de l'oxydation des lipides comme les hydroperoxydes lipidiques (Ismail *et al.* 2015) et plus généralement des produits secondaires : TBARS (Malhotra *et al.* 2008 ; Couillard *et al.* 2003 ; Wozniack *et al.* 2013), MDA (Ismail *et al.* 2015), 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (Barreiro *et al.* 2003) ; lipofuscine (Allaire *et al.* 2002 ; Barreiro *et al.* 2003). Ces observations ont été faites chez des patients BPCO stables mais aussi lors de périodes d'exacerbations, avec un déséquilibre « redox » qui semble être majoré au repos (Gumral *et al.* 2009 ; Crul *et al.* 2010).

Enfin, il a été récemment développé et validé **un modèle de culture cellulaire *in vitro* à partir de biopsies musculaires du quadriceps de patients BPCO** (Pomiès *et al.* 2015). Dans cette étude, les auteurs ont rapporté des niveaux plus élevés de protéines carbonylées et des peroxydations lipidiques dans les myotubes de patients BPCO comparativement aux myotubes de sujets sains reflétant un stress oxydant accru même au niveau de la cellule musculaire.

De plus, il a été montré que **l'exercice global induisait une augmentation de la production d'EOR**, notamment l' $O_2^{\cdot -}$ évalué au niveau sanguin, plus importante chez les patients BPCO par rapport à des sujets sains (Van Helvoort *et al.* 2006 ; Fischer-Wellman *et al.* 2009). De façon intéressante, Van Helvoort *et al.* (2007) ont montré une majoration du déséquilibre redox que ce soit après un exercice maximal sur cycloergomètre mais aussi après un effort

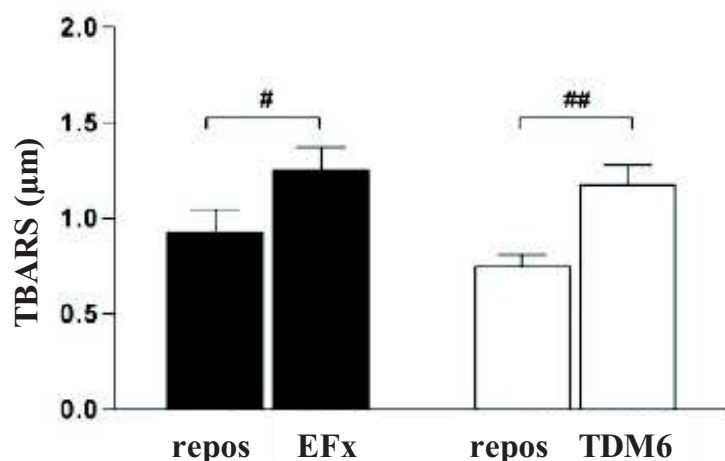


Figure 19. Niveaux de TBARS plasmatiques au repos et après une EFx et un TDM6 (Van Helvoort *et al.* 2007).

sous-maximal comme le TDM6.

Les auteurs ont ainsi montré une augmentation de la production d'EOR et des TBARS plasmatiques en réponse à ces deux exercices (cf. Figure 19). De plus, cette étude rapporte une augmentation du taux de protéines carbonylées seulement suite au TDM6.

Or, le TDM6 étant considéré comme un exercice proche des activités de la vie quotidienne (Pitta *et al.* 2005), ces données

laissent suggérer que les patients BPCO sont régulièrement exposés au stress oxydant.

Suite à un exercice global, l'origine du stress oxydant est inconnue car il peut provenir de nombreux organes. Afin de déterminer si ce stress oxydant avait une origine musculaire, les effets d'un exercice spécifique d'endurance du quadriceps sur certains marqueurs du stress oxydant ont été évalués (Couillard *et al.* 2003 ; Koechlin *et al.* 2004). Ces études ont principalement montré une augmentation de la production d' $O_2^{\cdot -}$ après l'exercice que ce soit chez les patients BPCO ou les sujets sains, mais de façon intéressante, seuls les patients

présentaient une augmentation des protéines carbonylées et des TBARS 6 heures après la fin de l'effort. Ces données vont donc dans le sens d'une exposition régulière des patients BPCO à un déséquilibre « redox » et aussi expliquent les taux plus élevés de dommages oxydatifs décrits à l'état basal.

b) Défenses en antioxydants : des données discordantes

Nous venons de voir que les patients BPCO stables présentent clairement un déséquilibre de la balance « redox » à l'état basal qui est majoré à l'effort. Ainsi, les défenses antioxydantes semblent être submergées par la production excessive d'EOR. Mais contrairement aux EOR et aux dommages oxydatifs cellulaires, la littérature rapporte une **importante hétérogénéité des données sur les antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques**.

- *Système antioxydant enzymatique*

Tout d'abord, au niveau des antioxydants enzymatiques, qui constituent la première ligne de défense contre les EOR, de nombreuses discordances sont retrouvées dans la littérature (cf. Tableau 2 ci-dessous). Dans cette analyse de la littérature, nous pouvons distinguer les études rapportant une diminution des capacités antioxydantes enzymatiques chez les patients BPCO par rapport à des sujets sains notamment au niveau sanguin. En revanche, d'autres études rapportent une augmentation de ces antioxydants chez les patients BPCO, et notamment la SOD. Comme décrit précédemment, face à une augmentation de la production d'EOR (e.g. lors d'un exercice ou un entraînement), les antioxydants enzymatiques peuvent être augmentés dans un premier temps, reflétant une adaptation physiologique de l'organisme à un déséquilibre redox (Levine et Kidd, 1996). Selon ces auteurs, c'est le phénomène de chronicité du déséquilibre redox qui va induire une diminution des capacités antioxydantes. La susceptibilité au stress oxydant étant variable d'une personne à une autre, cela peut constituer un des éléments explicatifs de l'hétérogénéité des données retrouvées dans la littérature.

Références / Auteurs	Population	Tissu	SOD	GPx	Catalase
Nadeem <i>et al.</i> (2005)	82 patients BPCO vs 22 sujets sains non-fumeurs	S	↗ activité	↗ activité	=
Zeng <i>et al.</i> (2013)	35 patients BPCO stables vs 28 sujets sains non-fumeurs	S	↘ activité	↘ activité	
Kirkil <i>et al.</i> (2008)	35 patients BPCO stables vs 15 sujets sains non-fumeurs	S	↘		↘
Ismail <i>et al.</i> (2015)	30 patients BPCO stables vs 30 sujets sains	S	↘ activité		↘ activité
Wozniak <i>et al.</i> (2013)	35 patients BPCO vs 30 sujets sains non-fumeurs	S	↗ activité	↘ activité	=
Santos <i>et al.</i> (2004)	21 patients BPCO vs 24 sujets sains	S	↗	↘	=
Gosker <i>et al.</i> (2005)	21 patients BPCO vs 12 sujets sains	M	=	=	
Rodriguez <i>et al.</i> (2012)	18 patients BPCO vs 12 sujets sains	M	↗ activité		=
Fermoselle <i>et al.</i> (2012)	29 patients BPCO vs 10 sujets sains	M	↗		=
Barreiro <i>et al.</i> (2003)	12 patients BPCO vs 6 sujets sains	M	↗		=
Couillard <i>et al.</i> (2003)	12 patients BPCO vs 6 sujets sains	M		=	

Tableau 2. Synthèse des principales études ayant évalué le système antioxydant enzymatique dans le sang et le muscle de patients BPCO. Les signes représentent les données obtenues chez les patients BPCO comparativement à un groupe de sujets sains contrôle. S=sang ; M=muscle (biopsies du vaste latéral externe du quadriceps).

De plus, lorsque nous analysons la littérature sur les niveaux d'antioxydants musculaires (à partir de biopsies du vaste latéral externe), on s'aperçoit que les données semblent plus homogènes qu'au niveau sanguin. Les études ne rapportent pas de différence au niveau de la GPx et de la catalase musculaires chez les patients BPCO comparativement aux sujets sains. En revanche, que ce soit pour les niveaux ou l'activité, la SOD semble être plus élevée chez les patients BPCO suggérant une adaptation physiologique à une production majorée d'EOR. Quoi qu'il en soit, au niveau musculaire, ces adaptations enzymatiques sont insuffisantes pour lutter contre les effets délétères EOR suggérant un déficit au niveau de l'activité des enzymes antioxydantes, mais à l'heure actuelle il n'y a pas de donnée disponible dans la littérature pour vérifier cette hypothèse.

- *Système antioxydant non-enzymatique*

Comme nous l'avons vu dans la partie II.1.b, l'activité des antioxydants enzymatiques est dépendante de la disponibilité de différents co-facteurs correspondant à une partie des **défenses non-enzymatiques du système antioxydant**. Cependant, peu d'études ont évalué les niveaux d'oligo-éléments chez les patients BPCO mais celles-ci ont montré un déséquilibre du ratio Cu/Zn dans le sens d'un déficit en zinc ainsi que des valeurs plus faibles de sélénium qui sont des co-facteurs de la SOD et de la GPx, respectivement (cf. Tableau 3 ci-dessous).

Un autre co-facteur essentiel de la GPx est le GSH. De façon étonnante, la littérature s'est intéressée principalement au niveau de GSH sans prendre en compte sa forme oxydée, le GSSG. Même si au niveau sanguin les niveaux de GSH sont plus faibles chez les patients BPCO par rapport aux sujets sains, cela ne semble pas être le cas au niveau musculaire comme l'ont rapporté récemment Rodriguez *et al.* (2012) dans leur papier.

Par ailleurs, concernant les antioxydants non-enzymatiques, la littérature s'est particulièrement intéressée aux niveaux sanguins de vitamines C et E chez les patients BPCO. Pour rappel, les vitamines C et E agissent en synergie avec le GSH afin de lutter notamment contre l'oxydation des lipides. Mais sur ces marqueurs, comme pour la GSH, il a été rapporté des discordances importantes entre les études. En effet, certaines études ont rapporté des niveaux équivalents et d'autres des niveaux plus faibles comparativement à des sujets sains. Ainsi, les données actuelles de la littérature ne permettent pas d'identifier spécifiquement les déficits en antioxydants chez une population de patients BPCO stables.

Références / Auteurs	Population	Tissu	GSH and GSSG	Vitamines	Oligo- éléments
Zeng <i>et al.</i> (2013)	35 patients BPCO stables vs 28 sujets sains non-fumeurs	S	GSH ↓		
Kirkil <i>et al.</i> (2008)	35 patients BPCO stables vs 15 sujets sains non-fumeurs	S			Zinc ↓
Karadag <i>et al.</i> (2004)	26 patients BPCO stables vs 24 sujets sains	S			Cu/Zn ↑ Zinc ↓
Ismail <i>et al.</i> (2015)	30 patients BPCO stables vs 30 sujets sains	S	GSH ↓	Vit C ↓	
Wozniak <i>et al.</i> (2013)	35 patients BPCO vs 30 sujets sains non-fumeurs	S		Vit E =	
Santos <i>et al.</i> (2004)	21 patients BPCO vs 24 sujets sains	S			↓ Selenium
Dhakal <i>et al.</i> (2015)	100 patients BPCO vs 100 sujets sains	S		Vit C = Vit E ↓	
Koechlin <i>et al.</i> (2004)	10 patients BPCO stables vs 7 sujets sains	S		Vit E =	
Couillard <i>et al.</i> (2002)	11 patients BPCO stables vs 12 sujets sains	S		Vit E ↓	
Gosker <i>et al.</i> (2005)	21 patients BPCO vs 12 sujets sains	M	GSH =		
Rodriguez <i>et al.</i> (2012)	18 patients BPCO vs 12 sujets sains	S et M	GSH =		

Tableau 3. Synthèse des principales études ayant évalué le système antioxydant non-enzymatique (ratio GSH/GSSG ; vitamines C, E; cuivre, zinc et sélénium) dans le sang et le muscle de patients BPCO. Les signes représentent les données obtenues chez les patients BPCO comparativement à un groupe de sujets sains contrôle. S=sang ; M=muscle (biopsies du vaste latéral externe du quadriceps).

c) Comment expliquer ces discordances dans la BPCO ?

Tout d'abord, ces discordances entre les études peuvent être attribuées en partie aux **différences méthodologiques** utilisées. En effet, outre les différences de techniques utilisées pour évaluer les marqueurs du stress oxydant et les antioxydants, ces études ont inclus un nombre assez faible de patients BPCO ce qui ne permet pas d'avoir un reflet de l'ensemble de la population au vue de l'importante hétérogénéité décrite dans cette maladie. De plus, la comparaison de moyenne par rapport aux données obtenues chez un groupe de sujets sains ne permet pas d'identifier clairement les déséquilibres individuels des marqueurs du stress oxydant. Mais ces variabilités et limites méthodologiques ne constituent en aucun cas les

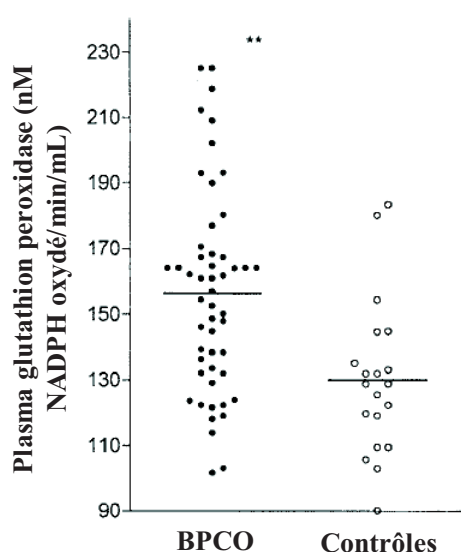


Figure 20. Représentation des valeurs individuelles de l'activité plasmatique de la GPx chez des patients BPCO et un groupe de sujets sains (Nadeem et al. 2005)

seules raisons. En effet, comme illustré sur la figure 20, il existe aussi une **importante variabilité inter-individuelle** chez les patients BPCO suggérant l'existence de différents profils des marqueurs du stress oxydant pouvant être en lien avec l'impact de plusieurs facteurs.

Un des premiers éléments pris en considérations dans les études est **le tabac**, considéré de par sa composition comme une source importante d'EOR et donc d'apparition d'un déséquilibre redox (MacNee et Rahman, 2000). Même si les mécanismes restent peu clairs, il est bien admis que la consommation de tabac induit une réduction des niveaux d'antioxydants non-enzymatiques, notamment la

vitamine C et E (Bruno and Traber, 2006). De plus, Wozniak *et al.* (2013) ont montré que l'activité de la SOD était augmentée, et associée à une augmentation des TBARS, chez des patients BPCO par rapport à des sujets sains non-fumeurs. Puis de façon intéressante, un protocole de sevrage tabagique permettait de réduire à la fois les niveaux de TBARS mais aussi l'activité de la SOD chez les patients BPCO. En revanche, Zeng *et al.* (2013) ont mis en évidence que les niveaux plasmatiques de SOD et GPx étaient diminués chez des BPCO non-fumeurs par rapport à des sujets sains non-fumeurs. Ces observations suggèrent donc l'implication d'autres facteurs physiopathologiques dans la régulation des niveaux systémiques des marqueurs du système antioxydant chez les patients BPCO.

De plus, comme nous l'avons vu dans la partie I.1 de la présente revue de littérature, les femmes semblent être plus susceptibles aux effets du tabac suggérant un **rôle potentiel du genre**. Au niveau des marqueurs du stress oxydant sanguin ou musculaire (vaste latéral externe du quadriceps), à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux différences potentielles entre les hommes et les femmes dans la BPCO. Même si la littérature a décrit classiquement que les hommes avaient des niveaux plus faibles d'antioxydants enzymatiques générant ainsi un stress oxydant plus important (Tothova *et al.* 2013), des études récentes remettent en question cela (Hakim *et al.* 2012 ; Brunelli *et al.* 2014). En effet, ces auteurs ont mis en évidence un déséquilibre de la balance « redox » plus important chez des femmes saines avec ou sans consommation de tabac par rapport à des hommes. Ainsi, lorsque nous analysons les études chez les patients BPCO, certaines études ont inclus uniquement des hommes alors que d'autres ont inclus aussi des femmes ce qui peut constituer un élément explicatif des discordances décrites dans la littérature au niveau du système antioxydant.

La sévérité de l'obstruction bronchique semble aussi constituer un facteur potentiel de modification des taux et d'activité des enzymes antioxydantes. Notamment, il est bien admis que les patients en situation d'exacerbation ont une augmentation importante des dommages oxydatifs cellulaires associée à une diminution importante des antioxydants enzymatiques par rapport à des patients BPCO stables (Zeng *et al.* 2013 ; Gumral *et al.* 2009). Cependant, l'activité de ces enzymes antioxydantes ne semble pas être différente selon le stade GOLD chez les patients BPCO stables (Nadeem *et al.* 2005). L'altération des échanges gazeux consécutive à l'atteinte pulmonaire peut entraîner une **hypoxémie** qui semble aussi constituer un facteur favorisant l'augmentation du stress oxydant (Koechlin *et al.* 2005 ; Puente-Maestu *et al.* 2009).

En plus des facteurs décrits précédemment, **la nutrition** est considérée comme l'un des plus important pouvant réguler les niveaux d'antioxydants non-enzymatiques et expliquer les différences entre les études (Schols, 2013 ; De Battle *et al.* 2010). Même si l'association directe entre la consommation de micronutriments (e.g. vitamines) et les taux sanguins de micronutriments (e.g. vitamines ou oligo-éléments) n'a pas été démontrée, certaines études rapportent une diminution de la concentration plasmatique en vitamines C et E, plus spécifiquement chez les patients BPCO présentant une malnutrition (Dhakal *et al.* 2015 ; Lin *et al.* 2010 ; Pirabassi *et al.* 2012). Mais ces études ont évalué le statut nutritionnel des patients BPCO uniquement à partir d'interviews ou de questionnaires de fréquence, sans

recueil et analyse directe des aliments consommés. Pourtant une étude récente a rapporté des apports en micronutriments souvent en dessous des apports nutritionnels conseillers journaliers (Van de Bool *et al.* 2014), ce qui laisse suggérer une implication dans la diminution des capacités antioxydantes non-enzymatiques décrites chez certains patients BPCO.

Par ailleurs, **l'atteinte musculaire périphérique**, et plus précisément **l'atrophie**, semble aussi conditionner les niveaux des marqueurs du stress oxydant. Comme évoqué précédemment, les patients BPCO présentant une atrophie musculaire ont des dommages cellulaires plus importants que ce soit au niveau sanguin ou au niveau musculaire (Gouzi *et al.* 2013). De plus, une étude récente a mis en évidence qu'une augmentation des niveaux de SOD musculaire plus spécifiquement chez les patients BPCO présentant une atrophie musculaire (Fermoselle *et al.* 2012) constitue ainsi un autre facteur à prendre en compte dans l'analyse et l'interprétation des données sur le stress oxydant.

Enfin, **le rôle de l'activité physique dans la régulation des défenses antioxydantes et des marqueurs des dommages oxydatifs** sera abordé plus en détails dans la partie III.3.a. de la revue de la littérature du présent manuscrit.

d) Implication dans l'atteinte musculaire périphérique

- *Stress oxydant et endurance musculaire :*

Comme nous venons de le voir, comparativement à des sujets sains, les patients BPCO ont une augmentation des marqueurs du stress oxydant après un simple exercice d'endurance du quadriceps (Couillard *et al.* 2003 ; Koechlin *et al.* 2004). Dans la BPCO, la première observation reliant le stress oxydant à l'endurance montrait une corrélation négative entre le delta des TBARS musculaires (pré/post exercice) et le Tlim (Couillard *et al.* 2003). Ces données montraient donc que plus les patients BPCO avaient une augmentation importante des TBARS suite à l'exercice d'endurance et plus leur Tlim était faible. **Cette implication du stress oxydant dans l'endurance musculaire du quadriceps a été mise en évidence par une supplémentation pharmacologique à court terme en NAC.** En effet, les auteurs ont supplémenté des patients BPCO avec 1800mg de NAC (ou placebo) pendant les 4 jours précédents l'évaluation du Tlim (Koechlin *et al.* 2004).

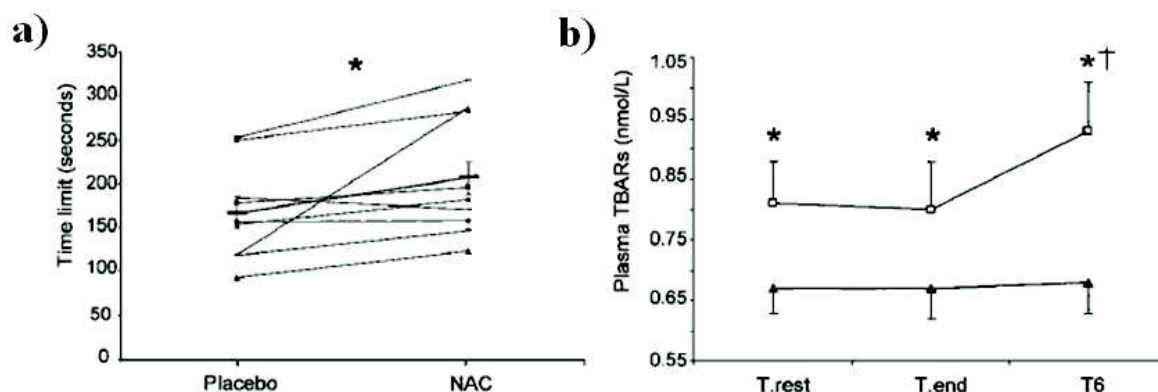


Figure 21. a) Temps d'endurance au cours d'un exercice localisé sur le quadriceps des patients BPCO en conditions placebo et NAC. b) Evaluation des niveaux de peroxydation lipidique, évalués par les TBARS plasmatiques avant et après l'exercice d'endurance du quadriceps (Koechlin *et al.* 2004)

Comme illustré sur la figure 21 ci-dessus, malgré l'hétérogénéité des mesures, cette étude a rapporté une augmentation du Tlim chez les patients BPCO ayant reçu la supplémentation en NAC associée à une diminution des niveaux de TBARS sanguins et de la production d'O₂^{•-} que ce soit avant, immédiatement ou 6 heures après l'effort.

Ces données sont en accord avec les résultats des études ayant supplémenté des sujets sains en NAC à court terme (cf. 1^{ère} Partie : III.1.d) et répondant au modèle théorique proposé par Reid. En effet, pour rappel, ce modèle mettait en avant que des niveaux trop élevés d'EOR pouvaient induire une limitation de l'endurance musculaire. Les auteurs mettent ainsi en lien la réduction du temps d'endurance avec l'apparition d'une fatigue musculaire suite à l'accumulation excessive d'EOR. Or, des études chez les patients BPCO ont montré que des supplémentations aigües en allopurinol (inhibiteur de la xanthine oxydase, une des sources principales d'EOR) ou en vitamine C permettaient là aussi de réduire la production d'EOR ainsi que la fatigue musculaire suite à un exercice d'endurance du quadriceps (Delamplé *et al.* 2008 ; Rossman *et al.* 2013).

Comme décrit précédemment (cf. 1^{ère} Partie : II.2.a), les patients BPCO ont une diminution des capacités oxydatives du muscle notamment caractérisée par un shift des fibres de type I vers les fibres de type II. Or, certains auteurs (Picard *et al.* 2008) suggèrent que l'augmentation de la production d'EOR retrouvée chez les patients BPCO soit en lien avec l'augmentation de la proportion de fibres de type II. Chez l'animal, il a été montré que les mitochondries des fibres de type II avaient des caractéristiques spécifiques induisant une

production plus importante d'EOR comparativement aux fibres de type I (Anderson et Neuffer, 2006). Dans ce sens et même si à l'heure actuelle les mécanismes impliqués dans l'endurance musculaire et régulés par le stress oxydant sont méconnus dans la BPCO, une étude récente a mis en avant des corrélations entre des marqueurs de ces 2 paramètres (Van den Borst *et al.* 2012). Plus particulièrement, les auteurs ont rapporté des corrélations négatives entre les niveaux de protéines carbonylées musculaires et l'endurance musculaire, la proportion de fibres de type I mais aussi les niveaux d'ARNm de PGC1- α . Mais cela reste à confirmer grâce à des études expérimentales intervenant sur les niveaux de stress oxydant des patients BPCO.

- *Stress oxydant, perte de force et masse musculaire*

Actuellement, dans la BPCO, il n'existe aucune étude ayant montré une implication directe du stress oxydant dans la régulation de la force musculaire. Toutefois, deux études rapportent une **corrélation négative entre le taux de protéines carbonylées musculaire et la FMIV** (Barreiro *et al.* 2008 ; Gouzi *et al.* 2013). Pour apporter des éléments explicatifs à cette potentielle relation, les études se sont focalisées plus spécifiquement sur le lien entre le stress oxydant et la perte de masse musculaire considérée comme un des principaux déterminants de la FMIV dans la BPCO (Maltais *et al.* 2014 ; Gondin *et al.* 2005). Dans ce sens, il a été aussi décrit des corrélations négatives entre les dommages oxydatifs au niveau musculaire (protéines carbonylées et peroxydations lipidiques) et la masse musculaire globale (Van Helvoort *et al.* 2007) ou encore la SSt des fibres musculaires du quadriceps des patients BPCO (Gouzi *et al.* 2013). Même si ces corrélations permettent simplement d'émettre des hypothèses, il existe dans la littérature un ensemble de données suggérant une **relation de causalité entre le stress oxydant et la perte de masse musculaire** (Barreiro, 2014 ; Puig-Vilanova *et al.* 2015). Ainsi, certains auteurs rapportent que chez des patients BPCO présentant les caractéristiques d'une « atrophie » musculaire, déterminée soit par des critères « indirects » (Van Helvoort *et al.* 2007 ; Barreiro *et al.* 2009 ; Puig-Vilanova *et al.* 2015) ou par des analyses en clusters incluant des mesures directes de la SSt des fibres musculaires (Gouzi *et al.* 2013), les marqueurs du stress oxydant sont plus élevés comparativement à des sujets sains et des patients BPCO sans « atrophie ». Chez ces patients BPCO « atrophiques », le stress oxydant est retrouvé que ce soit au niveau du plasma ou du muscle avec notamment une majoration des peroxydations lipidiques et des protéines carbonylées, respectivement.

Cette relation entre le stress oxydant et la masse musculaire a été mise en évidence que ce soit chez l'animal ou dans diverses conditions induisant une atrophie musculaire comme lors de protocoles d'immobilisation (« Bed rest ») (Powers *et al.* 2011 ; Smuder *et al.* 2010 ; Kondo *et al.* 1991). Tout d'abord, chez l'animal, il a été montré qu'une immobilisation induisant une perte de masse musculaire était associée à une augmentation de la production d'EOR et des dommages oxydatifs (Kondo *et al.* 1991 ; Mcclung *et al.* 2008). De plus, ces études ont montré qu'une supplémentation en antioxydants permettait d'induire les effets inverses, à savoir une diminution de la production des EOR et des dommages cellulaires ainsi qu'une limitation de la perte de masse musculaire.

Lors d'études fondamentales chez l'animal ou en culture cellulaire, il a été montré que cette augmentation de la production d'EOR suite à une inactivité musculaire pouvait induire une **stimulation des voies de signalisation de la protéolyse** comme le système ubiquitine-protéasome, l'autophagie ou encore le système des calpaïnes et des caspases (Powers *et al.* 2011).

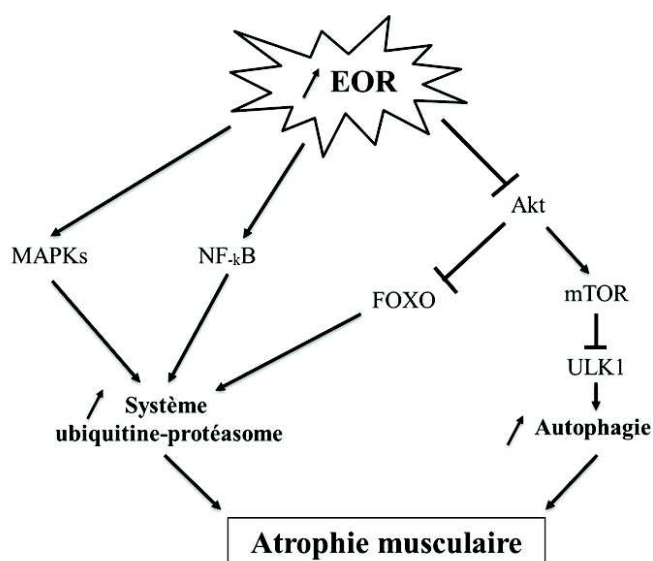


Figure 22. Représentation schématique des EOR comme déclencheurs potentiels des voies de signalisations impliqués dans les systèmes de catabolisme des protéines. Définition des abréviations : mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB), forkhead box O (FOXO), protein kinase Akt (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR).

Basé sur les connaissances actuelles de la littérature, la régulation des voies de signalisation de l'équilibre synthèse/dégradation des protéines en sont au simple stade d'hypothèse dans la BPCO comme illustré sur la figure 22 (Puig-Vilanova *et al.* 2015 ; Guo *et al.* 2015 ; Langen *et al.* 2013). En effet, même si chez les patients BPCO présentant une « atrophie », les données sont relativement homogènes sur l'augmentation des marqueurs des voies de signalisation des systèmes de protéolyse et

notamment le système ubiquitine-protéasome et de l'autophagie (Cf. Partie II.2.b.), la régulation par les EOR est encore largement sujette à caution. Ainsi, une étude récente a montré que certains marqueurs du système ubiquitine-protéasome étaient élevés chez des

patients BPCO, comparativement à des sujets sains, avec une majoration chez ceux présentant une « atrophie » musculaire (Fermoselle *et al.* 2012). Cependant, même si les auteurs rapportent aussi une élévation des marqueurs du stress oxydant musculaire chez les BPCO par rapport aux sujets sains, ils n'apparaissent pas majorer chez les patients « atrophiques ». A l'heure actuelle, cette étude étant la seule à avoir étudié le rôle du stress oxydant dans la régulation des voies de signalisation de l'atrophie musculaire des patients BPCO, des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ou infirmer ces données.

Grâce au **modèle de culture cellulaire *in vitro*** développé dans la BPCO (Pomiès *et al.* 2015), il a été rapporté que l'exposition à des EOR (H_2O_2) induit une augmentation du taux de mortalité des myotubes, ce qui va dans le sens des observations décrites précédemment chez l'animal. L'utilisation de ce modèle de culture cellulaire ouvre donc des perspectives de recherche intéressantes afin d'étudier l'implication du stress oxydant dans la régulation des voies de signalisation de l'atrophie musculaire présentes chez certains patients BPCO.

Ce qu'il faut retenir :

- Dans la littérature, il est bien admis que les patients BPCO ont des niveaux **élevés d'EOR et de dommages cellulaires oxydatifs** par rapport à des sujets sains.
- Concernant les défenses antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques des patients BPCO, les **données sont discordantes** que ce soit au niveau sanguin ou musculaire.
- Ces discordances peuvent être expliquées par des **facteurs méthodologiques** mais aussi **environnementaux** tels que :
 - le tabac
 - le genre
 - la sévérité de l'obstruction bronchique
 - la nutrition
 - l'atteinte musculaire périphérique
 - l'activité physique.
- **Compte tenu des répercussions sur l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO, il apparaît indispensable de faire évoluer l'approche de l'évaluation des marqueurs du stress oxydant afin d'identifier les déficits/déséquilibres spécifiques en antioxydants en vue de la mise en place de thérapies chez ces patients.**

3) Comment lutter contre l'atteinte musculaire périphérique et le stress oxydant dans la BPCO ?

a) La réhabilitation respiratoire

- *Concept général et bénéfices fonctionnels*

La réhabilitation respiratoire correspond à une **approche transdisciplinaire** dans la prise en charge des patients BPCO. Basé sur les connaissances actuelles, un groupe de travail commun aux sociétés savantes internationales (ATS et ERS) a récemment proposé la définition suivante de la réhabilitation respiratoire (Spruit *et al.* 2013):

*« La réhabilitation respiratoire est une **intervention globale** fondée sur une **évaluation approfondie du patient** suivie par des **thérapies individualisées** qui comprennent notamment le **réentraînement à l'effort et le changement de comportement**, visant à **améliorer la condition physique et psychologique** des personnes atteintes de maladies respiratoires chroniques et à **promouvoir l'adhésion à long terme à un comportement favorable à la santé.** »*

Un programme de réhabilitation respiratoire s'articule donc autour de plusieurs composantes (e.g. la nutrition, l'éducation thérapeutique,...) dont **le réentraînement à l'effort (REE) constitue l'axe principal**. Le REE, mis en place au sein de la Clinique du Souffle La Solane à Osséja, comprenait des séances d'endurance globales (marches en extérieur, cycloergomètres) ainsi que des séances de renforcement musculaire, d'équilibre/motricité et d'étirements. L'obstruction bronchique des patients n'étant pas complètement réversible, la prise en charge des atteintes musculaires est devenue la principale cible du REE. Le REE est **individualisé et adapté** aux capacités et aux besoins de chacun des patients (Serres *et al.* 1997) déterminés à partir d'un ensemble d'évaluations permettant d'apprécier à la fois la tolérance à l'effort (e.g. EFx et TDM6) et l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO (cf. 1^{ère} partie II.1.). Comme cela est recommandé (Spruit *et al.* 2013), le REE est notamment composé d'exercices en aérobic (ou en endurance), même s'il n'existe pas de consensus sur l'intensité ou la durée des programmes. Indépendamment des différentes modalités de REE, la réhabilitation respiratoire constitue une **thérapeutique de niveau A** en

termes d'*Evidence-Based Medicine* dans la BPCO concernant la qualité de vie, la dyspnée, la tolérance à l'effort et l'atteinte musculaire périphérique (Ries *et al.* 2007).

Au niveau de la fonction musculaire, le REE permet d'améliorer le temps limite d'endurance musculaire du quadriceps (Tlim) (Gouzi *et al.* 2013). Les mécanismes régulant l'endurance et la force musculaire étant différents, il apparaît logique que le REE basé sur des exercices d'endurance n'induisent pas d'amélioration de la FMIV ou encore de la masse musculaire des patients BPCO (Spruit *et al.* 2013 ; O'Shea *et al.* 2009 ; Ortega *et al.* 2002). L'intérêt de l'utilisation de séances de **renforcement musculaire** apparaît donc pertinent afin de compléter les bénéfices décrits lors des REE en endurance. En effet, lorsque des séances de renforcement musculaire sont combinées aux programmes de REE en endurance, il est clairement bien admis que la FMIV et la SSt des fibres musculaires du quadriceps sont augmentées chez les patients BPCO (Iepsen *et al.* 2015 ; Constantin *et al.* 2013).

Cependant, il est important de noter que l'ensemble des bénéfices ne semble pas optimal. Suivant les critères utilisés, certaines études ont mis en évidence qu'entre 33 % (Vagaggini *et al.* 2009) et 53% (Garrod *et al.* 2004) des patients BPCO réalisant un programme de réhabilitation respiratoire, n'augmentaient pas de façon cliniquement significative leur distance au TDM6.

De plus, Gouzi *et al.* (2013) ont rapporté que suite à un REE de 6 semaines à une intensité

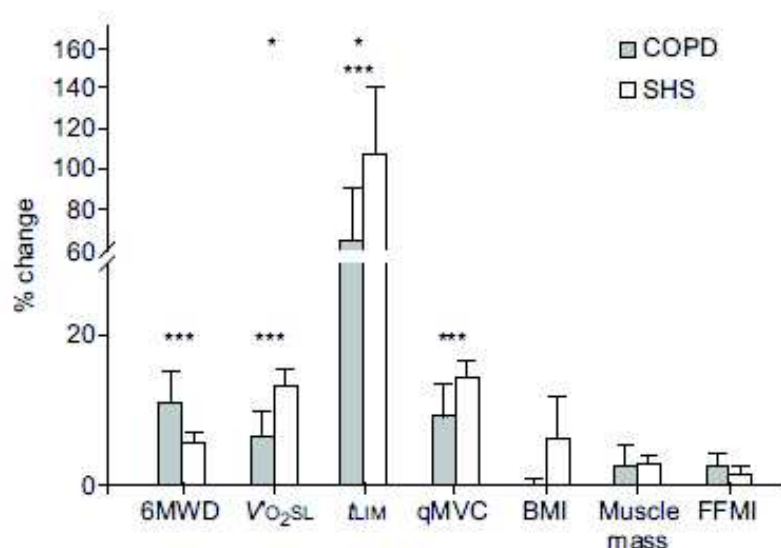


Figure 23. Pourcentage de changement des différents paramètres fonctionnels chez des sujets sains sédentaires (barres blanches) et des patients BPCO (barres grises) suite à un programme de Réhabilitation Respiratoire (Gouzi *et al.* 2013)

correspondante au SV₁ (20 sessions), les **bénéfices fonctionnels**, que ce soit pour le Tlim, la VO_{2SL} ou encore la FMIV du quadriceps, **étaient limités par rapport à des sujets sains sédentaires** (cf. Figure 23). Ces données sont en accords avec des études antérieures montrant des améliorations moins importantes chez des patients BPCO comparativement à des

sujets sains notamment sur la VO_{2SL} (Radom-aizik *et al.* 2007 ; Mador *et al.* 2012 ; Rabinovich

et al. 2001). Nous allons voir dans la prochaine partie que ces données peuvent être expliquées par des adaptations au niveau cellulaire, elles-mêmes limitées chez les patients BPCO.

- *Effets au niveau cellulaire : le stress oxydant comme facteur limitant ?*

Chez les sujets sains âgés, il est clairement admis que suite à un programme de REE, les dommages oxydatifs cellulaires sont diminués et associés à une augmentation des capacités antioxydantes (cf. 1^{ère} Partie : III.1.c.) (Gomez-Cabrera *et al.* 2008 ; Bouzid *et al.* 2015). De façon plus spécifique, l'ensemble des auteurs ont décrit une augmentation des défenses enzymatiques, telles que la SOD et la GPx, que ce soit au niveau sanguin ou musculaire.

Références / Auteurs	Population / Design REE	Tissu	Dommages oxydatifs	Système antioxydant
Rabinovich <i>et al.</i> (2001)	17 patients BPCO 8 semaines (40 sessions) de REE en endurance	S	Peroxydes lipidiques =	GSSG ↗ GSH/GSSG ↘
Pinho <i>et al.</i> (2007)	15 patients BPCO sévères 8 semaines (24 sessions) de REE en endurance	S	TBARS ↗	Capacité antiox. totale ↘
Barreiro <i>et al.</i> (2009)	15 patients BPCO sévères 3 semaines (15 sessions) de REE en endurance	M	HNE-protein ↗ Protéines carbonylées =	activité SOD =
Rodriguez <i>et al.</i> (2012)	18 patients BPCO sévères 8 semaines (40 sessions) de REE en endurance	M	Protéines carbonylées =	GSH ↘ SOD =
Rodriguez <i>et al.</i> (2012)	18 patients BPCO sévères 8 semaines (40 sessions) de REE en endurance	S	MDA = Protéines carbonylées =	GSH =

Tableau 4. Synthèse des principales études ayant évalué les effets d'un programme de réentraînement à l'effort chez les patients BPCO. Les signes représentent les données obtenues chez les patients BPCO comparativement aux valeurs basales. S=sang ; M=muscle (biopsies du vaste latéral externe du quadriceps).

En revanche, chez les patients BPCO, même si peu d'études se sont intéressées aux effets du REE sur les marqueurs du stress oxydant, les adaptations semblent plus limitées. Comme synthétisé dans le tableau 4 ci-dessus, le REE ne permet pas d'améliorer le profil des marqueurs du stress oxydant chez les patients BPCO. Cela peut se caractériser par une augmentation des dommages oxydatifs cellulaires dans certaines études, mais dans tous les cas, une absence d'adaptation du système antioxydant est observée, que ce soit au niveau sanguin ou musculaire. Or comme nous l'avons abordé dans la partie III.2.d. de la présente revue de la littérature, le stress oxydant peut participer à la régulation de nombreuses voies de signalisation impliquées à la fois dans le métabolisme oxydatif et l'équilibre de la balance synthèse/dégradation des protéines.

Chez les patients BPCO stables, les bénéfices du REE au niveau du métabolisme oxydatif apparaissent moins évidents. En effet, une grande majorité des études ne rapportent aucune modification de la typologie musculaire du quadriceps chez les patients BPCO (Gouzi *et al.* 2013 ; Gosker *et al.* 2006 ; Lewis *et al.* 2007) alors que cela est bien décrit chez des sujets sains contrôles (Coggan *et al.* 1992 ; Russel *et al.* 2003). Seul Vogiatzis *et al.* (2011) ont rapporté une augmentation du pourcentage de fibres de type I et une diminution du pourcentage de fibres de type II dans le quadriceps de patients BPCO suite à 10 semaines (30 sessions) de REE en endurance fractionné à haute intensité. A noter que cette étude ne rapporte pas de données chez des sujets sains contrôles ce qui ne permet pas de déterminer si ces adaptations sont similaires chez les patients BPCO.

Au niveau de l'activité et de la biogenèse mitochondriale, il a été montré qu'un REE permettait d'induire une augmentation des enzymes oxydatives (e.g. la CS) ou des facteurs de transcription tels que PGC1- α (Puente-Maestu *et al.* 2003 ; Vogiatzis *et al.* 2010 ; Puente-Maestu *et al.* 2011), mais là aussi sans comparaison avec des groupes de sujets sains. De plus, l'association de ces bénéfices au niveau mitochondrial avec le stress oxydant n'a jamais été démontrée dans la BPCO.

Concernant les effets du REE sur l'angiogenèse musculaire des patients BPCO stables, la littérature décrit une augmentation du ratio capillaires/fibres dans un certain nombre d'études (Vogiatzis *et al.* 2011 ; Gouzi *et al.* 2013). Mais ces adaptations semblent être émoussées chez les patients BPCO stables comme en témoigne une **moindre augmentation à la fois du ratio capillaires/fibres et du VEGF comparativement à des sujets sains sédentaires** (Gouzi *et al.* 2013).

En ce qui concerne les mécanismes impliqués dans la régulation de la force musculaire chez les patients BPCO stables, notamment les marqueurs de la balance synthèse/dégradation, les données sont plus discordantes.

Tout d'abord, certaines études ont rapporté une augmentation de la SSt des fibres musculaires que ce soit de type I ou de type II pour des programmes de REE en endurance à haute intensité de 8/10 semaines et/ou un programme de renforcement musculaire spécifique chez les patients BPCO (Costes *et al.* 2015 ; Lewis *et al.* 2007 ; Vogiatzis *et al.* 2010) comme chez les sujets sains âgés (Leenders *et al.* 2013 ; Scanlon *et al.* 2014). De façon intéressante, Vogiatzis *et al.* (2010) ont montré que la SSt des fibres de type I était augmentée uniquement chez les patients BPCO non cachectiques suite à un REE fractionné à haute intensité de 10 semaines (30 sessions). Au niveau des marqueurs des voies de signalisation de la balance synthèse/dégradation protéique, ces auteurs ont observé une augmentation d'IGF-1, MyoD ainsi qu'une diminution de la myostatine et de l'activité du système ubiquitine-protéasome uniquement dans le muscle des patients BPCO non-cachectiques (Vogiatzis *et al.* 2010).

En réponse à un programme de renforcement musculaire spécifique de 10 semaines chez des patients BPCO stables, Lewis *et al.* (2007) ont montré seulement une augmentation de la concentration musculaire en IGF-1 sans aucune modification de l'ensemble des marqueurs évoqués ci-dessus. Enfin, une étude récente a montré que seul MyoD était augmenté avec la même amplitude chez les patients BPCO stables par rapport à des sujets sains suite à un programme de renforcement musculaire de 8 semaines (Constantin *et al.* 2013).

L'ensemble de ces données montre clairement des bénéfices limités au niveau cellulaire concernant à la fois le métabolisme oxydatif mais aussi l'équilibre de la balance synthèse/dégradation des protéines, suite un programme de REE. Ces voies de signalisation pouvant être régulées par le stress oxydant, la mise en place de **supplémentations en antioxydants chez les patients BPCO** constitue une piste thérapeutique majeure. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en luttant contre le stress oxydant, *via* une supplémentation en antioxydant notamment au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire, les bénéfices au niveau de l'atteinte musculaire périphérique seraient optimisés chez les patients BPCO.

b) Supplémentation en antioxydants : un équilibre complexe

Depuis une quinzaine d'années, du fait de l'implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la BPCO, il y a eu un intérêt grandissant pour les suppléments en antioxydants avec de nombreux travaux réalisés. Ces études se sont focalisées essentiellement sur l'impact des antioxydants sur la fonction respiratoire, les exacerbations ou encore la qualité de vie des patients BPCO. Au cours de cette analyse de la littérature, nous avons retrouvé des méthodologies très variées principalement axées autour de **supplémentations pharmacologiques**, plus particulièrement en NAC, ou de **supplémentations en antioxydants nutritionnels comme les vitamines** avec des résultats oscillants entre bénéfices et controverses.

- *Supplémentation pharmacologique en NAC et BPCO*

Afin de développer des thérapeutiques pharmacologiques efficaces pour les patients BPCO, la très large majorité des études s'est intéressée à la supplémentation en NAC comme un médicament permettant de potentiellement améliorer divers processus pathologiques. La **NAC est considérée à la fois comme un agent mucolytique** (i.e. permet de fluidifier les sécrétions bronchiques) mais aussi comme un **puissant antioxydant de la famille des thiols**. Elle constitue donc un potentiel outil pharmacologique dans le traitement de maladies caractérisées par une augmentation de la production d'EOR et des dommages cellulaires oxydatifs comme c'est le cas dans la BPCO (Kelly, 1998). Après absorption, que ce soit par voie orale ou intraveineuse, la NAC est rapidement métabolisée en cystéine, qui est un précurseur direct de la synthèse intracellulaire de GSH. La NAC agit comme un antioxydant ayant pour objectif de restaurer des niveaux de GSH insuffisants mais il peut aussi agir en réduisant directement les EOR (Aruoma *et al.* 1989).

Dans la BPCO, l'intérêt de la supplémentation en NAC a été démontré dans l'étude de Koechlin *et al.* (2004). Pour rappel, les auteurs ont supplémenté des patients BPCO avec **1800 mg de NAC par jour** (ou placebo) pendant les 4 jours précédents l'évaluation du Tlim. Les bénéfices ont été rapportés que ce soit sur le Tlim mais aussi par une **diminution de la production d'EOR et des dommages oxydatifs lipidiques (TBARS)**.

Cependant, à ce jour et de façon étonnante, aucune étude ne s'est intéressée aux bénéfices à plus long terme d'une supplémentation en NAC sur la fonction musculaire périphérique des

patients BPCO. En effet, les travaux ayant étudiés les effets à plus long terme d'une supplémentation en NAC se sont focalisés sur le déclin la fonction respiratoire, le taux de survenue d'exacerbations ou encore la qualité de vie. Les bénéfices rapportés par la littérature sur ces paramètres sont très limités et les discordances observées entre les études peuvent être expliquées par la variabilité des durées et des doses de supplémentations étudiées (Decramer *et al.* 2005 ; Tse *et al.* 2013). Dans une méta-analyse récente de la littérature, Shen *et al.* (2014) ont montré que la diminution du nombre d'exacerbations était décrite uniquement pour des doses élevées de supplémentation en NAC (minimum de 1200 mg/jour). Ainsi, il est clairement admis dans la littérature qu'il existe un effet dose-réponse de la supplémentation en NAC notamment chez les patients BPCO (Sadowska *et al.* 2005).

Cependant, certaines données de la littérature mettent en avant que les doses élevées de supplémentations en NAC doivent être prescrites avec précaution. En effet, Sayin *et al.* (2014) ont montré que la supplémentation en NAC pouvait induire une augmentation de la progression du cancer des poumons que ce soit à partir d'un modèle de souris ou des cellules pulmonaires tumorales humaines mises en culture. Il a été démontré que la réduction de la production des EOR et des dommages cellulaires, notamment de l'ADN, induisait une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses et non leur destruction (*via* une réduction de l'activité de la protéine p53). Les auteurs ont conclu que la supplémentation en antioxydants, notamment en NAC, pourrait être dangereuse chez les patients ayant un stade peu avancé de cancer des poumons ou les patients à risque de développer cette maladie comme les BPCO. En effet, il est considéré que les patients BPCO ont un risque 2 à 5 fois supérieur à celui d'un fumeur aux capacités pulmonaires normales de développer un cancer des poumons (Schroedl et Kalhan, 2012).

Ainsi, même si la supplémentation en NAC constitue une potentielle piste thérapeutique dans la prise en charge des patients BPCO stables, les données actuelles ne rapportent pas de bénéfice à plus long terme. De plus, compte tenu des résultats controversés dans la littérature concernant l'utilisation de doses élevées d'antioxydants, celle-ci doit être délivrée avec précaution pour éviter de potentiels effets délétères.

- *Supplémentation en antioxydants nutritionnels et BPCO*

Depuis une vingtaine d'années, différentes études ont suggéré que le risque de survenue de BPCO pouvait être associé à un déficit d'apports en antioxydants nutritionnels, comme les vitamines, les oligo-éléments ou encore les polyphénols. Dans ce sens, une alimentation riche en fruits en légumes, qui sont les principales sources d'antioxydants non-enzymatiques, était associée à un risque plus faible de survenue de BPCO (Brug *et al.* 2004), et à une diminution de la mortalité (Walda *et al.* 2002) et du risque d'exacerbations (Tug *et al.* 2004). De plus, certaines études comme celle de Keranis *et al.* (2010), ont décrit une association entre la consommation de vitamines et la fonction pulmonaire de patients BPCO. Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'un shift vers une alimentation riche en antioxydants dans un groupe de patients BPCO pendant 3 ans permettait de limiter le déclin du VEMS par rapport à des patients ayant une alimentation « libre ». Combiné au fait que des supplémentations aiguës en vitamines ont montré des effets bénéfiques au niveau de la fonction musculaire périphérique (cf. Partie III.2.d ; Rossman *et al.* 2013), il apparaît intéressant d'analyser les effets rapportés par la littérature sur les apports en antioxydants non-enzymatiques à plus long terme chez les patients BPCO.

Chez les patients BPCO, du fait de leur activité antioxydante importante et la présence de valeurs faibles rapportées dans certaines études par rapport à des sujets sains, **les vitamines C et E ont été plus spécifiquement étudiées**. Tout d'abord, les supplémentations en ces vitamines ont été effectuées de façon dissociée. Chez des patients BPCO stables, il a été montré que des supplémentations en vitamine E à des doses de 400 à 800 UI/jour pendant 8 à 12 semaines, n'apportaient aucun bénéfice à la fois sur le système antioxydant et les niveaux de peroxydations lipidiques (TBARS et MDA) (Daga *et al.* 2003 ; Nadeem *et al.* 2008). Cette absence de bénéfice sur les marqueurs du stress oxydant chez les patients BPCO stables a également été décrite pour une supplémentation en vitamine C de 12 semaines (250 mg/jour). Ainsi, comme le rapporte Schols (2013), les données actuelles mettent clairement en avant que la supplémentation d'un antioxydant isolé est insuffisante pour améliorer le profil des marqueurs du stress oxydant des patients BPCO. Comme nous l'avons vu dans la partie III.1. b. du présent manuscrit, le système antioxydant agit en synergie (e.g. vitamine C et E) et de façon complémentaire afin de lutter efficacement contre les effets délétères de l'augmentation de la production des EOR. L'association de plusieurs antioxydants non-enzymatiques pourrait

de ce fait constituer une approche thérapeutique plus efficace pour améliorer les paramètres fonctionnels des patients.

A notre connaissance, une seule étude a supplémenté des patients BPCO stables en **vitamine C (500 mg/jour) et vitamine E (200 UI/jour) pendant 4 semaines** (Agacdiken *et al.* 2004). Les résultats de ce travail ont démontré une augmentation des niveaux de vitamine E sanguins associée à une **amélioration du temps global d'endurance** sur tapis, par rapport à des patients BPCO recevant une solution placebo. En revanche, dans ce travail, la fonction musculaire périphérique n'a pas été étudiée. De plus, une étude réalisée chez des patients atteints de dystrophie facioscapulo humérale (FSHD), caractérisés aussi par un déséquilibre « redox » basal important, a démontré des effets bénéfiques d'une supplémentation associant plusieurs antioxydants non-enzymatiques sur la fonction musculaire périphérique (Passerieux *et al.* 2015). En effet, ce travail a montré qu'une supplémentation en vitamine C (500 mg/jour), vitamine E (400 mg/jour), zinc (25 mg/jour) et sélénium (200 µg/jour) induisait une augmentation de la FMIV ainsi que du Tlim du quadriceps des patients *via* une amélioration des capacités antioxydantes reflétée notamment par une diminution des dommages cellulaires oxydatifs.

Contrairement aux données sur la NAC, la littérature nous rapporte donc des arguments en faveur de l'utilisation de supplémentations en antioxydants à plus long terme afin de lutter contre le stress oxydant et améliorer la fonction musculaire de patients BPCO. Cependant, comme nous l'avons vu dans les 2 études présentées ci-dessus (Agacdiken *et al.* 2004 ; Passerieux *et al.* 2015), les doses de supplémentations en vitamines sont bien souvent élevées, c'est-à-dire au-dessus des apports nutritionnels conseillés (ANC) et nous allons voir que certaines précautions doivent être prises quant à leur utilisation. En effet, certaines études chez l'homme ont rapporté que pour différentes vitamines, des supplémentations à des doses élevées à plus ou moins long terme pouvaient induire une augmentation du risque de cancer des poumons ou autres ainsi que la mortalité (Klein *et al.* 2011 ; Bjelakovic *et al.* 2007). De façon plus spécifique, la méta-analyse de Miller *et al.* (2005) a mis en avant que l'utilisation de supplémentations en vitamine E à des doses supérieures à 400 UI/jour pouvait augmenter l'ensemble des causes de mortalité et notamment les problèmes cardiovasculaires. Dans ce sens, l'étude de Sayin *et al.* (2013) a également mis en avant une augmentation de la prolifération des cellules tumorales pulmonaires suite à une supplémentation en vitamine E que ce soit dans un modèle de souris ou dans des cellules pulmonaires humaines en culture. Concernant la vitamine C, même si aucun effet toxique d'une supplémentation à doses

élevées est décrit dans la littérature, il est bien admis que des doses plasmatiques élevées pouvaient avoir une activité pro-oxydante *via* la stimulation d'OH^{*} (Sayre *et al.* 2008). L'ensemble de ces données mettent donc en avant l'intérêt de supplémenter les patients BPCO avec des doses d'antioxydants adaptées afin d'éviter de potentiels effets délétères, et donc d'évaluer de façon spécifique les déficits des patients.

c) Effets d'une supplémentation en antioxydants combinée au REE

D'un point de vue historique, les EOR ont d'abord été décrits comme ayant un effet délétère sur l'organisme. De plus, comme nous l'avons vu, il a été démontré que l'utilisation de suppléments aigües en antioxydants permettait d'améliorer la performance au cours d'un exercice, notamment en réduisant la fatigue induite par ce dernier. De ce fait, il y a un intérêt grandissant pour les suppléments à plus long terme notamment en combinaison avec l'entraînement (Gomez-Cabrera *et al.* 2015). Ces suppléments en antioxydants constituent les compléments à l'activité physique les plus couramment utilisés que ce soit chez les amateurs ou chez les sportifs (Margaritis et Rousseau, 2008). Cependant les bénéfices au niveau musculaire restent à ce jour controversés et largement remis en question depuis quelques années (Gomez-Cabrera *et al.* 2015).

En effet, comme décrit précédemment, l'augmentation de la production d'EOR au cours d'un entraînement physique peut induire des adaptations physiologiques bénéfiques *via* l'augmentation des capacités antioxydantes ou certains facteurs de transcription tels que PGC1- α ou encore NF- κ B, impliqués notamment dans la biogenèse mitochondriale (Hoppeler *et al.* 2011). Or, il a été récemment démontré qu'une supplémentation en antioxydants, que ce soit en vitamine C, E ou même en NAC, pouvait limiter ces adaptations physiologiques que ce soit dans un modèle animal ou chez l'homme (Gomez-Cabrera *et al.* 2008 ; Ristow *et al.* 2009 ; Petersen *et al.* 2012). Ainsi à titre d'exemple, Paulsen *et al.* (2014) ont montré qu'une supplémentation de 11 semaines en vitamine C (1000 mg/jour) et E (235 mg/jour) combinée à un protocole d'entraînement en endurance, induisait une limitation de l'amélioration des marqueurs de biogenèse mitochondriale et de PGC1- α par rapport à un groupe recevant une solution placebo. Chez les sujets sains âgés qui constituent potentiellement les groupes « contrôle » utilisés dans les études chez les patients BPCO, le peu d'études retrouvées dans la littérature rapportent également des résultats controversés. En effet, Bjornsen *et al.* (2015) ont récemment montré qu'une supplémentation en vitamine C (1000 mg/jour) et E (225

mg/jour) associée à un entraînement de 12 semaines en résistance, induisait de moindres bénéfices sur les gains de masse maigre par rapport à un groupe placebo. Les auteurs ont donc suggéré que des doses élevées en vitamine C et E limitaient les adaptations musculaires d'un programme de renforcement musculaire chez les sujets âgés (Bjornsen *et al.* 2015).

Ces données sont donc en lien direct avec le concept d'hormèse et le rôle bénéfique des EOR dans les adaptations musculaires suite à un entraînement. Il apparaît donc important de supplémenter en antioxydants uniquement lorsque la balance « redox » est déséquilibrée, c'est à dire avec une production d'EOR élevée et/ou des capacités antioxydantes insuffisantes comme c'est le cas chez les patients BPCO. En effet, il a été montré qu'une situation de stress

oxydant chronique pouvait inhiber les adaptations physiologiques induites par l'entraînement et donc limiter les bénéfices fonctionnels (Margaritis *et al.* 2003). Ainsi, malgré les résultats très controversés chez les sujets sains, une supplémentation en antioxydants semble être adaptée pour optimiser les bénéfices de la réhabilitation respiratoire chez les patients BPCO.

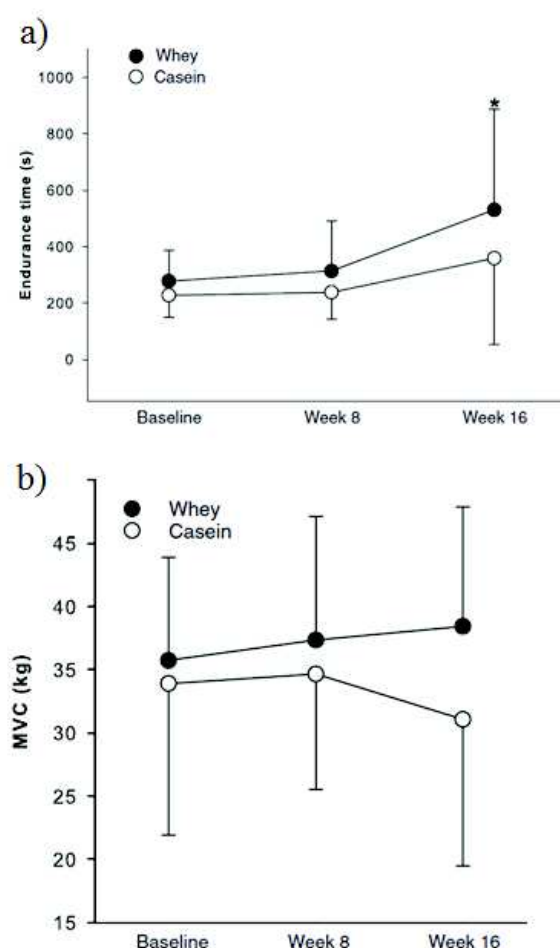


Figure 24. Evolution a) du temps d'endurance global et de b) la force maximale du quadriceps suite à un REE associé à une supplémentation en « petit lait (points noirs) ou placebo (cercles blancs) chez des patients BPCO stables (Laviolette *et al.* 2010)

Cependant, à ce jour et de façon étonnante, **une seule étude s'est intéressée aux effets d'une supplémentation en antioxydants combinée au REE chez les patients BPCO stables** (Laviolette *et al.* 2010). Ce travail a étudié les effets d'une supplémentation de 16 semaines en protéines de « petit lait », avec une dose de 20 g/jour, qui a notamment montré son efficacité pour augmenter la concentration de GSH au niveau sanguin (Zavorsky *et al.* 2007). Cette supplémentation a d'abord été administrée seule pendant les 8 premières semaines puis

combinée à un programme de REE jusqu'à la dernière semaine. Comme illustrée sur la figure 24 ci-dessus, cette étude rapporte seulement une augmentation du temps d'endurance sur cycloergomètre réalisé à 80% de W_{sl} au bout de 16 semaines sans effet additionnel sur la force et la masse musculaire du quadriceps.

De plus, cette étude ne rapporte aucune amélioration du profil des marqueurs du stress oxydant et notamment de la concentration plasmatique en GSH remettant en question le rôle de la supplémentation en « petit lait » utilisée. Combinées à l'absence d'efficacité de la NAC pour des supplémentations à plus long terme, ces données questionnent sur l'intérêt de cibler spécifiquement le GSH. Or, comme nous l'avons vu précédemment, une supplémentation associant plusieurs antioxydants non-enzymatiques semblerait être plus efficace. Il apparaît donc indispensable d'identifier la nature des déficits en antioxydants chez les patients afin de proposer une supplémentation adaptée.

Ce qu'il faut retenir :

- La **réhabilitation respiratoire**, incluant un programme de REE, permet **d'améliorer l'atteinte musculaire périphérique** des patients BPCO stables, mais les **bénéfices notamment au niveau cellulaire sont limités**.
- A l'heure actuelle, pour optimiser les bénéfices fonctionnels et cellulaires de la réhabilitation respiratoire, **l'efficacité d'une supplémentation en antioxydants reste à prouver chez les patients BPCO stables**. Néanmoins, de nombreux arguments dans la littérature rendent cette hypothèse recevable pour les patients BPCO stables :
 - Présence d'un déséquilibre « redox » à l'état basal au niveau sanguin et musculaire
 - Absence d'adaptation du profil des marqueurs du stress oxydant suite à un programme de réhabilitation respiratoire
 - Efficacité des supplémentations en antioxydants à court et plus long termes sur la fonction musculaire périphérique et la tolérance à l'effort.
- **Pour vérifier l'intérêt de cette thérapeutique**, l'analyse de l'ensemble des données relatives aux supplémentations en antioxydants soulève 2 points importants:
 - une étape préalable **de caractérisation des déficits est indispensable**.
 - **l'association de plusieurs antioxydants non-enzymatiques** semble être la solution la plus adaptée afin d'optimiser les bénéfices, mais reste à prouver.

2^{ème} Partie : CONTRIBUTION PERSONNELLE

I/ Objectifs des travaux de thèse

A travers la revue de la littérature, nous venons de voir que la réhabilitation respiratoire tient une place importante dans la prise en charge des patients BPCO stable. Cette thérapeutique permet plus particulièrement d'améliorer la fonction musculaire des patients. La présence d'un stress oxydant élevé à l'état basal, considéré comme un des principaux facteurs impliqués dans l'atteinte musculaire périphérique, est bien admise malgré les discordances dans la littérature concernant notamment le système antioxydant. L'absence d'amélioration des marqueurs du stress oxydant suite à un programme de réhabilitation respiratoire constitue une limite probable aux adaptations musculaires escomptées. Parmi les stratégies proposées, des apports en antioxydants pourraient répondre à cette problématique. Cependant à ce jour, l'hétérogénéité des protocoles de supplémentation et des résultats ne permettent pas de répondre de manière univoque à la question.

Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'une supplémentation en antioxydants, adaptée aux déficits des patients BPCO stables, permettrait d'optimiser les bénéfices d'un programme de réhabilitation respiratoire au niveau de l'atteinte musculaire périphérique.

Afin de vérifier cette hypothèse, ce travail de thèse s'est organisé autour des deux axes suivants :

Objectif de l'axe 1 :

Caractériser l'hétérogénéité des marqueurs du stress oxydant décrite dans la littérature chez les patients BPCO stables.

Dans la BPCO, de nombreux éléments sont en faveur d'un stress oxydant mais les discordances rapportées entre certaines études suggèrent une importante hétérogénéité notamment au niveau des antioxydants. La compréhension et la caractérisation de cette hétérogénéité constitue une étape préalable indispensable à la mise en place d'un protocole de recherche évaluant les effets d'une supplémentation en antioxydants chez les patients BPCO stables. La première étude de ce travail de thèse (cf. 2^{ème} Partie : III.2.a.) avait donc pour objectifs principaux :

- D'identifier et d'évaluer la prévalence des principaux déséquilibres des marqueurs du stress oxydant au niveau systémique.
- De déterminer s'il existe des profils des marqueurs du stress oxydant spécifiques associés à des caractéristiques cliniques et/ou musculaire périphérique.

Objectif de l'axe 2 :

Evaluer les effets combinés d'une supplémentation en antioxydants adaptée aux déséquilibres des marqueurs du stress oxydant de la BPCO et d'un programme de réhabilitation respiratoire, sur des marqueurs spécifiques de l'atteinte musculaire périphérique.

Afin d'évaluer les effets d'une thérapeutique, il est nécessaire de caractériser de façon précise la population étudiée. L'atrophie musculaire, impliquée notamment dans la perte de force musculaire, est considérée comme un des principaux paramètres de l'atteinte musculaire périphérique chez les patients BPCO. Cependant, les critères utilisés actuellement dans la BPCO pour définir l'atrophie musculaire présentent des limites et peuvent expliquer certaines controverses de la littérature. Pour répondre correctement aux objectifs de notre projet, nous avons donc choisi de **déterminer dans un travail préalable des valeurs de références pour la SSt des fibres musculaires du vaste latéral du quadriceps** à partir d'une méta-analyse réalisée chez des sujets sains (âge > 40 ans).

Nous avons mené ensuite un **essai contrôlé randomisé en double aveugle contre placebo chez 64 patients BPCO stables** admis pour un programme de réhabilitation respiratoire de 4 semaines en centre spécialisé. La nature de la supplémentation en antioxydants a été déterminée en fonction des principaux déséquilibres identifiés lors de l'étude 1. La mise en place et la réalisation de cette étude (cf. 2^{ème} Partie : III.2.c.), correspondant à un Programme Hospitalier de Recherche Clinique débuté en Juin 2012 et terminé en Janvier 2015, ont constitué la **majeure partie du présent travail de thèse**.

Au cours de cette étude, outre les évaluations fonctionnelles (cf. 2^{ème} Partie : II. « Méthodologie générale »), les patients ont eu une biopsie musculaire du vaste latéral externe du quadriceps avant et après le programme de réhabilitation respiratoire associé à une supplémentation en antioxydants ou placebo. Ce prélèvement musculaire a permis d'évaluer les effets des interventions sur la typologie, le ratio capillaires/fibres et la SSt des fibres musculaires du vaste latéral externe du quadriceps chez les patients BPCO stables.

II/ Méthodologie générale

Au cours des travaux menés durant cette thèse, les études 1 et 3 ont nécessité le recrutement de patients atteints de BPCO. Le premier contact avait pour objectif de proposer et d'expliquer au patient le déroulement des études mises en place au sein de la clinique du Souffle La Solane (associé à l'envoi d'un formulaire d'information). Cet appel permettait aussi de faire une première vérification des critères d'inclusions et de non inclusions de l'étude. Pour les patients souhaitant participer au protocole de recherche, la vérification de ces critères (voir ci-dessous) était effectuée par un médecin investigateur de l'étude lors de son arrivée dans l'établissement.

- **Critères d'inclusions :**

- Patients BPCO de sévérité respiratoire correspondant aux stades GOLD I à IV
- Patients BPCO stables, à distance d'au moins 4 semaines d'un épisode d'exacerbation.
- Age compris entre 40 et 80 ans.
- Sexe masculin ou féminin.
- Obligation de recueil du consentement.

- **Critères de non-inclusions :**

- Présence d'une maladie non-stabilisée incompatible avec la réalisation d'un programme de réhabilitation respiratoire (cardiaque, rénale, inflammatoire, métabolique, neuromusculaire ou psychiatrique).
- Infection par le VIH, Hépatite B ou C connue.
- Supplémentation en antioxydants, durant le mois précédent le début de l'étude, que ce soit nutritionnelle (vitamines, oligo-élément etc.) ou pharmacologique (NAC, Allopurinol etc.).
- Traitement par corticostéroïdes au long cours durant les 6 mois précédent.
- Femme enceinte ou allaitante
- Patient dans l'incapacité de donner son consentement (majeur protégé), personnes vulnérables (art.L. 1121-6, L. 1121-7, L. 1211-8, L. 1211-9).

Ces critères ont été choisis car ce sont des éléments pouvant à la fois moduler les différents marqueurs du stress oxydant et modifier les paramètres de l'atteinte musculaire périphérique des patients atteints de BPCO. D'un point de vue réglementaire, les patients participant à une

autre étude, ceux non affiliés à un régime de sécurité sociale (ou non bénéficiaire d'un tel régime), ou ceux pour lesquels le montant annuel des indemnités de participation à des protocoles de recherches maximum de 4500 € a été atteint, n'ont pas été inclus.

Plus spécifiquement à l'étude 3, les patients ayant une biopsie musculaire du vaste latéral externe du quadriceps, nous avons rajouté les critères de non-inclusions suivants :

- Patient ayant une hypersensibilité aux anesthésiques locaux amidés (xylocaïne).
- Patient traité par anticoagulants oraux et/ou par antiplaquettaires.

Outre la vérification des critères d'inclusions et de non-inclusions, la première visite médicale permettait le recueil de certaines données relatives aux facteurs de risque de la maladie telles que la consommation tabagique, ou encore à la sévérité de la maladie. De plus, au cours de cet entretien, les patients avaient un rappel sur les conditions et le déroulement de l'étude avant la signature des consentements concernant à la fois la participation à un protocole de recherche biomédicale et la constitution d'une collection biologique suite aux prélèvements sanguins et musculaires effectués. La réalisation de ces travaux a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes de Montpellier Sud-Méditerranée IV (n°2011-A00842-39) et réalisés en accord avec les principes de la déclaration d'Helsinki et les recommandations européennes de bonne pratique clinique.

• **Outils méthodologiques et contribution personnelle :**

L'ensemble des outils d'évaluations et de statistiques utilisés dans les 3 études du présent travail de thèse sont synthétisés dans le tableau 4 ci-dessous. Ces différentes méthodologies ainsi que les références (bibliographiques et matérielles) correspondantes, sont détaillées dans les parties « Materials and methods » de chacune des études (cf. Partie III.2. « Travaux personnels »). Par ailleurs, outre ma contribution personnelle à l'ensemble de ces aspects méthodologiques comme indiqué dans le tableau 5, mon rôle était d'organiser la planification de l'ensemble des évaluations (étude 1 et 3) en assurant la coordination des équipes impliquées (CHRU de Montpellier – Unité INSERM U1046 - Clinique du souffle « La Solane » à Osséja).

Méthodologie	Axe 1	Axe 2		
	Etude 1	Etude 2	Etude 3	
			Pré PR	Post PR
Outils d'évaluations				
Fonction respiratoire	✓ (3)		✓ (3)	✓ (3)
EFx et gazométrie	✓ (3)		✓ (3)	✓ (3)
Fonction musculaire périphérique	✓ (1 ; 3)		✓ (1 ; 3)	✓ (1 ; 3)
TDM6	✓ (1 ; 3)		✓ (1 ; 3)	✓ (1 ; 3)
Composition corporelle	✓ (1 ; 3)		✓ (1 ; 3)	✓ (1 ; 3)
Enquête alimentaire	✓ (1 ; 3)		✓ (1 ; 3)	✓ (1 ; 3)
Questionnaire Voorrips	✓ (1 ; 3)		✓ (1 ; 3)	✓ (1 ; 3)
Marqueurs du stress oxydant systémique	✓ (2 ; 3)		✓ (2 ; 3)	✓ (2 ; 3)
Biopsie musculaire			✓ (1 ; 3)	✓ (1 ; 3)
Outils statistiques				
Statistiques élémentaires	✓ (1 ; 3)	✓ (2 ; 3)	✓ (1 ; 3)	✓ (1 ; 3)
Méta-analyse				
Analyse en clusters	✓ (2 ; 3)			
ANOVA	✓ (1 ; 3)			✓ (1 ; 3)
ANCOVA	✓ (1 ; 3)			✓ (1 ; 3)
Organisation protocoles				
Recrutement patients	✓ (1)		✓ (1)	✓ (1)
Planification/coordination évaluations	✓ (1)		✓ (1)	✓ (1)
Enregistrement données sur e-CRF			✓ (1)	✓ (1)
Screening littérature			✓ (1)	
Extraction de données			✓ (1)	
Evaluation de la qualité des études			✓ (1)	

Tableau 5. Synthèse des outils méthodologiques utilisés dans les travaux de thèse et de ma contribution personnelle à ces derniers. La partie grisée correspond aux évaluations non effectuées dans le cadre de l'étude 2. PR=Programme de Réhabilitation respiratoire ; EFx=Epreuve d'effort maximale ; TDM6=Test de marche de 6 minutes ; ANOVA=Analyse de variance ; ANCOVA=Analyse covariance ; e-CRF=Cahier d'observation électronique. Contribution personnelle entre parenthèses : 1=Réalisation ; 2=Contribution ; 3=Exploitation et interprétation

III/ Conduite des recherches et résultats

1) Liste des publications et communications

- Articles faisant l'objet de publications dans des revues indexées ISI (Institute for Scientific Information) :

ETUDE 1

Maury J, Gouzi F, De Rigal P, Heraud N, Pincemail J, Molinari N, Pomiès P, Laoudj-Chenivresse D, Mercier J, Préfaut C, Hayot M. Heterogeneity of systemic oxidative stress profiles in COPD: A potential role of gender. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:201843. doi: 10.1155/2015/201843. Epub 2015 Jun 17.

ETUDE 2

Gouzi F, **Maury J**, Molinari N, Pomiès P, Mercier J, Préfaut C, Hayot M. Reference values for vastus lateralis fiber size and type in healthy subjects over 40 years old: a systematic review and metaanalysis. *J Appl Physiol (1985)*. 2013 Aug 1;115(3):346-54. doi: 10.1152/jappphysiol.01352.2012

ETUDE 3

Maury J, Gouzi F, Heraud N, De Rigal P, Molinari N, Pincemail J, Laoudj-Chenivresse D, Bughin F, Mercier J, Préfaut C, Pomiès P, Hayot M. Antioxidant supplementation in COPD patients: a relevant solution to optimize pulmonary rehabilitation effects on peripheral muscle impairment. *In preparation*

- **Liste des communications à des congrès nationaux et internationaux :**

European Respiratory Society, ERS du 07 au 11 Septembre 2013, dans la catégorie « The best posters in pulmonary rehabilitation ». Poster-Discussion :

Profile of systemic oxidative stress markers and effect on skeletal muscle function in COPD.

Maury J, Gouzi F, De Rigal P, Heraud N, Pincemail J, Pomiès P, Préfaut C, Hayot M.

Journées de la recherche respiratoire (J2R) les 11 et 12 octobre 2013 à Montpellier. Poster :

Profile of systemic oxidative stress markers and effect on skeletal muscle function in COPD

Maury J, Gouzi F, De Rigal P, Heraud N, Pincemail J, Pomiès P, Préfaut C, Hayot M.

Congrès de Pneumologie de la Langue Française (CPLF) à Marseille du 31 Janvier au 02 Février 2014. Poster-discussion :

Profil des marqueurs du stress oxydant systémique et implication dans la tolérance à l'effort des BPCO

Maury J, Gouzi F, De Rigal P, Heraud N, Pincemail J, Pomiès P, Laoudj-Chenivresse D, Préfaut C, Hayot M.

Journée de rentrée de l'Ecole Doctorale Sciences du Mouvement Humain, 14 Octobre 2013, Montpellier, France. Communication orale :

Maury J, Gouzi F, De Rigal P, Heraud N, Pincemail J, Molinari N, Pomiès P, Laoudj-Chenivresse D, Mercier J, Préfaut C, Hayot M. Gender difference in systemic oxidative stress profile in COPD: involvement in peripheral muscle function.

2) Travaux personnels

Afin d'homogénéiser la présentation de l'ensemble des travaux inclus dans ce manuscrit de thèse, nous présenterons dans une première partie les principaux points clés de chacune des études sous forme de résumés. Dans une seconde partie, nous présenterons les études dans leurs formes originales publiées (pour les études 1 et 2) ou en préparation (étude 3).

- **Résumés détaillés des études intégrées au travail de thèse :**

- a) **Etude 1 : « Hétérogénéité des profils du stress oxydant systémique dans la BPCO : un rôle potentiel du genre »**

Le stress oxydant joue un rôle clé dans l'atteinte musculaire périphérique et la tolérance à l'effort des patients BPCO. La présence d'un déséquilibre de la balance Redox est bien admise dans la littérature et est caractérisée par des niveaux élevés de dommages oxydatifs cellulaires chez les patients BPCO. Cependant, concernant les défenses antioxydantes, de nombreuses discordances sont rapportées entre les études. En effet, pour un antioxydant donné, la valeur moyenne peut être inférieure ou égale à la valeur moyenne retrouvée chez des sujets sains selon les études. Ces discordances peuvent être attribuées d'une part à des différences méthodologiques entre les études (e.g. méthodes de mesures, groupe contrôle etc.). D'autre part, l'importante hétérogénéité interindividuelle suggère la présence de différents profils des marqueurs du stress oxydant chez les patients BPCO. Afin d'avoir une représentation réelle des déficits et de mieux guider la prescription de supplémentation en antioxydants, nous avons envisagé une analyse globale du système antioxydant et des marqueurs des dommages cellulaires chez les patients BPCO. Plus spécifiquement, nos objectifs étaient les suivants :

1) Identifier et évaluer la prévalence des principaux déséquilibres en antioxydants chez des patients BPCO stables, par rapport à des valeurs de références validées.

2) Déterminer s'il existe des profils spécifiques de marqueurs du stress oxydant associés à des caractéristiques cliniques et/ou de l'atteinte musculaire périphérique.

Outre l'évaluation des paramètres de l'atteinte musculaire périphérique, de la tolérance à l'effort et des enquêtes alimentaires, nous avons mesuré les niveaux sanguins en antioxydants enzymatiques, non-enzymatiques et les peroxydes lipidiques chez 54 patients atteints de BPCO stables admis pour un programme de réhabilitation respiratoire (cf. Figure 25). Ces mesures ont été réalisées au Laboratoire du CHU de l'Université de Liège – Belgium (Pr. Joël Pincemail). Pour chacun des marqueurs du stress oxydant, ce laboratoire a établi des limites supérieures et inférieures de la normale chez une large cohorte de sujets sains. Afin de déterminer des sous-groupes/clusters de patients BPCO basés sur les marqueurs du stress oxydant sanguin, nous avons réalisé une analyse en composante principale complétée par une analyse en clusters.

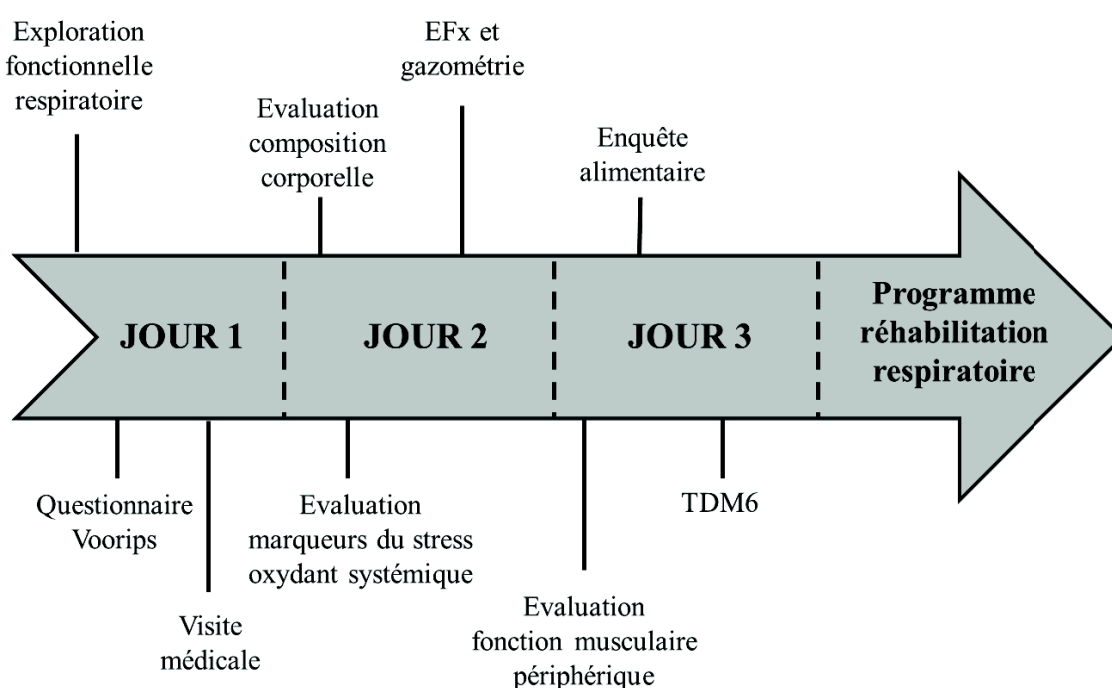


Figure 25. Organisation du planning d'évaluations des patients BPCO inclus dans l'étude.

Les principaux résultats de cette étude sont :

- les **principaux déficits en antioxydants** systémiques se situent au niveau des **vitamines C et E** ainsi qu'au niveau du **zinc (rapport cuivre/zinc élevé) et du sélénium**. De façon intéressante, nos données montrent que d'un point de vue quantitatif, les défenses en antioxydants enzymatiques et le ratio GSH/GSSG ne sont pas altérés au niveau systémique chez les patients BPCO stables.

- dans l'ensemble et malgré l'importante hétérogénéité que nous observons pour les différents marqueurs, **89% des patients BPCO stables présentent un déséquilibre du système antioxydant**. Ce déséquilibre peut expliquer que 69% des patients BPCO stables ont des peroxydes lipidiques systémiques au dessus de la limite supérieure à la normale.

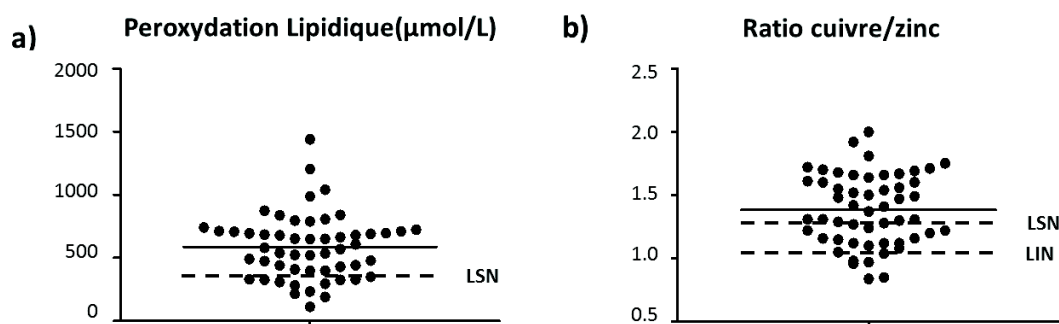


Figure 26. Représentation schématique de l'hétérogénéité interindividuelle des marqueurs du stress oxydant sanguin (peroxydation lipidiques et ratio cuivre/zinc) chez 54 patients BPCO. Cercles fermés: valeurs individuelles. Ligne en pointillés: Limite inférieure à la normale (LIN) et Limite supérieure à la normale (LSN). Ligne noire: valeur moyenne de la population de patients BPCO.

- un **sous-groupe de femmes BPCO** ayant une **majoration des taux de peroxydes lipidiques** associée à la tolérance à l'effort a été identifié.

Nos résultats confirment donc que les discordances entre les données rapportées dans la littérature ne peuvent pas s'expliquer exclusivement par des différences méthodologiques. En effet, en proposant une approche globale basée sur la comparaison des données avec des valeurs de références, nous confirmons l'existence d'une véritable hétérogénéité des marqueurs du stress oxydant chez les patients BPCO stables.

Dans cette population de patients admis pour un programme de réhabilitation respiratoire, les principaux déficits décrits en vitamine C, E, zinc et sélénium peuvent contribuer à diminuer l'activité des antioxydants enzymatiques tels que la SOD, la GPx ou encore le GSH. Ces déficits en antioxydants non-enzymatiques ne semblent pas associés aux déséquilibres d'apports nutritionnels des patients BPCO. Ces résultats suggèrent donc l'existence de mécanismes sous-jacents et spécifiques aux déséquilibres du système antioxydant comme illustré par les résultats des analyses en clusters. Par exemple, il est bien admis que des taux élevés de cuivre peuvent avoir une activité pro-oxydante et induire ainsi une augmentation des peroxydations lipidiques comme dans les clusters 3 et 4.

Par ailleurs, même si nous reconnaissons que, sur la seule base de nos résultats, nous ne pouvons pas conclure à un rôle majeur du genre, l'observation de différents sous-groupes de patients soulève la question d'une sensibilité spécifique des femmes atteintes de BPCO au stress oxydant (clusters 3 et 4). Des réponses différentes à la supplémentation en antioxydants proposée pourraient permettre de confirmer le rôle potentiel du genre.

L'ensemble de ces données confirme donc l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants (vitamines C et E, zinc, sélénium) chez les patients BPCO stables. De plus, les déficits n'étant pas majeurs, nous pouvons émettre l'hypothèse que des doses peu élevées pourraient suffire à rétablir l'équilibre du système antioxydant et ainsi améliorer l'atteinte musculaire périphérique. Dans le cadre du présent travail de thèse, cette hypothèse a fait l'objet d'un second axe de recherche présenté ci-dessous.

b) Etude 2: « Valeurs de références pour la taille et la proportion des fibres du vaste latéral chez des sujets sains âgés de plus de 40 ans : une revue systématique et méta-analyses »

Dans les maladies chroniques comme la BPCO, **l'atrophie musculaire** est une atteinte systémique majeure notamment caractérisée par une **diminution de la surface de section transversale (SSt) des fibres musculaires**. A l'heure actuelle, le manque de critères indiscutables pour définir l'atrophie musculaire rend difficile pour les chercheurs l'identification des mécanismes biologiques et les déterminants de cette atteinte musculaire. Bien que la définition de l'atrophie musculaire basée sur la mesure de la SSt semble être un outil efficace, il n'existe pas de normes de références chez les sujets ayant un âge supérieur à 40 ans (âge moyen d'apparition des maladies chroniques). **L'absence de valeurs de références** peut s'expliquer en partie par une hétérogénéité importante des mesures de SSt. A noter que cette hétérogénéité est non totalement expliquée par les variabilités méthodologiques entre les études. En effet, la SSt des fibres dépend de plusieurs paramètres comme la typologie musculaire ou encore le genre. La détermination de ces valeurs de références est donc complexe et nécessite un nombre très important de biopsies musculaires dans une population bien caractérisée.

Ainsi, l'objectif de l'étude était de réaliser une revue systématique de la littérature afin de déterminer des valeurs de références et des limites de la normale pour la SSt des fibres musculaires du quadriceps de sujets sains.

Pour cela, nous avons réalisé une revue systématique et une méta-analyse, en accord avec les recommandations « Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses » (PRISMA), des études rapportant des mesures de la SSt et de la typologie des fibres musculaires du vaste latéral externe du quadriceps. La stratégie de recherche était basée sur une combinaison de termes MesH sur différents moteurs de recherches (e.g. Pubmed, Web of Science etc.). La sélection des études a été faite selon une liste de critères d'inclusions prédéfinie. L'extraction des données a été réalisée après avoir contacté les auteurs des études sélectionnées afin de les compléter et de les vérifier. L'évaluation de la qualité des études était établie à partir d'un questionnaire standardisé conçu spécifiquement pour cette revue systématique.

Les principaux résultats de cette étude sont :

- La SSt moyenne des fibres musculaires est déterminée en fonction du pourcentage de fibres de type I et du genre selon les formules suivantes :

(pourcentage de fibres de type I x 60) + 1743 μm^2 pour les hommes

(pourcentage de fibres de type I x 70) + 139 μm^2 pour les femmes

- Les formules pour déterminer la limite inférieure de la normale (LIN) pour la SSt des fibres musculaires sont :

(pourcentage de fibres de type I x 60) - 718 μm^2 pour les hommes

(pourcentage de fibres de type I x 70) - 1485 μm^2 pour les femmes

- La LIN pour la proportion de fibres de type I est de **32,9%** (Moyenne=50,3%).

- Dans une analyse multivariée, la **SSt des fibres** était significativement **corrélée** à la **Vo_{2peak}**. De la même façon, la **proportion des fibres de type I** était significativement corrélée à **l'IMC, l'âge et la Vo_{2peak}**.

Cette revue systématique de la littérature est la **première étude à déterminer des LLNs pertinente pour la SSt des fibres musculaires** du vaste latéral externe du quadriceps en fonction du genre et du type de fibres. Jusqu'à présent, les patients ou sujets sains âgés ayant une atrophie musculaire avaient été identifiés à partir de leur IMC, leur indice de masse maigre ou leur fonction musculaire. L'atrophie définie au niveau cellulaire peut être considérée comme un marqueur plus précis car c'est un reflet direct du déséquilibre de la balance synthèse/dégradation des protéines. De plus, des modèles de cachexie, de dénervation ou de sédentarité ont démontré leur effet direct sur la SSt des fibres musculaires. De façon plus générale, ce travail permettra de faire avancer la recherche sur l'atrophie musculaire dans les maladies chroniques comme la BPCO, en offrant la possibilité de **sélection ou de catégorisation des patients en fonction de la présence ou non d'une atrophie musculaire**. L'identification de patients ayant une atrophie au niveau cellulaire pourrait aussi constituer un « Gold Standard » pour valider des outils de diagnostics non-invasifs de l'évaluation de la masse musculaire.

Par ailleurs, contrairement à nos données, une étude précédente avait déterminé une LIN à 27% pour la proportion de fibres de type I. Cependant, ces résultats n'étaient pas issus d'une

revue systématique de la littérature, ce qui laisse suggérer que les données obtenues dans la présente méta-analyse seraient plus appropriées pour évaluer les paramètres histomorphologiques musculaires dans les maladies chroniques.

Dans le cadre du **présent travail de thèse**, nous avons mis en évidence, à travers la revue de la littérature, que les patients BPCO présentant une diminution de la SSt des fibres musculaires du quadriceps semblent avoir une majoration du stress oxydant à l'état basal mais aussi une réponse spécifique à un PR, notamment au niveau cellulaire. Ainsi, l'identification précise des patients ayant une atrophie musculaire pourrait constituer un **paramètre important** dans l'hypothèse de réponses différentielles à la supplémentation en antioxydants.

c) Etude 3 : « Supplémentation en antioxydants chez les patients BPCO : une solution pertinente pour optimiser les effets de la réhabilitation respiratoire sur l'atteinte musculaire périphérique »

Le réentraînement à l'effort (REE), inclus dans un programme de réhabilitation respiratoire (PR), est actuellement considéré comme une thérapeutique de base pour améliorer l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO. Toutefois, si cette amélioration est cliniquement significative, elle reste limitée par rapport aux bénéfices reportés chez des sujets sains. Le stress oxydant a été identifié comme un des principaux facteurs pouvant limiter les bénéfices de la réhabilitation respiratoire, notamment au niveau musculaire. En effet, il est bien admis que le stress oxydant peut réguler de façon négative certaines voies de signalisations impliquées dans la balance synthèse/dégradation des protéines ou encore l'angiogenèse.

Ainsi, la supplémentation en antioxydants semble être une solution efficace pour optimiser les effets de la réhabilitation respiratoire mais les données disponibles dans la littérature ne permettent pas de vérifier cette hypothèse. La seule étude ayant analysée les effets d'une supplémentation en « petit lait », utilisée comme un précurseur du GSH, combinée à un programme de réhabilitation respiratoire ne rapporte aucun bénéfice sur l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO. Etant donné la complexité du système antioxydant, il est probable que l'utilisation d'un seul antioxydant n'était pas appropriée pour rétablir l'ensemble des déséquilibres des marqueurs du stress oxydant des patients BPCO. Dans ce sens, nous avons montré dans la première étude de thèse qu'un déficit en vitamine C, E, sélénium et zinc existait chez les patients BPCO. Ainsi, une combinaison d'antioxydants centrée sur ces déficits semblerait être plus adaptée pour atteindre cet objectif chez les patients BPCO stables.

L'objectif principal de ce travail était donc d'étudier les effets d'une supplémentation en antioxydants, basée sur l'association de vitamine C, E, zinc et sélénium, combinée à un programme de réhabilitation respiratoire sur l'atteinte musculaire périphérique de patients BPCO stables.

Pour cela, nous avons mené un **essai contrôlé randomisé en double aveugle contre placebo** chez 64 patients BPCO stables. Le design général de l'étude est synthétisé dans le schéma de la figure 27 ci-dessous. L'ensemble des patients ont réalisé un minimum de 20 sessions de

Réentraînement à l'effort répartis sur 4 semaines, basé essentiellement sur des activités d'endurance et complétées par des séances de renforcement musculaire et d'éducation thérapeutique. Ce réentraînement à l'effort a été réalisé dans le cadre d'un programme de réhabilitation respiratoire, comme recommandé dans la BPCO. En parallèle, les patients ont reçu soit une solution placebo soit une supplémentation en antioxydants constituée de vitamines et oligo-éléments à des doses nutritionnelles: Vitamine C (180 mg/jour); Vitamine E (30 mg/jour); Zinc gluconate (15 mg/jour); sélénium sous forme de sélénométhionine (50 µg/jour). Le paramètre d'analyse principal était les variations du temps d'endurance du quadriceps (Qend). Les paramètres secondaires comprenaient la force maximale isométrique du quadriceps (FMIV), les marqueurs de la tolérance à l'effort, les marqueurs du stress oxydant (identiques à l'étude 1). De plus, des biopsies musculaires du vaste latéral externe du quadriceps ont été réalisées avant et après le PR afin d'évaluer certains paramètres histomorphologiques tels que la surface de section transversale (SSt) du quadriceps, la proportion de fibre de type et le ratio capillaires/fibres.

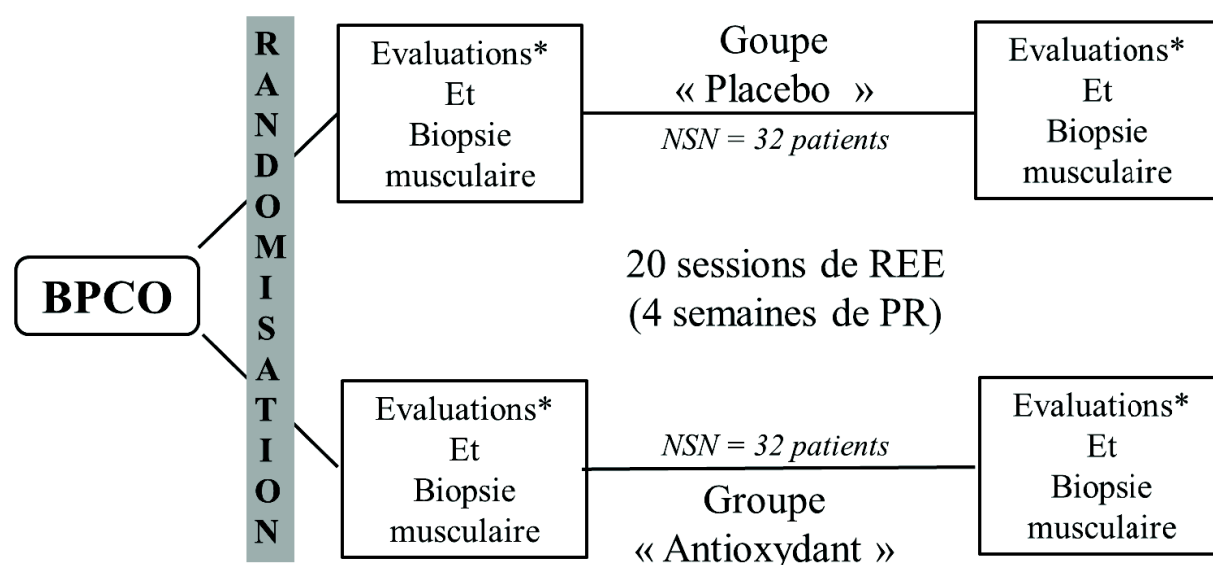


Figure 27. Design général de l'essai contrôlé randomisé en double aveugle. Après vérification des critères d'inclusions, les patients étaient randomisés en 2 groupes (« PR placebo » ou « PR antioxydant »). * renvoi au planning des évaluations présenté dans le cadre de l'étude 1 (cf. Figure 24). BPCO=Broncho-pneumopathie chronique obstructive ; PR=Programme de Réhabilitation Respiratoire ; REE=Réentraînement à l'effort ; NSN=Nombre de sujets nécessaires par groupe.

Les principaux résultats de cette étude montrent que :

- le Q_{end} était augmenté dans les 2 conditions alors que la **FMIV était améliorée (en moyenne de 9%)** significativement uniquement dans le groupe de patients ayant reçu la supplémentation en antioxydants (cf. Figure 28a).

- la distance au TDM6, la W_{sl} et le SV₁ étaient augmentés dans les 2 groupes de façon identique alors la **Vo_{2sl} était améliorée (en moyenne de 16%)** uniquement dans le groupe ayant reçu la supplémentation en antioxydants (cf. Figure 28b).

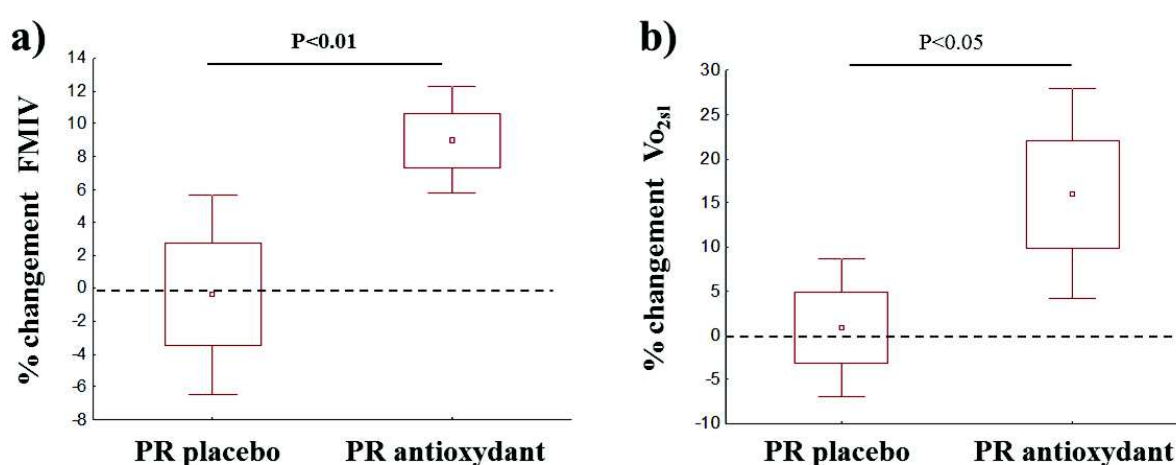


Figure 28. Boxplots représentant les changements des paramètres fonctionnels après interventions (en %) chez des patients BPCO stables: a) Force Maximale Isométrique Volontaire (FMIV) ; b) Consommation maximale en O₂ (Vo_{2sl}). Les boîtes représentent les 25ème et 75ème percentiles et le carré dans chaque boîte représentant la moyenne. Les barres situées au-dessus et en-dessous des boîtes représentent les écart-type. La valeur P représente l'effet groupe spécifique obtenu dans un modèle d'analyse de covariance (ANCOVA) intégrant les valeurs individuelles à baseline.

- Concernant les marqueurs du stress oxydant, la supplémentation en antioxydants a induit une **augmentation des niveaux systémiques en vitamine E et sélénium** sans effet additionnel sur la vitamine C et les peroxydations lipidiques. Après interventions, le ratio GSH/GSSG était augmenté dans le groupe placebo alors que dans le groupe supplémené, la moyenne était identique par rapport à l'état basal.

- les adaptations de la SSt de l'ensemble des fibres musculaires, après les interventions, sont significativement différentes entre le groupe « PR antioxydant » et le groupe « PR placebo » (+17% vs -6% respectivement, $p=0.03$) (cf. Figure 29b). Plus

spécifiquement, la SSt des fibres musculaires de type non I est significativement augmentée avec la supplémentation en antioxydants comparativement au groupe ayant reçu le placebo (cf. Figure 29a).

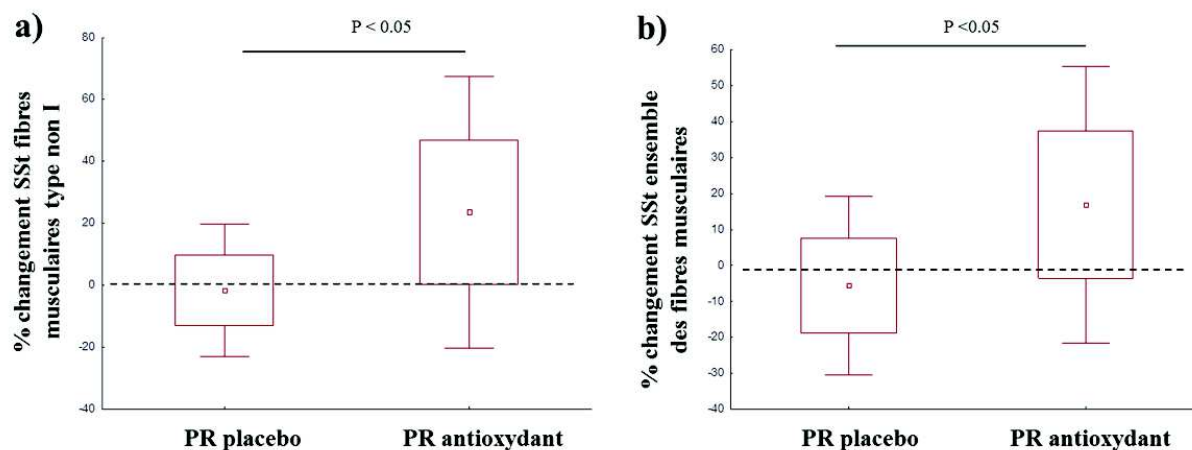


Figure 29. Boxplots représentant les changements des paramètres histomorphologiques des fibres musculaires après interventions (en %) chez des patients BPCO stables: a) Surface de section transversale (SSt) des fibres de type non I ; b) Surface de section transversale (SSt) de l'ensemble des fibres musculaires. Les boîtes représentent les 25ème et 75ème percentiles et le carré dans chaque boîte représentant la moyenne. Les barres situées au-dessus et en-dessous des boîtes représentent les écart-type. La valeur P représente l'effet groupe spécifique obtenu dans un modèle d'analyse de covariance (ANCOVA) intégrant les valeurs individuelles à baseline.

Afin d'apprécier uniquement les effets de la supplémentation en antioxydants, nous avons contrôlé les principaux facteurs confondant pouvant modifier les paramètres de l'atteinte musculaire périphérique au cours des 4 semaines d'interventions (20 sessions d'entraînement en endurance). Que ce soit au niveau du contenu du programme de réentraînement à l'effort, du nombre d'exacerbations, de la consommation tabagique ou encore au niveau nutritionnel, les caractéristiques étaient similaires entre les 2 groupes de patients.

Comme cela est le cas dans le groupe « placebo », la littérature rapporte des effets limités d'un réentraînement à l'effort en endurance pendant 4 semaines (20 sessions) sur la FMIV et la Vo_{2sl} . Concernant le groupe ayant reçu la supplémentation en antioxydants, même s'il n'existe pas de seuils de significativité, **les améliorations en FMIV et la Vo_{2sl} peuvent être considérées comme pertinente d'un point de vue clinique.** En effet, les bénéfices obtenus

dans notre étude sont de la même ampleur que les résultats rapportés dans des études précédentes ayant utilisé des protocoles spécifiques de réentraînement à l'effort avec une durée et un nombre de sessions de réentraînement à l'effort plus important (e.g. entraînement en résistance ou exercices spécifiques sur cycloergomètre). Cependant nos données ne permettent pas de mettre en évidence de réponses différentielles à la supplémentation en antioxydants proposée, entre les hommes et les femmes BPCO.

Ces résultats suggèrent tout de même une augmentation des capacités antioxydantes grâce à la supplémentation en antioxydants comme reflété par les différences observées entre les 2 groupes concernant les niveaux systémiques de vitamine E, du sélénium et du ratio GSH/GSSG. En dépit des bénéfices évidents de la supplémentation en antioxydants, notre étude ne permet pas d'établir un lien direct entre les marqueurs du stress oxydant et les paramètres tels que la FMIV et la Vo_{2sl} alors que de nombreux arguments sont disponibles dans la littérature.

Comme illustré par le modèle de Reid (2000), il est bien admis qu'une régulation de la production d'EOR par le système antioxydant, au cours d'un programme de REE, peut stimuler différentes voies de signalisations impliquées dans l'amélioration des paramètres fonctionnels. Dans ce sens, les adaptations positives décrites au niveau de la SSt, suite à la supplémentation en antioxydants, peuvent expliquer en partie les améliorations de FMIV suggérant une régulation des voies de signalisations telles que l'équilibre de la balance synthèse/dégradation des protéines. A noter que l'application des valeurs de références de la SSt des fibres musculaires (déterminées dans l'étude 2) à nos données, permet d'identifier seulement 2 patients BPCO atrophiques sur 32 évalués. Ainsi, l'hypothèse d'une réponse différentielle à la supplémentation en antioxydants chez les patients BPCO atrophiques ne peut pas être vérifiée dans cette étude compte tenu du nombre limité de patients.

Pour expliquer l'amélioration de la Vo_{2sl} dans le groupe « PR antioxydant », le manque d'effet au niveau du ratio capillaires/fibres suggère une adaptation positive des mécanismes impliqués dans l'amélioration des capacités oxydatives mitochondriales ou de la fonction vasculaire. De façon intéressante, une étude récente (Rossman *et al.* 2015) a montré qu'une supplémentation en antioxydants à court terme induisait une augmentation du débit sanguin associée à une augmentation de la Vo_{2sl} chez des patients BPCO stables.

Ainsi, de futures analyses sont nécessaires afin d'évaluer les effets de la supplémentation en antioxydants utilisée dans notre étude, sur les voies de signalisations impliquées à la fois dans l'amélioration de la FMIV et de la Vo_{2sl} .

- Version intégrale des études intégrées au travail de thèse:

Etude 1 : « Hétérogénéité des profils du stress oxydant systémique dans la BPCO : un rôle potentiel du genre »

Ce travail ayant été accepté pour publication, les textes, figures et tableaux présentés ci-dessous correspondent en tous points à la version intégrale de l'article publiée dans « Oxidative Medicine and Cellular Longevity » en 2015 (*Impact Factor* : 3.516).

Hindawi Publishing Corporation
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2015, Article ID 201843, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/201843>



Research Article

Heterogeneity of Systemic Oxidative Stress Profiles in COPD: A Potential Role of Gender

Jonathan Maury,^{1,2,3} Farés Gouzi,^{1,2,4} Philippe De Rigal,³ Nelly Heraud,³ Joël Pincemail,⁵ Nicolas Molinari,^{1,2,4} Pascal Pomiès,^{1,2} Dalila Laoudj-Chenivresse,^{1,2,4} Jacques Mercier,^{1,2,4} Christian Préfaut,^{2,3} and Maurice Hayot^{1,2,4}

¹PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, 34295 Montpellier Cedex 5, France

²University of Montpellier, 34295 Montpellier, France

³Clinique du Souffle "La Solane", Fontalvie Group, 66340 Ossèja, France

⁴Department of Clinical Physiology, CHRU Montpellier, 34295 Montpellier, France

⁵Department of Cardiovascular Surgery and CREDEC, University of Liège, CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgium

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex disease usually characterized by progressive airflow limitation that is not fully reversible and significant extrapulmonary effects that may further contribute to disease severity in individual patients [1]. One of the main systemic effects is a decrease in muscle mass linked to muscle dysfunction, which contribute to the decline in exercise capacity and a worsened prognosis [2, 3]. Although many factors are implicated in the respiratory and muscle pathophysiology of COPD, oxidative stress (OS) appears to play a key role [4, 5]. The COPD literature usually describes an increase in prooxidants, macromolecular damage (lipid and protein oxidation), and DNA oxidation [6-8], which correspond to deleterious OS as defined by Jones [9]. To limit cell damage, a complex antioxidant system may directly scavenge ROS and/or inhibit lipid peroxide reactions [10-13], but previous studies have shown a decrease in many enzymatic and nonenzymatic antioxidants in COPD patients [6, 7, 14-16].

However, the literature also suggests that systemic OS markers show great heterogeneity, particularly in the systemic antioxidant levels. For example, for a given parameter, systemic antioxidant levels in different groups of COPD patients were either lower than [6, 7, 14] or equal to [5] the levels in healthy subjects. The discrepancies among studies may be due to the differences in centers and the low number of COPD patients included in the investigations. The literature has also described great heterogeneity from one COPD patient to another suggesting different systemic OS marker profiles, but none of these earlier studies has tested this hypothesis [5-8, 14]. The impact of such clinical factors as physical inactivity, tobacco consumption, gender or nutritional intake on prooxidants and antioxidant levels may explain the individual differences in systemic OS markers among COPD patients but the literature remains unclear [17-19]. Similarly, although it is broadly acknowledged that deleterious OS is implicated in muscle pathophysiology [5], only one study showed that the level of systemic isoprostanes, a specific marker of lipid peroxidation, was more elevated in a COPD phenotype characterized by muscle atrophy and decreased exercise capacity [8].

A more systematic analysis of antioxidant deficits and deleterious OS markers in COPD patients is thus needed to understand the great heterogeneity in the results reported in the literature and to provide data that can better guide the prescription of antioxidant supplementations. Therefore, using validated and previously published reference values determined from a cohort of healthy subjects [20, 21], this study aimed to identify OS marker

imbalances in COPD patients and to determine whether systemic OS profiles exist. The secondary objective was to identify the clinical and muscle characteristics specifically associated with these systemic OS markers in COPD patients.

MATERIALS AND METHODS

Study patients

Fifty-four stable COPD patients, as defined by the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines, were included in our study with the diagnosis confirmed by plethysmography (Body Box 5500, Medisoft, Belgium). The parameters evaluated during plethysmography were compared with normal values [22] and the diagnosis of COPD was especially based on a post bronchodilator forced expiratory volume in one second (FEV_1)/forced vital capacity (FVC) ratio below 70% of theoretical FEV_1 /FVC [1]. Exclusion criteria were the presence of exacerbations within the last month; unstabilized disease (e.g., cardiac, inflammatory, neuromuscular); disability that could modulate OS and limit exercise capacity; antioxidant supplementation (vitamins, trace elements, etc.), and use of drugs such as allopurinol and N-acetylcysteine within the last month or use of oral corticosteroids over the last six months. All had been referred for a rehabilitation program at ‘La Solane’ Pulmonary Rehabilitation Center in Osseja, France. All patients received a detailed information letter about the study before providing their written informed consent. This study was approved by the ethics committee Montpellier Sud-Méditerranée IV (n°2011-A00842-39) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the European guidelines for ‘good clinical practice’.

Oxidative stress determination

Venous blood samples were taken immediately after an overnight fast and drawn into tubes containing EDTA or Na-heparin as anticoagulant or clot-activating gel, depending on the parameter. Blood samples were immediately conditioned in the laboratory of ‘La Solane’ Pulmonary Rehabilitation Centre in Osseja, France. Firstly, the samples from one ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tube were directly transferred to Eppendorf tubes to analyse systemic levels of enzymatic antioxidants: total reduced glutathione (GSH = 50 μ l), oxidised glutathione (GSSG = 100 μ l), superoxide dismutase (SOD = 500 μ l) and peroxidase glutathione (GPx = 500 μ l). For the GSSG sample, we added 10 μ l of Scavenger (Bioxytech GSH-GSSG 2 ml) to keep GSSG in its oxidised form. For SOD, we washed the blood sample

with distilled water and centrifuged it at 3500 T/min for 5 minutes. We repeated this process four times and to finish we collected 500 µl of plasma conditioned with 500 µl of demineralised water. Secondly, other blood samples were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium and lithium heparin tubes and were immediately centrifuged (3000 T/min for 10 min). Then, plasmas were frozen in dry ice and kept at -80°C until analysis of lipid peroxidation markers, vitamins and trace elements. Specifically, for vitamin C levels, 500 µl of plasma was immediately transferred to ice-cold tubes containing 500 µl of 10% metaphosphoric acid (to protect against vitamin C oxidation with air) and then frozen in dry ice. Within a maximal period of one month, samples were sent for analysis in dry ice to the CHU Clinical Laboratories of the University of Liège-Belgium (Professor Joël Pincemail). For each OS marker, this laboratory established lower and upper limits of the reference values (LLR and ULR) from a large healthy subject cohort, as previously done [20, 21]. This cohort included 123 subjects of Caucasian origin with an age range of 21 to 64 years with no known history of respiratory, cardiovascular, liver, or kidney diseases or cancer.

Lipid peroxidation markers

The lipid peroxides (ROOH) in plasma were analyzed with a commercial kit (Oxystat, Biomedica Gruppe, Vienna, Austria) as previously described [21, 23]. Oxidized low density lipoprotein (LDL) levels in plasma samples were determined spectrophotometrically with a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Immunodiagnostik, Bensheim, Germany).

Antioxidants

For vitamin C determination, 0.5 ml plasma was immediately transferred to ice-cold tubes containing 0.5 ml of 10% metaphosphoric acid and kept at -80°C . Analyses were performed by a spectrophotometric method using the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (Perkin Elmer Lambda 40, Norwalk, CT, USA). Plasma vitamin A and vitamin E (α - and γ -tocopherol) levels were determined simultaneously by HPLC (Alliance HPLC System, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled with a diode array detector [24]. Blood levels of vitamin E were normalized to plasma levels of total cholesterol [25], which were determined by an enzymatic method with cholesterol oxidase. Total reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were determined in whole blood using the GSH/GSSG-412 kit

(Bioxytech, Oxis International, Inc., Portland, WA, USA). Superoxide dismutase (SOD) and peroxidase glutathione (GPx) enzymatic activities in whole blood were determined with the Ransod and Ransel kits (Randox, England) and were expressed as UI/g of haemoglobin.

Trace elements

Plasma levels of selenium, copper and zinc were determined by inductively coupled plasma–mass spectroscopy [26].

Functional evaluations

Bioelectrical multifrequency impedance (BIACORPUS RX spectral, MEDICAL HealthCare GmbH, Karlsruhe, Germany) was used to assess body composition: fat mass (FM), fat-free mass (FFM), total body water and muscle mass. More specifically, muscle mass was calculated using the bioelectrical impedance analysis equation of Janssen and coll. [27].

A maximal incremental exercise test on a cycle ergometer (Ergoselect, Sorinnes, Belgium) was performed to evaluate exercise capacity. The 3-minute warm-up was performed at 20% of maximal predicted power, and the workload was increased every minute by 8% of maximal predicted power. Recording with a 12-lead electrocardiogram and gas exchange measurement with a breath-by-breath system (Medisoft Expair software, Ergocard, Sorinnes, Belgium) were continuous during exercise testing. The maximality criteria were established in accordance with the international standards on cardiopulmonary exercise testing [28]. Maximal power output (W_{max}) and symptom-limited oxygen consumption (VO_{2sl}) were the main variables evaluated.

The 6-minute walk test (6MWT) [29] was also performed to evaluate exercise capacity. It was performed twice along a 30-m perimeter with at least 30 minutes between tests and the highest 6-minute walking distance (6-MWD) was selected, in line with the guidelines [29]. Oxygen saturation (SpO_2) and heart rate (HR) were recorded every minute using pulse oximetry (Nonin 8500 M; Nonin Medical, Inc., Minneapolis, MN, USA). The dyspnea score was measured before and at the end of the test on a visual analog scale.

The BODE index was used to assess global disease severity [30]. This index is based on the body mass index (B), the degree of airflow obstruction with FEV_1 (O), dyspnea (D) assessed by the Medical Research Council (MRC) scale, and exercise capacity (E) measured by the 6MWT.

The quadriceps maximal voluntary isometric contraction (QMVC, in Nm) was measured in a seated position at 90° knee and hip flexion on a quadriceps-hamstring chair (Quadriergoforme

Rehabilitation Chair, Aleo Industrie/Design Corporel, Salome, France). This chair has a strain gauge system connected to a signal acquisition and analysis system (MP36, BIOPAC Systems). Three reproducible measurements (within 5%) per leg were recorded and the best value of the dominant leg was retained. QMVC was compared with the reference values [2].

Quadriceps endurance time (Qend, in seconds) was determined only for the dominant leg, as previously described by our group [8]. The patients performed knee extensions (6 movements per minute) with a workload to 30% of QMVC until exhaustion. Immediately after this test, patients performed a QMVC to evaluate quadriceps fatigue, and a reduction of QMVC >10% was necessary to validate the test.

The questionnaire validated by Voorrips et al. was used to assess the physical activity level [31]. This questionnaire is composed of three parts, with information about daily activities, sports and spare-time activities giving a total score. The daily physical activity value is interpreted as low (total score <9.4), moderate (total score between 9.4 and 16.4) or high (total score >16.4).

Nutritional assessment

The nutritional status of all patients was obtained from dietary records [32] that they maintained in the week before the start of the functional evaluations. We then determined the potential origins of nonenzymatic antioxidant deficits. Patients recorded on paper the foods and beverages consumed over three nonconsecutive days, specifying quantities based on various indicators (weighing, egg cups, tablespoons, food models, etc.). With the collaboration of a dietician to determine the volume of food intake for each patient, nutrients were converted to micronutrients in order to estimate the consumption of antioxidants like vitamins and trace elements using GENI software (Micro6, Villiers-lès-Nacy, France). This software compares an individual's dietary intake with a recommended daily intake (RDI) given by the "Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)" of France. These RDI are based on gender and age [33].

Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Individual values for each OS marker were compared with LLR and ULR from the healthy subject cohort in order to obtain the percentage of COPD patients with abnormal values (below LLR and above ULR). Using principal component analysis (PCA), we determined new variables ("major components") summarizing the multiple systemic OS markers measured. Then, each variable

and each patient was placed on the graph/map of PCA. Using Ward's method, we performed cluster analysis based on the major components of PCA. A one-way analysis of variance (or the Kruskal-Wallis for non-normally distributed variables) or Pearson's chi-squared test compared the OS and clinical parameters of the identified COPD patient clusters. If interactions between clusters were found, post-hoc analysis (Bonferroni or Dunn) was performed to identify specific differences. A Student *t* test or a Mann-Whitney was used to compare the clusters separately. The Pearson coefficient (univariate analysis) identified the clinical and/or functional parameters associated with changes in the OS markers. Then, a multivariate analysis (ANCOVA) was performed to determine the factors independently associated with the OS markers, particularly with systemic lipid peroxidation. We chose this specific OS marker because it is strongly implicated in the cell damage induced by redox imbalance. In this multivariate analysis model, we studied the factors that might be associated with and/or modify the systemic lipid peroxidation level, such as age, disease severity (FEV1 and BODE score), physical activity (Voorrips score), gender and tobacco consumption. Also, we included in this model the parameters significantly correlated with systemic lipid peroxidation, like 6-minute walking distance (6-MWD) and muscle mass index.

For all analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using R version 2.15.2.

RESULTS

The anthropometric and clinical characteristics of the 54 COPD patients are presented in Table 1. An equivalent number of men and women was included (27 men and 27 women; mean age 60 ± 7 years with an age range of 40 to 80 years) and all GOLD severity stages (GOLD I to GOLD IV) are represented.

Table 1. Anthropometric and clinical characteristics of 54 COPD patients

	COPD patients (n = 54)
Age (years)	60 ± 7
Sex ratio (W / M)	27 / 27
BMI (kg/m ²)	24.7 ± 4.1
Fat free mass index (kg/m ²)	17.3 ± 2.3
Muscle mass index (kg/m ²)	7.9 ± 1.5
FEV1 (% pred)	54 ± 21
FEV1/FVC ratio	53 ± 14
GOLD stage I/II/III/IV (n)	6/23/20/5
BODE score [18]	2.1 ± 1.5
Breathlessness, MRC score	1.5 ± 1.1
Tobacco consumption (packs /year)	44 ± 24
Physical activity level, Voorrips score [21]	4.4 ± 3.2
6-MWD (m)	518 ± 90
6-MWD (% pred)	81 ± 14
W _{sl} (% pred)	50 ± 19
VO _{2sl} (% pred)	60 ± 16
QMVC (Nm)	102 ± 37
QMVC (% pred)	75 ± 19
Qend (s)	368 ± 152

Results are expressed in mean ± SD. Definition of abbreviations: COPD=chronic obstructive pulmonary disease; W=women/M=men; MRC=Medical Research Council; BODE index=body mass index, airway obstruction, dyspnoea, exercise capacity index (6-MWD); BMI=body mass index (kg/m²); FEV₁ (%pred)=forced expiratory volume in 1 second; W_{max} (% pred)=symptom-limited power output; VO_{2sl} (% pred)=symptom-limited oxygen uptake; 6-MWD (m)=6-minute walking distance; QMVC (Nm)=quadriceps maximal voluntary contraction expressed in Newtons ; Qend (s)=quadriceps endurance time expressed in seconds.

Systemic OS imbalance in COPD patients

The most prevalence of COPD patients with deficits (values below the LLR) in nonenzymatic antioxidants were found in vitamin C, zinc and selenium (Table 2). These deficits contributed to an imbalance in the vitamin C/vitamin E and copper/zinc ratios (Table 2).

Table 2. Systemic oxidative stress markers of 54 patients with COPD.

	Plasma levels of OS markers Mean $\pm$ SD	COPD patients with deficits N (%)	Reference values (LLR – ULR)
Vitamin C ($\mu\text{g/ml}$)	10.5 $\pm$ 4.2	14 (26%)	M: 6.21 – 15.18 F: 8.60 – 18.83
Vitamin E (mg/L)	14.4 $\pm$ 3.5	0 (0%)	8.00 – 15.00
Vitamin C / E	0.74 $\pm$ 0.30	17 (31%)	0.59 – 1.19
Selenium ($\mu\text{g/ml}$)	89.5 $\pm$ 14.0	27 (66%)	94 – 130
Copper (mg/ml)	1.1 $\pm$ 0.2	3 (6%)	M: 0.70 – 1.40 F: 0.80 – 1.55
Zinc (mg/ml)	0.79 $\pm$ 0.13	15 (28%)	0.70 – 1.20
Copper/zinc ratio	1.42 $\pm$ 0.37	33 (61%)	1.14 – 1.29
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	944 $\pm$ 168	3 (6%)	717 - 1110
GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	5.40 $\pm$ 6.54	10 (19%)	0.96 – 10
GSH/GSSG	437 $\pm$ 320	11 (20%)	111 – 747
GPx (UI/gHb)	47.5 $\pm$ 12.1	3 (7%)	30 – 55
SOD (UI/gHb)	1310 $\pm$ 302	2 (6%)	785 – 1570
Lipid peroxidation ($\mu\text{mol/L}$)	587 $\pm$ 256	37 (69%)	0 – 432
LDL ox (UI/L)	178 $\pm$ 275	16 (30%)	28 – 70

Results are expressed in mean $\pm$ SD. Percentage of COPD patients with selenium, GPx and SOD deficits were established from a total of 41, 47 and 32 patients respectively. Definition of abbreviations: COPD=chronic obstructive pulmonary disease; M=male/F=female; LLR and ULR=lower and upper limits of reference, respectively, obtained in a large cohort of healthy subjects; GSH=reduced glutathione; GSSG=oxidized glutathione; SOD=superoxide dismutase; GPx=peroxidase glutathione; LDL=oxidized low-density lipoprotein.

Although less than 10% of the COPD patients had systemic copper deficits, 61% had an elevated copper/zinc ratio (Table 2). The systemic copper/zinc ratio and the copper levels

were significantly and positively correlated with the systemic lipid peroxidation levels ($p<0.001$; $r=0.69$ and $p<0.001$; $r=0.83$, respectively). Our results showed that 69% and 30% of COPD patients had systemic lipid peroxidation levels and LDL oxidized above the ULR respectively (Table 2). In addition, it should be noted that despite the great variability in values for each parameter as illustrated by Figure 1, 89% of the COPD patients had at least one antioxidant deficit (Figure 2).

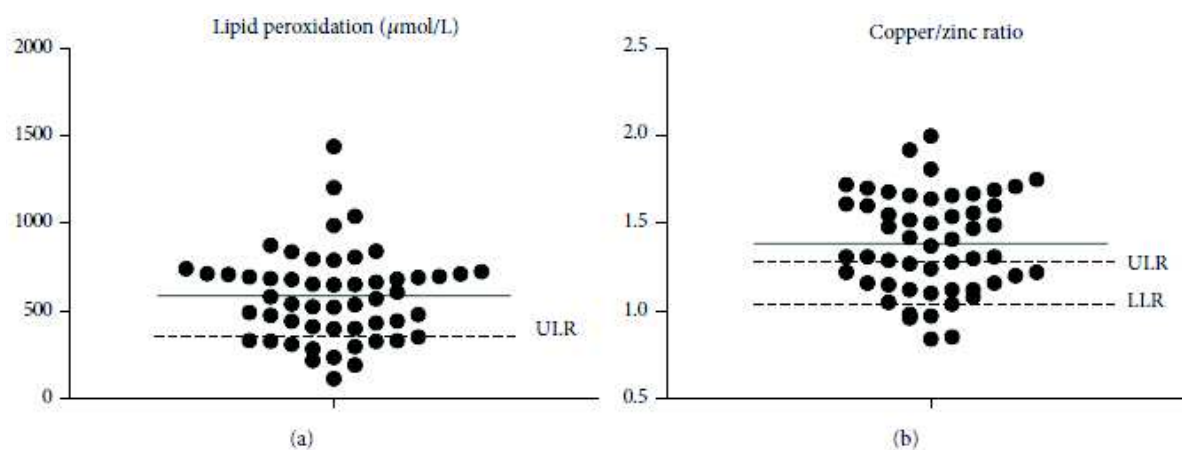


Figure 1. Systemic lipid peroxidation level and copper/zinc ratio in 54 COPD patients. Closed circles: individual values. Lower dashed line: lower limit of reference (LLR) [22]. Upper dashed lines: upper limit of reference (ULR) [22]. Solid line, mean value of the COPD patient group.

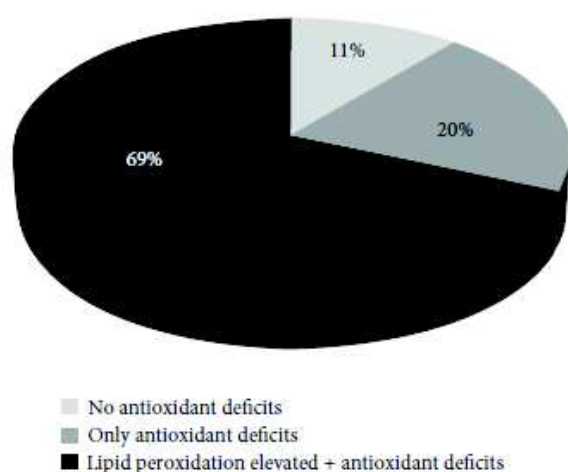


Figure 2. Prevalence of patients with plasma antioxidant deficits and elevated lipid peroxidation in 54 COPD patients. Black: patients with elevated plasma lipid peroxidation and at least one antioxidant deficit/redox imbalance. Gray: patients with only antioxidant deficit/redox imbalance. White: patients with a normal systemic oxidative stress profile.

Our data also revealed a substantial imbalance in dietary intake, in particular with regard to micronutrients, although we observed no significant correlation with systemic antioxidant levels. Intake of vitamin C and E was below the RDI in 70% and 92% of COPD patients, respectively (Figure 3). Regarding trace element consumption, absolute intake was below the RDI for zinc and copper in 68% and 27% of COPD patients, respectively, while selenium intake was normal (Figure 3).

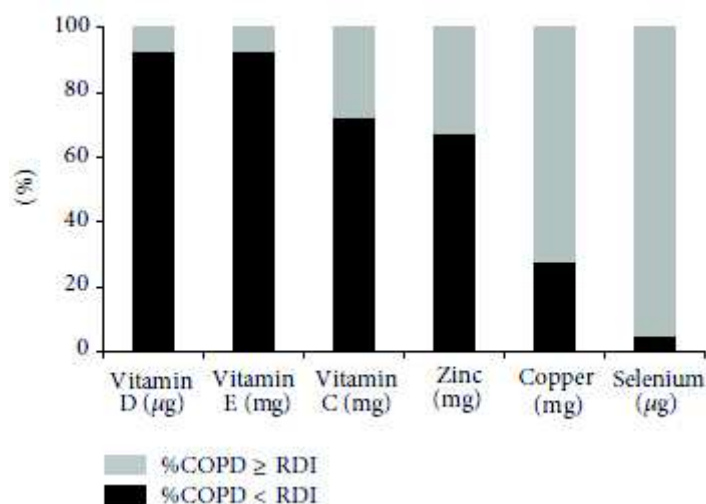


Figure 3. *Quality of micronutrient intake in 40 COPD patients. For each micronutrient, results showed the proportion of patients with COPD with dietary intake above (grey part) or below (dark part) recommendations. Recommended daily intake (RDI) were defined in function of gender.*

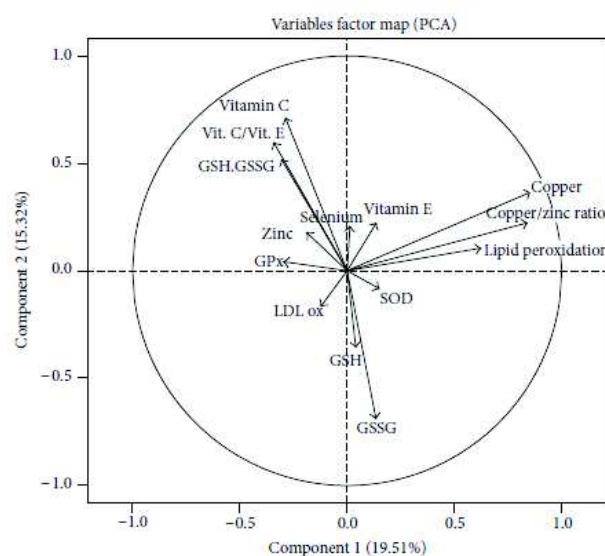


Figure 4. *Factor map of 14 systemic OS markers obtained in all individuals (n=54) by principal component analysis (PCA). The original variables are projected in a reduced dimension space defined by component 1 (x axis) and component 2 (y axis).*

significantly lower levels of systemic vitamin C (and vitamin C/vitamin E ratio), GSH and GPx compared with cluster 3, while the GSH/GSSG ratio remained normal (Table 3).

Profiles of systemic OS markers in COPD patients

PCA was performed on 14 systemic OS markers, which yielded two major components (Figure 4). Component 1 was defined essentially by systemic copper, the copper/zinc ratio and lipid peroxidation levels, whereas

component 2 was defined by systemic GSH, GSSG, GSH/GSSG, vitamin C and the vitamin C/vitamin E ratio levels. Four clusters of COPD patients emerged from the hierarchical model (Ward's method) of classification in function of the 2 major components defined in PCA.

Cluster 1 comprised COPD patients with no specific OS markers deficits in common. Cluster 2 comprised COPD patients with amore elevated systemic lipid peroxidation level than that of the cluster 1 patients, whereas the systemic GSH/GSSG ratio was lower (Table 3). Compared with clusters 1 and 2, the COPD patients of clusters 3 and 4 had significantly higher levels of systemic lipid peroxidation and copper and significantly higher copper/zinc ratios (Table 3). More specifically, cluster 4 had

Table 3. Systemic OS levels in clusters of COPD patients

	Cluster 1 N=19	Cluster 2 N=19	Cluster 3 N=10	Cluster 4 N=6	<i>P</i> <i>Interact.</i>
Vitamin C (µg/ml)	11.8 ± 4.0*	8.8 ± 3.1 [#]	14.0 ± 3.1*	5.2 ± 2.7 [#]	<0.001
Vitamin E (mg/L)	13.7 ± 2.9	14.5 ± 4.3	15.5 ± 3.6	14.4 ± 2.9	0.698
Vit C/vit E	0.86 ± 0.28*	0.65 ± 0.26 [#]	0.91 ± 0.14*	0.36 ± 0.16 [#]	<0.001
Selenium (µg/ml)	92.3 ± 14.3	87.1 ± 13.9	91.7 ± 13.0	87.1 ± 17.6	0.744
Copper (mg/ml)	0.95 ± 0.16* [#]	1.06 ± 0.12* [#]	1.33 ± 0.26	1.34 ± 0.19	<0.001
Zinc (mg/ml)	0.82 ± 0.13	0.77 ± 0.09	0.74 ± 0.07	0.87 ± 0.20	0.161
Copper/zinc ratio	1.19 ± 0.25* [#]	1.38 ± 0.21 [#]	1.81 ± 0.44	1.60 ± 0.2	<0.001
GSH (µmol/L)	945 ± 174	975 ± 150	978 ± 166	788 ± 153	0.096
GSSG (µmol/L)	1.66 ± 0.97	11.84 ± 7.50* ^{#§}	2.84 ± 0.80	1.15 ± 0.23	<0.001
GSH/GSSG	694 ± 279 [#]	135 ± 113* ^{#§}	363 ± 99*	712 ± 213 [#]	<0.001
GPx (UI/gHb)	47.8 ± 12.5	48.2 ± 13.9	51.1 ± 8.4	38.5 ± 7.9	0.265
SOD (UI/gHb)	1247 ± 260	1366 ± 332	1466 ± 311	1097 ± 222	0.219
Lipid peroxidation (µmol/L)	402 ± 158* [#]	570 ± 179*	777 ± 253	904 ± 214	<0.001
LDL ox (UI/L)	172 ± 219	71 ± 57	98 ± 70	94 ± 99	0.188

Results are expressed in mean ± SD. *=*p*<0.05 vs. Cluster 4; [#]=*p*<0.05 vs. Cluster 3; [§]=*p*<0.05 vs. Cluster 1. Definition of abbreviations: W=women; M=Men; GSH=reduced glutathione; GSSG=oxidized glutathione; SOD=superoxide dismutase; GPx=peroxidase glutathione; LDL=oxidized low-density lipoproteins

Clinical relevance of the systemic OS imbalance

Clinical and muscle parameters of the four clusters of COPD patients are presented in Table 4. Significant differences were found in the sex ratio and muscle mass index. Compared with clusters 1 and 2, clusters 3 and 4 included significantly more women (Table 4).

Table 4. Clinical, functional and muscle characteristics in clusters of COPD patients

	Cluster 1 N=19	Cluster 2 N=19	Cluster 3 N=10	Cluster 4 N=6	<i>P</i> <i>Interact.</i>
Sex ratio (W/M)	8/11	5/14	8/2* [#]	6/0* [#]	<0.01
Age (years)	59 ± 7	63 ± 7	61 ± 8	57 ± 4	0.23
BMI (kg/m ²)	24.0 ± 4.8	25.3 ± 2.8	25.4 ± 4.4	24.1 ± 4.8	0.71
Fat Free Mass index (kg/m ²)	17.4 ± 2.4	17.9 ± 2.2	16.6 ± 2.3	15.5 ± 1.7	0.14
Muscle mass index (kg/m ²)	8.0 ± 1.6	8.5 ± 1.4	7.0 ± 1.5 [#]	6.6 ± 0.6 [#]	0.02
FEV1 (% pred)	58 ± 24	50 ± 20	51 ± 13	61 ± 26	0.74
BODE Score [18]	2.1 ± 1.3	1.6 ± 1.6	3.0 ± 1.4	1.8 ± 1.5	0.29
Breathlessness, MRC score	1.5 ± 1.3	1.5 ± 1.0	1.5 ± 1.3	1.3 ± 0.8	0.97
Tobacco consumption (Packs /years)	43 ± 21	46 ± 26	34 ± 20	56 ± 27	0.31
Physical Activity level, Voorips Score [21]	4.6 ± 3.1	5.3 ± 4.1	4.1 ± 2.7	2.5 ± 1.1	0.69
6-MWD (m)	557 ± 87	516 ± 104	469 ± 35	481 ± 67	0.07
6-MWD (% pred)	85 ± 14	79 ± 16	77 ± 10	79 ± 13	0.40
W _{sl} (% pred)	53 ± 19	46 ± 16	49 ± 21	57 ± 24	0.53
VO _{2sl} (% pred)	62 ± 17	57 ± 16	64 ± 17	63 ± 19	0.68
QMVC (Nm)	98 ± 29	119 ± 45	90 ± 33	77 ± 16	0.11
QMVC (% pred)	73 ± 14	81 ± 24	71 ± 16	68 ± 14	0.53
Qend (s)	397 ± 170	327 ± 105	337 ± 92	458 ± 253	0.70

*Results are expressed in mean ± SD. *= $p < 0.05$ vs. Cluster 1; #= $p < 0.05$ vs. Cluster 2. Definition of abbreviations: COPD=chronic obstructive pulmonary disease; W=women/M=men; MRC=Medical Research Council; BODE index=body mass index, airway obstruction, dyspnoea, exercise capacity index (6-MWD); BMI=body mass index (kg/m²); FEV₁ (%pred)=forced expiratory volume in 1 second; W_{max} (% pred)=symptom-limited power output; VO_{2sl} (% pred)=symptom-limited oxygen uptake; 6-MWD (m)=6-minute walking distance; QMVC (Nm)=quadriceps maximal voluntary contraction expressed in Newtons; Qend (s)=quadriceps endurance time expressed in seconds.*

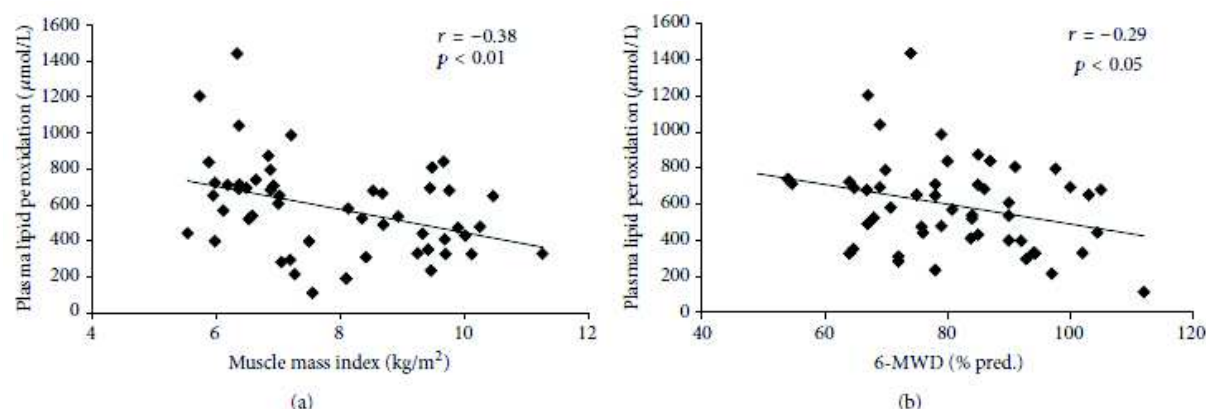


Figure 5. Relationships between systemic lipid peroxidation and a) muscle mass index (kg/m^2) and b) 6-MWD (%pred). a) Systemic lipid peroxidation, expressed in $\mu\text{mol/L}$, was significantly and negatively correlated with muscle mass index ($r=-0.38$; $p<0.01$) in 54 COPD patients. b) Systemic lipid peroxidation, expressed in $\mu\text{mol/L}$, was significantly and negatively correlated with 6-MWD ($r=-0.29$; $p<0.05$) in 54 COPD patients.

When the systemic OS markers were considered separately, univariate analysis revealed a significant and negative correlation between the copper/zinc ratio and the muscle mass index ($p<0.05$; $r=-0.49$). Similarly, systemic lipid peroxidation was significantly and negatively correlated with the muscle mass index ($p<0.01$; $r=-0.38$; Figure 5a) and the 6-MWD in % predicted ($p<0.05$; $r=-0.29$; Figure 5b).

The multivariate analysis model also showed that systemic lipid peroxidation was associated with gender (Table 5). As shown in Figure 6, the mean value of systemic lipid peroxidation was significantly higher in COPD women than in COPD men ($701\pm263 \mu\text{mol/L}$ vs. 468 ± 190

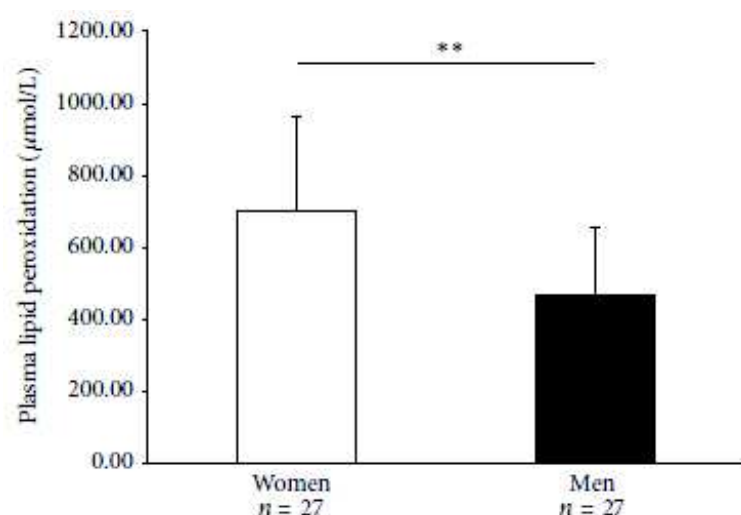


Figure 6. Systemic lipid peroxidation levels according to gender in COPD patients. Bars represent results expressed in mean $\pm$ standard deviation. White bars: results of 27 COPD women. Black bars: results of 27 COPD men. **: $p<0.01$.

$\mu\text{mol/L}$; $p<0.01$). Secondly, systemic lipid peroxidation was significantly associated with the 6-MWD (% predicted) (Table 5). Moreover, the negative correlation between systemic lipid peroxidation and the 6-MWD (in % of predicted) was significant only in women ($p<0.05$; $r=-0.49$).

Table 5. Parameters associated with systemic lipid peroxidation in 54 patients with COPD (multivariate analysis: ANCOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Gender	1	421026	421026	7.46	0.01*
Age (years)	1	53879	53879	0.96	0.33
Tobacco consumption (packs/year)	1	13984	13984	0.25	0.62
Physical activity level, Voorrips score	1	48971	48971	0.87	0.36
Muscle mass index (Kg/m ²)	1	2134	2134	0.04	0.84
FEV1 (% pred)	1	134549	134549	2.39	0.14
FEV1/FVC	1	17162	17162	0.31	0.59
6-MWD(% pred)	1	291300	291300	5.18	0.03*
Residuals	22	1239096	56323		

*To check parameters associated with systemic lipid peroxidation, we performed covariance analysis (ANCOVA). *= $p < 0.05$ means that the parameter is statistically associated with systemic lipid peroxidation. Definition of abbreviations: COPD=chronic obstructive pulmonary disease; BMI=body mass index; FEV₁=forced expiratory volume in 1 second; FVC=forced vital capacity; 6-MWD=6-minute walk distance; Df=degrees of freedom; Sq=square.*

DISCUSSION

This study showed that stable COPD patients referred to a rehabilitation program had a systemic antioxidant imbalance, particularly regarding vitamins and trace elements. Taken together, 89% of COPD patients had at least one systemic antioxidant imbalance, which might explain the elevated systemic LP levels found in 69% of them. We confirmed the great heterogeneity of systemic OS markers in these patients, but for the first time we also identified four profiles of systemic OS marker imbalance. The profiles of the COPD patients of clusters 3 and 4 were characterized by a considerable imbalance in copper metabolism, and cluster 4 patients showed imbalances in GSH, GPx and vitamin C associated with a particularly high level of systemic lipid peroxidation. Regarding the clinical and muscle parameters, further analysis allowed us to identify that the systemic lipid peroxidation level was higher in COPD women and associated with a decrease in exercise capacity.

Systemic antioxidant OS profiles in COPD patients

Our results showed specific OS markers imbalance, in particular in nonenzymatic antioxidants, in different proportions but 89% of COPD patients were concerned. Some OS markers showed a great part of deficits in COPD patients, as vitamin C (26%), zinc (28%) and selenium (66%) [15], while other markers as GSH, vitamin E and enzymatic antioxidants are not much affected compared with that is described in the literature [7, 14, 15, 34]. These discrepancies between studies cannot be linked only to a small number of COPD patients included or methodological differences. In fact, to limit these methodological considerations, we compared systemic OS markers of COPD patients to validated reference values obtained in a large cohort of healthy subjects [20, 21]. One possible limitation of this methodology is the different range of our COPD patients included (47 to 76 years) vs. this cohort of healthy subjects (21 to 64 years) [20, 21]. Indeed, in the present study, only 28% of patients were aged of 65 years or more. However, the effect of age on systemic OS markers in particular in antioxidants was discussed and questioned in literature [35, 36]. In agreement with this discussion, no difference was noted for any of the systemic OS markers investigated in our study between COPD patients 65 years old or younger (47 to 64 years) and COPD patients older than 65 years (data not shown). Despite the use of this methodology which appeared a suitable solution, the apparent discrepancies between studies reflect a large heterogeneity in individual systemic OS marker in COPD patients as illustrated in our study (Figure 1).

One of the most important factors that could modulate and explain systemic nonenzymatic antioxidant differences between COPD patients is the nutritional intake [37, 38]. However, we didn't find any correlation between micronutrient intake and systemic antioxidant levels although our study showed a high prevalence of inadequate intake of micronutrients like vitamins C, E and zinc in COPD patients, as Van de Boel and al. [39]. These data suggest specific underlying mechanisms for antioxidant system imbalance as reflected by the cluster analysis results. Indeed, we showed that cluster 3 and 4 had elevated systemic copper level and copper/zinc ratio. In addition, we found a significant correlation between systemic lipid peroxidation and copper (and copper/zinc ratio) in line with previous studies [21, 40]. In literature, it's well admitted that copper in excess may have a "pro-oxidant" activity inducing lipid peroxidation and zinc may partially inhibit these reactions [41]. As nutritional intake did not appear to explain the increase in systemic copper in our study, an inflammatory phenomenon and/or a more important susceptibility to tobacco consumption are currently the only assumptions advanced in literature [42, 43].

Compared with clusters 2 and 3, the COPD patients of cluster 4 had normal values for the GSH/GSSG ratio, whereas the mean lipid peroxidation level was more elevated. However, in the deleterious OS state, the GSH/GSSG ratio was usually decreased, reflecting the activity of GSH to scavenge ROS, thereby inducing an increase in this oxidized form (GSSG) [12]. To explain this surprising result, we hypothesize that GSH is not used by glutathione peroxidase (GPx). In fact, GSH acts mainly as a substrate of GPx, which directly scavenges ROS and may limit lipid peroxidation production [11]. It was shown that GPx activity will respond in two different ways to oxidative stress: the first is an adaptation characterized by an increase in GPx activity, whereas in response to chronic or severe oxidative stress, this activity decreases [2, 3]. We were able to associate this GPx kinetics with the results in our four clusters of COPD patients. The first three clusters had elevated GPx levels, whereas the cluster 4 COPD patients showed a tendency toward a decrease in systemic GPx. Nevertheless, the current data in literature did not allow us to check this hypothesis.

Moreover, as they act as substrate, the decrease in selenium and zinc in a large part of COPD patients may also contribute to the decrease in the enzymatic activity of GPx and SOD respectively [10, 11]. At last, this decrease in GSH activity may contribute to the decrease in vitamin C observed in cluster 4. In fact, GSH regenerate the oxidized form of vitamin C in its active form [13]. Also, vitamin C directly scavenges ROS and permits the oxidized form of vitamin E to be regenerated to maintain normal systemic levels as found in our study [13].

Clinical relevance of systemic OS imbalance

It is widely acknowledged that antioxidant deficits might contribute to deleterious OS, as illustrated by the significant and positive correlation found between systemic Copper/Zinc ratio and lipid peroxidation [44]. In agreement with previous studies [8, 14], we found an increase in systemic lipid peroxidation in 69% of COPD patients. The different antioxidant imbalance profiles described previously may explain higher systemic lipid peroxidation levels found in clusters 3 and 4 of COPD patients. Interestingly, we also observed that clusters 3 and 4 of COPD patients were constituted mainly of women. The literature had usually described that men generated lower levels of enzymatic antioxidant, potentially leading to higher OS [45]. However recent studies argued that women have a more important OS imbalance than men in a healthy population [46] and in current/former smokers [42].

With regard to systemic lipid peroxidation, the multivariate analysis showed a significant correlation with gender but also with 6-MWD (% predicted). A possible explanation for the relationship between oxidative stress and the 6-MWD is that this submaximal test reflects the

daily living conditions of COPD patients, unlike the maximal incremental test, for example [47]. In literature, it's well admitted that high systemic lipid peroxidation levels induce cell dysfunction, which may lead to a decrease in muscle function contributing to exercise limitation, without evidence of differences between COPD men and women [2, 5, 8]. In our study, when COPD men and women were separated, we found significant negative correlation between systemic lipid peroxidation and 6-MWD (% predicted) only in COPD women, supporting the hypothesis of clinical and physiological differences between men and women in COPD advanced by De Torres *et al.* [18]. The present data therefore argue in favor of future supplementation with vitamins and trace elements to optimize the benefits of general nutritional support on muscle function/exercise capacity observed in COPD patients [48] by reducing deleterious OS as lipid peroxidation. Thus, we also suspect that COPD patients will show different positive responses to antioxidant supplements, validating specific phenotypes of patients with COPD [49].

In conclusion, our study showed for the first time that 89% of COPD patients had a systemic antioxidant imbalance, with more important deficits in vitamins and trace elements contributing to deleterious OS in 69% of them. Specific systemic OS profiles were defined in COPD patients and characterized by an increase in systemic copper and/or imbalance of vitamin C, GSH and GPx associated with particularly high level of lipid peroxidation. In addition, from a clinical point of view, systemic lipid peroxidation level was higher in COPD women and was associated with a decrease in exercise capacity suggesting that different underlying mechanisms lead to muscle impairment. Future research is therefore needed to investigate more thoroughly the responses to targeted antioxidant supplementation in COPD patients.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the team of 'La Solane' Pulmonary Rehabilitation Center, especially the nursing service and the research laboratory, for their contribution to this work. E. Tremey is also acknowledged for his critical reading of the manuscript.

GRANTS

This study was supported by joint grants from the CHRU Montpellier and the Fontalvie Corporation, Toulouges, France. J. Maury was supported by a ‘CIFRE grant’ (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) from the Fontalvie Corporation and the French ‘Association Nationale de la Recherche et de la Technologie’.

REFERENCES

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Sep 15; 176(6):532-55. Epub 2007 May 16.
2. Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, Natanek SA, Man WD, Jackson A, Gosker HR, Schols AM, Moxham J, Polkey MI, Wouters EF. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur Respir J*. 2010 Jul; 36(1):81-8.
3. Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, Moore AJ, Moxham J, Polkey MI. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2007 Feb;62(2):115-20.
4. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med*. 2001 Feb;7(2):55-62.
5. Koechlin C, Couillard A, Simar D, Cristol JP, Bellet H, Hayot M, Prefaut C. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 1; 169(9):1022-7.
6. Couillard A, Koechlin C, Cristol JP, Varray A, Prefaut C. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J*. 2002 Nov;20(5):1123-9.
7. Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, Elliott M, Singh A, Chen L, Zhuang X, Hogg J, Pare P, Tudor RM, Biswal S. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Sep 15;178(6):592-604.
8. Gouzi F, Abdellaoui A, Molinari N, Pinot E, Ayoub B, Laoudj-Chenivresse D, Cristol JP, Mercier J, Hayot M, Préfaut C. Fiber atrophy, oxidative stress, and oxidative fiber reduction are the attributes of different phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease patients. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Dec;115(12):1796-805.
9. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct; 295(4):C849-68.
10. Wei JP, Srinivasan C, Han H, Valentine JS, Gralla EB. Evidence for a novel role of copper-zinc superoxide dismutase in zinc metabolism. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48)
11. Pannala VR, Bazil JN, Camara AK, Dash RK. A mechanistic mathematical model for the catalytic action of glutathione peroxidase. *Free Radic Res*. 2014 Apr;48(4):487-502.
12. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000 Sep;16(3):534-54.
13. May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med*. 2000 May 1;28(9):1421-9.
14. Kirkil G, Hamdi Muz M, Seçkin D, Sahin K, Küçük O. Antioxidant effect of zinc picolinate in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2008 Jun; 102(6):840-4.

15. Santos MC, Oliveira AL, Viegas-Crespo AM, Vicente L, Barreiros A, Monteiro P, Pinheiro T, Bugalho De Almeida A. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*. 2004 Nov-Dec;9(6):461-9.
16. Lin YC, Wu TC, Chen PY, Hsieh LY, Yeh SL. Comparison of plasma and intake levels of antioxidant nutrients in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy people in Taiwan: a case-control study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010;19(3):393-401.
17. Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Vuillemin A, Molinari N, Ninot G, Caris G, Hayot M. Evidence of an early physical activity reduction in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Arch Phys Med Rehabil*. 2011 Oct;92(10):1611-1617.e2.
18. De Torres JP, Casanova C, Hernández C, Abreu J, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and COPD in patients attending a pulmonary clinic. *Chest*. 2005 Oct;128(4):2012-6.
19. Woźniak A, Górecki D, Szpinda M, Mila-Kierzenkowska C, Woźniak B. Oxidant-antioxidant balance in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease after smoking cessation. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:897075.
20. Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle,J.P. [Oxidative stress]. *Rev. Med.Liege* 62:628–638; 2007.
21. Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, Collette G, Haleng J, Cheramy-Bien JP, Charlier C, Chapelle JP, Giet D, Albert A, Limet R, Defraigne JO. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40 48 years from the ELAN study in the province of Liege, Belgium. *Hum Reprod*. 2007 Aug;22(8):2335-43.
22. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*. 1993 Mar; 16:5-40.
23. Turki A, Hayot M, Carnac G, Pillard F, Passerieux E, Bommart S, Raynaud de Mauverger E, Hugon G, Pincemail J, Pietri S, Lambert K, Belayew A, Vassetzky Y, Juntas Morales R, Mercier J, Laoudj-Chenivesse D. Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 2012 Sep 1; 53(5):1068-79.
24. Zhao B, Tham SY, Lu J, Lai MH, Lee LK, Mochhala SM. Simultaneous determination of vitamins C, E and beta-carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Pharm Sci*. 2004 Jun 30; 7(2):200-4.
25. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*. 1995 Jun; 18(6):1079-86.
26. Stürup S, Hayes RB, Peters U. Development and application of a simple routine method for the determination of selenium in serum by octopole reaction system ICPMS. *Anal Bioanal Chem*. 2005 Feb; 381(3):686-94.
27. Janssen I, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Ross R. Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Aug;89(2):465-71.
28. ATS/ACCP Statement on cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 211-277, 2003.

29. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jul 1; 166(1):111-7.
30. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 Mar 4; 350(10):1005-12.
31. Voorrips LE, Ravelli AC, Dongelmans PC, Deurenberg P, Van Staveren WA. A physical activity questionnaire for the elderly. *Med Sci Sports Exerc.* 1991 Aug;23(8):974-9.
32. Biró G, Hulshof KF, Ovesen L, Amorim Cruz JA; EFCOSUM Group. Selection of methodology to assess food intake. *Eur J Clin Nutr.* 2002 May;56 Suppl 2:S25-32.
33. Ambroise Martin, Apports nutritionnels conseillés pour la population française, Tec & Doc, 2000, 605.
34. Van Helvoort HA, Heijdra YF, Heunks LM, Meijer PL, Ruitenbeek W, Thijs HM, Dekhuijzen PN. Supplemental oxygen prevents exercise-induced oxidative stress in muscle-wasted patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 May 15; 173(10):1122-9. Epub 2006 Mar 2.
35. Polidori MC, Cherubini A, Senin U, Mecocci P. Peripheral non-enzymatic antioxidant changes with human aging: a selective status report. *Biogeront* 2001: 99–104.
36. Pincemail J, Ricour C, Defraigne JO, Petermans J. [Oxidative stress, antioxydants and the ageing process]. *Rev Med Liege.* 2014 May-Jun;69(5-6):270-5.
37. Odencrants S, Bjuström T, Wiklund N, Blomberg K. Nutritional status, gender and marital status in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Nurs.* 2013 Oct;22(19-20):2822-9.
38. Schols AM. Nutrition as a metabolic modulator in COPD. *Chest.* 2013 Oct;144(4):1340-5. doi: 10.1378/chest.13-0326.
39. Van de Bool C, Mattijssen-Verdonschot C, van Melick PP, Spruit MA, Franssen FM, Wouters EF, Schols AM, Rutten EP. Quality of dietary intake in relation to body composition in patients with chronic obstructive pulmonary disease eligible for pulmonary rehabilitation. *Eur J Clin Nutr.* 2014 Feb;68(2):159-65.
40. Passerieux E, Hayot M, Jaussent A, Carnac G, Gouzi F, Pillard F, Picot MC, Böcker K, Hugon G, Pincemail J, Defraigne JO, Verrips T, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Free Radic Biol Med.* 2014 Sep 19.
41. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):147-63.
42. Hakim IA, Harris R, Garland L, Cordova CA, Mikhael DM, Sherry Chow HH. Gender difference in systemic oxidative stress and antioxidant capacity in current and former heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Dec;21(12):2193-200. Epub 2012 Oct 2.
43. Dransfield MT, Davis JJ, Gerald LB, Bailey WC. Racial and gender differences in susceptibility to tobacco smoke among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2006 Jun;100(6):1110-6.

44. Couillard A, Prefaut C. From muscle disuse to myopathy in COPD: potential contribution of oxidative stress. *Eur Respir J.* 2005 Oct;26(4):703-19.
45. Tóthová L, Ostatníková D, Šebeková K, Celec P, Hodosy J. Sex differences of oxidative stress markers in young healthy subjects are marker-specific in plasma but not in saliva. *Ann Hum Biol.* 2013 Mar;40(2):175-80. Epub 2013 Jan 18.
46. Brunelli E, Domanico F, La Russa D, Pellegrino D. Sex differences in oxidative stress biomarkers. *Curr Drug Targets.* 2014;15(8):811-5.
47. Garcia-Rio F, Lores V, Mediano O, Rojo B, Hernanz A, López-Collazo E, Alvarez-Sala R. Daily physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease is mainly associated with dynamic hyperinflation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Sep 15;180(6):506-12.
48. Keranis E, Makris D, Rodopoulou P, Martinou H, Papamakarios G, Daniil Z, Zintzaras E, Gourgoulialis KI. Impact of dietary shift to higher-antioxidant foods in COPD: a randomised trial. *Eur Respir J.* 2010 Oct;36(4):774-80.
49. Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, Macnee W, Make BJ, Rabe KF, Rennard SI, Sciurba FC, Silverman EK, Vestbo J, Washko GR, Wouters EF, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 1; 182(5):598-604.

Etude 2: « Valeurs de références pour la taille et la proportion des fibres du vaste latéral chez des sujets sains âgés de plus de 40 ans : une revue systématique et méta-analyses »

Ce travail ayant été accepté pour publication, les textes, figures et tableaux présentés ci-dessous correspondent en tous points à la version intégrale de l'article publiée dans « Journal of Applied Physiology » en 2013 (*Impact Factor* : 3.434).

J Appl Physiol 115: 346–354, 2013.
First published April 4, 2013; doi:10.1152/jappphysiol.01352.2012.

Reference values for vastus lateralis fiber size and type in healthy subjects over 40 years old: a systematic review and metaanalysis

Fares Gouzi,^{1,2} Jonathan Maury,^{1,2} Nicolas Molinari,³ Pascal Pomiès,¹ Jacques Mercier,¹ Christian Préfaut,¹ and Maurice Hayot¹

¹CHRU Montpellier, Department of Clinical Physiology, University of Montpellier I and II, Montpellier, France; ²Pulmonary Rehabilitation Center "La Solane," Fontalvie Group, Osséja, France; and ³CHRU Montpellier, Department of Medical Information, University of Montpellier I, Montpellier, France

Submitted 6 November 2012; accepted in final form 29 March 2013

INTRODUCTION

Skeletal muscle atrophy is a major systemic impairment in chronic diseases. In chronic obstructive pulmonary disease (COPD), this muscle atrophy has been characterized by a reduced cross-sectional area (CSA) of the myofibers, based on biopsies from the *vastus lateralis* of the quadriceps (1). Similar changes have been described in chronic heart failure [CHF (48)] and in elderly subjects (13).

In clinical practice, histopathological proof of muscle atrophy is currently not mandatory in the context of chronic disease. Similarly, in research on chronic diseases and aging, the selection of subjects with atrophic muscle is not systematically based on standardized criteria (13). Despite indirect tools like muscle imaging (6), the lack of criteria for indisputable proof of muscle atrophy has unfortunately made it difficult for researchers to identify its biological mechanisms and determinants. Reduced muscle fiber CSA on a histopathological sample is a standardized parameter of an atrophic process and may therefore be a valuable tool for research on muscle atrophy, as the fiber CSA reduction directly matches the loss in myofibrillar protein (29) and the increased proteolysis (30).

Reference values for muscle fiber CSA have never been published, however, particularly in healthy subjects over 40 yrs old, which is generally the age of onset of a chronic disease (74a). The determination of these values is a particularly complex endeavor for two reasons. First, the fiber CSA depends on the fiber type, and thus, muscle fiber typing is mandatory for the assessment of fiber CSA. Second, there is a great heterogeneity of the fiber size in patients and healthy subjects, which has been observed in young subjects (62). This heterogeneity cannot be fully explained by the variability associated with the biopsy site (only 10%-15% of variation within the same muscle) (7), and is also due to genetic background (61), gender (45, 67), age (58), the physical activity level (45), and body weight (58). Determining reference values for fiber CSA would thus require muscle biopsies in huge and well-characterized populations. Another possibility might be to combine the data from control groups of healthy subjects over 40 yrs old collected from the literature. We therefore aimed to systematically review the studies providing data on the fiber CSA and fiber type proportion in the *vastus lateralis* of the quadriceps of healthy subjects (age >40 yrs) and then to pool and analyze the data from the selected studies, in order to provide reference values and lower limits of normal for muscle fiber CSA.

MATERIALS AND METHODS

This systematic review and meta-analysis was performed according to the guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (50). Methods of analysis and inclusion criteria were specified before the beginning of the study and documented in a protocol. The review team was composed of clinicians in pulmonary rehabilitation, academic physiologists from a university hospital, a methodologist/statistician and researchers. The group met 4 times over the course of the review.

Search strategy

A computerized literature search was performed to identify the relevant trials reported in PubMed, Web of Science, the Physiotherapy Evidence Database (PEDro), and the Cochrane Library from January 1967 to March 2012. Congress abstracts of the ERS and ATS were screened between 2001 and 2012. Additional published studies were added after analysis of reviews on the topic and based on the references in the articles we initially retrieved. Given our study design and the low risk of publication bias, unpublished sources were not included. The search was also restricted to the English language literature.

A combination of the following MesH terms was used:

(Muscle fibers, skeletal) AND (vastus lateralis OR quadriceps OR knee-extensor OR knee-extensors OR quadriceps femoris OR Muscle, quadriceps) AND (healthy subject* OR elderly OR sedentary subjects OR adult* OR aged OR patient).

To minimize information bias, the study titles and abstracts were screened by 3 authors (FG, PP, J. Maury) and the full texts of the original articles of potentially eligible studies were then retrieved, in order to obtain complete details for inclusion. Study selection was based on the agreement of 2 authors and, in cases of disagreement, the consensus of 3 authors (FG, MH, CP) was sought.

Study selection

Table 1 summarizes the inclusion criteria. We included every type of clinical study (observational/comparative studies, longitudinal studies, and randomized controlled trials) in which the outcomes were fiber CSA and fiber type proportions (as at least a secondary outcome) assessed by histochemical or immunohistochemical methods. Both fiber CSA and type were mandatory because fiber CSA varies according to the fiber type. The complete

methodology had to be provided: biopsy site, reference for the validated technique, methodology for fiber type and size assessment, system for size measurement, and number of fibers analyzed (>100 (7)). All the selected studies had to have been approved by a local institutional review board. The sample sizes for the CSA analysis were >6.

Table 1. Inclusion criteria for the systematic review

Inclusion criteria	
Design	Any type of clinical study: .observational studies (case-control, etc.) .quasi-experimental studies (before-and-after studies, etc.) .randomized control trials
Participants	Healthy subjects aged >40 yrs No condition susceptible to impact skeletal muscle function Non-inclusion criteria: .obesity .diabetes .glucose intolerance .statins .osteoarticular diseases .thyroid diseases .hormone replacement therapies/androgen, GH or insulin supplementation
Interventions	NA
Comparisons	NA
Outcome measure	Fiber cross-sectional area and type in the <i>vastus lateralis</i>

The population was restricted to healthy subjects >40 yrs old (in order to obtain values in healthy subjects potentially comparable with those of subjects with a chronic disease (1)), with no condition susceptible to impact skeletal muscle function. Healthy subjects were defined according to the conclusion of a medical examination performed by a medical doctor. Obesity (70), diabetes (52), glucose intolerance (44), osteoarticular diseases (55), thyroid diseases (9), hormone replacement therapies (8), androgen, GH or insulin (66) supplementation, and statin use (49), all of which have demonstrated an impact on muscle morphology or function, constituted the non-inclusion criteria. Thus, potential co-morbidities and treatments of the subjects had to be screened clinically. If these informations were lacking in the full-text of the published study, the authors of the study were contacted. If no answer was obtained, or if no medical examination with screening of co-morbidities and treatments

was performed, the study was excluded.” Conversely, smoking status was not a criterion, as no definitive evidence of any impact on the quadriceps muscle has been demonstrated (4). In addition, reduced physical activity and overweight ($25 < \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) were not considered as non-inclusion criteria. Post-operative assessment and autopsy studies were not included because they are associated with an increased risk of bias. Studies in which CSA values were obtained on single skinned fibers were not considered in this systematic review.

Data extraction

Data were extracted blindly and independently by 2 independent authors using a standardized form (see appendix 1) (FG, J. Maury). In the case of discrepancy, the final data record was based on consensus (FG, J. Maury). The authors of the selected studies were all contacted in order to complete and verify the data. From the eligible articles, we extracted the fiber CSA (in μm^2) of all fiber types and the fiber type composition (type I/type II ratio, in %). In addition, we extracted the age, sex ratio, body mass index (BMI), physical activity level (sedentary/no structured program: 0, active: 1, trained: 2), and peakVO₂ if available, because these parameters have been incriminated in the variability of quadriceps fiber CSA (66).

Study quality assessment

The selected studies were both interventional and non-interventional, and study quality was assessed by the study design and the impact factor of the review in which the article was published. In addition, the methodological quality of the muscle histomorphological measurement and the population description was assessed for each article using a standardized questionnaire specifically designed for this very systematic review. The questionnaire items were devised by the experienced researchers and clinicians of the review team (see appendix 2). Last, the risk of bias (selective reporting, redundancy, etc.) was assessed.

Statistical analysis

Quantitative data are presented in means $\pm$ standard deviation (SD) and qualitative data are presented with proportions. If there were subgroups, data were pooled into a single group and the SD was calculated according to the following formula:

$$\text{SD} = \sqrt{((n_1/\text{ntot})^2 * \text{SD}_1^2) + (n_2/\text{ntot})^2 * \text{SD}_2^2) + \dots}$$

To estimate the pooled SD, we used a Markov chain Monte Carlo (MCMC) approach. Simulated data were generated according to each distribution (each study) and the pooled data

set was used to obtain the pooled SD. Forest plots were used to graphically evaluate both the variability (i.e., SD [1]) of the data and the weight of each study, according to its population size. Heterogeneity between studies was assessed using the Q statistic and quantified using the I² index (36). Meta-analytic computations were then performed on the all-fiber type CSA and the fiber type I proportion, using fixed-effect or random-effect modeling if there was significant heterogeneity on the Q-tests and/or I² index >50%. Inter-rater agreement was measured using a Kappa statistic.

Differences between subgroups were tested using the *t*-test. Regressions were performed for the fiber CSA and the type I fiber proportion with the following covariates: age, BMI, and peakVO₂, and using univariate and multivariate analyses with group size as the weight factor. Reference equations were established using predictors of fiber CSA and type I proportion in a stepwise linear regression model. The models were evaluated by correlation coefficient (*r*) and the standard error of the mean (SEM). The 95% confidence interval (95% CI) was calculated as follows: theoretical value+/-1.64*residual standard deviation (SD). A measured CSA and type I fiber proportion lower than the lower limit of normal (LLN=theoretical value-1.64*SD) was considered abnormal. A *p* value <0.05 was considered as statistically significant. Analyses were performed using R.2.13.0 software (Bell Laboratories, USA).

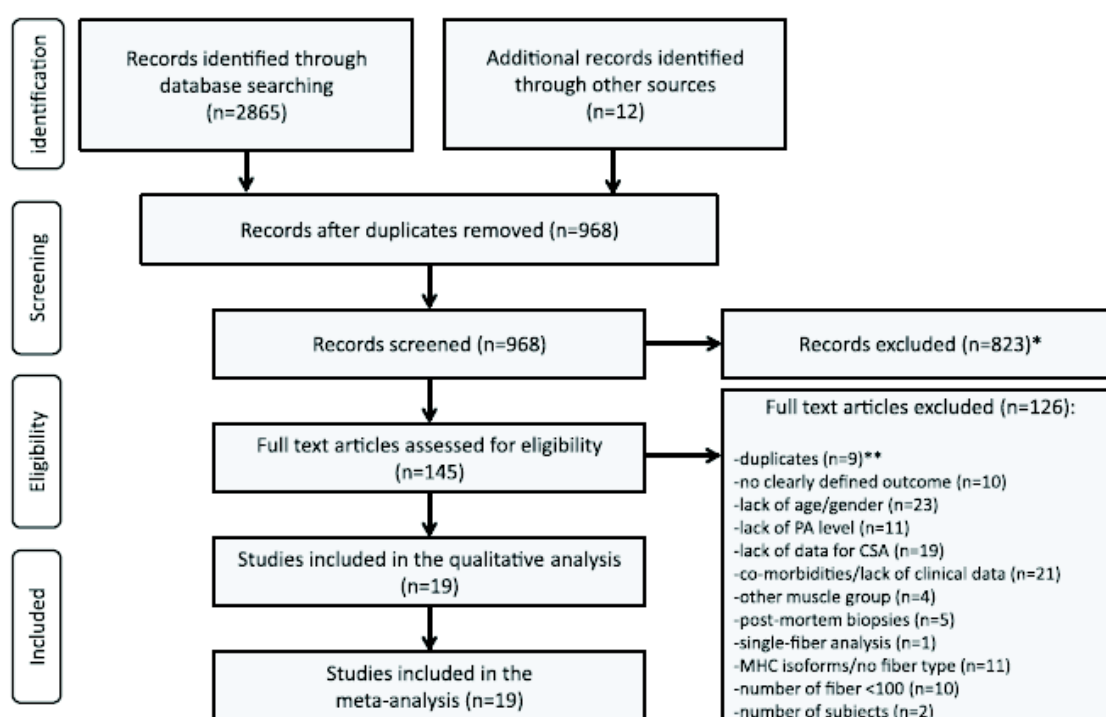


Figure 1. PRISMA flowchart of the studies enrolled for systematic review. *presence of a non-inclusion criterion based on the title and abstract of the record. **duplicates identified in the full-text article (population being part of a previous study).

RESULTS

Study selection

Figure 1 details the flow of studies included in the review. A final library of 19 studies involving 423 subjects (64 ± 1 yrs) was eligible (Table 2). Subjects were recruited worldwide, mostly from Nordic European countries and North America. Eighteen studies were identified from reference lists. In order to improve the precision of the retrieved data, the corresponding authors of 10 out of 31 (32.2%) potentially includable studies responded to our request for data missing from the full texts of the retrieved manuscripts. The inter-rater agreement for the study selection and data extraction from the included studies was 93%.

Heterogeneity and pooled results

Fiber CSA varied from $2858 \pm 648 \mu\text{m}^2$ (11) to $5892 \pm 1095 \mu\text{m}^2$ (68). The forest plot of the fiber CSA data for all the included studies revealed the heterogeneity of the studies (Figure 2): $Q=28.1$; $p=0.06$. The corresponding I^2 index reached 36%.

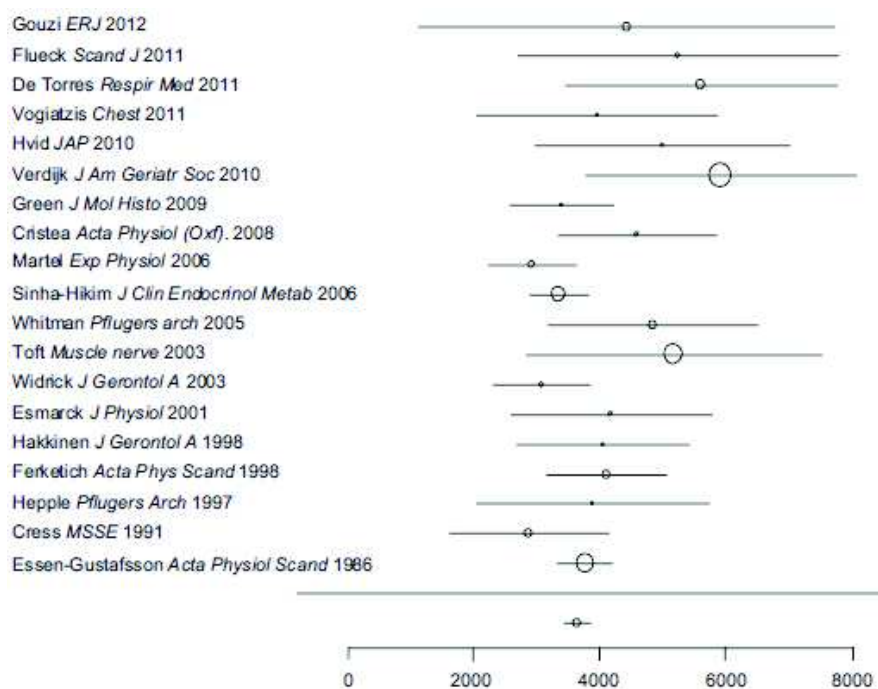


Figure 2. Forest plot of studies reporting the fiber cross-sectional area (mean and SD, in μm^2) for the 19 studies included in the systematic review.

Table 2. Fiber CSA and type I proportion in the included studies

N°	Study	N	Age	BMI	M/W	peakVO2	Physical Activity (PA) level	Prop type I	All fiber CSA
1	Essen-Gustavsson B <i>et al.</i> 1986 (19)	45	40-80	24.3	23/22		active/sedentary	0.54±0.05	3749±223
2	Cress ME <i>et al.</i> 1991 (11)	21	72±6	25.6	0/21	19.95	all PA levels	0.47	2858±648
3	Hepple RT <i>et al.</i> 1997 (34)	9	65-73		9/0	27.9±4.5	no structured PA program	0.59±0.06	3874±942
4	Ferketich AK <i>et al.</i> 1998 (21)	15	68.1±1.3	24.9	0/21		no structured PA program	0.49±0.05	4087±488
5	Hakkinen K <i>et al.</i> 1998 (31)	10	61±4	27.3	10/0	27.9±1.5	active	0.48±0.09	4039±700
6	Esmarck B <i>et al.</i> 2001 (18)	13	74±3.6	25±3.6	13/0		no structured PA program	0.54±0.10	4164±815
7	Widrick JJ <i>et al.</i> 2003 (74)	17	52.5±2.1	24.3	0/17		active/sedentary	0.38±0.06	3061±391
8	Toft I <i>et al.</i> 2003 (66)	51	60.7±2.2	26.8±2.8	36/15		all PA levels	0.58±0.11	5154±1196
9	Whitman SA <i>et al.</i> 2005 (73)	21	73±8	26.9	11/10		sedentary	0.54±0.10	4826±851
10	Sinha-Hikim I <i>et al.</i> 2006 (63)	36	65±5	27±4	36/0		no structured PA program	0.44	3339±243
11	Martel GF <i>et al.</i> 2006 (46)	18	68.6±3.1	26.3±3.1	11/7	22.4±1.3	no structured PA program	0.49±0.07	2917±356
12	Cristea A <i>et al.</i> 2008 (12)	11	67.8±6.2	23.8	11/0		trained	0.42±0.07	4572±642
13	Green HJ <i>et al.</i> 2009 (28)	8	68±14	27±5.7	0/8		no structured PA program	0.58±0.13	3372±421
14	Verdijk LB <i>et al.</i> 2010 (68)	59	72±5	26.8±3.2	59/0		no structured PA program	0.52±0.13	5892±1095
15	Hvid L <i>et al.</i> 2010 (38)	9	67.3±3.9	26.6	9/0		active	0.56±0.11	4973±1035
16	Vogiatis I <i>et al.</i> 2011 (69)	8	60±5.7	25.6±1.4	8/0	25.1±2.6	no structured PA program	0.49±0.10	3942±973
17	Torres SH <i>et al.</i> 2011 (67)	26	58±8	26.7±2.7	9/17		no structured PA program	0.53±0.08	5588±1097
18	Flueck M <i>et al.</i> 2011 (23)	17	67±2.1	26.9±2.9	11/6		active	0.53±0.13	5218±1296
19	Gouzi F <i>et al.</i> 2012 (27)	23	61.5±5.7	25.9±2.8	11/12	25.7±6	sedentary	0.45±0.11	4409±1679

BMI, Body Mass Index ; M/W, Men/Women ratio; CSA, Cross Sectional area

The range for the type I fiber proportion was smaller (from 44% (63) to 59%±6% (34)). The forest plot for the type I fiber proportion showed no significant heterogeneity (Figure 3): $Q=10.2$; $p=0.85$.

The meta-analysis was performed using a fixed-effect model. The pooled estimates were $3630 \pm 114 \mu\text{m}^2$ for fiber CSA (Figure 2) and $50.3 \pm 1.9\%$ for type I fiber proportion (Figure 3). Based on the variability of the selected studies, the simulated SDs were $1352 \mu\text{m}^2$ for fiber CSA and 10.6% for type I fiber proportion.

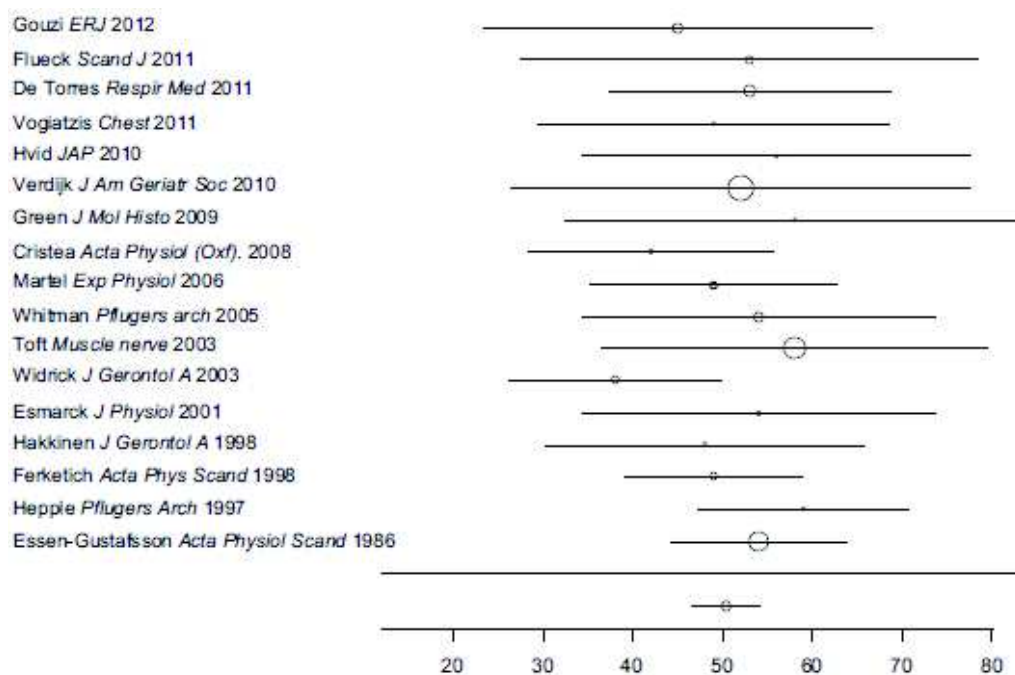


Figure 3. Forest plot of studies reporting the type I fiber proportion (mean and SD, in %) for the 19 studies included in the systematic review.

Post-hoc subgroup comparisons showed significant differences in fiber CSA between men and women: 4329 ± 193 and $3447 \pm 155 \mu\text{m}^2$, respectively; $p < 0.01$. The simulated SDs of the pooled fiber CSA in males and females were $1501 \mu\text{m}^2$ and $985 \mu\text{m}^2$, respectively.

Significant differences in fiber CSA between type I and type II fibers were also found: 4351 ± 203 vs. $3628 \pm 245 \mu\text{m}^2$; $p < 0.001$, in men, and 3829 ± 180 vs. $2652 \pm 196 \mu\text{m}^2$; $p < 0.001$, in women. There was no significant heterogeneity in the CSA per gender or fiber type: in men: type I: $Q=19$; $p=0.1$, type II: $Q=11$; $p=0.54$; in women: type I: $Q=4.62$; $p=0.87$, type II: $Q=5.9$; $p=0.75$. Only 10 and 8 studies in men and women, respectively, provided results per each fiber type ($n=266$). The resulting means and simulated SDs per gender and fiber type were:

	Men (n=141):	Women (n=125):
Type I:	4652±1391	3840±1587
Type IIa:	4167±1630	3056±1598
Type IIx:	3697±1577	2033±1519

The difference in PA level was also significantly different (sedentary/no structured PA program vs. active: $3552 \pm 154 \mu\text{m}^2$ vs. $4517 \pm 408 \mu\text{m}^2$; $p < 0.001$), but the sex ratio was higher in the sedentary subgroup than in the active subgroup (Men/Women: 52/6 vs. 167/75), suggesting that the increased fiber CSA in the active group may have been the effect of the higher proportion of males in this latter group. Regarding the type I fiber proportion, there was no significant difference between men and women: 53.9 ± 2.8 and 48.1 ± 2.6 , respectively; $p = 0.33$, nor between sedentary/no structured PA program and active: 53.2 ± 2.3 and 47.4 ± 4.6 , respectively; $p = 0.41$.

Regression analyses

The univariate analysis showed significant correlations between fiber CSA and BMI ($p = 0.057$), peakVO₂ ($p = 0.035$), and type I fibers ($p = 0.035$). In multivariate analysis, only peakVO₂ remained significant ($\beta = 190.92$; $p = 0.03$, see Table 3). In multivariate analysis (see Table 4), we found significant correlations between type I fiber proportion and age ($\beta = -0.024$; $p = 0.005$), BMI ($\beta = 0.096$; $p = 0.005$), and peakVO₂ ($\beta = -0.053$; $p = 0.005$).

Table 3. Multivariate regression analysis for fiber CSA

	Estimate (β)	SEM	t value	p value
Intercept	-996	1467	-0.68	0.53
peakVO ₂	191	60	3.16	0.034*

Quality assessment of the studies

The inter-observer agreement between FG and J. Maury was >95%. Quality assessment is summarized in Table S1 (See supplementary data). The main discrepancies between the studies concerned study outcomes, reporting on the management of potential pathologies and treatments, exercise capacity assessment, and the number of fibers analyzed (from 104 to

387). We observed very little description of ethnic origin (in no study), PA level (in 9 studies), and smoking status (in 6 studies).

Table 4. Multivariate regression analysis for type I fiber proportion

	Estimate (β)	SEM	t value	p value
Intercept	0.834	0.009	92.74	0.007
Age	-0.025	0.0002	-118.19	0.005*
BMI	0.096	0.001	138.27	0.005*
peakVO ₂	-0.053	0.0004	-125.57	0.005*

Prediction equations and lower/upper limits of normal

The number of studies (n=10 and n=8 for male and female, respectively) and subjects (n=141 and n=125, for men and women, respectively) providing data per each fiber type was not enough to determine valid LLNs, in particular for Type IIx fiber in female. According to type I and type II fibers, the LLNs were 1642 μm^2 and 593 μm^2 in men (n=247) and 2084 μm^2 and 338 μm^2 in women (n=148), respectively. We also provide prediction equations and LLNs for the pooled fiber CSA per each gender and according to the type I fiber proportion, expressed in % (n=267 and n= 156, in men and women, respectively). Given the β of the type I fiber proportion (in %) in the regression analysis, the prediction equations for the fiber CSA were as follows:

Men fiber CSA = (%type I*60)+1743 μm^2 and Women fiber CSA = (%type I*70)+139 μm^2

Therefore, the LLNs for fiber CSA were (%type I*60)-718 μm^2 and (%type I*70)-1485 μm^2 , in men and women, respectively.

DISCUSSION

The major finding of our meta-analysis is that the *vastus lateralis* of the quadriceps of a healthy subject over 40 yrs old is characterized by a mean fiber CSA of (%type I*60)+1743 μm^2 and (%type I*70)+139 μm^2 in men and women, respectively. The variability in the fiber CSA was explained by gender, the fiber type proportion, and VO_{2peak}. However,

this variability remained substantial in subgroups. The LLNs were thus (%type I*60)-718 μm^2 and (%type I*70)-1485 μm^2 in men and women, respectively.

Variability and physiological factors

Our analyses revealed that the fiber CSA depended on gender, fiber type proportion, and $\text{VO}_{2\text{peak}}$. The PA level was also associated with fiber CSA in the univariate analysis. These findings are consistent with basic muscle physiology (19, 67) and highlight the validity of the present systematic review. Interestingly, in our multivariate regression, age was inversely correlated with type I fiber proportion, whereas a type I fiber predominance and a decrease in type II fibers has been classically reported (58). Moreover, in contrast with former studies showing reduction in all (19) and type II fiber size (54, 58), age did not alter fiber CSA in our >40 yr old subjects. However, over an 8-year prospective study of the healthy elderly [older than the subjects of the previous studies (19, 54, 58)] with stable PA levels, no significant change in fiber type proportion or size occurred (24). These discrepancies may thus be explained by the progressive PA reduction associated with aging. Therefore, taking the PA level into account in the multivariate analysis, the independent relationship between type I fiber proportion and age would be inverse. Similarly, the type I fiber proportion was positively correlated with BMI. An increase in fiber CSA (42, 70) and a reduction in type I fiber proportion (35, 65) have been reported in obesity. Here again, taking into account the PA reduction (which occurs with increases in BMI) and multivariate analysis did not reveal a correlation between BMI and fiber CSA in our non-obese subjects.

Variability and quality assessment

The quality assessment indicated little discrepancy in the study designs and methodologies, but a low quality in reporting issues regarding the population i.e., potential pathologies and treatments, ethnic origin and physical activity level/exercise capacity of the subjects. In all but one of the 19 studies included in the review, muscle sampling was performed using the percutaneous biopsy needle technique described by Bergström *et al.* (5) and modified by Evans *et al.* (20). Only Flueck *et al.* (23) used a conchotome technique, which appears to be satisfactory for most histochemical analyses (16). Thus, the fiber CSA in the study of Flueck *et al.* did not appear discrepant with the others. The transverse sections of the fibers were stained using the same protocols as in histo- or immunohistochemical methods (n=3). Good agreement between the 2 methods for assessing type I fiber proportion has been demonstrated (32).

No study detailed the subject ethnic origins [which may influence the muscle histomorphology (10, 41, 72)]. In addition, smoking status was mentioned in only 6 studies. As smoking may have a deleterious impact on muscle function (43, 75) and structure (51, 53), this factor may explain some of the variability in the muscle histology of these healthy subjects. Last but not least, exercise capacity was assessed in 7 of the 19 studies, and the PA level was assessed by a simple question in 9 of the 19 studies. Given the impact of peakVO₂ and PA level on muscle fiber CSA and proportion, the lack of these latter data may be considered as a methodological flaw in these studies and would thus also explain an important part of the variability in the results of the present systematic review.

Conversely, healthy subjects have been defined on the basis of a same criteria, which was a direct clinical examination performed by a medical doctor, allowing the screening of clinical co-morbidities and treatments. In addition, a cardio-pulmonary exercise testing with measurement of the maximal oxygen uptake was available in 8 out of the 19 studies. Obese patients have been excluded on the basis of the BMI, and at least one specific test for the screening of potential co-morbidities has been performed in all studies [electrocardiogram (n=10), body composition analysis (n=7), spirometry (n=4), muscle function test (n=12), glucose tolerance test (n=2), other biological assay (n=3)]. If every infra-clinical co-morbidity has not been eliminated by the multiplication of systematic investigations, the probability to have included subjects with an infra-clinical co-morbidity, and then to have increased the variability of our results, has been reduced to its minimal. Then, the included studies match the current highest standard for the definition of a “healthy subject” in scientific studies. This definition has constituted the basis of the definition of muscle fiber impairments observed in the context of a chronic disease. Altogether, the results are consistent with the aim of our systematic review and meta-analysis, which was to provide reference values for the *vastus lateralis* fiber CSA in healthy subjects, in order to define muscle fiber atrophy in research studies on chronic diseases.

In contrast, although the authors of the studies in our review confirmed that they did not include healthy subjects with any condition or treatment susceptible to impact muscle morphology or function, we observed low quality of reporting with regard to the management of potential medication and pathologies. Yet, the quality of reporting does not necessarily reflect the quality of the underlying data, methods, or inclusion criteria of a population, and

failure to report a data or methods does not necessarily mean it has not been used (15, 37, 64). Thus, if this incomplete reporting does not constitute a bias in our systematic review, it is an indication of the required level of reporting the definition of a healthy subject > 40 yrs old in the included publications.

Reference values

Although some research groups have provided reference values for fiber CSA, these data can be disputed because of the low number of subjects included (n=74 (26), n=59 (68)). In our study, we pooled a larger number of data items (n=423) from 19 studies showing relatively little heterogeneity [and non-significant among the subgroups (36)] using a validated method to assess the mean and LLN of the fiber CSA per fiber type and gender. If the variability of the CSA and the number of observations leads to low LLNs per fiber type (type II in particular), our LLNs for fiber CSA according to the fiber type proportion provide relevant LLN, for the usual type I fiber proportions of the *vastus lateralis* in chronic diseases patients.

We used a similar and appropriate systematic screening process to retrieve 9 additional studies providing the fiber type proportions only, but none met the inclusion criteria of our systematic review. However, because the means and SDs provided for the type I fiber proportions resulted from a systematic review process, our calculation of a type I fiber proportion of 32.9% constitutes a valid LLN. In contrast, the 27% in healthy subjects provided by Gosker *et al.* did not result from a systematic review process (26). Therefore, the means and LLNs for fiber CSA per fiber type and the type I fiber proportion that we present here are currently the most valid reference values to assess the histomorphological parameters of muscle in chronic diseases.

Consistently with the observations in young subjects (62), the CVs obtained with the simulated SDs for type I and II fibers were 38% and 51% in men and 46% and 53% in women, respectively, and 20% for the type I fiber proportion, meaning that the variability in fiber CSA and type I proportion remained high (47). Thus, given the impact of anthropometric parameters, tobacco smoking and exercise capacity/PA level on fiber CSA and type I proportion, these reference values could probably be improved by further inclusions of studies with well-characterized healthy subjects over 40 years old.

Research and clinical implications

The critical muscle event in chronic disease is the onset of atrophy because it is a prognostic factor in many chronic conditions like COPD, CHF (25) and aging (13). However, there is currently no validated tool to define muscle atrophy (71). In research, patients/elderly subjects with muscle atrophy have been isolated according to their BMI (2, 60) or their physical functioning (39). This poor definition of atrophy increases the risk of false-negative results in studies aiming to isolate its underlying biological mechanisms. Cellular atrophy may be a more precise marker of muscle atrophy because it directly reflects an abnormal process in the contractile compartment of the whole organ, in contrast to muscle strength, which depends on several factors. It is therefore widely used as a marker of catabolic/anabolic imbalance. Disuse (14, 22), denervation (57) and cachexia (56, 71) models have demonstrated the direct and early effect on fiber CSA.

In addition, there are currently no technical limitations in assessing fiber CSA. A minimally-invasive method has been validated (33), and a rapid automated image analysis system has shown promising accuracy (59). Conversely, body imaging techniques, like computed tomography (6) are limited by cost, accessibility and concerns about radiation exposure (13). Therefore, the definition of the normal range for muscle fiber CSA will advance the research on muscle atrophy by offering the possibility of selection or stratification of subjects and patients according to the occurrence of cellular atrophy. Last, the definition of subjects/patients with cellular atrophy would constitute a “gold standard” for validating non-invasive diagnostic tools of muscle mass assessment.

In conclusion, our study is the first to provide the lower limits of normal for fiber CSA according to the fiber type. According to fiber type and gender, the LLNs for men and women were (%type I*60)-718 μm^2 and (%type I*70)-1485 μm^2 , respectively. There was no significant heterogeneity among subgroups. In addition, the LLN for type I fiber proportion was 32.9%. These reference values will help to better define muscle atrophy in research studies. Ongoing work with inclusions of new studies of well-characterized populations of healthy subjects will further optimize these reference values by reducing the present variability in fiber CSA and proportions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge L. Barbé from the library of the University of Montpellier I for her contribution to the retrieval of the full-text articles and all the team of “La Solane” and “La Vallonie” Pulmonary Rehabilitation Centers for their contribution to this work. C. Stott is also acknowledged for his critical reading of the manuscript.

GRANTS

This study was supported by joint grants from the CHRU Montpellier and the patient association, APARD. Fares Gouzi and Jonathan Maury were supported by a "CIFRE grant" (*Conventions Industrielles de Formation par la Recherche*) from the Fontalvie Corporation, Toulouges, France, and the French "Ministère délégué à la recherche et aux nouvelles technologies."

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

REFERENCES

1. **Abdellaoui A, Prefaut C, Gouzi F, Couillard A, Coisy-Quivy M, Hugon G, Molinari N, Lafontaine T, Jonquet O, Laoudj-Chenivesse D, and Hayot M.** Skeletal muscle effects of electrostimulation after COPD exacerbation: a pilot study. *Eur Respir J* 38: 781-788, 2011.
2. **Agusti A, Morla M, Sauleda J, Saus C, and Busquets X.** NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax* 59: 483-487, 2004.
4. **Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, Gea J, and Barbera JA.** Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 477-488, 2010.
5. **Bergström J.** Muscle electrolytes in man. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 68: 1962.
6. **Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, and Maltais F.** Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 629-634, 1998.
7. **Blomstrand E, Celsing F, Friden J, and Ekblom B.** How to calculate human muscle fibre areas in biopsy samples--methodological considerations. *Acta Physiol Scand* 122: 545-551, 1984.
8. **Carville SF, Rutherford OM, and Newham DJ.** Power output, isometric strength and steadiness in the leg muscles of pre- and postmenopausal women; the effects of hormone replacement therapy. *Eur J Appl Physiol* 96: 292-298, 2006.
9. **Cheah JS, Tock EP, and Kan SP.** The light and electron microscopic changes in the skeletal muscles during paralysis in thyrotoxic periodic paralysis. *Am J Med Sci* 269: 365-374, 1975.
10. **Coetzer P, Noakes TD, Sanders B, Lambert MI, Bosch AN, Wiggins T, and Dennis SC.** Superior fatigue resistance of elite black South African distance runners. *J Appl Physiol* 75: 1822-1827, 1993.
11. **Cress ME, Thomas DP, Johnson J, Kasch FW, Cassens RG, Smith EL, and Agre JC.** Effect of training on VO₂max, thigh strength, and muscle morphology in septuagenarian women. *Med Sci Sports Exerc* 23: 752-758, 1991.
12. **Cristea A, Korhonen MT, Hakkinen K, Mero A, Alen M, Sipila S, Viitasalo JT, Koljonen MJ, Suominen H, and Larsson L.** Effects of combined strength and sprint training on regulation of muscle contraction at the whole-muscle and single-fibre levels in elite master sprinters. *Acta Physiol (Oxf)* 193: 275-289, 2008.
13. **Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M, and Zamboni M.** Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39: 412-423, 2010.
14. **Derde S, Hermans G, Derese I, Guiza F, Hedstrom Y, Wouters PJ, Bruyninckx F, D'Hoore A, Larsson L, Van den Berghe G, and Vanhorebeek I.** Muscle atrophy and preferential loss of myosin in prolonged critically ill patients. *Crit Care Med* 40: 79-89, 2012.
15. **Devereaux PJ, Choi PT, El-Dika S, Bhandari M, Montori VM, Schunemann HJ, Garg AX, Busse JW, Heels-Ansdell D, Ghali WA, Manns BJ, and Guyatt GH.** An observational study found that authors of randomized controlled trials frequently use concealment of randomization and blinding, despite the failure to report these methods. *J Clin Epidemiol* 57: 1232-1236, 2004.

16. **Dietrichson P, Coakley J, Smith PE, Griffiths RD, Helliwell TR, and Edwards RH.** Conchotome and needle percutaneous biopsy of skeletal muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 1461-1467, 1987.
17. **Dunn AL, Marcus BH, Kampert JB, Garcia ME, Kohl HW, 3rd, and Blair SN.** Comparison of lifestyle and structured interventions to increase physical activity and cardiorespiratory fitness: a randomized trial. *Jama* 281: 327-334, 1999.
18. **Esmarck B, Andersen JL, Olsen S, Richter EA, Mizuno M, and Kjaer M.** Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *J Physiol* 535: 301-311, 2001.
19. **Essen-Gustavsson B, and Borges O.** Histochemical and metabolic characteristics of human skeletal muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand* 126: 107-114, 1986.
20. **Evans WJ, Phinney SD, and Young VR.** Suction applied to a muscle biopsy maximizes sample size. *Med Sci Sports Exerc* 14: 101-102, 1982.
21. **Ferketich AK, Kirby TE, and Alway SE.** Cardiovascular and muscular adaptations to combined endurance and strength training in elderly women. *Acta Physiol Scand* 164: 259-267, 1998.
22. **Fitts RH, Riley DR, and Widrick JJ.** Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89: 823-839, 2000.
23. **Flueck M, Eyeang-Bekale N, Heraud A, Girard A, Gimpl M, Seynnes OR, Rittweger J, Niebauer J, Mueller E, and Narici M.** Load-sensitive adhesion factor expression in the elderly with skiing: relation to fiber type and muscle strength. *Scand J Med Sci Sports* 21 Suppl 1: 29-38, 2011.
24. **Frontera WR, Reid KF, Phillips EM, Krivickas LS, Hughes VA, Roubenoff R, and Fielding RA.** Muscle fiber size and function in elderly humans: a longitudinal study. *J Appl Physiol* 105: 637-642, 2008.
25. **Gosker HR, Wouters EF, van der Vusse GJ, and Schols AM.** Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *Am J Clin Nutr* 71: 1033-1047, 2000.
26. **Gosker HR, Zeegers MP, Wouters EF, and Schols AM.** Muscle fibre type shifting in the vastus lateralis of patients with COPD is associated with disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 62: 944-949, 2007.
27. **Gouzi F, Prefaut C, Abdellaoui A, Roudier E, de Rigal P, Molinari N, Laoudj-Chenivesse D, Mercier J, Birot O, and Hayot M.** Blunted muscle angiogenic training-response in copd patients versus sedentary controls. *Eur Respir J* 2012.
28. **Green HJ, Burnett ME, D'Arsigny C, Iqbal S, Ouyang J, Webb KA, and O'Donnell DE.** Muscle fiber type characteristics in females with chronic obstructive pulmonary disease. A preliminary study. *J Mol Histol* 40: 41-51, 2009.
29. **Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, and Baldwin KM.** Atrophy responses to muscle inactivity. I. Cellular markers of protein deficits. *J Appl Physiol* 95: 781-790, 2003.
30. **Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, and Baldwin KM.** Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *J Appl Physiol* 95: 791-802, 2003.
31. **Hakkinen K, Newton RU, Gordon SE, McCormick M, Volek JS, Nindl BC, Gotshalk LA, Campbell WW, Evans WJ, Hakkinen A, Humphries BJ, and Kraemer WJ.** Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53: B415-423, 1998.
32. **Havenith MG, Visser R, Schrijvers-van Schendel JM, and Bosman FT.** Muscle fiber typing in routinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies. *Histochemistry* 93: 497-499, 1990.

33. **Hayot M, Michaud A, Koechlin C, Caron MA, Leblanc P, Prefaut C, and Maltais F.** Skeletal muscle micro biopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur Respir J* 25: 431-440, 2005.
34. **Hepple RT, Mackinnon SL, Thomas SG, Goodman JM, and Plyley MJ.** Quantitating the capillary supply and the response to resistance training in older men. *Pflugers Arch* 433: 238-244, 1997.
35. **Hickey MS, Carey JO, Azevedo JL, Houmard JA, Pories WJ, Israel RG, and Dohm GL.** Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol* 268: E453-457, 1995.
36. **Higgins J, Green S, and (editors).** *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. Version 5.1.0 [updated March 2011]*
The Cochrane Collaboration, 2011
37. **Hill CL, LaValley MP, and Felson DT.** Discrepancy between published report and actual conduct of randomized clinical trials. *J Clin Epidemiol* 55: 783-786, 2002.
38. **Hvid L, Aagaard P, Justesen L, Bayer ML, Andersen JL, Ortenblad N, Kjaer M, and Suetta C.** Effects of aging on muscle mechanical function and muscle fiber morphology during short-term immobilization and subsequent retraining. *J Appl Physiol* 109: 1628-1634, 2010.
39. **Joseph AM, Adhihetty PJ, Buford TW, Wohlgemuth SE, Lees HA, Nguyen LM, Aranda JM, Sandesara BD, Pahor M, Manini TM, Marzetti E, and Leeuwenburgh C.** The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. *Aging Cell* 11: 801-809, 2012.
40. **Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plataras J, Roberts LJ, 2nd, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, and Barrett JC.** Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med* 38: 698-710, 2005.
41. **Kohn TA, Essen-Gustavsson B, and Myburgh KH.** Do skeletal muscle phenotypic characteristics of Xhosa and Caucasian endurance runners differ when matched for training and racing distances? *J Appl Physiol* 103: 932-940, 2007.
42. **Krotkiewski M, and Bjorntorp P.** Muscle tissue in obesity with different distribution of adipose tissue. Effects of physical training. *Int J Obes* 10: 331-341, 1986.
43. **Kumar PR, and Kumar NV.** Effect of cigarette smoking on muscle strength of flexibility of athletes. *Indian J Exp Biol* 36: 1144-1146, 1998.
44. **Larsson H, Dugaard JR, Kiens B, Richter EA, and Ahren B.** Muscle fiber characteristics in postmenopausal women with normal or impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 22: 1330-1338, 1999.
45. **Lortie G, Simoneau JA, Hamel P, Boulay MR, and Bouchard C.** Relationships between skeletal muscle characteristics and aerobic performance in sedentary and active subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 54: 471-475, 1985.
46. **Martel GF, Roth SM, Ivey FM, Lemmer JT, Tracy BL, Hurlbut DE, Metter EJ, Hurley BF, and Rogers MA.** Age and sex affect human muscle fibre adaptations to heavy-resistance strength training. *Exp Physiol* 91: 457-464, 2006.
47. **Martin L, and Gendron A.** *Méthodes statistiques appliquées à la psychologie: Traitement de données avec Excel*. Trois-Rivières: 2004, p. 904.
48. **Middlekauff HR.** Making the case for skeletal myopathy as the major limitation of exercise capacity in heart failure. *Circ Heart Fail* 3: 537-546, 2010.

49. **Mohaupt MG, Karas RH, Babiychuk EB, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Iyer L, Hoppeler H, Breil F, and Draeger A.** Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. *Cmaj* 181: E11-18, 2009.
50. **Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, and Altman DG.** Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 6: e1000097, 2009.
51. **Montes de Oca M, Loeb E, Torres SH, De Sanctis J, Hernandez N, and Talamo C.** Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest* 133: 13-18, 2008.
52. **Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schon MR, Bluher M, and Punkt K.** Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29: 895-900, 2006.
53. **Orlander J, Kiessling KH, and Larsson L.** Skeletal muscle metabolism, morphology and function in sedentary smokers and nonsmokers. *Acta Physiol Scand* 107: 39-46, 1979.
54. **Proctor DN, Sinning WE, Walro JM, Sieck GC, and Lemon PW.** Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol* 78: 2033-2038, 1995.
55. **Reardon K, Galea M, Dennett X, Choong P, and Byrne E.** Quadriceps muscle wasting persists 5 months after total hip arthroplasty for osteoarthritis of the hip: a pilot study. *Intern Med J* 31: 7-14, 2001.
56. **Reed SA, Sandesara PB, Senf SM, and Judge AR.** Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *Faseb J* 26: 987-1000, 2012.
57. **Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, Solbak NM, Turnbull DM, and Hepple RT.** Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. *PLoS One* 7: e29082, 2012.
58. **Scelsi R, Marchetti C, and Poggi P.** Histochemical and ultrastructural aspects of m. vastus lateralis in sedentary old people (age 65--89 years). *Acta Neuropathol* 51: 99-105, 1980.
59. **Sertel O, Dogdas B, Chiu CS, and Gurcan MN.** Microscopic image analysis for quantitative characterization of muscle fiber type composition. *Comput Med Imaging Graph* 35: 616-628, 2011.
60. **Siednienko J, Jankowska EA, Banasiak W, Gorczyca WA, and Ponikowski P.** Nuclear factor-kappaB activity in peripheral blood mononuclear cells in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 122: 111-116, 2007.
61. **Simoneau JA, and Bouchard C.** Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *Faseb J* 9: 1091-1095, 1995.
62. **Simoneau JA, and Bouchard C.** Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *Am J Physiol* 257: E567-572, 1989.
63. **Sinha-Hikim I, Cornford M, Gaytan H, Lee ML, and Bhasin S.** Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3024-3033, 2006.
64. **Soares HP, Daniels S, Kumar A, Clarke M, Scott C, Swann S, and Djulbegovic B.** Bad reporting does not mean bad methods for randomised trials: observational study of randomised controlled trials performed by the Radiation Therapy Oncology Group. *Bmj* 328: 22-24, 2004.
65. **Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PR, Swanson MS, and Houmard JA.** Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1191-1196, 2002.
66. **Toft I, Lindal S, Bonna KH, and Jenssen T.** Quantitative measurement of muscle fiber composition in a normal population. *Muscle Nerve* 28: 101-108, 2003.

67. **Torres SH, Montes de Oca M, Loeb E, Mata A, and Hernandez N.** Gender and skeletal muscle characteristics in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 105: 88-94, 2011.
68. **Verdijk LB, Snijders T, Beelen M, Savelberg HH, Meijer K, Kuipers H, and Van Loon LJ.** Characteristics of muscle fiber type are predictive of skeletal muscle mass and strength in elderly men. *J Am Geriatr Soc* 58: 2069-2075, 2010.
69. **Vogiatzis I, Terzis G, Stratakos G, Cherouveim E, Athanasopoulos D, Spetsioti S, Nasis I, Manta P, Roussos C, and Zakynthinos S.** Effect of pulmonary rehabilitation on peripheral muscle fiber remodeling in patients with COPD in GOLD stages II to IV. *Chest* 140: 744-752, 2011.
70. **Wade AJ, Marbut MM, and Round JM.** Muscle fibre type and aetiology of obesity. *Lancet* 335: 805-808, 1990.
71. **Weber MA, Kinscherf R, Krakowski-Roosen H, Aulmann M, Renk H, Kunkele A, Edler L, Kauczor HU, and Hildebrandt W.** Myoglobin plasma level related to muscle mass and fiber composition: a clinical marker of muscle wasting? *J Mol Med (Berl)* 85: 887-896, 2007.
72. **Weston AR, Karamizrak O, Smith A, Noakes TD, and Myburgh KH.** African runners exhibit greater fatigue resistance, lower lactate accumulation, and higher oxidative enzyme activity. *J Appl Physiol* 86: 915-923, 1999.
73. **Whitman SA, Wacker MJ, Richmond SR, and Godard MP.** Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch* 450: 437-446, 2005.
74. **Widrick JJ, Maddalozzo GF, Lewis D, Valentine BA, Garner DP, Stelzer JE, Shoepe TC, and Snow CM.** Morphological and functional characteristics of skeletal muscle fibers from hormone-replaced and nonreplaced postmenopausal women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58: 3-10, 2003.
- 74a. **Global status report on non communicable disease 2010** Geneva: World Health Organization. Dept. of Chronic Diseases and Health Promotion, 2011.
75. **Wust RC, Morse CI, de Haan A, Rittweger J, Jones DA, and Degens H.** Skeletal muscle properties and fatigue resistance in relation to smoking history. *Eur J Appl Physiol* 104: 103-110, 2008.

Supplementary data

Table S1. Quality assessment of the included studies

Study	Primary secondary outcome	Statement for medical examination	Statement for management of pathologies of treatments	Statement for management of pathologies of treatments	Ethnic origin	Statement on smoking status	Assessment of exercise capacity	Descripti on of PA level	Tool (B/C/ O)	Defined sampling site	Detailed procedure for sections	Sarcolemmal staining	Picture	Modality of CSA measurement	Normality tested	Number of fibers	Two biopsies or repeatability	Method of analysis
	(2/1/0)	(1/0)	(2/1/0)	(2/1/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(4/3/2/1/ 0)	(B/C/ O)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(2/1/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)
Essen-Gustavsson B et al. 1986 [19]	0	1	0	1	0	0	0	1	B	1	0	0	0	1	0	1	1	0
Cress ME et al. 1991 [15]	1	0	0	0	0	0	1	4	B	0		0				0	0	0
Hepple RT et al. 1997 [18]	1	0	0	1	0	1	1	0	B	1	1	0	0	2	0	1	0	0
Ferketich AK et al. 1998 [41]	2	1	0	0	0	0	1	0	B	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Hakkinen K et al. 1998 [42]	0	1	1	1	0	0	0	2	B	1	0	0	0	1	0	0	1	0
Esmarck B et al. 2001 [43]	0	0	0	0	0	0	0	0	B	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Widrick JJ et al. 2003 [44]	0	1	0	0	0	0	0	2	B	0	1	0	1	1	0	1	0	0
Toft I et al. 2003 [45]	2	1	1	1	0	1	0	2	B	0	0	0	1	1	1	1	0	0
Whitman SA et al. 2005 [46]	1	0	1	1	0	1	0	2	B	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Sinha-Hikim I et al. 2006 [17]	1	0	1	1	0	0	0	0	B	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Martel GF et al. 2006 [47]	2	1	2	1	0	1	1	0	B	1	1	0	0	1	0	1	1	0
Cristea A et al. 2008 [48]	0	1	1	1	0	0	1	1	B	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Green HJ et al. 2009 [49]	2	1	2	1	0	0	0	0	B	0	1	0	1	2	0	1	0	0
Verdijk LB et al. 2010 [16]	2	1	0	1	0	0	0	0	B	1	1	1	0	2	1	1	0	1
Hvid L et al. 2010 [50]	1	1	1	1	0	0	0	2	B	1	1	0	0	1	1	1	0	0
Vogiatzis I et al. 2011 [51]	2	0	0	0	0	0	1	0	B	1	1	0	0	1	1	1	0	0
Torres SH et al. 2011 [10]	2	0	0	0	0	0	0	0	B	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Flueck M et al. 2011 [28]	2	0	0	0	0	1	0	0	C	0	1	0	1	1	0	0	0	1
Gouzi F et al. 2012 [52]	1	0	0	1	0	1	1	4	B	0	0	1	1	2	1	0	0	1

APPENDIX

Appendix 1. Data extraction form

General data

Name of the first author:

Year of publication:

Journal:

Study design:

Date at inclusion:

Location (city, region, country):

Ethnic origin:

Number of subjects: Total:

Per group:

Gender (M/F):

Age (49):

Total:

Per group:

BMI (kg/m²):

Total:

Per group:

Treatment:

Co-morbidities:

Physical activity level (free text):

Total:

Per group:

peakVO2 (%pred.): Total:

Per group:

Fiber size:

All fiber CSA (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total:

Per group:

Total:

Per gender:

CSA type I (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total:

Per group:

Total:

Per gender:

CSA type II (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total:

Per group:

Total:

Per gender:

CSA type I/IIa (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total:

Per group:

Total:

Per gender:

CSA type IIa (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total:

Per group:

Total:

Per gender:

CSA type IIa/IIx (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total:

Per group:

Total:

Per gender:

CSA type IIx or IIb (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total:

Per group:

Total:

Per gender:

CSA type IIc (mean +/- SD or (SE) or [IC95%] in μm^2):

Total: Per group:

Total: Per gender:

Fiber proportions (%):

I/II:

Total: Per group:

Total: Per gender:

I/IIa/IIx/IIc:

Total: Per group:

Total: Per gender:

I - I/IIa - IIa - IIa/IIx - IIx - IIc:

Total: Per group:

Total: Per gender:

Method: Histochemistry (HC) or Immunohistochemistry (IHC):

Number of fibers/biopsy analyzed:

Appendix 2. Quality assessment questionnaire

Author:

Year:

1. Aim of the study (1 item)

Is the fiber CSA (or histomorphometry) defined as a:

primary outcome (40) ☐ secondary outcome (1) ☐ undetermined (ex: "hypertrophy") (0) ☐

2. Description of the population of the study (7 items)

a. Is there a statement of a detailed medical examination?

yes (1) ☐ no (0) ☐

b. Is there a statement on how the potential medical treatments are managed in subjects?

no (0) ☐ non-inclusion criteria (1) ☐ authorized if no muscle impact (2) ☐

c. Is there a statement on how the potential pathologies are managed in subjects?

no (0) ☐ non-inclusion criteria (1) ☐ authorized if no muscle impact (2) ☐

d. Is there a statement on the smoking status/habits of the subjects?

yes (1) ☐ no (0) ☐

e. Is there an assessment of the global exercise capacity of the subjects?

yes (1) ☐ no (0) ☐

f. How is the physical activity (PA) level assessed (Shephard *et al.* 2003):

- Simple question: is there regular PA practice?
(e.g., “no regular PA over the last ...yrs”) (0) ☐
- Open non-standardized question: what and how much PA?
(e.g., “practice of ... min of moderate PA / week”) (1) ☐
- Standardized PA questionnaire (40) (2) ☐
- Actimetry (17) (3) ☐
- Combination of 2 methods among: simple question /PA questionnaire/actimetry (4) ☐

3. Biopsy procedure (2 items)

- a. Device:
Bregström needle (B) ☐ Conchotome (C) ☐ Open biopsy (O) ☐
- b. Is the sampling site in the *vastus lateralis* precisely described (depth + distance from anatomic points, Lexell *et al.* 1989)?
yes (1) ☐ no (0) ☐

4. Method (8 items)

- a. How is the procedure for preparing the transverse sections described?
“Care” or “oriented” = manually (0) ☐
Use of a device (microscope) for orienting the biopsy (1) ☐
- b. Is there sarcolemmal staining?
yes (1) ☐ no (0) ☐
- c. Is there a picture of a muscle transverse section?
yes (1) ☐ no (0) ☐
- d. What are the modalities for measuring the CSA of the stained fibers?
Not reported (0) ☐
No sarcolemmal staining followed by numerization/analysis of picture (1) ☐
Sarcolemmal staining or handmade contour + numerization/analysis of pictures (2) ☐
- e. Is the normality of the statistical distribution of the fiber CSA tested?
yes (1) ☐ no (0) ☐
- f. How many fibers are analyzed (all-type) (Lexell *et al.* 1991):
> 100 (0) ☐ >200 (1) ☐
- g. Are two biopsies performed or was the repeatability assessed?
yes (1) ☐ no (0) ☐
- h. Which method of analysis is used for the muscle fiber type (Serrano *et al.* 2001)?
Immunohistochemistry (1) ☐ myosin ATPase (40) ☐

5. Risk of bias

Etude 3 : « Supplémentation en antioxydants chez les patients BPCO: une solution pertinente pour optimiser les effets de la réhabilitation respiratoire sur l'atteinte musculaire périphérique »

Pour ce travail, des évaluations complémentaires sont actuellement en cours afin d'étudier les relations entre les marqueurs du stress oxydant et l'expression des voies de signalisations de l'équilibre synthèse/dégradation des protéines au niveau musculaire. Les textes, figures et tableaux présentés ci-dessous sont donc susceptibles d'être modifiés lors de la soumission à une revue indexée ISI.

**Antioxidant supplementation in COPD patients: a relevant solution to optimize
pulmonary rehabilitation effects**

Jonathan Maury^{1, 3}, Fares Gouzi^{1, 4}, Nelly Heraud³, Philippe De Rigal³, Nicolas Molinari^{1, 4},
Joël Pincemail⁵, Dalila Laoudj-Chenivresse^{1, 4}, François Bughin^{1, 4}, Jacques Mercier^{1, 4},
Christian Préfaut², Pascal Pomiès¹, Maurice Hayot^{1, 4}

¹PhyMedExp, university of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR9214, 34295
Montpellier Cedex 5, France

²University of Montpellier, France

³Clinique du Souffle "La Solane", Fontalvie Group, 66340 Osséja, France

⁴CHRU Montpellier, Department of Clinical Physiology, 34295 Montpellier, France

⁵Department of Cardiovascular Surgery and CREDEC, University of Liège, CHU Sart
Tilman, 4000 Liège, Belgium

Fares Gouzi and Nelly Heraud contributed equally to this study.

Corresponding author:

Jonathan Maury

¹PhyMedExp, university of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR9214, F_34295
Montpellier Cedex 5, France

Phone: +33 467 335 908 / Fax: +33 467 335 923

e-mail: maury.jonathan6@gmail.com

Running head : Oxidative stress and pulmonary rehabilitation in COPD

Subject category of the manuscript: “Lung disease”: 9.11. COPD: Non pharmacological
treatment

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

Currently, exercise training as part of pulmonary rehabilitation (PR), is considered as a core therapeutic to improve muscle impairment in COPD patient. However, exercise training may worsen oxidative stress profile without inducing antioxidant capacity adaptations. Thus, antioxidant supplementation appeared to be a suitable solution to optimize PR effects, but the data available in literature not allow checking this hypothesis in COPD patients.

What This Study Adds to the Field

This randomized double-blind-placebo-controlled study shows that antioxidant supplementation (vitamin C, E, zinc and selenium), at nutritional doses, significantly improve the effects induced by four weeks of PR program (20 exercise training sessions) on quadriceps maximal voluntary contraction (QMVC) and symptom-limited oxygen consumption (Vo_{2sl}) in stable COPD patients. These benefits, in particular on QMVC, could be partly explained by the positive adaptation of muscle fiber cross sectional area (CSA) through antioxidant supplementation. Further analyses are needed in order to evaluate the effects of increased antioxidant capacity on signaling pathway involved in QMVC and Vo_{2sl} improvement.

“This article has an online data supplement, which is accessible from the issue’s table of content online of the journal.

Clinical trial registered from www.clinicaltrials.gov (NCT01942889)

KEY-WORDS: COPD; oxidative stress; antioxidant supplementation; exercise training; pulmonary rehabilitation program

ABSTRACT (250 words)

Rationale: In chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, oxidative stress (OS) constitutes one of the possible factors limiting the effects of exercise training on muscle impairment. Currently, antioxidant supplementation used in literature, appeared to be inappropriate to cope with COPD-related antioxidant deficits.

Objectives: We therefore investigated whether exercise training during pulmonary rehabilitation (PR), combined with non-pharmacological antioxidant supplementation targeted to specific deficits (vitamins C and E, zinc, selenium), would have beneficial effects on muscle impairment and exercise capacity.

Methods: A total of 64 stable COPD patients referred for a 4-week PR program (20 exercise training sessions), aged 40-80 years, were recruited in a double-blind randomized, placebo-controlled clinical trial. Primary outcome was change in quadriceps endurance limit time (Qend). The secondary outcomes included quadriceps maximal voluntary contraction (QMVC), exercise capacity parameters as maximal oxygen uptake ($\text{Vo}_{2\text{sl}}$), systemic OS markers and histomorphological muscle parameters.

Measurements and Main Results: Although Qend was significantly increased in both COPD patients groups, QMVC and $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ were improved by an average of 9 and 16% respectively exclusively in “PR antioxidant” group ($p=0.01$ and $p<0.05$). The “PR antioxidant” group showed a significant increase of vitamin E and selenium compared to “PR placebo” group ($p=0.05$ and $p<0.001$ respectively) without differences in vitamin C and lipid peroxidation. Regarding all muscle fiber CSA, the mean was significantly increased in “PR antioxidant” group compared to “PR placebo” group (+17% vs -6% respectively, $p<0.05$).

Conclusion: The results showed that antioxidant supplementation in vitamin C, E, zinc and selenium, at nutritional doses, improves for the first time the PR effects on QMVC, $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ and muscle fiber CSA by enhancing antioxidant capacity of COPD patients.

INTRODUCTION

Improving the management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a major cause of mortality in the world, constitutes an intricate challenge for contemporary clinical research [1]. Besides progressive airflow limitation, COPD is also typified by extrapulmonary effects – such as peripheral muscle impairment – which negatively impact exercise capacity and contribute to disease severity [1-3]. Several studies have demonstrated that muscle impairment and exercise capacity can be dealt with appropriate exercise training, as part of pulmonary rehabilitation (PR) [4-7].

Among the mechanisms implicated in peripheral muscle impairment, oxidative stress (OS) is currently considered as a key factor [8]. In fact, it was shown that short term N-Acetylcysteine supplementation, used as reduced glutathione (GSH) precursor, but also four weeks of vitamin C and E supplementation may improve muscle function and exercise capacity respectively [8, 9]. Interestingly, some authors reported that oxidative cell damages, in particular lipid peroxidation, were elevated at baseline [8, 10] and can be worsened after exercise training in stable COPD patients [11], while no changes or even a decrease in antioxidant capacity were reported either in blood or muscle level unlike in healthy subjects [12, 13]. Moreover, oxidative stress may negatively regulate different signaling pathways such as the synthesis/degradation protein balance [14, 15], which could explained the limited effects of exercise training on specific histomorphological muscle parameters [6]. Based on these findings, improving OS profile of stable COPD patients by antioxidant supplementation could be a suitable solution to optimize the benefits of exercise training on muscle impairment and exercise capacity.

Only one study has investigated the effects of combining exercise training and pressurized whey, used as GSH precursor, on muscle function and exercise capacity in stable COPD patients [13]. The authors reported no additional effects of antioxidant supplementation on muscle function and systemic OS markers compared to single exercise training program [13]. Given the complexity of antioxidant system, we could hypothesize that targeting only one antioxidant was not appropriate to cope with COPD-related antioxidant deficits. In this context, we recently showed that the main antioxidant deficits were related to vitamin C, vitamin C/E ratio, zinc and selenium in agreement with previous studies in stable COPD patients [10, 16, 17]. However, it is important to note that these antioxidant deficits were not major compared to healthy subjects [10]. Thus, these data suggest higher benefits of PR on

muscle impairment and exercise capacity by enhancing OS profile of stable COPD patients, through antioxidant supplementation based on an association of vitamin C, E, zinc and selenium at non-pharmacological doses. The present study precisely aimed at testing this hypothesis in a randomized double-blind-placebo-controlled trial.

MATERIALS AND METHODS

Detailed information about the methods is available in Supplementary data.

Study patients

For this study, we recruited stable COPD patients (40 to 80 years old) referred for 4-week of PR at “La Solane” center (Clinique du Souffle, Fontalvie Group, F-66340 Osséja, France). The main exclusion criteria were: presence of exacerbations within the last month; unstabilized disease incompatible with a respiratory rehabilitation program; antioxidant supplementation (vitamins, trace elements, etc.) or use of drugs such as allopurinol and N-acetylcysteine within the last month; use of oral corticosteroid over the last six months. All patients received a detailed information letter about the study before providing their written informed consent. This study was approved by the ethics committee Montpellier Sud-Méditerranée IV (n°2011-A00842-39).

Randomization and study design

COPD patients were randomly allocated (1:1 ratio) with permuted blocks of 4 patients in order to integrate “PR placebo” or “PR antioxidant” group. Randomization was centralized by computer software at the medical information department, Montpellier University Hospital (Dr N. Molinari, France). Thus, all personnel of “La Solane” center involved in the study and COPD patients were blind to the nature of supplementation until trial completion.

All the COPD patients performed an exercise training conducted as part of a multi-component PR, as recommended in COPD [4]. In parallel, COPD patients received either the placebo or the antioxidant supplementation, orally administered, constituted of vitamins and trace elements at nutritional doses: Vitamin C (180mg/day); Vitamin E (30mg/day); Zinc gluconate (15mg/day); selenium as selenomethionine (50µg/day).

Outcomes

The primary outcome was changes in quadriceps endurance time (Qend, in seconds) assessed before and after interventions. Among all secondary outcomes, we mainly evaluate changes in

1) muscle function: quadriceps maximal voluntary isometric contraction (QMVC); 2) exercise capacity parameters: maximal power outputs (W_{sl}), symptom-limited oxygen consumption (VO_{2sl}), the first ventilator or dyspnea threshold (VT or DT respectively) and the 6-minute walking distance (6-MWD); 3) body composition as fat mass (FM), fat-free mass (FFM), total body water and muscle mass; 4) nutritional consumption assessed by dietary records.

We also evaluated changes in the systemic antioxidant status and oxidative cell damage markers. We measured in blood samples the levels of: vitamin C, E (α - and γ -tocopherol) and A; trace elements (copper, zinc and selenium); reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG); glutathione peroxidase (GPx); superoxide dismutase (SOD); lipid peroxides (ROOH) and oxidized low density lipoprotein (LDLox).

Muscle biopsies were performed in the vastus lateralis of the quadriceps before and after interventions and were analysed blindly for muscle fiber cross sectional area (CSA), muscle fiber type I proportion and capillary to fiber ratio as previously described [6].

Sample size and statistical analysis

Sample size was calculated based on the change of quadriceps endurance time (Q_{end} in seconds). With a one-sided alpha risk of 5% and a power of 80%, the number of COPD patients required per group was estimated at 29. As we considered a dropout rate of 10%, we included 32 stable COPD patients per group.

Quantitative data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) while qualitative data were described using proportions. To compare all the parameters evaluated between “placebo group” and the “control group” at baseline, we used a student t test (or a Mann-Whitney) for quantitative data or Pearson's chi-squared test for qualitative data. To examine within-group changes and the effect of interventions between the two groups of COPD patients, two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) was performed. Eta-square (η^2) for effect sizes were used for interpretation, where effect size <0.01 , 0.06 and 0.14 are considered as small, medium and large, respectively. To complete the analysis, we determined the percentage of change in each parameter, and we performed multivariate analysis (ANCOVA) in order to test the group and baseline value effects separately. For all analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed on intention-to-treat basis using R version 2.15.2.

RESULTS

Baseline clinical characteristics of COPD patients and intervention programs

After inclusion and exclusion criteria verification, 64 COPD patients were randomly assigned to antioxidant or placebo supplementation. As shown in the flow chart (figure 1), 58 COPD patients had completed the study and were included in the analysis (“PR placebo” group, n=27; “PR antioxidant” group, n=31). There were no significant differences between the two COPD patient groups regarding age, sex ratio, disease severity and body composition (table 1). The number of COPD patients with chronic (“PR placebo” group, n=4; “PR antioxidant” group, n=3) or intermittent (“PR placebo” group, n=8; “PR antioxidant” group, n=8) hypoxemia was identical between the two COPD patients group. The supplementation program was identical between “PR placebo” and “PR antioxidant” group whether in number of consumed capsules or in the compliance (“PR placebo” group: $99\pm 1\%$ versus “PR antioxidant” group: $99\pm 1\%$, $p=0.27$; table S1). In the same way, there were no differences between the two groups in the content of exercise training program performed at the intensity of the ventilatory threshold (expressed as % $\text{Vo}_{2\text{sl}}$, “PR placebo” group: 65 ± 13 versus “PR antioxidant” group: 70 ± 19 , $p=0.27$; table S1). Dietary record analysis showed that COPD patients had imbalance of micronutrient intake at baseline (before interventions) without differences between the two groups (Figure S1 a and b). In the same way during interventions, COPD patients of “PR placebo” and “PR antioxidant” group had a similarly improvement of micronutrient intake status (Figure S1 c and d). Specifically, the percentage of COPD patients with vitamin C intake below the recommended daily intake (RDI) significantly decreased from 68 to 20% in “PR placebo” group and from 75 to 13% in “PR antioxidant” group (Figure S1)

Effects of interventions on functional parameters

Our data reported no differences at baseline between the two COPD patients groups in all functional parameters (table 1). Regarding peripheral muscle function, we showed significant increase of Qend in both COPD patient groups after interventions (“PR placebo”: 357 ± 155 s to 492 ± 213 s, $p<0.001$ and “PR antioxidant”: 345 ± 116 s to 435 ± 175 s, $p<0.001$, $\eta^2=0.02$; table S2) without group effects. The QMVC was significantly increase in “PR antioxidant” group while no change was reported in “PR placebo” group (“PR placebo”: 114 ± 50 Nm to 114 ± 51 Nm, $p=0.60$; “PR antioxidant”: 102 ± 38 Nm to 114 ± 50 Nm, $p<0.001$; table S2) with significant interaction between group and time ($p<0.01$, $\eta^2=0.29$). This interaction was confirmed by a statistical model taking into account baseline values as fixed variable in order

to explain the difference in percentage of change in QMVC between the two COPD patient groups (“PR placebo”: $0\pm 16\%$ and “PR antioxidant”: $9\pm 9\%$, $p<0.01$; figure 2c). Similarly, regarding exercise capacity parameters, we found a significant increase in Vo_{2sl} only in “antioxidant” group (“PR placebo”: $1\pm 19\%$ and “PR antioxidant”: $16\pm 30\%$, $p<0.05$, $\eta^2=0.42$; figure 3c). In both groups, improvement in 6-MWD, W_{sl} and W_{sl} at VT were observed with no group and time interaction for each parameter (table S2).

Effects of interventions on systemic OS markers

In all systemic OS markers, there were no significant differences between the two COPD patient groups at baseline (Table 2). After interventions, our results showed no change in systemic lipid peroxidation in both groups (“PR placebo”: 645 ± 280 to 696 ± 356 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.40$ and “PR antioxidant”: 636 ± 316 to 638 ± 337 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.55$, $\eta^2=0.21$; table S3). In all COPD patients, changes in systemic lipid peroxidation was significantly and positively correlated with copper/zinc ratio ($r=0.51$, $p<0.01$; figure S2a). In the two groups, no correlations were found between change in systemic lipid peroxidation and change in all functional parameters. Regarding systemic antioxidant levels, we showed a significant increase in vitamin C, vitamin C/E ratio and GPx with no interactions between group and time (table S3). After intervention programs, we found between-group differences in systemic level of vitamin E, selenium and GSH/GSSG ratio using ANCOVA model (Table 3). Systemic vitamin E and selenium levels were significantly increased only in “PR antioxidant” group ($p=0.05$ and $p<0.001$ respectively; table 3). GSH/GSSG ratio was significantly increased in “PR placebo” group while it remained unchanged in “PR antioxidant” group ($175\pm 299\%$ and $10\pm 113\%$ respectively, $p<0.001$, $\eta^2=0.70$; table 3). A significant correlation was found between change in systemic GSH/GSSG ratio and change in lipid peroxidation only in “PR antioxidant” group ($r=-0.56$, $p<0.01$; figure S2b).

Effects of interventions on muscle fiber histomorphology

In a representative part of COPD patients included in this study (16 patients in both groups), muscle biopsy analyses showed no differences between the “PR placebo” and the “PR antioxidant group” regarding the type I muscle fiber proportion, the capillary to fiber ratio and the muscle fiber CSA at baseline (Table 1). After interventions, our results showed no significant changes in type I muscle fiber proportion (“PR placebo”: 42 ± 11 to $41\pm 10\%$, $p=0.65$ and “PR antioxidant”: 36 ± 14 to $32\pm 16\%$, $p=0.41$; table S4) and capillary to fiber ratio in both groups (“PR placebo”: 1.81 ± 0.52 to 2.00 ± 0.65 , $p=0.14$ and “PR antioxidant”:

1.68±0.43 to 1.79±0.37, $p=0.44$; table S4). Regarding all fiber CSA parameter, the mean tended to decrease in the “PR placebo” group after intervention (5064±1586 to 4582±1306, $p=0.15$; Table S4) while this tendency was reversed in the “PR antioxidant” group (4639±1628 to 5284±2184, $p=0.10$; Table S4) with a significant interaction between group and time ($p=0.03$, $\eta^2=0.92$; table S4). When type I and non-type I muscle fiber CSA were evaluated separately, the same differences were founded between the two groups of COPD patients (Table S4). As illustrated in Figure 4, using the ANCOVA model, the percentage of change were significantly more elevated in “PR antioxidant” than in “PR placebo” group on type I (+15% vs -8% respectively, $p<0.05$), non-type I (+24% vs -2% respectively, $p<0.05$) and all CSA muscle fiber CSA (+17% vs -6% respectively, $p<0.05$).

DISCUSSION

This randomized double-blind, placebo-controlled trial study showed that PR program increases Qend but this improvement was not optimized by antioxidant supplementation (vitamin C, E, zinc and selenium) at nutritional doses. However, we reported for the first time that antioxidant supplementation induced additional benefits on PR effects by significantly improving the QMVC, Vo_{2sl} and muscle fiber CSA. We also observed an increase in systemic vitamin E and selenium combined with no change in GSH/GSSG in “PR antioxidant” group. These data suggest an enhancement of antioxidant capacity although no decrease was observed in systemic lipid peroxidation in both groups.

In order to appreciate only the additional effects of antioxidant supplementation through PR on muscle impairment, we have checked the main etiological confounding factors. In recent reviews [7, 18], exercise training, exacerbations, hypoxemia and tobacco consumption were identified as major factors which could impact muscle function and exercise capacity by changing OS profile. As presented in “results” part, there were no differences between our two COPD patient groups in these parameters. Moreover, regarding systemic inflammation markers (TNF- α ; IL-1 α ; IL-6; protein C reactive), preliminary results showed no differences either at baseline or interventions between the two COPD patient groups (data not shown). Another major factor associated with muscle impairment is the nutritional status [19]. At baseline, as previously shown [20], we reported inadequate intake of micronutrients without differences between “PR placebo” and “PR antioxidant” groups. As the literature reported beneficial effects of nutritional intervention [19, 21], a general well-balanced diet during the four weeks of PR was proposed to all the COPD

patients included. Therefore, dietary records analysis during the PR showed an improvement of micronutrient intake, in particular on vitamin C, compared to dietary records performed before PR, without differences between the two COPD patient groups. Thus, the comparability between “PR placebo” and “PR antioxidant” groups in all of these PR parameters combined with the study design applied, allows us to ensure that the benefits found on muscle impairment and exercise capacity parameters were only associated with antioxidant supplementation effects.

In this study, taking into account the duration of PR, we focused the exercise training mainly on endurance exercise, as it recommended [4], performed at the first VT intensity (see Table S1). In this context, the two COPD patient groups significantly increased the 6-MWD, W_{sl} , W_{sl} at VT and Qend, which was consistent with previous studies [6, 22]. However, no additional effects of antioxidant supplementation were reported on these functional parameters. Although we have not shown benefits on the primary study outcome, we found additional benefits of antioxidant supplementation in QMVC and Vo_{2sl} with an adequate statistical power, as discussed below.

Regarding QMVC, the literature reported limited effects of endurance training in COPD patients [4, 23, 24], as we showed in “PR placebo” group. This result could be explained by the fact that the PR, performed by all COPD patients, included few resistance training compared to endurance training sessions. It is well admitted that the physiological adaptations induced by endurance and resistance training are distinct [25]. Nevertheless, with antioxidant supplementation, we reported that COPD patients had a mean increase of 9% in QMVC. Even if there is no significance threshold to appreciate this result in literature, it may be considered as pertinent in a clinical point of view as reflected by the important effect size reported. Indeed, the increase found in our “PR antioxidant” group was in line with the results reported in previous studies which were specifically based on progressive resistance training with longer protocol duration [26]. For example, Sillen *et al.* [27] showed that a specific resistance training during an 8-weeks of PR (twice a day, five times a week) led to a mean QMVC increase of 8% in COPD patients. Otherwise expressed and as it previously specified [2], approximately 30% of COPD patients included in our study (33% in “PR placebo” and 29% in “PR antioxidant” group) had quadriceps muscle weakness at baseline. After interventions, this percentage remained identical in “PR placebo” group while it significantly decreased to 12% in “PR antioxidant” group. Knowing that quadriceps muscle weakness is

considered as a determinant factor of vital prognosis [28], this data additionally argue the clinical relevance of QMVC improvement.

Whether in healthy subjects or COPD patients, $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ is considered as one of the most important factors determining the organism capacity to generate the energy required by muscles for endurance activities. In COPD patients, some studies failed to show an increase in $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ through exercise training performed at high or moderate intensity [6, 28, 30], as reported in “PR placebo” group of the present study. However, we showed that COPD patients of “PR antioxidant” group improved $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ with a mean of 16% in four weeks (20 endurance sessions) of PR performed at moderate intensity. Yet, while the exercise training duration appeared to be a determinant factor in $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ improvement of COPD patients [31], the mean percentage of increase reported in four weeks in “PR antioxidant” group was to the same extent than previous studies with longer exercise training. In fact, a recent study showed that 24 specific exercise training sessions on cycloergometer, reported that COPD patients had a mean increase of 17% in $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ independently of exercise intensity [32].

Our data clearly showed significant improvement of QMVC and $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ in “PR antioxidant” group suggesting increase in antioxidant capacity with antioxidant supplementation. In fact, regarding systemic antioxidant markers, we observed a significant increase in systemic vitamin E only in “PR antioxidant” group. Vitamin E may directly scavenge ROS and also promote the vitamin C and GSH activity by limiting their depletion because these antioxidants act in synergy [33]. In our study, the systemic GSH/GSSG ratio was increased after interventions in “PR placebo” group, as previously shown in healthy subjects [34]. However, in “PR antioxidant” group, the systemic GSH/GSSG ratio remained unchanged after interventions compared to baseline values. It is well admitted that in response to OS, GSH/GSSG ratio was decreased meaning an increase in GSH activity to scavenge ROS [35]. In a recent study, it was shown in patients with muscle dystrophy that systemic GSH/GSSG was decreased after 17 weeks of antioxidant supplementation [36]. Moreover, the significant correlation between change in systemic GSH/GSSG ratio and lipid peroxidation found only in “PR antioxidant” group suggest an adaptive GSH response with antioxidant supplementation in order to regulate ROS level. GSH plays a key role in GPx activity as it constitutes the main substrate [37]. We also reported a significant increase in systemic selenium only in “PR antioxidant” group, which act as GPx substrate [37]. These data

suggested an increase in GPx activity in “PR antioxidant” group although the two COPD patient groups increase similarly the mean systemic level of this enzymatic antioxidant.

However, antioxidant supplementation had no additional effect on systemic lipid peroxidation. In fact, we found that the mean systemic lipid peroxidation levels remained identical compared to baseline values in the two COPD patient groups while previous studies showed an increase in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [11], a lipid peroxidation markers, after single exercise training. In line with previous observations [19], these data suggested a beneficial role of general well-balanced diet, included in PR, without additional effects of antioxidant supplementation on systemic lipid peroxidation. Supporting this hypothesis, we also found in “PR placebo” as in “PR antioxidant” group, an increase in systemic vitamin C, vitamin/E ratio and GPx. Moreover, as we showed in the present study, it is well admitted that systemic lipid peroxidation is strongly correlated with copper/zinc ratio [10, 36]. We found no significant additional effects of antioxidant supplementation on copper/zinc ratio after interventions. Thus, zinc supplementation doses used in our study, was probably not sufficient to regulate the copper-induced lipid peroxidation [38].

Despite the obvious benefits of antioxidant supplementation, our study fails to show a direct association between systemic OS markers and functional parameters as QMVC and $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ while some argues are available in literature. In fact, based on Reid’s model [39], it is well admitted that a regulation of ROS by antioxidant system during exercise training may stimulate different signaling pathways involved in functional and muscle parameters improvement [14, 15]. Firstly, in literature, muscle mass is considered as one of the main determinant QMVC factor [7]. Our results showed that antioxidant supplementation induced an increase in muscle fiber CSA, in particular in non-type I fiber which are mainly involved in muscle strength production [40]. As the muscle fiber CSA is determined by the regulation of synthesis/degradation protein balance [41], our data suggest a positive adaptive response of the corresponding signaling pathways, such as the ubiquitin-proteasome markers, to antioxidant supplementation in COPD patients. Secondly, to explain the increase in $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ reported only in “PR antioxidant” group, improvement of angiogenesis signaling pathway appeared to be a possible explanation [6, 42]. However, the link between oxidative stress and angiogenesis remained unclear in literature. In this context, the antioxidant supplementation used in our study not allowed to increase the capillary-to-fiber ratio in COPD patients. Considering all $\text{Vo}_{2\text{sl}}$ determinants, OS improvement may have induced positive adaptations

in mitochondrial oxidative capacity but also vascular function [42]. Interestingly, a recent study showed that a short term antioxidant supplementation may induce an increase in leg blood flow associated with an improvement in muscle oxygen consumption during exercise in stable COPD patients [43]. Thus, we could hypothesize that the antioxidant supplementation used in our study have positively regulated the signaling pathways involved in leg blood flow determinants, such as vasodilatory response or vascular resistance [44].

In conclusion, this study support the hypothesis that adapted nutritional antioxidant supplementation constitutes a relevant solution to improve PR benefits on QMVC and Vo_{2sl} in stable COPD patients. Specifically, QMVC improvement could be partly explained by the increase of muscle fiber cross sectional area (CSA) through antioxidant supplementation. Further analyses and studies are needed in order to 1) evaluate the effects of increased antioxidant capacity on signaling pathways involved in both QMVC and Vo_{2sl} improvement, 2) target COPD patients in whom antioxidant supplementation could be more effective.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the team of ‘La Solane’ Pulmonary Rehabilitation Center, especially the nursing service and the research laboratory, for their contribution to this work. E. Tremey is also acknowledged for his critical reading of the manuscript.

GRANTS

This study was supported by joint grants from the CHRU Montpellier and the Fontalvie Corporation, Toulouges, France. J. Maury was supported by a ‘CIFRE grant’ (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) from the Fontalvie Corporation and the French ‘Association Nationale de la Recherche et de la Technologie’.

REFERENCES

1. Celli BR, Decramer M, Wedzicha JA, Wilson KC, Agustí A, Criner GJ, MacNee W, Make BJ, Rennard SI, Stockley RA, Vogelmeier C, Anzueto A, Au DH, Barnes PJ, Burgel PR, Calverley PM, Casanova C, Clini EM, Cooper CB, Coxson HO, Dusser DJ, Fabbri LM, Fahy B, Ferguson GT, Fisher A, Fletcher MJ, Hayot M, Hurst JR, Jones PW, Mahler DA, Maltais F, Mannino DM, Martinez FJ, Miravittles M, Meek PM, Papi A, Rabe KF, Roche N, Sciurba FC, Sethi S, Siafakas N, Sin DD, Soriano JB, Stoller JK, Tashkin DP, Troosters T, Verleden GM, Verschakelen J, Vestbo J, Walsh JW, Washko GR, Wise RA, Wouters EF, ZuWallack RL; ATS/ERS Task Force for COPD Research. An official american thoracic society/european respiratory society statement: research questions in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Apr 1;191(7):e4-e27.
2. Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, Natanek SA, Man WD, Jackson A, Gosker HR, Schols AM, Moxham J, Polkey MI, Wouters EF. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur Respir J*. 2010 Jul; 36(1):81-8.
3. Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, Moore AJ, Moxham J, Polkey MI. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2007 Feb;62(2):115-20.
4. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester C, Hill K, Holland AE, Lareau SC, Man WD, Pitta F, Sewell L, Raskin J, Bourbeau J, Crouch R, Franssen FM, Casaburi R, Vercoulen JH, Vogiatzis I, Gosselink R, Clini EM, Effing TW, Maltais F, van der Palen J, Troosters T, Janssen DJ, Collins E, Garcia-Aymerich J, Brooks D, Fahy BF, Puhan MA, Hoogendoorn M, Garrod R, Schols AM, Carlin B, Benzo R, Meek P, Morgan M, Rutten-van Mölken MP, Ries AL, Make B, Goldstein RS, Dowson CA, Brozek JL, Donner CF, Wouters EF; ATS/ERS Task Force on Pulmonary Rehabilitation. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Oct 15;188(8):e13-64.
5. Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, De Paepe K, Decramer M. Resistance versus endurance training in patients with COPD and peripheral muscle weakness. *Eur Respir J*. 2002 Jun;19(6):1072-8.
6. Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Roudier E, de Rigal P, Molinari N, Laoudj-Chenivess D, Mercier J, Birot O, Hayot M. Blunted muscle angiogenic training-response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J*. 2013 Apr;41(4):806-14.
7. Maltais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigaré R, Dekhuijzen PN, Franssen F, Gayan-Ramirez G, Gea J, Gosker HR, Gosselink R, Hayot M, Hussain SN, Janssens W, Polkey MI, Roca J, Saey D, Schols AM, Spruit MA, Steiner M, Taivassalo T, Troosters T, Vogiatzis I, Wagner PD; ATS/ERS Ad Hoc Committee on Limb Muscle Dysfunction in COPD. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 May 1;189(9):e15-62.

8. Koechlin C, Couillard A, Simar D, Cristol JP, Bellet H, Hayot M, Prefaut C. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 1; 169(9):1022-7.
9. Agacdiken A, Basyigit I, Ozden M, Yildiz F, Ural D, Maral H, Boyaci H, Ilgazli A, Komsuoglu B. The effects of antioxidants on exercise-induced lipid peroxidation in patients with COPD. *Respirology*. 2004 Mar;9(1):38-42.
10. Maury J, Gouzi F, De Rigal P, Heraud N, Pincemail J, Molinari N, Pomiès P, Laoudj-Chenivesse D, Mercier J, Préfaut C, Hayot M. Heterogeneity of systemic oxidative stress profiles in COPD: The role of gender. *Oxid Med Cell Longev*.. Submitted
11. Pinho RA, Chiesa D, Mezzomo KM, Andrades ME, Bonatto F, Gelain D, Dal Pizzol F, Knorst MM, Moreira JC. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. *Respir Med*. 2007 Aug;101(8):1830-5. Epub 2007 Mar 26.
12. Barreiro E, Rabinovich R, Marin-Corral J, Barberà JA, Gea J, Roca J. Chronic endurance exercise induces quadriceps nitrosative stress in patients with severe COPD. *Thorax*. 2009 Jan;64(1):13-9.
13. Laviolette L, Lands LC, Dauletbaev N, Saey D, Milot J, Provencher S, LeBlanc P, Maltais F. Combined effect of dietary supplementation with pressurized whey and exercise training in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, controlled, double-blind pilot study. *Med Food*. 2010 Jun;13(3):589-98.
14. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1243-76.
15. Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:756132.
16. Santos MC, Oliveira AL, Viegas-Crespo AM, Vicente L, Barreiros A, Monteiro P, Pinheiro T, Bugalho De Almeida A. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*. 2004 Nov-Dec;9(6):461-9.
17. Lin YC, Wu TC, Chen PY, Hsieh LY, Yeh SL. Comparison of plasma and intake levels of antioxidant nutrients in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy people in Taiwan: a case-control study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010;19(3):393-401.
18. Gea J, Agustí A, Roca J. Pathophysiology of muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2013 May;114(9):1222-34.
19. Schols AM, Ferreira IM, Franssen FM, Gosker HR, Janssens W, Muscaritoli M, Pison C, Rutten-van Mölken M, Slinde F, Steiner MC, Tkacova R, Singh SJ. Nutritional assessment and therapy in COPD: a European Respiratory Society statement. *Eur Respir J*. 2014 Dec;44(6):1504-20.
20. Van de Bool C, Mattijssen-Verdonschot C, van Melick PP, Spruit MA, Franssen FM, Wouters EF, Schols AM, Rutten EP. Quality of dietary intake in relation to body composition in patients with chronic obstructive pulmonary disease eligible for pulmonary rehabilitation. *Eur J Clin Nutr*. 2014 Feb;68(2):159-65.
21. Pison CM, Cano NJ, Chérion C, Caron F, Court-Fortune I, Antonini MT, Gonzalez-Bermejo J, Meziane L, Molano LC, Janssens JP, Costes F, Wuyam B, Similowski T, Melloni

- B, Hayot M, Augustin J, Tardif C, Lejeune H, Roth H, Pichard C; IRAD Investigators. Multimodal nutritional rehabilitation improves clinical outcomes of malnourished patients with chronic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Thorax*. 2011 Nov;66(11):953-60.
22. Franssen FM, Broekhuizen R, Janssen PP, Wouters EF, Schols AM. Effects of whole-body exercise training on body composition and functional capacity in normal-weight patients with COPD. *Chest*. 2004 Jun;125(6):2021-8.
23. O'Donnell DE, Lam M, Webb KA. Measurement of symptoms, lung hyperinflation, and endurance during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1557-65.
24. Mador MJ, Bozkanat E, Aggarwal A, Shaffer M, Kufel TJ. Endurance and strength training in patients with COPD. *Chest*. 2004 Jun;125(6):2036-45.
25. Hawley JA. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009 Jun;34(3):355-61.
26. O'Shea SD, Taylor NF, Paratz JD. Progressive resistance exercise improves muscle strength and may improve elements of performance of daily activities for people with COPD: a systematic review. *Chest*. 2009 Nov;136(5):1269-83.
27. Sillen MJ, Franssen FM, Delbressine JM, Vaes AW, Wouters EF, Spruit MA. Efficacy of lower-limb muscle training modalities in severely dyspnoeic individuals with COPD and quadriceps muscle weakness: results from the DICES trial. *Thorax*. 2014 Jun;69(6):525-31.
28. Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, Moore AJ, Moxham J, Polkey MI. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2007 Feb;62(2):115-20.
29. Eves ND, Sandmeyer LC, Wong EY, Jones LW, MacDonald GF, Ford GT, Petersen SR, Bibeau MD, Jones RL. Helium-hyperoxia: a novel intervention to improve the benefits of pulmonary rehabilitation for patients with COPD. *Chest*. 2009 Mar;135(3):609-18.
30. Vogiatzis I, Terzis G, Nanas S, Stratakis G, Simoes DC, Georgiadou O, Zakynthinos S, Roussos C. Skeletal muscle adaptations to interval training in patients with advanced COPD. *Chest*. 2005 Dec;128(6):3838-45.
31. Borghi-Silva A, Mendes RG, Trimer R, Oliveira CR, Fregonezi GA, Resqueti VR, Arena R, Sampaio-Jorge LM, Costa D. Potential effect of 6 versus 12-weeks of physical training on cardiac autonomic function and exercise capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2015 Apr;51(2):211-21. Epub 2014 Mar 5.
32. Rodríguez DA, Arbilla A, Barberan-García A, Ramirez-Sarmiento A, Torralba Y, Vilaró J, Gimeno-Santos E, Gea J, Orozco-Levi M, Roca J, Marco E. Effects of interval and continuous exercise training on autonomic cardiac function in COPD patients. *Clin Respir J*. 2014 Jul 11.
33. May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med*. 2000 May 1;28(9):1421-9.

34. Elokda AS, Nielsen DH. Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007 Oct;14(5):630-7.
35. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids.* 2012;2012:736837.
36. Passerieux E, Hayot M, Jaussent A, Carnac G, Gouzi F, Pillard F, Picot MC, Böcker K, Hugon G, Pincemail J, Defraigne JO, Verrips T, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Free Radic Biol Med.* 2014 Sep 19.
37. Pannala VR, Bazil JN, Camara AK, Dash RK. A mechanistic mathematical model for the catalytic action of glutathione peroxidase. *Free Radic Res.* 2014 Apr;48(4):487-502.
38. Filipe PM, Fernandes AC, Manso CF. Effects of zinc on copper-induced and spontaneous lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res.* 1995 Jan-Mar;47(1-3):51-6.
39. Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol (1985).* 1993 Sep;75(3):1081-7.
40. Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Reggiani C. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J Physiol.* 1996 Sep 1;495
41. Lambert CP, Evans WJ. Effects of aging and resistance exercise on determinants of muscle strength. *J Am Aging Assoc.* 2002 Apr;25(2):73-8.
42. Betik AC, Hepple RT. Determinants of VO₂ max decline with aging: an integrated perspective. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Feb;33(1):130-40.
43. Rossman MJ, Trinity JD, Garten RS, Ives SJ, Conklin JD, Barrett-O'Keefe Z, Witman MA, Bledsoe AD, Morgan DE, Runnels S, Reese VR, Zhao J, Amann M, Wray DW, Richardson RS. Oral antioxidants improve leg blood flow during exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015 Sep;309(5):H977-85.
44. Richardson RS. Oxygen transport and utilization: an integration of the muscle systems. *Advances in physiology education* 27: 183-191, 2003.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Baseline clinical and functional characteristics of COPD patients

	PR placebo group (n=27)	PR antioxidant group (n=31)	<i>P value</i>
Age (years)	61 ± 9	62 ± 6	0.58
Sex ratio (W / M)	13 / 14	17 / 15	0.82
BMI (kg/m ²)	25.4 ± 4.7	24.8 ± 4.3	0.60
Fat Free Mass index (kg/m ²)	17.4 ± 2.4	17.3 ± 2.4	0.88
Muscle mass index (kg/m ²)	8.0 ± 1.6	7.9 ± 1.6	0.98
FEV1 (% pred)*	62 ± 27	55 ± 18	0.25
FEV1/FVC ratio*	49 ± 11	47 ± 8	0.65
GOLD stage I/II/III/IV (n)	4/11/6/6	3/16/4/8	0.69
BODE Score [18]	1.9 ± 1.7	2.2 ± 1.9	0.60
Breathlessness, MRC score	1.2 ± 0.9	1.3 ± 1.2	0.81
Tobacco consumption (Packs /years)	40 ± 17	43 ± 25	0.63
Physical Activity level, Voorips Score [21]	6.2 ± 6.6	5.9 ± 4.8	0.85
6-MWD (m)	508 ± 104	510 ± 99	0.96
6-MWD (% pred)	78 ± 17	81 ± 14	0.45
W _{sl} (watt)	69 ± 31	61 ± 25	0.31
W _{sl} (% pred)	51 ± 20	52 ± 20	0.82
VO _{2sl} (ml/min/kg)	15.9 ± 3.9 (n=24)	14.0 ± 3.2 (n=27)	0.07
VO _{2sl} (% pred)	64 ± 16 (n=24)	56 ± 16 (n=27)	0.12
W _{sl} at VT (watt)	39 ± 20	36 ± 14	0.53
QMVC (Nm)	114 ± 50	102 ± 38	0.32
QMVC (% pred)	90 ± 24	87 ± 14	0.56
Qend (s)	357 ± 155	345 ± 116	0.75
Muscle fiber type I %	42 ± 11	36 ± 14	0.35
Capillary to fiber ratio	1.81 ± 0.52	1.68 ± 0.43	0.55
Muscle type I fiber CSA (μm ²)	5673 ± 1712	5299 ± 1911	0.57
Muscle non type I fiber CSA (μm ²)	4456 ± 1779	4310 ± 1519	0.80
All muscle fiber CSA (μm ²)	5064 ± 1586	4639 ± 1628	0.46

Results are expressed in mean $\pm$ SD. Definition of abbreviations: COPD=chronic obstructive pulmonary disease; W=women/M=men; BMI=body mass index (kg/m^2); FEV_1 (%pred)=forced expiratory volume in 1 second; BODE index=body mass index, airway obstruction, dyspnoea, exercise capacity index (6-MWD); MRC=Medical Research Council; 6-MWD (m)=6-minute walking distance; W_{sl} =symptom-limited power output; Vo_{2sl} =symptom-limited oxygen uptake; VT=Ventilatory Threshold; QMVC (Nm)=quadriceps maximal voluntary contraction expressed in Newtons; Qend (s)=quadriceps endurance time expressed in seconds.

Table 2. Baseline systemic OS marker levels of COPD patients

	PR placebo group (n=27)	PR antioxidant group (n=31)	<i>P value</i>
Vitamin C (µg/ml) [W : 8.6-18.8 ; M : 6.2-15.2]	9.4 ± 4.1	10.8 ± 4.6	0.21
Vitamin E (mg/L) [8.0-15.0]	14.2 ± 4.1	15.3 ± 4.6	0.24
Vitamin C / vitamin E [0.59-1.19]	0.70 ± 0.33	0.72 ± 0.31	0.77
Selenium (µg/ml) [94-130]	84.9 ± 14.3	88.3 ± 14.3	0.37
Copper (mg/ml) [W : 0.8-1.55 ; M : 0.7-1.40]	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.91
Zinc (mg/ml) [0.70-1.20]	0.82 ± 0.12	0.79 ± 0.12	0.34
Copper/zinc ratio [1.14-1.29]	1.40 ± 0.41	1.44 ± 0.37	0.68
GSH/GSSG [111-747]	330 ± 237	461 ± 288	0.07
GPx (UI/gHb) [30-55]	44.8 ± 11.0	49.3 ± 11.7	0.14
SOD (UI/gHb) [785-1570]	1338 ± 358	1286 ± 250	0.63
Lipid peroxidation (µmol/L) [<432]	645 ± 280	636 ± 316	0.90
LDLox (UI/L) [28-70]	59 ± 21	61 ± 17	0.66

Results are expressed in mean ± SD. In the first column, we specify the lower and upper limit of reference values obtained in a large healthy subject cohort, as previously described [10]. Definition of abbreviations: M=male/W=women; GSH=reduced glutathione; GSSG=oxidized glutathione; SOD=superoxide dismutase; GPx=peroxidase glutathione; LDL=oxidized low-density lipoprotein.

Table 3. Changes in systemic OS markers after antioxidant or placebo supplementation combined with pulmonary rehabilitation program

% change	PR placebo group (n=27)	PR antioxidant group (n=31)	<i>P</i> value*
Vitamin C (µg/ml)	72 ± 111	83 ± 129	0.73
Vitamin E (mg/L)	1.5 ± 23.3	14.3 ± 25.2	0.05
Vitamin C / vitamin E	77 ± 127	62± 106	0.62
Selenium (µg/ml)	2.4 ± 17.5	19.6 ± 14.2	<0.001
Copper (mg/ml)	-0.5 ± 24.1	0.7 ± 18.1	0.82
Zinc (mg/ml)	2.9 ± 16.5	8.2 ± 9.7	0.13
Copper/zinc ratio	-2.0 ± 28.1	-6.1 ± 19.7	0.52
GSH/GSSG	175 ± 299	10 ± 113	<0.001
GPx (UI/gHb)	6.6 ± 13.3	7.4 ± 12.7	0.81
SOD (UI/gHb)	13.7 ± 45.9	7.3 ± 28.3	0.79
Lipid peroxidation (µmol/L)	14.0 ± 45.6	11.3 ± 45.8	0.83
LDLox (UI/L)	1.9 ± 26.8	3.3 ± 19.9	0.52

Results are expressed in mean ± SD. GSH=reduced glutathione; GSSG=oxidized glutathione; SOD=superoxide dismutase; GPx=peroxidase glutathione; LDLox=oxidized low-density lipoprotein.

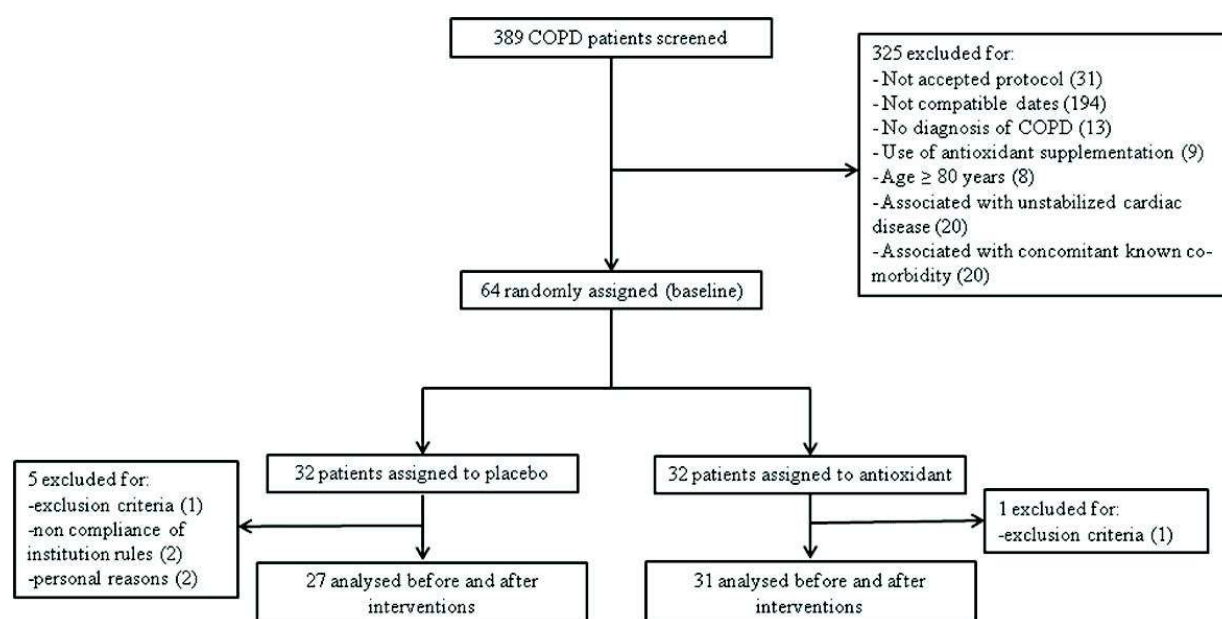


Figure 1. *Flow chart of COPD patient recruitment.*

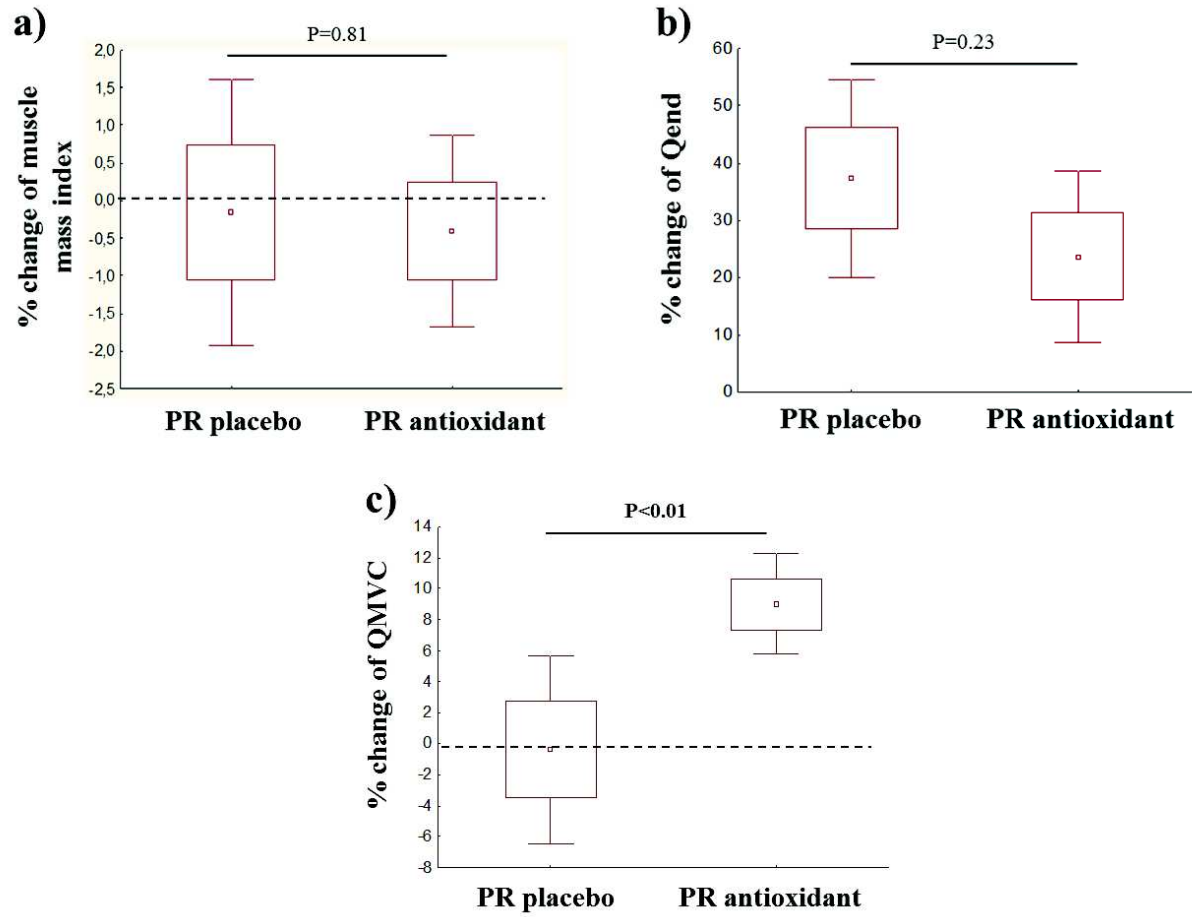


Figure 2. Box-and-whisker plots for change in functional parameters (in %): a) muscle mass index, b) quadriceps endurance limit time (Q_{end}) and c) quadriceps maximal voluntary contraction ($QMVC$) after intervention programs. The boxes represent the 25th to 75th percentiles and the square within each box shows the mean value. The whiskers represent the standard deviation values. P value represents the specific group effect obtained in ANCOVA model.

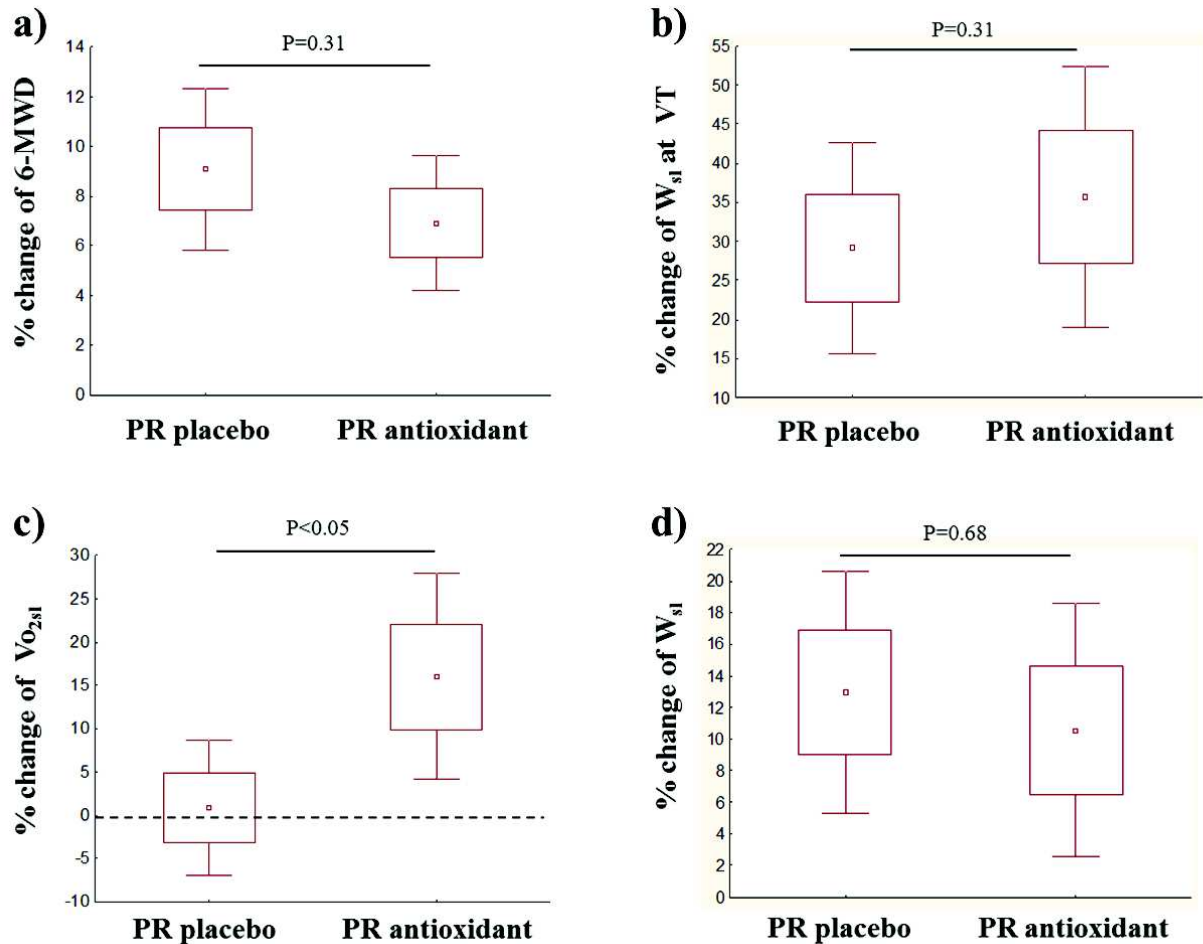


Figure 3. Box-and-whisker plots for change in exercise capacity parameters (in %): a) 6-meter walking distance (6-MWD), b) maximal power outputs at the first ventilatory threshold (W_{sl} at VT), c) symptom-limited oxygen consumption (Vo_{2sl}) and d) maximal power outputs (W_{sl}) after intervention programs. The boxes represent the 25th to 75th percentiles and the square within each box shows the mean value. The whiskers represent the standard deviation values. P value represents the specific group effect obtained in ANCOVA model.

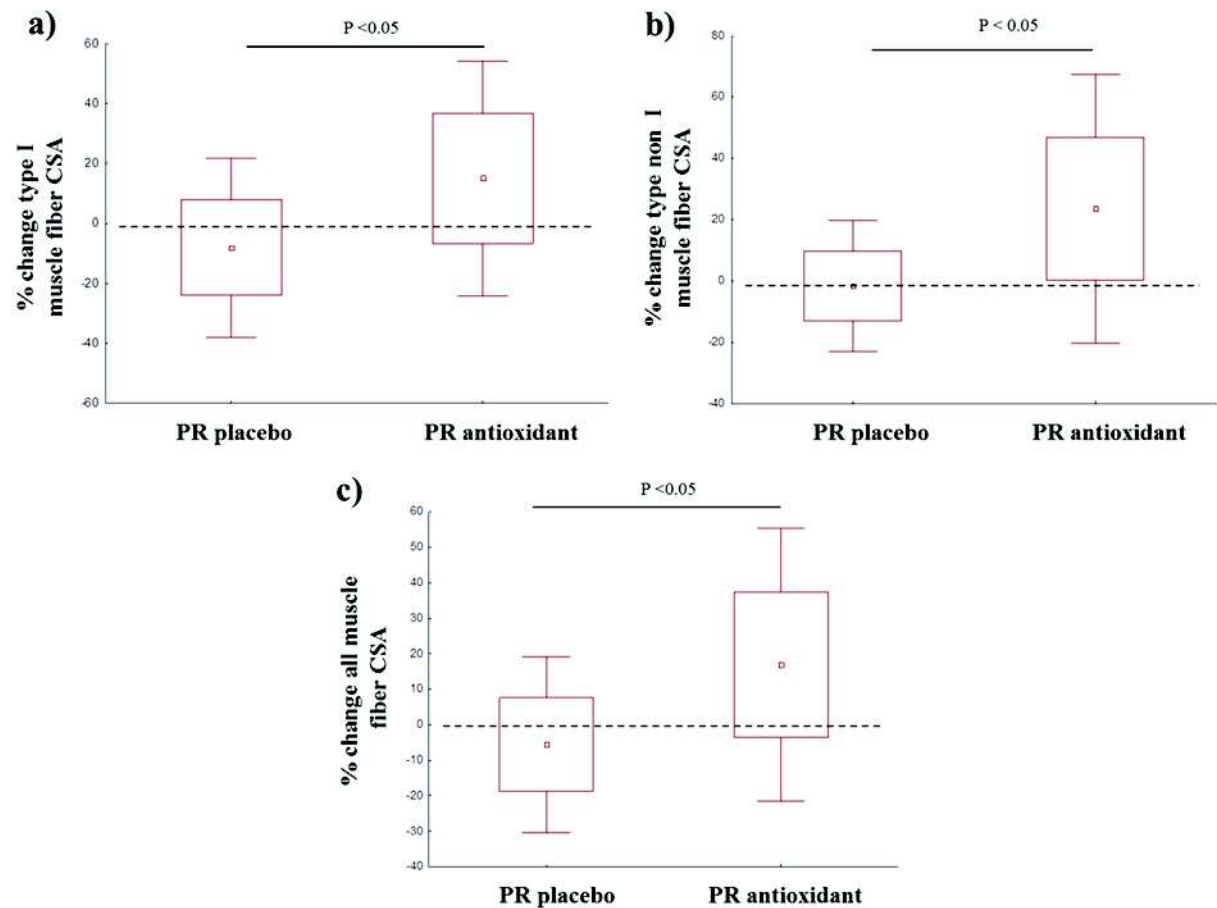


Figure 4. Box-and-whisker plots for change in histomorphological parameters (in %): a) Type I muscle fiber cross sectional area (CSA), b) Type non I muscle fiber cross sectional area (CSA), c) All muscle fiber cross sectional area (CSA) after intervention programs. The boxes represent the 25th to 75th percentiles and the square within each box shows the mean value. The whiskers represent the standard deviation values. P value represents the specific group effect obtained in ANCOVA model.

Supplementary data

MATERIALS AND METHODS

Study patients

For this study, we recruited stable COPD patients (40 to 80 years old) referred for a 4-week of rehabilitation program at “La Solane” (Clinique du Souffle, Fontalvie Group, F-66340 Osséja, France) between June 2012 and December 2014. The diagnosis of COPD, as defined by the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines, was especially based on a post bronchodilator forced expiratory volume in one second (FEV₁)/forced vital capacity (FVC) ratio below 70% of theoretical given by plethysmography method [1]. Exclusion criteria were as follows: presence of exacerbations within the last month; unstabilized disease incompatible with a respiratory rehabilitation program (e.g., cardiac, inflammatory, metabolic, kidney, neuromuscular or psychiatric); disability that could modulate OS and limit exercise capacity; antioxidant supplementation (vitamins, trace elements, etc.) or use of drugs such as allopurinol and N-acetylcysteine within the last month; use of oral corticosteroid over the last six months; known infection by VIH, hepatitis C and B. All patients received a detailed information letter about the study before providing their written informed consent. This study was approved by the ethics committee Montpellier Sud-Méditerranée IV (n°2011-A00842-39) and realized in accordance with the Helsinki declaration and the European guidelines for “good clinical practice”.

Study design and randomization

This randomized controlled double-blind study compared the effects of four weeks of exercise training program combined with antioxidant supplementation (“PR antioxidant” group) or placebo (“PR placebo” group) on muscle function and exercise capacity. After a screening by telephone and a first medical visit to verify inclusion and exclusion criteria, COPD patients were randomly allocated (1:1 ratio) in order to integrate experimental or control group.

Randomization was performed with permuted blocks of 4 patients and centralized by computer software at the medical information department, Montpellier University Hospital (Dr N. Molinari, France). Pharmacy of Montpellier University Hospital conducted labeling, with random numbers, and distribution of supplementation lots (antioxidants or placebo) at the pharmacy of “La Solane”. In this way, all personnel involved in the study and COPD patients were blind to the nature of supplementation until trial completion.

Before and after the exercise training program combined with antioxidant supplementation (or placebo), COPD patients had respiratory, muscle functional evaluations, exercise capacity assessment and systemic OS determination.

Exercise training program and supplementation

Exercise training was conducted as part of a multi-component pulmonary rehabilitation program, as recommended in COPD [2], including: dietary and psychological monitoring; respiratory physiotherapy sessions; education program. Exercise training consisted of at least 20 endurance sessions distributed over four weeks (*i.e.*, stationary cycling, walking or adapted physical activity). The exercise intensity was set as the heart rate at the ventilatory or dyspnea threshold [2]. This threshold was assessed using a cardio frequency meter during the maximal incremental exercise test. Heart rate was then continuously monitored during training sessions using the same apparatus. The stationary cycling sessions had duration of 45 minutes alternating periods of work at the first ventilator threshold and rest periods. The duration of the outdoor walking depended on basal exercise capacity of patients (between 1 hour and 3 hours). The program was completed by strength-building of lower and upper limb, stretching and physical adapted physical activity including, balancing and motor skills exercise. Exercise training intensity was increased during training program and supervised by experienced clinicians of “La Solane” (Clinique du Souffle, Fontalvie Group, F-66340 Osséja, France).

During the four weeks of exercise training program, COPD patients received an antioxidant (or placebo) supplementation in galenic form of capsules distributed in different colors pillbox. Antioxidant capsules were indistinguishable (same form, color and taste) and realized by Pierre Martin Privat laboratory (Montpellier, France). The antioxidant supplementation was constituted of vitamins and trace elements at doses below the recommended daily nutritional intake: Vitamin C (30mg/day); Vitamin E (180mg/day); Zinc gluconate (15mg/day); selenium as selenomethionine (50µg/day). To limit interactions between antioxidants and enhance their biodisponibility, the capsule consumptions were staggered throughout the day. For example, vitamin C capsule or placebo (red pillbox) was taken during breakfast while vitamin E capsule or placebo (blue pillbox) was taken during dinner. Antioxidant consumptions were controlled by the nursing service of “La Solane” using compliance logbook.

Functional evaluations

Outcomes

Visit 1 (pre interventions) and visit 4 (post interventions)

Changes in pulmonary function were assessed by *plethysmography* (Medisoft Body Box 5500, Sorinnes, Belgium), as recommended by ATS/ERS, in order to determine the forced expiratory volume in one second (FEV₁)/forced vital capacity (FVC) ratio. Based on the GOLD guidelines, FEV₁ was used as an indicator of pulmonary severity [1] and patient values were compared with normal values [3].

The questionnaire validated by Voorrips et al. was used (only at V1) to assess the quantity of physical activity level during the previous month [4]. This questionnaire is composed of three parts, with information about daily activities, sports and spare-time activities giving a total score. The daily physical activity value is interpreted as low (total score <9.4), moderate (total score between 9.4 and 16.4) or high (total score >16.4).

Visit 2 (pre interventions) and visit 4 (post interventions)

Bioelectrical multifrequency impedance (BIACORPUS RX spectral, MEDICAL HealthCare GmbH, Karlsruhe, Germany) was used to assess body composition: fat mass (FM), fat-free mass (FFM), total body water and muscle mass. More specifically, muscle mass was calculated using the bioelectrical impedance analysis equation of Janssen and coll. [5]. Measurements were taken immediately after an overnight fast, before blood sample.

Maximal incremental exercise test on a cycle ergometer (Ergoselect, Sorinnes, Belgium) was performed to evaluate exercise capacity. Using a 12-lead electrocardiogram and gas exchange measurement with a breath-by-breath system (Medisoft Expair software, Ergocard, Sorinnes, Belgium) were continuous during exercise testing. Moreover, measurement of blood gases (PaO₂; PaCO₂; SaO₂) collected from the radial artery was performed in resting and during exercise patients, using a blood gases analyzer (Phox PlusT, Nova Biomedical, Watham, MA, USA). Maximality criteria were determined according to the international standards on cardiopulmonary exercise testing [6]. Maximal power outputs (W_{sl}), symptom-limited oxygen consumption (VO_{2sl}) were the main variables evaluated and the first ventilator or dyspnea threshold (VT or VD) was used to determine exercise intensity [2].

Visit 3 (pre interventions) and visit 5 (post interventions)

The Quadriceps maximal voluntary isometric contraction (QMVC, in Nm) was determined in a seated position at 90° knee and hip flexion on a quadriceps-hamstring chair

(Quadriergoforme Rehab Chair, Aleo Industrie/Design Corporel, Salome, France). This chair has a strain gauge system (Captels, Saint Mathieu de Treviers, France) connected to a signal acquisition and analysis system (MP36, BIOPAC Systems). The pelvis and the proximal extremity of the patella were securely attached to the chair in order to minimize movements of adjacent muscles. All the patients were systematically familiarized with maximal voluntary contractions before evaluations. Three reproducible measurements (within 5%) per leg were recorded and the best value of the dominant leg was retained [7]. QMVC was compared with the reference values [8].

The Quadriceps endurance time (Qend, in seconds) was determined only for the dominant leg, as previously described by our group [9]. The patients performed knee extensions (6 movements per minute) with a workload to 30% of QMVC until exhaustion. Immediately after this test, patients performed a QMVC to evaluate quadriceps fatigue, and a reduction of QMVC >10% was necessary to validate the test.

The 6-minute walk test (6MWT) [10] was performed to evaluate exercise capacity. It was performed twice along a 30-m perimeter with at least 30 minutes between tests and the highest 6-minute walking distance (6-MWD) was selected, in line with the guidelines [10] and compared to reference values [11]. Oxygen saturation (SpO₂) and heart rate (HR) were recorded every minute using pulse oximetry (Nonin 8500 M; Nonin Medical, Inc., Minneapolis, MN, USA). The dyspnea score was measured before and at the end of the test on a visual analog scale. *The BODE index* was determined to assess global disease severity [12]. The BODE index was determined from the body mass index (B), the degree of airflow obstruction with FEV1 (O), dyspnoea (D) assessed by the Medical Research Council (MRC) scale, and exercise capacity (E) measured by the 6-minute walk test (6MWT).

Muscle biopsy

Visit 4 (pre interventions) and visit 6 (post interventions)

Muscle biopsies were performed in the vastus lateralis of the quadriceps before and after interventions as previously described [6]. Muscle biopsies were analysed blindly for fiber cross sectional area (CSA) type I proportion and capillary to fiber ratio. Muscle fiber type I and CSA were assessed after immunohistochemistry on frozen sections (10-mm thickness) from the muscle biopsies, using antibodies specific to myosin heavy chain type I (University of Iowa, Iowa City, IO, USA). Capillaries were visualised by immunochemistry with the

monoclonal antibody against CD31 (#550389; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Fiber type, size and capillary number were identified with ImageJ software.

Oxidative stress determination

Visit 2 (pre interventions) and visit 4 (post interventions)

Blood samples were taken immediately after an overnight fast and drawn into tubes containing EDTA or Na-heparin as anticoagulant or clot-activating gel, depending on the parameter. The samples were immediately centrifuged on site (3000 rpm; 10 minutes) and plasma or sera were frozen at -80°C. All analyses of the COPD patient blood samples were routinely performed in the clinical laboratory of the University of Liège (Professor Joël Pincemail). For each OS marker, this laboratory established lower and upper limits of the reference values (LLR and ULR) from a large healthy subject cohort, as previously done [13, 14]. This cohort included 123 subjects of Caucasian origin with an age range of 21 to 64 years with no known history of respiratory, cardiovascular, liver, or kidney diseases or cancer.

Lipid peroxidation markers

The lipid peroxides (ROOH) in plasma were analyzed with a commercial kit (Oxystat, Biomedica Gruppe, Vienna, Austria) as previously described [13, 15]. Oxidized low density lipoprotein (LDL) levels in plasma samples were determined spectrophotometrically with a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Immunodiagnostik, Bensheim, Germany).

Antioxidants

For vitamin C determination, 0.5 ml plasma was immediately transferred to ice-cold tubes containing 0.5 ml of 10% metaphosphoric acid and kept at -80°C. Analyses were performed by a spectrophotometric method using the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (Perkin Elmer Lambda 40, Norwalk, CT, USA). Plasma vitamin A and vitamin E (α - and γ -tocopherol) levels were determined simultaneously by HPLC (Alliance HPLC System, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled with a diode array detector [16]. Blood levels of vitamin E were normalized to plasma levels of total cholesterol [17], which were determined by an enzymatic method with cholesterol oxidase. Total reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were determined in whole blood using the GSH/GSSG-412 kit (Bioxytech, Oxis International, Inc., Portland, WA, USA). Superoxide dismutase (SOD) and

peroxidase glutathione (GPx) enzymatic activities in whole blood were determined with the Ransod and Ransel kits (Randox, England) and were expressed as UI/g of haemoglobin.

Trace elements

Plasma levels of selenium, copper and zinc were determined by inductively coupled plasma–mass spectroscopy [18].

Nutritional assessment

The nutritional status of all patients was obtained from dietary records [19] that they maintained in the week before the start of the functional evaluations. As general well-balanced diet during the four weeks of PR was proposed to all the COPD patients, we also evaluated the nutritional status the week before the final evaluations. Patients recorded on paper the foods and beverages consumed over three nonconsecutive days, specifying quantities based on various indicators (weighing, egg cups, tablespoons, food models, etc.). With the collaboration of a dietician to determine the volume of food intake for each patient, nutrients were converted to micronutrients in order to estimate the consumption of antioxidants like vitamins and trace elements using GENI software (Micro6, Villiers-lès-Nacy, France). This software compares an individual's dietary intake with a recommended daily intake (RDI) given by the “Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)” of France. These RDI are based on gender and age [20].

Sample size and statistical analysis

Sample size was calculated based on the change of quadriceps endurance time (Qend in seconds) because our group previously showed that change in OS profile improved directly this muscle function in stable COPD patients [11]. With a one-sided alpha risk of 5% and a power of 80%, the number of COPD patients required per group was estimated at 29. As we considered a dropout rate of 10%, we included 32 stable COPD patients per group.

Quantitative data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) while qualitative data were described using proportions. To compare all the parameters evaluated between “PR placebo group” and the “PR antioxidant group” at baseline, we used a student *t* test (or a Mann-Whitney) for quantitative data or Pearson's chi-squared test for qualitative data. To examine within-group changes and the effect of interventions between the two groups of COPD patients, two-way repeated measures analysis of variance and least significant difference

(LSD) post hoc tests were used. To complete the analysis, we determined the percentage of change in each parameter, and we performed multivariate analysis (ANCOVA) in order to test the group and baseline value effects separately. For all analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using R version 2.15.2.

REFERENCES

1. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Feb 15;187(4):347-65.
2. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester C, Hill K, Holland AE, Lareau SC, Man WD, Pitta F, Sewell L, Raskin J, Bourbeau J, Crouch R, Franssen FM, Casaburi R, Vercoulen JH, Vogiatzis I, Gosselink R, Clini EM, Effing TW, Maltais F, van der Palen J, Troosters T, Janssen DJ, Collins E, Garcia-Aymerich J, Brooks D, Fahy BF, Puhan MA, Hoogendoorn M, Garrod R, Schols AM, Carlin B, Benzo R, Meek P, Morgan M, Rutten-van Mölken MP, Ries AL, Make B, Goldstein RS, Dowson CA, Brozek JL, Donner CF, Wouters EF; ATS/ERS Task Force on Pulmonary Rehabilitation. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Oct 15;188(8):e13-64.
3. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*. 1993 Mar;16:5-40.
4. Voorrips LE, Ravelli AC, Dongelmans PC, Deurenberg P, Van Staveren WA. A physical activity questionnaire for the elderly. *Med Sci Sports Exerc*. 1991 Aug;23(8):974-9.
5. Janssen I, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Ross R. Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Aug;89(2):465-71.
6. ATS/ACCP Statement on cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 211-277, 2003.
7. Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Roudier E, de Rigal P, Molinari N, Laoudj-Chenivresse D, Mercier J, Birot O, Hayot M. Blunted muscle angiogenic training-response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J*. 2013 Apr;41(4):806-14.
8. Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, Natanek SA, Man WD, Jackson A, Gosker HR, Schols AM, Moxham J, Polkey MI, Wouters EF. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur Respir J*. 2010 Jul; 36(1):81-8.
9. Koechlin C, Couillard A, Simar D, Cristol JP, Bellet H, Hayot M, Prefaut C. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 1; 169(9):1022-7.
10. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(1): 111-117.
11. Troosters T, Gosselink R, Decramer M. Six minutes walking distance in healthy elderly subjects. *Eur Respir J*. 1999; 14(2):270-274.
12. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004 Mar 4;350(10):1005-12.
13. Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle,J.P. [Oxidative stress]. *Rev. Med.Liege* 62:628–638; 2007.

14. Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, Collette G, Haleng J, Cheramy-Bien JP, Charlier C, Chapelle JP, Giet D, Albert A, Limet R, Defraigne JO. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40-48 years from the ELAN study in the province of Liege, Belgium. *Hum Reprod.* 2007 Aug;22(8):2335-43.
15. Turki A, Hayot M, Carnac G, Pillard F, Passerieux E, Bommart S, Raynaud de Mauverger E, Hugon G, Pincemail J, Pietri S, Lambert K, Belayew A, Vassetzky Y, Juntas Morales R, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D. Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2012 Sep 1; 53(5):1068-79.
16. Zhao B, Tham SY, Lu J, Lai MH, Lee LK, Moolchala SM. Simultaneous determination of vitamins C, E and beta-carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Pharm Sci.* 2004 Jun 30; 7(2):200-4.
17. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med.* 1995 Jun; 18(6):1079-86.
18. Stürup S, Hayes RB, Peters U. Development and application of a simple routine method for the determination of selenium in serum by octopole reaction system ICPMS. *Anal Bioanal Chem.* 2005 Feb; 381(3):686-94.
19. Biró G, Hulshof KF, Ovesen L, Amorim Cruz JA; EFCOSUM Group. Selection of methodology to assess food intake. *Eur J Clin Nutr.* 2002 May;56 Suppl 2:S25-32.
20. Ambroise Martin, Apports nutritionnels conseillés pour la population française, Tec & Doc, 2000, 605.

Supplementary tables and figures

Table S1. Interventions and exacerbation characteristics

	PR placebo group (n=27)	PR antioxidant group (n=31)	<i>P</i> value
Antioxidant/placebo supplementation			
Duration (days)	28 ± 1	28 ± 1	0.86
Capsule consumption (total number)	112 ± 3	112 ± 2	0.91
Compliance (%)	99 ± 1	99 ± 1	0.72
Exercise training intensity			
Vo _{2sl} at VT / Vo _{2sl} (%)	65 ± 13	70 ± 19	0.27
W _{sl} at VT / W _{sl} (%)	55 ± 11	55 ± 11	0.78
HR at VT / HR _{max} (%)	81 ± 9	84 ± 9	0.25
Exercise training sessions (total number)			
-stationary cycling	9 ± 3	9 ± 4	0.61
-walking	9 ± 4	8 ± 3	0.47
-strength building	9 ± 4	10 ± 3	0.52
-adapted physical activity	8 ± 3	10 ± 4	0.21
Exacerbations during interventions			
Duration (days)	5 ± 3	4 ± 3	0.49

Results are expressed in mean ± SD. Definition of abbreviations: W_{sl} (% pred)=symptom-limited power output; Vo_{2sl} (% pred)=symptom-limited oxygen uptake; VT=Ventilatory Threshold; HR: heart rate

Table S2. Changes in functional parameters after exercise training combined with antioxidant supplementation or placebo.

	PR placebo group (n=27)			PR antioxidant group (n=31)			
	Baseline	After interventions	Within-group evolution <i>P value</i>	Baseline	After interventions	Within-group evolution <i>P value</i>	Between group evolution <i>P value</i>
BMI (kg/m ²)	25.4 ± 4.7	25.1 ± 4.6	0.03	24.7 ± 4.3	24.4 ± 4.0	0.03	0.88
Fat Free Mass index (kg/m ²)	17.4 ± 2.4	17.4 ± 2.4	0.82	17.2 ± 2.4	17.3 ± 2.4	0.47	0.51
Muscle mass index (kg/m ²)	8.0 ± 1.6	7.9 ± 1.5	0.70	7.9 ± 1.6	7.9 ± 1.6	0.78	0.92
FEV1 (% pred)	57 ± 23	61 ± 23	0.06	51 ± 16	57 ± 17	<0.05	0.18
FEV1/FVC ratio	49 ± 11	51 ± 12	0.12	47 ± 8	50 ± 10	0.06	0.88
6-MWD (m)	508 ± 104	552 ± 107	<0.001	510 ± 99	541 ± 95	<0.001	0.18
6-MWD (% pred)	78 ± 17	84 ± 16	<0.001	81 ± 14	86 ± 13	<0.001	0.28
W _{sl} (watt)	69 ± 31	77 ± 31	<0.001	61 ± 25	66 ± 28	<0.001	0.65
W _{sl} (% pred)	51 ± 20	57 ± 20	<0.01	52 ± 20	55 ± 19	<0.01	0.82
VO _{2sl} (ml/min/kg)	15.9 ± 3.9	15.9 ± 5.0	0.89	14.0 ± 3.2	15.6 ± 4.7	<0.01	<0.05
VO _{2sl} (% pred)	64 ± 16	63 ± 19	0.77	56 ± 16	63 ± 21	<0.01	<0.05
W _{sl} at VT (ml/min/kg)	39 ± 20	47 ± 20	<0.05	36 ± 14	46 ± 19	<0.05	0.81
QMVC (Nm)	114 ± 50	114 ± 51	0.601	102 ± 38	111 ± 41	<0.001	<0.01
QMVC (% pred)	90 ± 24	92 ± 22	0.488	87 ± 14	95 ± 16	<0.001	<0.05
Qend (s)	357 ± 155	457 ± 177	<0.001	345 ± 116	435 ± 175	<0.001	0.67

Results are expressed in mean ± SD. Definition of abbreviations: BMI=body mass index (kg/m²); FEV₁ (%pred)=forced expiratory volume in 1 second; FVC=forced vital capacity; (6-MWD); MRC=Medical Research Council; 6-MWD=6-minute walking distance; W_{sl}=symptom-limited power output; Vo_{2sl}=symptom-limited oxygen uptake; VT=Ventilatory Threshold; QMVC (Nm)=quadriceps maximal voluntary contraction expressed in Newtons; Qend (s)=quadriceps endurance time expressed in seconds

Table S3. Changes in systemic OS markers after exercise training combined with antioxidant supplementation or placebo.

	PR placebo group (n=27)			PR antioxidant group (n=31)			
	Baseline	After interventions	Within-group evolution <i>P</i> value	Baseline	After interventions	Within-group evolution <i>P</i> value	Between group evolution <i>P</i> value
Vitamin C (µg/ml) [F :8.6-18.8 ; M : 6.2-15.2]	9.4 ± 4.1	12.7 ± 3.3	<0.001	10.8 ± 4.6	15.1 ± 2.8	<0.001	0.44
Vitamin E (mg/L) [8.0-15.0]	14.2 ± 4.1	14.3 ± 4.1	0.73	15.3 ± 4.6	17.0 ± 3.9	<0.01	0.10
Vitamin C / vitamin E [0.59-1.19]	0.70 ± 0.33	0.95 ± 0.32	<0.001	0.72 ± 0.31	0.93 ± 0.24	<0.001	0.67
Selenium (µg/ml) [94-130]	84.9 ± 14.3	85.4 ± 12.4	0.90	88.3 ± 14.3	104.4 ± 12.7	<0.001	<0.001
Copper (mg/ml) [F :0.8-1.55 ; M : 0.7-1.40]	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.68	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.84	0.87
Zinc (mg/ml) [0.70-1.20]	0.82 ± 0.12	0.84 ± 0.14	0.56	0.79 ± 0.13	0.85 ± 0.13	<0.01	0.11
Copper/zinc ratio [1.14-1.29]	1.40 ± 0.41	1.35 ± 0.46	0.38	1.44 ± 0.37	1.32 ± 0.33	<0.05	0.48
GSH/GSSG [111-747]	330 ± 237	425 ± 263	<0.05	461 ± 288	382 ± 307	0.13	<0.01
GPx (UI/gHb) [30-55]	44.8 ± 11.0	45.1 ± 8.8	0.04	49.3 ± 11.7	52.3 ± 11.2	<0.01	0.57
SOD (UI/gHb) [785-1570]	1338 ± 358	1378 ± 352	0.62	1286 ± 250	1313 ± 306	0.54	0.81
Lipid peroxidation (µmol/L) [<432]	645 ± 280	696 ± 356	0.40	636 ± 316	638 ± 337	0.97	0.55
LDLox (UI/L) [28-70]	59 ± 21	57 ± 16	0.77	61 ± 17	62 ± 16	0.68	0.48

Results are expressed in mean ± SD. In the first column, we specify the lower and upper limit of reference values obtained in a large healthy subject cohort. Definition of abbreviations: M=male/W=women; GSH=reduced glutathione; GSSG=oxidized glutathione; SOD=superoxide dismutase; GPx=peroxidase glutathione; LDL=oxidized low-density lipoprotein.

Table S4. Changes in histomorphological muscle parameters after exercise training combined with antioxidant supplementation or placebo

	PR placebo group (n=16)			PR antioxidant group (n=16)			
	Baseline	After interventions	Within-group evolution <i>P value</i>	Baseline	After interventions	Within-group evolution <i>P value</i>	Between group evolution <i>P value</i>
Muscle fiber type I %	42 ± 11	41 ± 10	0.65	36 ± 14	32 ± 16	0.41	0.69
Capillary to fiber ratio	1.81 ± 0.52	2.00 ± 0.65	0.14	1.68 ± 0.43	1.79 ± 0.37	0.44	0.66
Muscle type I fiber CSA (μm ²)	5673 ± 1712	4947 ± 1487	0.09	5299 ± 1911	5903 ± 2636	0.22	0.04
Muscle non type I fiber CSA (μm ²)	4456 ± 1779	4218 ± 1392	0.38	4310 ± 1519	5034 ± 1650	0.04	0.03
All muscle fiber CSA (μm ²)	5064 ± 1586	4582 ± 1306	0.15	4639 ± 1628	5284 ± 2184	0.10	0.03

Results are expressed in mean ± SD. Definition of abbreviations: CSA=cross sectional area (μm²)

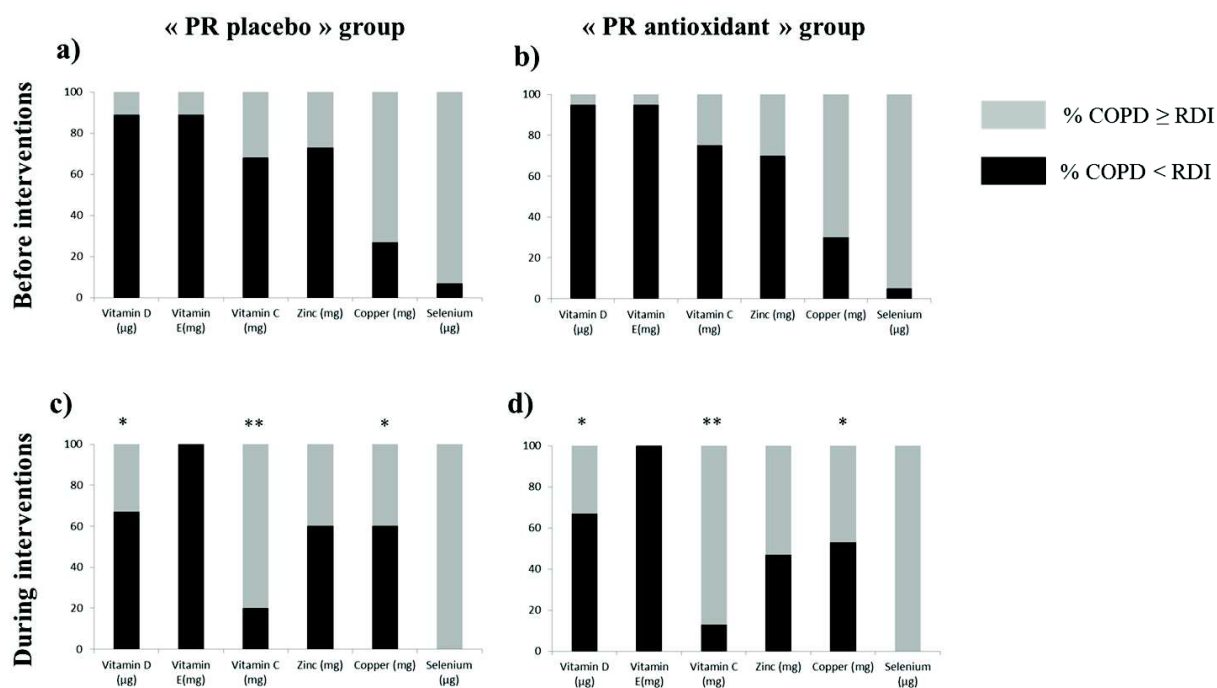


Figure S1. Quality of micronutrient intake in 36 COPD patients (18 in “PR placebo” and 18 in “PR antioxidant” group) before and during interventions. For each micronutrient, results showed the proportion of patients with COPD with dietary intake above (grey part) or below (dark part) recommendations. Recommended daily intake (RDI) were defined in function of gender. *: significant difference compared to data obtained before interventions with $p < 0.05$. **: significant difference compared to data obtained before interventions with $p < 0.01$.

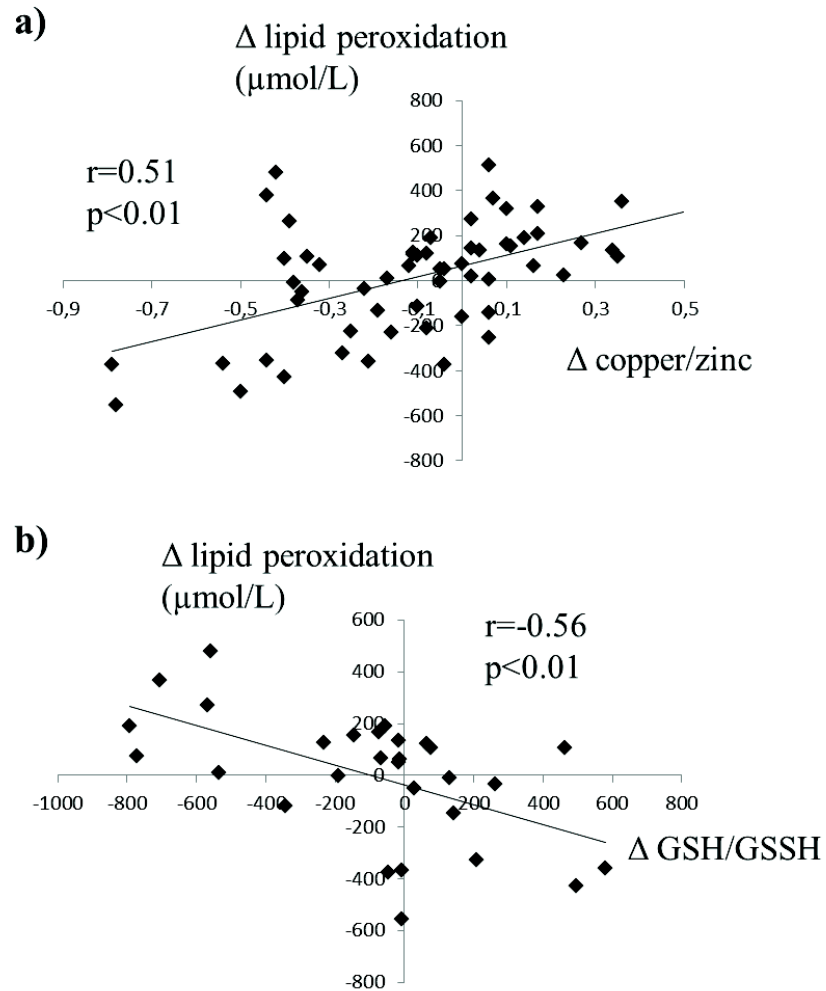


Figure S2. Relationships between changes in systemic lipid peroxidation and a) changes in systemic copper/zinc ratio and b) changes in systemic GSH/GSSG ratio a) Changes in systemic lipid peroxidation, expressed in $\mu\text{mol/L}$, was significantly and positively correlated with changes in copper/zinc ratio ($r=0.51$; $p<0.01$) in all COPD patients included in the study b) Systemic lipid peroxidation, expressed in $\mu\text{mol/L}$, was significantly and negatively correlated with changes in GSH/GSSG ratio ($r=-0.56$; $p<0.01$) only in “PR antioxidant” group.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'est inscrit dans la problématique générale de la caractérisation de l'atteinte musculaire périphérique et du stress oxydant chez les patients BPCO stables dans un contexte de réhabilitation respiratoire. Ainsi, nos objectifs étaient de caractériser l'hétérogénéité des marqueurs du stress oxydant et d'étudier les effets d'une supplémentation en antioxydants adaptée en proposant des marqueurs spécifiques de l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO stables.

Les principaux résultats de nos travaux ont montré, à travers une analyse globale (c'est à dire intégrant plus généralement toute la complexité du stress oxydant), que les principaux déficits en antioxydants chez les patients BPCO stables se situent au niveau de l'équilibre vitamine C/E, du zinc et du sélénium. Basé sur les principaux déficits identifiés et malgré l'importante hétérogénéité des réponses, nous avons montré qu'une supplémentation en antioxydants permettait d'optimiser les bénéfices d'un programme de réhabilitation respiratoire en améliorant la force du quadriceps, la consommation maximale d'O₂ à l'effort et la surface de section transversale des fibres musculaires de patients BPCO stables. Ces résultats nous apportent donc **un nouvel éclairage sur le rôle des antioxydants dans l'amélioration de l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO.**

De même, la définition de marqueurs spécifiques du stress oxydant et de l'atteinte musculaire périphérique nous a permis d'appréhender différents profils de patients BPCO et des valeurs de référence de la surface de section transversale des fibres musculaires déterminées dans notre seconde étude. Ces données constituent **de nouveaux arguments en faveur de l'hétérogénéité du stress oxydant et de l'atteinte musculaire périphérique dans la BPCO et d'une approche par phénotypes de patients.**

1) Antioxydants et atteinte musculaire périphérique : un nouvel éclairage dans la BPCO

Au cours de la revue de la littérature, nous avons vu que l'adaptation des suppléments en antioxydants en fonction des déficits est un élément indispensable à prendre en considération. L'absence d'identification précise des déficits en antioxydants dans la BPCO constituait jusqu'à présent une limite dans la mise en place de suppléments adaptés. Nous avons observé que près de 90% des patients BPCO stables inclus pour un programme de réhabilitation respiratoire ont un déséquilibre du système antioxydant. Ces

éléments questionnent donc le ***choix de la supplémentation en antioxydants à mettre en place au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire chez les patients BPCO.***

A notre connaissance, seuls Lavolette *et al.* (2010) ont testé l'efficacité d'un apport quotidien en « petit lait » au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire dans la BPCO (Lavolette *et al.* 2010). Basé sur les propriétés du « petit lait », cette étude visait plus spécifiquement une augmentation des quantités de GSH, ce qui n'a pas été obtenu. Cette absence d'augmentation du GSH peut expliquer les effets limités observés au niveau des paramètres de l'atteinte musculaire périphérique. Dans notre étude 1, les patients BPCO ne présentaient pas de déficits (i.e. par rapport à des valeurs de références établies chez une large cohorte de sujets sains) concernant la concentration de GSH systémique. Ces données remettent ainsi en question l'intérêt de la supplémentation utilisée dans l'étude de Lavolette *et al.* (2010). Nous avons par contre montré que les principaux déficits en antioxydants se situaient au niveau de l'équilibre vitamine C/E, du zinc et du sélénium. Face à la complexité du système antioxydant, une **supplémentation ciblant les déficits multiples en vitamines et oligo-éléments semble donc être un choix plus adapté.** La combinaison de plusieurs antioxydants permettrait d'agir de façon complémentaire à différents niveaux du système antioxydant en régulant la production d'EOR, les dommages oxydatifs cellulaires mais aussi d'augmenter l'activité des antioxydants enzymatiques.

L'autre point clé dans la conception d'une supplémentation en antioxydants est le **choix des doses** à utiliser. Dans la littérature, certaines études ont montré que des supplémentations à des doses élevées d'antioxydants non-enzymatiques (e.g. vitamines C et E) pouvaient induire des effets délétères en inhibant notamment les adaptations physiologiques liées à un entraînement chez des sujets sains âgés (Bjornsen *et al.* 2015 ; Paulsen *et al.* 2014). Répondant au principe d'hormèse, les voies de signalisations impliquées dans ces adaptations physiologiques à l'entraînement peuvent être régulées par les EOR (Gomez-Cabrera *et al.* 2008). Une adaptation des doses de supplémentation en antioxydants en fonction des déficits réels des patients est donc indispensable pour réguler et non supprimer la production d'EOR. Compte tenu de la faible amplitude des déficits en vitamines et oligo-éléments décrits dans notre 1^{ère} étude, nous avons donc pris le parti, dans ce projet, d'utiliser des **doses de supplémentation nutritionnelles** (cf. Méthodologie étude 3 p. 100). L'utilisation de ces doses nutritionnelles s'est avérée efficace puisque nous avons observé une amélioration des capacités antioxydantes systémiques et plus spécifiquement une augmentation des concentrations en vitamine E ainsi qu'un ratio GSH/GSSG inchangé suggérant une adaptation de l'activité du GSH et donc de la GPx.

D'un point de vue clinique, l'ensemble de ces observations re-questionne les modalités de prise en charge nutritionnelle des patients BPCO au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire. Une évolution des recommandations actuelles (Schols, 2013), intégrant une étape d'identification et une caractérisation systématique des déficits en antioxydants, paraît désormais indispensable. Une sensibilisation des professionnels de santé à cette démarche devrait permettre une orientation de nos pratiques vers une prise en compte de ces déficits par des conseils nutritionnels et/ou l'utilisation de compléments alimentaires.

Par ailleurs, les bénéfices fonctionnels observés suite à la supplémentation en antioxydants utilisée dans le présent travail de thèse témoignent aussi de l'intérêt de cette thérapeutique dans la BPCO. Cependant, d'un point de vue fondamental, les données disponibles dans la littérature ne permettent pas d'apporter de réponses claires à la question suivante : ***quels sont les mécanismes physiopathologiques de l'atteinte musculaire périphérique régulés par le stress oxydant dans la BPCO ?***

Les résultats de notre étude 3 permettent ainsi de cibler les voies de signalisations impliquées plus spécifiquement dans la force du quadriceps et la consommation maximale d'O₂ à l'effort.

Stress oxydant, force et masse musculaire : parmi les paramètres permettant d'améliorer la force du quadriceps, la masse musculaire est considérée comme un déterminant majeur et suscite un intérêt particulier dans la BPCO (Maltais *et al.* 2014 ; Gondin *et al.* 2005). Dans notre étude 3, la supplémentation en antioxydants a induit une augmentation spécifique de la surface de section transversale des fibres musculaires du quadriceps et plus particulièrement des fibres de type non I impliquées majoritairement dans la production de force (Botinelli *et al.* 1996). La surface de section transversale des fibres musculaires est déterminée par l'équilibre de la balance entre la dégradation et la synthèse des protéines (cf. 1^{ère} partie. II.2.b. p.32). D'un point de vue mécanistique, il a été montré chez l'animal qu'une augmentation de la production d'espèces oxygénées réactives induisait une stimulation des différentes voies de signalisation de la dégradation des protéines (Powers *et al.* 2012 ; Smuder *et al.* 2010). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une régulation de la production d'espèces oxygénées réactives suite à la supplémentation en antioxydant induirait une inhibition des voies de signalisation de la dégradation protéique. Par ailleurs, même si peu de données sont disponibles dans la littérature, l'hypothèse d'une augmentation de l'expression des voies de signalisation de la synthèse protéique n'est pas à exclure.

Dans un travail récent mené sur un modèle *in vitro* de culture cellulaire développé par notre équipe (Pomiès *et al.* 2015), nous avons montré que l'exposition de myotubes BPCO à la vitamine C induisait une réduction des taux d'espèces oxygénées réactives, des dommages oxydatifs cellulaires (e.g. les protéines carbonylées) et de l'expression des marqueurs des voies de signalisation de la dégradation protéique (e.g. Murf1 et FoxO1) (Pomiès *et al.*, soumis). De façon complémentaire, nous avons constaté que l'exposition de myotubes à l'H₂O₂ induisait les effets totalement inverses, confirmant les observations faites à partir des modèles animaux. A notre connaissance, ces résultats sont la première preuve démontrant un lien direct entre le stress oxydant et les mécanismes physiopathologiques de l'atrophie musculaire dans la BPCO, et permettent par ailleurs de clarifier certaines discordances observées dans la littérature (Gouzi *et al.* 2013 ; Fermoselle *et al.* 2012).

Stress oxydant et déterminants de la consommation maximale d'O₂ à l'effort : les mécanismes physiopathologiques régulés par le stress oxydant et impliqués dans l'amélioration des capacités oxydatives musculaires restent encore très largement discutés dans la littérature. Cette augmentation de la consommation maximale d'O₂ à l'effort peut être la résultante d'une amélioration de différents facteurs liés au métabolisme oxydatif au niveau musculaire (Betik et Hepple, 2008) : augmentation de la proportion de fibres de type I, de la capacité de diffusion musculaire de l'O₂, évaluée notamment par le ratio capillaires/fibres (Gouzi *et al.* 2013), et/ou de l'activité/biogenèse mitochondriale.

Dans notre étude 3, nous n'avons pas observé d'augmentation de la proportion des fibres de type I et du ratio capillaires/fibres suite à la supplémentation en antioxydants combinée à un programme de réhabilitation respiratoire. Ces données ne permettent donc pas d'impliquer le stress oxydant dans la régulation des mécanismes musculaires du remodelage typologique et de l'angiogenèse.

Basé sur le concept d'hormèse, nous pouvons émettre l'hypothèse que la supplémentation en antioxydants induirait une optimisation des bénéfices sur l'activité et de la biogenèse mitochondriale, phénomène précédemment décrit au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire (Puente-Maestu *et al.* 2003 ; Vogiatzis *et al.* 2010 ; Puente-Maestu *et al.* 2011). Comme cela a été démontré dans des modèles animaux, la régulation de la production d'espèces oxygénées réactives peut stimuler l'expression de certaines enzymes oxydatives (e.g. la citrate synthase) ou de facteurs de transcription tels que PGC1- α . (Jackson *et al.* 2015 ; Saint Pierre *et al.* 2006). La stimulation de ces voies de signalisation favorise l'activité, la biogenèse mitochondriale et donc la consommation maximale d'O₂. En tant que principale

source et cible des EOR, il est bien admis que la mitochondrie constitue une piste thérapeutique intéressante dans la BPCO (Meyer *et al.* 2013), justifiant d'autant plus l'intérêt de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, l'amélioration de la consommation maximale d'O₂ à l'effort peut être expliquée par des facteurs externes au muscle et notamment par l'augmentation du débit sanguin (Betik et Hepple, 2008). La régulation du débit sanguin, en particulier au niveau des muscles squelettiques, est principalement déterminée par la fonction vasculaire endothéliale (Richardson, 2003). Récemment, cette altération de la fonction vasculaire a été mise en lien avec le stress oxydant dans la BPCO (Ives *et al.* 2014). En effet, le stress oxydant peut entraîner un déséquilibre du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) réduisant ainsi sa biodisponibilité au niveau des cellules endothéliales, nécessaire à la vasodilatation (Munzel *et al.* 2005). Mais à ce jour, il n'y a pas de données sur la biodisponibilité du NO dans la BPCO. Cependant, une étude récente a montré qu'une supplémentation en antioxydants (i.e. vitamine C, E et acide α -lipoïque) induisait à court terme une augmentation du débit sanguin associé à une augmentation de la consommation d'O₂ au niveau musculaire chez des patients BPCO stables (Rossman *et al.* 2015).

Ainsi, même si nos résultats ne démontrent pas le lien direct entre le stress oxydant et les mécanismes physiopathologiques d'amélioration de la force du quadriceps et de la consommation maximale d'O₂ à l'effort, en nous appuyant sur les données actuelles de la littérature, nous pouvons émettre des hypothèses mécanistiques recevables. **L'élaboration de futures études visant à comprendre la régulation plus spécifique des voies de signalisations de l'équilibre synthèse/dégradation des protéines, de l'activité/biogenèse mitochondriale mais aussi de la fonction vasculaire dans la BPCO, constitue des perspectives de recherche intéressantes.**

De plus, comme précisé par Han *et al.* (2010), l'identification des mécanismes physiopathologiques constitue une étape indispensable dans l'optique d'une approche par phénotypes qui se développe actuellement dans la BPCO.

2) BPCO et hétérogénéité : de nouveaux arguments pour une approche par phénotypes

La BPCO se caractérise par une importante hétérogénéité que ce soit au niveau pulmonaire, musculaire et cellulaire. Cette hétérogénéité constitue un frein important dans

l'identification des différents mécanismes physiopathologiques de la maladie et dans la mise en place de thérapeutiques adaptées aux différentes atteintes. Pour répondre à cette problématique, la recherche permet de faire évoluer les concepts : passer d'une médecine « traditionnelle », considérant les patients BPCO dans leur ensemble, à une médecine « stratifiée », correspondant à une approche par phénotypes de patients (Agusti *et al.* 2015). Selon ces auteurs, cette étape d'identification et de caractérisation de sous-groupes de patients ayant des caractéristiques cliniques et cellulaires relativement homogènes, constitue une phase de transition indispensable pour aller vers une médecine « personnalisée » basée sur la biologie des systèmes (cf. Figure 30).

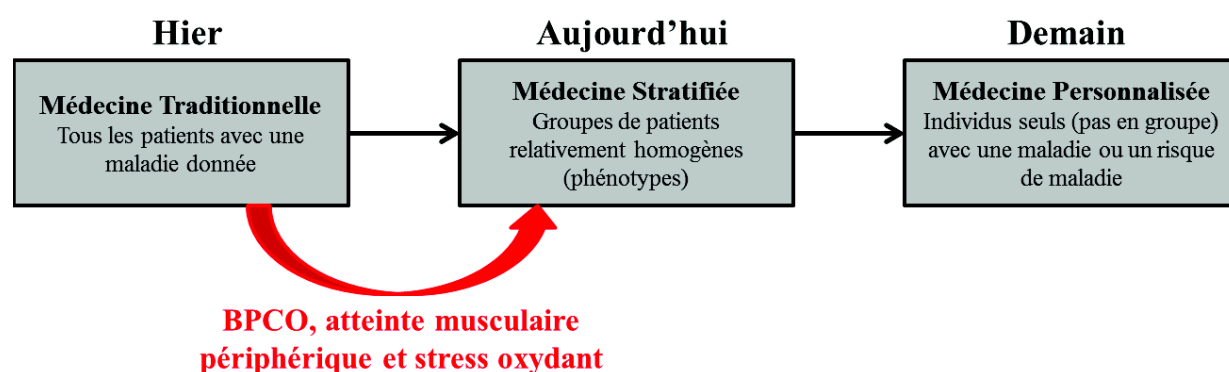


Figure 30. Evolution temporelle de la compréhension et de la prise en charge des maladies humaines. La flèche rouge correspond à la situation actuelle de la recherche concernant le stress oxydant et son rôle dans l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO (adapté d'Agusti *et al.* 2015).

Même si notre étude 3 est basée sur une approche globale, la démarche générale et les résultats rapportés au cours de ce travail de thèse participent à l'évolution de la prise en charge des patients BPCO vers une médecine « stratifiée ». Conscient de cette hétérogénéité, nos données contribuent à améliorer les connaissances, plus spécifiquement au niveau du stress oxydant et de l'atteinte musculaire périphérique.

Pour appréhender cette hétérogénéité dans la BPCO, l'analyse statistique réalisée au cours de notre 1^{ère} étude a notamment permis d'identifier un sous-groupe de femmes ayant une majoration du stress oxydant associée à une diminution de la tolérance à l'effort. Même si cette approche préliminaire nécessite une confirmation dans le cadre d'études futures, nos résultats apparaissent cohérents avec certains arguments de la littérature et soulèvent la question plus spécifique du rôle du genre dans la physiopathologie de la BPCO. Concernant

les marqueurs du stress oxydant, une majoration des dommages cellulaires oxydatifs chez les femmes par rapport aux hommes a été démontrée chez les sujets sains (Hakim *et al.* 2012 ; Brunelli *et al.* 2014). Cette majoration du stress oxydant chez les femmes constitue une piste potentielle dans les différences observées au niveau de l'atteinte pulmonaire. En effet, les femmes atteintes de BPCO semblent avoir une précocité et une évolution plus rapide que les hommes de la sévérité de l'obstruction bronchique (Vestbo *et al.* 2014). Cela peut être attribué au fait que les femmes BPCO ont une sensibilité plus importante aux effets délétères du tabac (i.e. source importante d'EOR), caractérisée par un VEMS plus altéré par rapport aux hommes et ce à même consommation tabagique (Dransfield *et al.* 2006). De plus, De Torres *et al.* (2005) ont montré qu'à même VEMS, les femmes BPCO avaient une tolérance à l'effort diminuée par rapport aux hommes. Au niveau de l'atteinte musculaire périphérique, peu de données sont disponibles dans la littérature. Il a été tout de même montré que la proportion de femmes présentant une diminution de la masse musculaire était plus élevée que celle des hommes (Natanek *et al.* 2013). Même si les caractéristiques physiopathologiques de l'atteinte musculaire périphérique ne semblent pas différer entre les femmes et les hommes BPCO (Torres *et al.* 2011), la possibilité de différences au niveau des profils des marqueurs du stress oxydant n'est pas à exclure. Malgré ces arguments, nous ne pouvons pas, à l'heure actuelle, parler de phénotypes spécifiques de femmes dans la BPCO. En effet, pour valider un phénotype de patients, l'observation de réponses différentielles et spécifiques à une thérapeutique (comme l'intervention mise en place dans le présent travail de thèse) constitue une étape indispensable. L'effet du genre n'étant pas l'objectif principal de ce projet, la taille de l'échantillon déterminée pour la 3^{ème} étude s'avère insuffisante pour pouvoir conforter spécifiquement cette observation.

Par ailleurs, bien que la supplémentation en antioxydants utilisée dans notre étude soit efficace et n'entraîne pas d'effets délétères, elle n'est pas optimale. Force est de constater que 35% des patients BPCO ayant reçu la supplémentation en antioxydants combinée au PR ne présentent aucune amélioration de la force du quadriceps, de la surface de section transversale des fibres musculaires et de la consommation maximale d'O₂ à l'effort (données non montrées dans l'étude 3). Ces données confortent l'idée de réponses différentielles à la supplémentation en antioxydants combinée à un programme de réhabilitation respiratoire et donc la nécessité d'identifier des phénotypes de patients BPCO afin d'ajuster la prise en charge des patients par des thérapeutiques adaptées. Pour mieux caractériser les différentes expressions de la BPCO,

la détermination de marqueurs spécifiques de l'atteinte musculaire périphérique mais aussi du stress oxydant est un prérequis nécessaire (Agusti *et al.* 2015).

Concernant l'atteinte musculaire périphérique, nous avons montré une augmentation uniquement de la surface de section transversale des fibres musculaires et non des paramètres généraux d'estimation de la masse musculaire suite à la supplémentation en antioxydants chez les patients BPCO. Sachant que la sensibilité à une thérapeutique est un critère indispensable pour la définition d'un biomarqueur (Morrow et De Lemos, 2007), la surface de section transversale des fibres musculaires apparaît ici comme un critère spécifique de l'atteinte musculaire et un marqueur pertinent pour la définition des phénotypes. D'ailleurs, une étude récente a proposé la mesure de la surface de section transversale des fibres musculaires comme seul marqueur sensible à l'atrophie musculaire chez les patients BPCO (Natanek *et al.* 2013). Nous nous sommes donc attachés à déterminer, dans le cadre de notre seconde étude, des équations permettant de définir les limites inférieures à la normale de la surface de section transversale des fibres musculaires du quadriceps à partir de données chez des sujets sains âgés (>40 ans). Cependant, comme argumenté par Gosker et Schols (2013) dans une « lettre à l'éditeur », l'utilisation de nos valeurs de référence présente certaines limites, notamment pour les patients BPCO ayant une faible proportion de fibres de type I. Même si nos données apportent un éclairage complémentaire dans la détermination de biomarqueurs de l'atteinte musculaire périphérique, il apparaît indispensable de faire évoluer ces valeurs de référence. Pour cela, l'inclusion d'un plus grand nombre de sujets sains, à travers une étude multicentrique, permettrait de mieux tenir compte de la variabilité des mesures de la surface de section transversale des fibres musculaires et donc d'optimiser les valeurs de référence.

Concernant le stress oxydant, il est clairement admis que l'utilisation d'un seul marqueur n'est pas suffisante pour apprécier l'ensemble des déséquilibres. Nous avons montré que les marqueurs évalués dans notre 1^{ère} étude permettaient de discriminer différents profils de patients BPCO avec des déficits en antioxydants et des dommages oxydatifs cellulaires spécifiques. Cependant, la démonstration aboutie de l'existence de différents phénotypes de patients doit certainement passer par le suivi d'une cohorte dans laquelle on s'attacherait à évaluer les réponses à une prise en charge individualisée du stress oxydant au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire. Toutefois, même si cette approche méthodologique complexe questionne la faisabilité expérimentale d'un tel projet, elle représente un véritable défi pour évoluer vers une médecine « personnalisée » intégrant l'approche de la biologie des systèmes (Agusti *et al.* 2015).

CONCLUSION GENERALE

Face à l'importante hétérogénéité à la fois du stress oxydant et de l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO, la mise en place d'approches complémentaires aux programmes de réhabilitation respiratoire paraît indispensable. Les effets bénéfiques que nous avons observé au niveau de la force, la masse musculaire ou encore la consommation maximale d'O₂ à l'effort, démontrent plus spécifiquement l'efficacité et donc l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants chez les patients BPCO stables. Même si de futures études sont encore nécessaires, nos données contribuent à améliorer nos connaissances sur le rôle du stress oxydant dans l'atteinte musculaire périphérique.

De plus, ce travail de thèse s'inscrit dans la dynamique de médecine stratifiée dans laquelle la notion d'adaptation des modalités de prise en charge constitue un concept clé. Ainsi, la caractérisation de l'hétérogénéité à la fois du stress oxydant et de l'atteinte musculaire périphérique au cours de nos travaux, ouvre la voie à des perspectives de recherche intéressantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Agacdiken A, Basyigit I, Ozden M, Yildiz F, Ural D, Maral H, Boyaci H, Ilgazli A, Komsuoglu B. The effects of antioxidants on exercise-induced lipid peroxidation in patients with COPD. *Respirology*. 2004 Mar;9(1):38-42.
- Agusti A, Sobradillo P, Celli B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 May 1;183(9):1129-37.
- Agusti A, Gea J, Faner R. Biomarkers, the control panel and personalized COPD medicine. *Respirology*. 2015 Jul 14.
- Alexandre F, Heraud N, Oliver N, Varray A. Cortical implication in lower voluntary muscle force production in non-hypoxemic COPD patients. *PLoS One*. 2014 Jun 27;9(6):e100961.
- Allaire J, Maltais F, Doyon JF, Noël M, LeBlanc P, Carrier G, Simard C, Jobin J. Peripheral muscle endurance and the oxidative profile of the quadriceps in patients with COPD. *Thorax*. 2004 Aug;59(8):673-8.
- Ambroise Martin, Apports nutritionnels conseillés pour la population française, Tec & Doc, 2000, 605.
- Amigo H, Erazo M, Oyarzún M, Bello S, Peruga A. [Smoking and chronic obstructive pulmonary disease: attributable risk determination]. *Rev Med Chil*. 2006 Oct;134(10):1275-82. Epub 2006 Dec 13.
- Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Mar;290(3):C844-51. Epub 2005 Oct 26.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(6):593-7.
- ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jul 1; 166(1):111-7.
- ATS/ACCP Statement on cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 211-277, 2003.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.

B

- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1464-76.
- Bailey DM, Lawrenson L, McEneny J, Young IS, James PE, Jackson SK, Henry RR, Mathieu-Costello O, McCord JM, Richardson RS. Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free Radic Res*. 2007 Feb;41(2):182-90.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):483-95.
- Barberà JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in COPD: old and new concepts. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2000 Dec;55(6):445-9.

- Barberà JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003 May;21(5):892-905.
- Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 2009 May;33(5):1165-85.
- Barreiro E, Gea J, Corominas JM, Hussain SN. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Dec;29(6):771-8. Epub 2003 Jun 19.
- Barreiro E, Gea J, Di Falco M, Kriazhev L, James S, Hussain SN. Protein carbonyl formation in the diaphragm. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Jan;32(1):9-17. Epub 2004 Oct 7.
- Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, Coronell C, Gea J; ENIGMA in COPD project. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax*. 2008 Feb;63(2):100-7. Epub 2007 Sep 17.
- Barreiro E, Rabinovich R, Marin-Corral J, Barberà JA, Gea J, Roca J. Chronic endurance exercise induces quadriceps nitrosative stress in patients with severe COPD. *Thorax*. 2009 Jan;64(1):13-9.
- Barreiro E, Hussain SN. Protein carbonylation in skeletal muscles: impact on function. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Mar;12(3):417-29.
- Barreiro E, Ferrer D, Sanchez F, Minguella J, Marin-Corral J, Martinez-Llorens J, Lloreta J, Gea J. Inflammatory cells and apoptosis in respiratory and limb muscles of patients with COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2011 Sep;111(3):808-17.
- Barreiro E. Protein carbonylation and muscle function in COPD and other conditions. *Mass Spectrom Rev*. 2014 May-Jun;33(3):219-36.
- Barry BK, Enoka RM. The neurobiology of muscle fatigue: 15 years later. *Integr Comp Biol*. 2007 Oct;47(4):465-73.
- Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, Maltais F. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Aug;158(2):629-34.
- Betik AC, Hepple RT. Determinants of VO₂ max decline with aging: an integrated perspective. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008 Feb;33(1):130-40.
- Biró G, Hulshof KF, Ovesen L, Amorim Cruz JA; EFCOSUM Group. Selection of methodology to assess food intake. *Eur J Clin Nutr*. 2002 May;56 Suppl 2:S25-32.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2007 Feb 28;297(8):842-57.
- Bjørnsen T, Salvesen S, Berntsen S, Hetlelid KJ, Stea TH, Lohne-Seiler H, Rohde G, Haraldstad K, Raastad T, Køpp U, Haugeberg G, Mansoor MA, Bastani NE, Blomhoff R, Stølevik SB, Seynnes OR, Paulsen G. Vitamin C and E supplementation blunts increases in total lean body mass in elderly men after strength training. *Scand J Med Sci Sports*. 2015 Jul 1.
- Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med*. 2008 Sep;5(3):218-28.
- Borghi-Silva A, Mendes RG, Trimer R, Oliveira CR, Fregonezi GA, Resqueti VR, Arena R, Sampaio-Jorge LM, Costa D. Potential effect of 6 versus 12-weeks of physical training on cardiac autonomic function and exercise capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2015 Apr;51(2):211-21. Epub 2014 Mar 5.
- Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Reggiani C. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J Physiol*. 1996 Sep 1;495.

- Bouزيد MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports Med.* 2015 Sep;45(9):1245-61.
- Brug J, Schols A, Mesters I. Dietary change, nutrition education and chronic obstructive pulmonary disease. *Patient Educ Couns.* 2004 Mar;52(3):249-57.
- Brunelli E, Domanico F, La Russa D, Pellegrino D. Sex differences in oxidative stress biomarkers. *Curr Drug Targets.* 2014;15(8):811-5.
- Bruno RS, Traber MG. Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking. *Pathophysiology.* 2006 Aug;13(3):143-9. Epub 2006 Jun 30.
- Burrows B, Fletcher CM, Heard BE, Jones NL, Wootliff JS. The emphysematous and bronchial types of chronic airways obstruction. A clinicopathological study of patients in London and Chicago. *Lancet.* 1966 Apr 16;1(7442):830-5.

C

- Caron MA, Debigaré R, Dekhuijzen PN, Maltais F. Comparative assessment of the quadriceps and the diaphragm in patients with COPD. *J Appl Physiol (1985).* 2009 Sep;107(3):952-61. 9.
- Celli BR, Decramer M, Wedzicha JA, Wilson KC, Agustí A, Criner GJ, MacNee W, Make BJ, Rennard SI, Stockley RA, Vogelmeier C, Anzueto A, Au DH, Barnes PJ, Burgel PR, Calverley PM, Casanova C, Clini EM, Cooper CB, Coxson HO, Dusser DJ, Fabbri LM, Fahy B, Ferguson GT, Fisher A, Fletcher MJ, Hayot M, Hurst JR, Jones PW, Mahler DA, Maltais F, Mannino DM, Martinez FJ, Miravittles M, Meek PM, Papi A, Rabe KF, Roche N, Sciurba FC, Sethi S, Siafakas N, Sin DD, Soriano JB, Stoller JK, Tashkin DP, Troosters T, Verleden GM, Verschakelen J, Vestbo J, Walsh JW, Washko GR, Wise RA, Wouters EF, ZuWallack RL;ATS/ERS Task Force for COPD Research. An official american thoracic society/european respiratory society statement: research questions in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Apr 1;191(7):e4-e27.
- Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 Mar 4; 350(10):1005-12.
- Chi H, Flavell RA. Acetylation of MKP-1 and the control of inflammation. *Sci Signal.* 2008 Oct 14;1(41):pe44.
- Clark BC, Manini TM. Sarcopenia $\neq$ dynapenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008 Aug;63(8):829-34.
- Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM, Holloszy JO. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol (1985).* 1992 May;72(5):1780-6.
- Constantin D, Menon MK, Houchen-Wolloff L, Morgan MD, Singh SJ, Greenhaff P, Steiner MC. Skeletal muscle molecular responses to resistance training and dietary supplementation in COPD. *Thorax.* 2013 Jul;68(7):625-33.
- Costes F, Gosker H, Feasson L, Desgeorges M, Kelders M, Castells J, Schols A, Freyssenet D. Impaired exercise training-induced muscle fiber hypertrophy and Akt/mTOR pathway activation in hypoxemic patients with COPD. *J Appl Physiol (1985).* 2015 Apr 15;118(8):1040-9.

- Couillard A, Koechlin C, Cristol JP, Varray A, Prefaut C. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J*. 2002 Nov;20(5):1123-9.
- Couillard A, Maltais F, Saey D, Debigaré R, Michaud A, Koechlin C, LeBlanc P, Préfaut C. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jun 15;167(12):1664-9. Epub 2003 Apr 2.
- Couillard A, Prefaut C. From muscle disuse to myopathy in COPD: potential contribution of oxidative stress. *Eur Respir J*. 2005 Oct;26(4):703-19.
- Crul T, Testelmans D, Spruit MA, Troosters T, Gosselink R, Geeraerts I, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Gene expression profiling in vastus lateralis muscle during an acute exacerbation of COPD. *Cell Physiol Biochem*. 2010;25(4-5):491-500.

D

- Daga MK, Chhabra R, Sharma B, Mishra TK. Effects of exogenous vitamin E supplementation on the levels of oxidants and antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *J Biosci*. 2003 Feb;28(1):7-11.
- Dhakal N, Lamsal M, Baral N, Shrestha S, Dhakal SS, Bhatta N, Dubey RK. Oxidative stress and nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Diagn Res*. 2015 Feb;9(2):BC01-4.
- De Batlle J, Barreiro E, Romieu I, Mendez M, Gómez FP, Balcells E, Ferrer J, Orozco-Levi M, Gea J, Antó JM, Garcia-Aymerich J. Dietary modulation of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Free Radic Res*. 2010 Nov;44(11):1296-303.
- De Torres JP, Casanova C, Hernández C, Abreu J, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and COPD in patients attending a pulmonary clinic. *Chest*. 2005 Oct;128(4):2012-6.
- Debigaré R, Maltais F, Côté CH, Michaud A, Caron MA, Mofarrahi M, Leblanc P, Hussain SN. Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD*. 2008 Apr;5(2):75-84.
- Debigaré R, Côté CH, Maltais F. Ubiquitination and proteolysis in limb and respiratory muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 Feb;7(1):84-90.
- Decramer M, Lacquet LM, Fagard R, Rogiers P. Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Jul;150(1):11-6.
- Decramer M, Gosselink R, Troosters T, Verschueren M, Evers G. Muscle weakness is related to utilization of health care resources in COPD patients. *Eur Respir J*. 1997 Feb;10(2):417-23.
- Decramer M, Rutten-van Mölken M, Dekhuijzen PN, Troosters T, van Herwaarden C, Pellegrino R, van Schayck CP, Olivieri D, Del Donno M, De Backer W, Lankhorst I, Ardia A. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005 Apr 30-May 6;365(9470):1552-60.
- Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2012 Apr 7;379(9823):1341-51.

- Degens H, Gayan-Ramirez G, van Hees HW. Smoking-induced skeletal muscle dysfunction: from evidence to mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Mar 15;191(6):620-5.
- Delamplé D, Durand F, Severac A, Belghith M, Mas E, Michel F, Cristol JP, Hayot M, Prefaut C. Implication of xanthine oxidase in muscle oxidative stress in COPD patients. *Free Radic Res*. 2008 Sep;42(9):807-14.
- Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1978 Dec;45(6):927-32.
- Doucet M, Russell AP, Léger B, Debigaré R, Joanisse DR, Caron MA, LeBlanc P, Maltais F. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Aug 1;176(3):261-9. Epub 2007 May 3.
- Dransfield MT, Davis JJ, Gerald LB, Bailey WC. Racial and gender differences in susceptibility to tobacco smoke among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2006 Jun;100(6):1110-6.
- Dunn SE, Chin ER, Michel RN. Matching of calcineurin activity to upstream effectors is critical for skeletal muscle fiber growth. *J Cell Biol*. 2000 Oct 30;151(3):663-72.

E

- Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR; Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 1;182(5):693-718.
- Ekeowa UI, Gooptu B, Belorgey D, Hägglöf P, Karlsson-Li S, Miranda E, Pérez J, MacLeod I, Kroger H, Marciniak SJ, Crowther DC, Lomas DA. alpha1-Antitrypsin deficiency, chronic obstructive pulmonary disease and the serpinopathies. *Clin Sci (Lond)*. 2009 May 14;116(12):837-50.
- Eliason G, Abdel-Halim SM, Piehl-Aulin K, Kadi F. Alterations in the muscle-to-capillary interface in patients with different degrees of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2010 Jul 15;11:97.
- Elokda AS, Nielsen DH. Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007 Oct;14(5):630-7.
- Evans RA, Kaplovitch E, Beauchamp MK, Dolmage TE, Goldstein RS, Gillies CL, Brooks D, Mathur S. Is quadriceps endurance reduced in COPD? a systematic review. *Chest*. 2015 Mar;147(3):673-84.
- Eves ND, Sandmeyer LC, Wong EY, Jones LW, MacDonald GF, Ford GT, Petersen SR, Bibeau MD, Jones RL. Helium-hyperoxia: a novel intervention to improve the benefits of pulmonary rehabilitation for patients with COPD. *Chest*. 2009 Mar;135(3):609-18.

F

- Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1995 Oct 27;270(43):25557-63.
- Fermoselle C, Rabinovich R, Ausín P, Puig-Vilanova E, Coronell C, Sanchez F, Roca J, Gea J, Barreiro E. Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? *Eur Respir J*. 2012 Oct;40(4):851-62. Epub 2012 Mar 9.
- Fisher-Wellman K, Bell HK, Bloomer RJ. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 Jan-Mar;2(1):43-51.
- Filipe PM, Fernandes AC, Manso CF. Effects of zinc on copper-induced and spontaneous lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res*. 1995 Jan-Mar;47(1-3):51-6.
- Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*. 1977 Jun 25;1(6077):1645-8.
- Franssen FM, Broekhuizen R, Janssen PP, Wouters EF, Schols AM. Effects of whole-body exercise training on body composition and functional capacity in normal-weight patients with COPD. *Chest*. 2004 Jun;125(6):2021-8.
- Franssen FM, Broekhuizen R, Janssen PP, Wouters EF, Schols AM. Limb muscle dysfunction in COPD: effects of muscle wasting and exercise training. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Jan;37(1):2-9.
- Franssen FM, Rutten EP, Groenen MT, Vanfleteren LE, Wouters EF, Spruit MA. New reference values for body composition by bioelectrical impedance analysis in the general population: results from the UK Biobank. *J Am Med Dir Assoc*. 2014 Jun;15(6):448.e1-6.

G

- Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004 Jul;59(7):574-80.
- Gan WQ, Man SF, Postma DS, Camp P, Sin DD. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res*. 2006 Mar 29;7:52.
- Garcia-Rio F, Lores V, Mediano O, Rojo B, Hernanz A, López-Collazo E, Alvarez-Sala R. Daily physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease is mainly associated with dynamic hyperinflation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Sep 15;180(6):506-12.
- Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2003 Jul 15;189(1-2):147-63.
- Garrod R, Ford K, Daly C, Hoareau C, Howard M, Simmonds C. Pulmonary rehabilitation: analysis of a clinical service. *Physiother Res Int*. 2004;9(3):111-20.
- Gea J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Ferrer A, Broquetas J. Structural and functional changes in the skeletal muscles of COPD patients: the "compartments" theory. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2001 Jun;56(3):214-24.
- Gea J, Agustí A, Roca J. Pathophysiology of muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2013 May;114(9):1222-34.

- Geddes EL, O'Brien K, Reid WD, Brooks D, Crowe J. Inspiratory muscle training in adults with chronic obstructive pulmonary disease: an update of a systematic review. *Respir Med*. 2008 Dec;102(12):1715-29.
- Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:756132.
- Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*. 2005 Aug 15;567(Pt 1):113-20. Epub 2005 Jun 2.
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):126-31.
- Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Cabo H, Ferrando B, Viña J. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? *Free Radic Biol Med*. 2015 Sep;86:37-46.
- Gondin J, Guede M, Ballay Y, Martin A. Electromyostimulation training effects on neural drive and muscle architecture. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Aug;37(8):1291-9.
- Gosker HR, Engelen MP, van Mameren H, van Dijk PJ, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM. Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. 2002 Jul;76(1):113-9.
- Gosker HR, Bast A, Haenen GR, Fischer MA, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM. Altered antioxidant status in peripheral skeletal muscle of patients with COPD. *Respir Med*. 2005 Jan;99(1):118-25.
- Gosker HR, Schrauwen P, Broekhuizen R, Hesselink MK, Moonen-Kornips E, Ward KA, Franssen FM, Wouters EF, Schols AM. Exercise training restores uncoupling protein-3 content in limb muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 May;290(5):E976-81. Epub 2005 Dec 13.
- Gosker HR, Hesselink MK, Duimel H, Ward KA, Schols AM. Reduced mitochondrial density in the vastus lateralis muscle of patients with COPD. *Eur Respir J*. 2007 Jul;30(1):73-9. Epub 2007 Apr 11.
- Gosker HR, Langen RC, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG, Steele C, Ward KA, Wouters EF, Schols AM. Extrapulmonary manifestations of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Jun;40(6):710-6.
- Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Distribution of muscle weakness in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm Rehabil*. 2000 Nov-Dec;20(6):353-60.
- Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Roudier E, de Rigal P, Molinari N, Laoudj-Chenivresse D, Mercier J, Birot O, Hayot M. Blunted muscle angiogenic training-response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J*. 2013 Apr;41(4):806-14.
- Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Vuillemin A, Molinari N, Ninot G, Caris G, Hayot M. Evidence of an early physical activity reduction in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Arch Phys Med Rehabil*. 2011 Oct;92(10):1611-1617.e2.
- Gouzi F, Abdellaoui A, Molinari N, Pinot E, Ayoub B, Laoudj-Chenivresse D, Cristol JP, Mercier J, Hayot M, Préfaut C. Fiber atrophy, oxidative stress, and oxidative fiber reduction are the attributes of different phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease patients. *J Appl Physiol (1985)*. 2013 Dec;115(12):1796-805.
- Grant I, Heaton RK, McSweeney AJ, Adams KM, Timms RM. Neuropsychologic findings in hypoxemic chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med*. 1982 Aug;142(8):1470-6.

- Green HJ, Bombardier E, Burnett M, Iqbal S, D'Arsigny CL, O'Donnell DE, Ouyang J, Webb KA. Organization of metabolic pathways in vastus lateralis of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Sep;295(3):R935-41.
- Gross M, Baum O. Supplemental Antioxidants and Adaptation to Physical Training. *Antioxidants in Sport Nutrition*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2015. Chapter 7.
- Gumral N, Naziroglu M, Ongel K, Beydilli ED, Ozguner F, Sutcu R, Caliskan S, Akkaya A. Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods. *Cell Biochem Funct*. 2009 Jul;27(5):276-83.
- Guo Y, Gosker HR, Schols AM, Kapchinsky S, Bourbeau J, Sandri M, Jagoe RT, Debigaré R, Maltais F, Taivassalo T, Hussain SN. Autophagy in locomotor muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Dec 1;188(11):1313-20.

H

- HajGhanbari B, Hamarneh G, Changizi N, Ward AD, Reid WD. MRI-based 3D shape analysis of thigh muscles patients with chronic obstructive pulmonary disease versus healthy adults. *Acad Radiol*. 2011 Feb;18(2):155-66.
- Hakim IA, Harris R, Garland L, Cordova CA, Mikhael DM, Sherry Chow HH. Gender difference in systemic oxidative stress and antioxidant capacity in current and former heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Dec;21(12):2193-200. Epub 2012 Oct 2.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle,J.P. [Oxidative stress]. *Rev. Med. Liege* 62:628–638; 2007.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):1147-50.
- Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, Macnee W, Make BJ, Rabe KF, Rennard SI, Sciurba FC, Silverman EK, Vestbo J, Washko GR, Wouters EF, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 1; 182(5):598-604.
- Hawley JA. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009 Jun;34(3):355-61.
- Hayot M, Rodriguez J, Vernus B, Carnac G, Jean E, Allen D, Goret L, Obert P, Candau R, Bonniou A. Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Jan 30;332(1-2):38-47.
- Hegner SP, Breitkreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML, Dröge W. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol*. 2000 Oct 15;165(8):4319-28.
- Hepple RT, Hogan MC, Stary C, Bebout DE, Mathieu-Costello O, Wagner PD. Structural basis of muscle O₂ diffusing capacity: evidence from muscle function in situ. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Feb;88(2):560-6.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré . The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004 Jun 24;350(26):2645-53.

- Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:435-59.
- Hoppeler H, Baum O, Lurman G, Mueller M. Molecular mechanisms of muscle plasticity with exercise. *Compr Physiol*. 2011 Jul;1(3):1383-412.
- Hortobágyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, Lambert J, Dohm L. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol*. 2000 Apr 1;524 Pt 1:293-304.
- Hvidsten SC, Storesund L, Wentzel-Larsen T, Gulsvik A, Lehmann S. Prevalence and predictors of undiagnosed chronic obstructive pulmonary disease in a Norwegian adult general population. *Clin Respir J*. 2010 Jan;4(1):13-21.

I

- Iepsen UW, Jørgensen KJ, Ringbaek T, Hansen H, Skrubbeltrang C, Lange P. A Systematic Review of Resistance Training Versus Endurance Training in COPD. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2015 May-Jun;35(3):163-72.
- Ismail M, Hossain MF, Tanu AR, Shekhar HU. Effect of spirulina intervention on oxidative stress, antioxidant status, and lipid profile in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Biomed Res Int*. 2015;2015:486120.
- Ives SJ, Harris RA, Witman MA, Fjeldstad AS, Garten RS, McDaniel J, Wray DW, Richardson RS. Vascular dysfunction and chronic obstructive pulmonary disease: the role of redox balance. *Hypertension*. 2014 Mar;63(3):459-67.

J

- Jackson MJ. Redox regulation of muscle adaptations to contractile activity and aging. *J Appl Physiol (1985)*. 2015 Aug 1;119(3):163-71.
- Janssen I, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Ross R. Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis. *J Appl Physiol (1985)*. 2000 Aug;89(2):465-71.
- Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*. 1995 Jun; 18(6):1079-86.
- Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):142-52.
- Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79.
- Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct; 295(4):C849-68.
- Jones SE, Maddocks M, Kon SS, Canavan JL, Nolan CM, Clark AL, Polkey MI, Man WD. Sarcopenia in COPD: prevalence, clinical correlates and response to pulmonary rehabilitation. *Thorax*. 2015 Mar;70(3):213-8.

K

- Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice

- have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):41114-23. Epub 2004 Jul 21.
- Karadag F, Cildag O, Altinisik M, Kozaci LD, Kiter G, Altun C. Trace elements as a component of oxidative stress in COPD. *Respirology*. 2004 Mar;9(1):33-7.
- Karakas E, Yildizhan M, Karakas O, Boyaci FN, Cullu N, Cece H, Yildiz S, Sak ZH. Examining cerebral metabolic abnormalities in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients by localized proton magnetic resonance spectroscopy (MRS). *Clin Ter*. 2013 May-Jun;164(3):e179-82.
- Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev*. 1998 Apr;3(2):114-27.
- Keranis E, Makris D, Rodopoulou P, Martinou H, Papamakarios G, Daniil Z, Zintzaras E, Gourgoulis KI. Impact of dietary shift to higher-antioxidant foods in COPD: a randomised trial. *Eur Respir J*. 2010 Oct;36(4):774-80.
- Killian KJ, Leblanc P, Martin DH, Summers E, Jones NL, Campbell EJ. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Oct;146(4):935-40.
- King DA, Cordova F, Scharf SM. Nutritional aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 May 1;5(4):519-23.
- Kirkil G, Hamdi Muz M, Seçkin D, Sahin K, Küçük O. Antioxidant effect of zinc picolinate in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2008 Jun;102(6):840-4.
- Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM, Karp DD, Lieber MM, Walther PJ, Klotz L, Parsons JK, Chin JL, Darke AK, Lippman SM, Goodman GE, Meyskens FL Jr, Baker LH. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2011 Oct 12;306(14):1549-56.
- Koechlin C, Couillard A, Simar D, Cristol JP, Bellet H, Hayot M, Préfaut C. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 1; 169(9):1022-7.
- Koechlin C, Maltais F, Saey D, Michaud A, LeBlanc P, Hayot M, Préfaut C. Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005 Oct;60(10):834-41. Epub 2005 Jun 17.
- Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand*. 1991 Aug;142(4):527-8.

L

- Lambert CP, Evans WJ. Effects of aging and resistance exercise on determinants of muscle strength. *J Am Aging Assoc*. 2002 Apr;25(2):73-8.
- Lamprecht M, Greilberger J, Oetl K. Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *Nutrition*. 2004 Jul-Aug;20(7-8):728-30.
- Langen RC, Gosker HR, Remels AH, Schols AM. Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Oct;45(10):2245-56.
- Laviolette L, Lands LC, Dauletbaev N, Saey D, Milot J, Provencher S, LeBlanc P, Maltais F. Combined effect of dietary supplementation with pressurized whey and exercise training in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, controlled, double-blind pilot study. *Med Food*. 2010 Jun;13(3):589-98.

- Leenders M, Verdijk LB, van der Hoeven L, van Kranenburg J, Nilwik R, van Loon LJ. Elderly men and women benefit equally from prolonged resistance-type exercise training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013 Jul;68(7):769-79.
- Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol*. 1997 Jan;272(1 Pt 2):R363-9.
- Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torreilles J. [Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1998 May-Jun;56(3):305-19.
- Lemire BB, Debigaré R, Dubé A, Thériault ME, Côté CH, Maltais F. MAPK signaling in the quadriceps of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol (1985)*. 2012 Jul;113(1):159-66.
- Levine SA and Kidd PM. Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California. Eds A. Biocurrents division, Allergy Research Group, 1996.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002 May 1;32(9):790-6.
- Levine S, Bashir MH, Clanton TL, Powers SK, Singhal S. COPD elicits remodeling of the diaphragm and vastus lateralis muscles in humans. *J Appl Physiol (1985)*. 2013 May;114(9):1235-45.
- Lewis MI, Fournier M, Storer TW, Bhasin S, Porszasz J, Ren SG, Da X, Casaburi R. Skeletal muscle adaptations to testosterone and resistance training in men with COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2007 Oct;103(4):1299-310. Epub 2007 Aug 2.
- Lin YC, Wu TC, Chen PY, Hsieh LY, Yeh SL. Comparison of plasma and intake levels of antioxidant nutrients in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy people in Taiwan: a case-control study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010;19(3):393-401.
- Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax*. 2006 Nov;61(11):935-9.
- Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M, Rönmark E, Jonsson AC, Jönsson E, Larsson LG, Andersson S, Sandström T, Larsson K; Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. Not 15 but 50% of smokers develop COPD?-Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med*. 2003 Feb;97(2):115-22.
- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012;2012:736837.

M

- MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med*. 2001 Feb;7(2):55-62.
- Macchia A, Monte S, Romero M, D'Ettorre A, Tognoni G. The prognostic influence of chronic obstructive pulmonary disease in patients hospitalised for chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2007 Sep;9(9):942-8. Epub 2007 Jul 12.
- Mador M, Kufel TJ, Pineda L. Quadriceps fatigue after cycle exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):447-53.
- Mador MJ, Bozkanat E, Kufel TJ. Quadriceps fatigue after cycle exercise in patients with COPD compared with healthy control subjects. *Chest*. 2003 Apr;123(4):1104-11.

- Mador MJ, Bozkanat E, Aggarwal A, Shaffer M, Kufel TJ. Endurance and strength training in patients with COPD. *Chest*. 2004 Jun;125(6):2036-45.
- Mador MJ, Krauza M, Shaffer M. Effect of exercise training in patients with chronic obstructive pulmonary disease compared with healthy elderly subjects. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2012 May-Jun;32(3):155-62.
- Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, Elliott M, Singh A, Chen L, Zhuang X, Hogg J, Pare P, Tudor RM, Biswal S. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Sep 15;178(6):592-604.
- Maltais F, LeBlanc P, Whittom F, Simard C, Marquis K, Bélanger M, Breton MJ, Jobin J. Oxidative enzyme activities of the vastus lateralis muscle and the functional status in patients with COPD. *Thorax*. 2000 Oct;55(10):848-53.
- Maltais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigaré R, Dekhuijzen PN, Franssen F, Gayan-Ramirez G, Gea J, Gosker HR, Gosselink R, Hayot M, Hussain SN, Janssens W, Polkey MI, Roca J, Saey D, Schols AM, Spruit MA, Steiner M, Taivassalo T, Troosters T, Vogiatzis I, Wagner PD; ATS/ERS Ad Hoc Committee on Limb Muscle Dysfunction in COPD. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 May 1;189(9):e15-62.
- Man WD, Hopkinson NS, Harraf F, Nikolettou D, Polkey MI, Moxham J. Abdominal muscle and quadriceps strength in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005 Sep;60(9):718-22. Epub 2005 May 27.
- Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr*. 2003 Apr;22(2):147-56.
- Margaritis I, Rousseau AS. Does physical exercise modify antioxidant requirements? *Nutr Res Rev*. 2008 Jun;21(1):3-12.
- Marquis K, Debigaré R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, Maltais F. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Sep 15;166(6):809-13.
- Marquis N, Debigaré R, Bouyer L, Saey D, Laviolette L, Brouillard C, Maltais F. Physiology of walking in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Aug;41(8):1540-8.
- Mathur S, Brooks D, Carvalho CR. Structural alterations of skeletal muscle in copd. *Front Physiol*. 2014 Mar 19;5:104.
- May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med*. 2000 May 1;28(9):1421-9.
- McCarthy B, Casey D, Devane D, Murphy K, Murphy E, Lacasse Y. Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb 23;2:CD003793.
- McClung JM, Judge AR, Talbert EE, Powers SK. Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Feb;296(2):C363-71.
- McKeever TM, Lewis SA, Cassano PA, Ocké M, Burney P, Britton J, Smit HA. The relation between dietary intake of individual fatty acids, FEV1 and respiratory disease in Dutch adults. *Thorax*. 2008 Mar;63(3):208-14. Epub 2007 Sep 27.
- McKenna MJ, Medved I, Goodman CA, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, Petersen AC, Sostaric S, Gong X. N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na⁺,K⁺-pump

- activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J Physiol*. 2006 Oct 1;576(Pt 1):279-88. Epub 2006 Jul 13.
- Medved I, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, Petersen AC, Sostaric S, Gong X, McKenna MJ. N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J Appl Physiol* (1985). 2004 Oct;97(4):1477-85. Epub 2004 Jun 11.
- Menon MK, Houchen L, Singh SJ, Morgan MD, Bradding P, Steiner MC. Inflammatory and satellite cells in the quadriceps of patients with COPD and response to resistance training. *Chest*. 2012 Nov;142(5):1134-42.
- Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol*. 2004 Apr;8(2):162-8.
- Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*. 2005 Jan 4;142(1):37-46. Epub 2004 Nov 10.
- Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation*. 2007 Feb 27;115(8):949-52.
- Mostert R, Goris A, Weling-Scheepers C, Wouters EF, Schols AM. Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2000 Sep;94(9):859-67.
- Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med*. 2013 Aug 1;369(5):448-57.

N

- Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*. 2005 Feb;29(1):23-32.
- Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Effect of vitamin E supplementation with standard treatment on oxidant-antioxidant status in chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Med Res*. 2008 Dec;128(6):705-11.
- Natanek SA, Gosker HR, Slot IG, Marsh GS, Hopkinson NS, Man WD, Tal-Singer R, Moxham J, Kemp PR, Schols AM, Polkey MI. Heterogeneity of quadriceps muscle phenotype in chronic obstructive pulmonary disease (COPD); implications for stratified medicine? *Muscle Nerve*. 2013 Oct;48(4):488-97.

O

- Oba T, Koshita M, Yamaguchi M. H₂O₂ modulates twitch tension and increases P_o of Ca²⁺ release channel in frog skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1996 Sep;271(3 Pt 1):C810-8.
- Odencrants S, Bjuström T, Wiklund N, Blomberg K. Nutritional status, gender and marital status in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Nurs*. 2013 Oct;22(19-20):2822-9.
- O'Donnell DE, Lam M, Webb KA. Measurement of symptoms, lung hyperinflation, and endurance during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1557-65.
- Ortega F, Toral J, Cejudo P, Villagomez R, Sánchez H, Castillo J, Montemayor T. Comparison of effects of strength and endurance training in patients with chronic

- obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Sep 1;166(5):669-74.
- O'Shea SD, Taylor NF, Paratz JD. Progressive resistance exercise improves muscle strength and may improve elements of performance of daily activities for people with COPD: a systematic review. *Chest*. 2009 Nov;136(5):1269-83.

P

- Pannala VR, Bazil JN, Camara AK, Dash RK. A mechanistic mathematical model for the catalytic action of glutathione peroxidase. *Free Radic Res*. 2014 Apr;48(4):487-502.
- Passerieux E, Hayot M, Jaussent A, Carnac G, Gouzi F, Pillard F, Picot MC, Böcker K, Hugon G, Pincemail J, Defraigne JO, Verrips T, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Free Radic Biol Med*. 2014 Sep 19.
- Paulsen G, Cumming KT, Holden G, Hallén J, Rønnestad BR, Sveen O, Skaug A, Paur I, Bastani NE, Østgaard HN, Buer C, Midttun M, Freuchen F, Wiig H, Ulseth ET, Garthe I, Blomhoff R, Benestad HB, Raastad T. Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial. *J Physiol*. 2014 Apr 15;592(Pt 8):1887-901.
- Peinado VI, Barberá JA, Abate P, Ramírez J, Roca J, Santos S, Rodriguez-Roisin R. Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 May;159(5 Pt 1):1605-11.
- Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, Sapsford RJ, Müllerova H, Donaldson GC, Wedzicha JA. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J*. 2007 Mar;29(3):527-34. Epub 2006 Nov 15.
- Petersen AC, McKenna MJ, Medved I, Murphy KT, Brown MJ, Della Gatta P, Cameron-Smith D. Infusion with the antioxidant N-acetylcysteine attenuates early adaptive responses to exercise in human skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012 Mar;204(3):382-92.
- Picard M, Godin R, Sinnreich M, Baril J, Bourbeau J, Perrault H, Taivassalo T, Burelle Y. The mitochondrial phenotype of peripheral muscle in chronic obstructive pulmonary disease: disuse or dysfunction? *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Nov 15;178(10):1040-7.
- Pincemail J, Ricour C, Defraigne JO, Petermans J. [Oxidative stress, antioxidants and the ageing process]. *Rev Med Liege*. 2014 May-Jun;69(5-6):270-5.
- Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, Collette G, Haleng J, Cheramy-Bien JP, Charlier C, Chapelle JP, Giet D, Albert A, Limet R, Defraigne JO. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40-48 years from the ELAN study in the province of Liege, Belgium. *Hum Reprod*. 2007 Aug;22(8):2335-43.
- Pinho RA, Chiesa D, Mezzomo KM, Andrades ME, Bonatto F, Gelain D, Dal Pizzol F, Knorst MM, Moreira JC. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. *Respir Med*. 2007 Aug;101(8):1830-5. Epub 2007 Mar 26.

- Pison CM, Cano NJ, Chérion C, Caron F, Court-Fortune I, Antonini MT, Gonzalez-Bermejo J, Meziane L, Molano LC, Janssens JP, Costes F, Wuyam B, Similowski T, Melloni B, Hayot M, Augustin J, Tardif C, Lejeune H, Roth H, Pichard C; IRAD Investigators. Multimodal nutritional rehabilitation improves clinical outcomes of malnourished patients with chronic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Thorax*. 2011 Nov;66(11):953-60.
- Pitta F, Troosters T, Spruit MA, Probst VS, Decramer M, Gosselink R. Characteristics of physical activities in daily life in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 May 1;171(9):972-7. Epub 2005 Jan 21.
- Plant PJ, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, Correa J, Pearce D, Binnie M, Batt J. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Apr;42(4):461-71.
- Polidori MC, Cherubini A, Senin U, Mecocci P. Peripheral non-enzymatic antioxidant changes with human aging: a selective status report. *Biogeront* 2001: 99–104.
- Pomiès P, Rodriguez J, Blaquièrre M, Sedraoui S, Gouzi F, Carnac G, Laoudj-Chenivresse D, Mercier J, Préfaut C, Hayot M. Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J Cell Mol Med*. 2015 Jan;19(1):175-86.
- Poulain M, Durand F, Palomba B, Ceugniet F, Desplan J, Varray A, Préfaut C. 6-minute walk testing is more sensitive than maximal incremental cycle testing for detecting oxygen desaturation in patients with COPD. *Chest*. 2003 May;123(5):1401-7.
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1994 Feb;266(2 Pt 2):R375-80.
- Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*. 1999 Nov;58(4):1025-33.
- Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol (1985)*. 2007 Jun;102(6):2389-97. Epub 2007 Feb 8.
- Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1243-76.
- Powers SK, Smuder AJ, Criswell DS. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Nov 1;15(9):2519-28.
- Puente-Maestu L, Tena T, Trascasa C, Pérez-Parra J, Godoy R, García MJ, Stringer WW. Training improves muscle oxidative capacity and oxygenation recovery kinetics in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Appl Physiol*. 2003 Feb;88(6):580-7. Epub 2002 Nov 30.
- Puente-Maestu L, Pérez-Parra J, Godoy R, Moreno N, Tejedor A, González-Aragoneses F, Bravo JL, Alvarez FV, Camaño S, Agustí A. Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients. *Eur Respir J*. 2009 May;33(5):1045-52.
- Puente-Maestu L, Lázaro A, Tejedor A, Camaño S, Fuentes M, Cuervo M, Navarro BO, Agustí A. Effects of exercise on mitochondrial DNA content in skeletal muscle of patients with COPD. *Thorax*. 2011 Feb;66(2):121-7.
- Puente-Maestu L, Tejedor A, Lázaro A, de Miguel J, Alvarez-Sala L, González-Aragoneses F, Simón C, Agustí A. Site of mitochondrial reactive oxygen species production in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with exercise oxidative stress. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Sep;47(3):358-62.
- Puig-Vilanova E, Rodriguez DA, Lloreta J, Ausin P, Pascual-Guardia S, Broquetas J, Roca J, Gea J, Barreiro E. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in

cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free Radic Biol Med*. 2015 Feb;79:91-108.

Q

- Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*. 1993 Mar; 16:5-40.
- Qaseem A, Wilt TJ, Weinberger SE, Hanania NA, Criner G, van der Molen T, Marciniuk DD, Denberg T, Schünemann H, Wedzicha W, MacDonald R, Shekelle P; American College of Physicians; American College of Chest Physicians; American Thoracic Society; European Respiratory Society. Diagnosis and management of stable chronic obstructive pulmonary disease: a clinical practice guideline update from the American College of Physicians, American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, and European Respiratory Society. *Ann Intern Med*. 2011 Aug 2;155(3):179-91.

R

- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Sep 15; 176(6):532-55. Epub 2007 May 16.
- Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbó N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaró J, Barberà JA, Polo MF, Argilés JM, Fernandez-Checa JC, Roca J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Oct 1;164(7):1114-8.
- Rabinovich RA, Bastos R, Ardite E, Llinàs L, Orozco-Levi M, Gea J, Vilaró J, Barberà JA, Rodríguez-Roisin R, Fernández-Checa JC, Roca J. Mitochondrial dysfunction in COPD patients with low body mass index. *Eur Respir J*. 2007 Apr;29(4):643-50. Epub 2006 Dec 20.
- Radom-Aizik S, Kaminski N, Hayek S, Halkin H, Cooper DM, Ben-Dov I. Effects of exercise training on quadriceps muscle gene expression in chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol (1985)*. 2007 May;102(5):1976-84.
- Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000 Sep;16(3):534-54.
- Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):153-9.
- Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 1993 Sep;75(3):1081-7.
- Reid MB. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Mar;33(3):371-6.
- Reid WD, Rurak J, Harris RL. Skeletal muscle response to inflammation--lessons for chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Care Med*. 2009 Oct;37(10 Suppl):S372-83.

- Remels AH, Schrauwen P, Broekhuizen R, Willems J, Kersten S, Gosker HR, Schols AM. Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD. *Eur Respir J*. 2007 Aug;30(2):245-52. Epub 2007 Apr 25.
- Remels AH, Gosker HR, Schrauwen P, Langen RC, Schols AM. Peroxisome proliferator-activated receptors: a therapeutic target in COPD? *Eur Respir J*. 2008 Mar;31(3):502-8.
- Remels AH, Gosker HR, Langen RC, Schols AM. The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol* (1985). 2013 May;114(9):1253-62.
- Richardson RS. Oxygen transport and utilization: an integration of the muscle systems. *Advances in physiology education* 27: 183-191, 2003.
- Ries AL, Bauldoff GS, Carlin BW, Casaburi R, Emery CF, Mahler DA, Make B, Rochester CL, Zuwallack R, Herrerias C. Pulmonary Rehabilitation: Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2007 May;131(5 Suppl):4S-42S.
- Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Sep;85(17):6465-7.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8665-70.
- Rodriguez DA, Kalko S, Puig-Vilanova E, Perez-Olabarria M, Falciani F, Gea J, Cascante M, Barreiro E, Roca J. Muscle and blood redox status after exercise training in severe COPD patients. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jan 1;52(1):88-94.
- Rodríguez DA, Arbillaga A, Barberan-Garcia A, Ramirez-Sarmiento A, Torralba Y, Vilaró J, Gimeno-Santos E, Gea J, Orozco-Levi M, Roca J, Marco E. Effects of interval and continuous exercise training on autonomic cardiac function in COPD patients. *Clin Respir J*. 2014 Jul 11.
- Rossmann MJ, Garten RS, Groot HJ, Reese V, Zhao J, Amann M, Richardson RS. Ascorbate infusion increases skeletal muscle fatigue resistance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Nov 15;305(10):R1163-70.
- Rossmann MJ, Trinity JD, Garten RS, Ives SJ, Conklin JD, Barrett-O'Keefe Z, Witman MA, Bledsoe AD, Morgan DE, Runnels S, Reese VR, Zhao J, Amann M, Wray DW, Richardson RS. Oral antioxidants improve leg blood flow during exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Sep;309(5):H977-85.
- Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Dériaz O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*. 2003 Dec;52(12):2874-81.

S

- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*. 2005 Dec;11(12):1306-13.
- Sadowska AM, van Overveld FJ, Górecka D, Zdral A, Filewska M, Demkow UA, Luyten C, Saenen E, Zielinski J, De Backer WA. Epub 2005 Nov 13. The interrelationship between markers of inflammation and oxidative stress in chronic obstructive

- pulmonary disease: modulation by inhaled steroids and antioxidant. *Respir Med*. 2005 Feb;99(2):241-9.
- Saey D, Debigare R, LeBlanc P, Mador MJ, Cote CH, Jobin J, Maltais F. Contractile leg fatigue after cycle exercise: a factor limiting exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug 15;168(4):425-30. Epub 2003 Apr 24.
- Saey D, Lemire BB, Gagnon P, Bombardier E, Tupling AR, Debigaré R, Côté CH, Maltais F. Quadriceps metabolism during constant workrate cycling exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol (1985)*. 2011 Jan;110(1):116-24.
- Santos MC, Oliveira AL, Viegas-Crespo AM, Vicente L, Barreiros A, Monteiro P, Pinheiro T, Bugalho De Almeida A. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*. 2004 Nov-Dec;9(6):461-9.
- Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med*. 2014 Jan 29;6(221):221ra15.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2008 Jan;21(1):172-88. Epub 2007 Dec 4.
- Scanlon TC, Fragala MS, Stout JR, Emerson NS, Beyer KS, Oliveira LP, Hoffman JR. Muscle architecture and strength: adaptations to short-term resistance training in older adults. *Muscle Nerve*. 2014 Apr;49(4):584-92.
- Schols AM, Wouters EF, Soeters PB, Westerterp KR. Body composition by bioelectrical-impedance analysis compared with deuterium dilution and skinfold anthropometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. 1991 Feb;53(2):421-4.
- Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis*. 1993 May;147(5):1151-6.
- Schols AM. Nutrition as a metabolic modulator in COPD. *Chest*. 2013 Oct;144(4):1340-5.
- Schols AM, Ferreira IM, Franssen FM, Gosker HR, Janssens W, Muscaritoli M, Pison C, Rutten-van Mölken M, Slinde F, Steiner MC, Tkacova R, Singh SJ. Nutritional assessment and therapy in COPD: a European Respiratory Society statement. *Eur Respir J*. 2014 Dec;44(6):1504-20.
- Schroedl C, Kalhan R. Incidence, treatment options, and outcomes of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2012 Mar;18(2):131-7.
- Serres I, Varray A, Vallet G, Micallef JP, Préfaut C. Improved skeletal muscle performance after individualized exercise training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm Rehabil*. 1997 Jul-Aug;17(4):232-8.
- Serres I, Gautier V, Varray A, Préfaut C. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. *Chest*. 1998 Apr;113(4):900-5.
- Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, Natanek SA, Man WD, Jackson A, Gosker HR, Schols AM, Moxham J, Polkey MI, Wouters EF. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur Respir J*. 2010 Jul;36(1):81-8.
- Seymour JM, Ward K, Raffique A, Steier JS, Sidhu PS, Polkey MI, Moxham J, Rafferty GF. Quadriceps and ankle dorsiflexor strength in chronic obstructive pulmonary disease. *Muscle Nerve*. 2012 Oct;46(4):548-54.
- Shen Y, Cai W, Lei S, Zhang Z. Effect of high/low dose N-acetylcysteine on chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *COPD*. 2014 Jun;11(3):351-8.

- Shiva S, Moellering D, Ramachandran A, Levonen AL, Landar A, Venkatraman A, Ceaser E, Ulasova E, Crawford JH, Brookes PS, Patel RP, Darley-Usmar VM. Redox signalling: from nitric oxide to oxidized lipids. *Biochem Soc Symp.* 2004;(71):107-20.
- Shrikrishna D, Patel M, Tanner RJ, Seymour JM, Connolly BA, Puthuchery ZA, Walsh SL, Bloch SA, Sidhu PS, Hart N, Kemp PR, Moxham J, Polkey MI, Hopkinson NS. Quadriceps wasting and physical inactivity in patients with COPD. *Eur Respir J.* 2012 Nov;40(5):1115-22.
- Sillen MJ, Franssen FM, Delbressine JM, Vaes AW, Wouters EF, Spruit MA. Efficacy of lower-limb muscle training modalities in severely dyspnoeic individuals with COPD and quadriceps muscle weakness: results from the DICES trial. *Thorax.* 2014 Jun;69(6):525-31.
- Silverman EK, Vestbo J, Agusti A, Anderson W, Bakke PS, Barnes KC, Barr RG, Bleecker ER, Boezen HM, Burkart KM, Celli BR, Cho MH, Cookson WO, Croxton T, Daley D, DeMeo DL, Gan W, Garcia-Aymerich J, Hall IP, Hansel NN, Hersh CP, Kalsheker N, Kiley JP, Kim WJ, Lambrechts D, Lee SD, Litonjua AA, Lomas DA, London SJ, Nishimura M, Nordestgaard BG, O'Donnell CJ, Postma DS, Puhan MA, Tesfaigzi Y, Tobin MD, Vogelmeier C, Wilk JB, Wouters E, Young RP, Ziegler-Heitbrock L, MacNee W, Crapo JD. Opportunities and challenges in the genetics of COPD 2010: an International COPD Genetics Conference report. *COPD.* 2011 Apr;8(2):121-35.
- Similowski T, Cracco C, Duguet A, Derenne JP. [Diagnosis and management of exacerbations and acute respiratory failure in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Rev Prat.* 2004 Sep 15;54(13):1438-44
- Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti AG. Mortality in COPD: Role of comorbidities. *Eur Respir J.* 2006 Dec;28(6):1245-57.
- Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free Radic Biol Med.* 2010 Oct 15;49(7):1152-60.
- Soriano JB, Zielinski J, Price D. Screening for and early detection of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2009 Aug 29;374(9691):721-32.
- Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, De Paepe K, Decramer M. Resistance versus endurance training in patients with COPD and peripheral muscle weakness. *Eur Respir J.* 2002 Jun;19(6):1072-8.
- Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, Kasran A, Gayan-Ramirez G, Bogaerts P, Bouillon R, Decramer M. Muscle force during an acute exacerbation in hospitalised patients with COPD and its relationship with CXCL8 and IGF-I. *Thorax.* 2003 Sep;58(9):752-6.
- Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester C, Hill K, Holland AE, Lareau SC, Man WD, Pitta F, Sewell L, Raskin J, Bourbeau J, Crouch R, Franssen FM, Casaburi R, Vercoulen JH, Vogiatzis I, Gosselink R, Clini EM, Effing TW, Maltais F, van der Palen J, Troosters T, Janssen DJ, Collins E, Garcia-Aymerich J, Brooks D, Fahy BF, Puhan MA, Hoogendoorn M, Garrod R, Schols AM, Carlin B, Benzo R, Meek P, Morgan M, Rutten-van Mölken MP, Ries AL, Make B, Goldstein RS, Dowson CA, Brozek JL, Donner CF, Wouters EF; ATS/ERS Task Force on Pulmonary Rehabilitation. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Oct 15;188(8):e13-64.
- Steiner MC, Evans R, Deacon SJ, Singh SJ, Patel P, Fox J, Greenhaff PL, Morgan MD. Adenine nucleotide loss in the skeletal muscles during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2005 Nov;60(11):932-6. Epub 2005 Jul 29.
- Stone CA, Nolan B, Lawlor PG, Kenny RA. Hand-held dynamometry: tester strength is paramount, even in frail populations. *J Rehabil Med.* 2011 Sep;43(9):808-11.

- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44784-90. Epub 2002 Sep 16.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38084-9. Epub 2001 Aug 10.
- Stürup S, Hayes RB, Peters U. Development and application of a simple routine method for the determination of selenium in serum by octopole reaction system ICPMS. *Anal Bioanal Chem*. 2005 Feb; 381(3):686-94.
- Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, Moore AJ, Moxham J, Polkey MI. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2007 Feb;62(2):115-20.

T

- Tóthová L, Ostatníková D, Šebeková K, Celec P, Hodosy J. Sex differences of oxidative stress markers in young healthy subjects are marker-specific in plasma but not in saliva. *Ann Hum Biol*. 2013 Mar;40(2):175-80. Epub 2013 Jan 18.
- Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:347-62.
- Tse HN, Raiteri L, Wong KY, Yee KS, Ng LY, Wai KY, Loo CK, Chan MH. High-dose N-acetylcysteine in stable COPD: the 1-year, double-blind, randomized, placebo-controlled HIACE study. *Chest*. 2013 Jul;144(1):106-18.
- Tug T, Karatas F, Terzi SM. Antioxidant vitamins (A, C and E) and malondialdehyde levels in acute exacerbation and stable periods of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Invest Med*. 2004 Jun;27(3):123-8.
- Turki A, Hayot M, Carnac G, Pillard F, Passerieux E, Bommart S, Raynaud de Mauverger E, Hugon G, Pincemail J, Pietri S, Lambert K, Belayew A, Vassetzky Y, Juntas Morales R, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D. Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 2012 Sep 1; 53(5):1068-79.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.

V

- Vagaggini B, Costa F, Antonelli S, De Simone C, De Cusatis G, Martino F, Santerini S, Paggiaro P. Clinical predictors of the efficacy of a pulmonary rehabilitation programme in patients with COPD. *Respir Med*. 2009 Aug;103(8):1224-30.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. Epub 2006 Aug 4.
- Van de Bool C, Mattijssen-Verdonschot C, van Melick PP, Spruit MA, Franssen FM, Wouters EF, Schols AM, Rutten EP. Quality of dietary intake in relation to body composition in patients with chronic obstructive pulmonary disease eligible for pulmonary rehabilitation. *Eur J Clin Nutr*. 2014 Feb;68(2):159-65.

- Van den Borst B, Souren NY, Gielen M, Loos RJ, Paulussen AD, Derom C, Schols AM, Zeegers MP. Association between the IL6-174G/C SNP and maximally attained lung function. *Thorax*. 2011 Feb;66(2):179; author reply 179-80.
- Van den Borst B, Slot IG, Hellwig VA, Vosse BA, Kelders MC, Barreiro E, Schols AM, Gosker HR. Loss of quadriceps muscle oxidative phenotype and decreased endurance in patients with mild-to-moderate COPD. *J Appl Physiol* (1985). 2013 May;114(9):1319-28.
- Vanfleteren LE, Spruit MA, Groenen M, Gaffron S, van Empel VP, Bruijnzeel PL, Rutten EP, Op 't Roodt J, Wouters EF, Franssen FM. Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Apr. 1;187(7):728-35.
- Van Helden YG, Keijer J, Knaapen AM, Heil SG, Briedé JJ, van Schooten FJ, Godschalk RW. Beta-carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jan 15;46(2):299-304.
- Van Helvoort HA, Heijdra YF, Heunks LM, Meijer PL, Ruitenbeek W, Thijs HM, Dekhuijzen PN. Supplemental oxygen prevents exercise-induced oxidative stress in muscle-wasted patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 15; 173(10):1122-9. Epub 2006 Mar 2.
- Van Helvoort HA, Heijdra YF, de Boer RC, Swinkels A, Thijs HM, Dekhuijzen PN. Six-minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. *Chest*. 2007 Feb;131(2):439-45.
- Vermeeren MA, Creutzberg EC, Schols AM, Postma DS, Pieters WR, Roldaan AC, Wouters EF; COSMIC Study Group. Prevalence of nutritional depletion in a large out-patient population of patients with COPD. *Respir Med*. 2006 Aug;100(8):1349-55. Epub 2006 Jan 18.
- Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Feb 15;187(4):347-65.
- Vilaro J, Rabinovich R, Gonzalez-deSuso JM, Troosters T, Rodríguez D, Barberà JA, Roca J. Clinical assessment of peripheral muscle function in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Phys Med Rehabil*. 2009 Jan;88(1):39-46.
- Vivodtzev I, Flore P, Lévy P, Wuyam B. Voluntary activation during knee extensions in severely deconditioned patients with chronic obstructive pulmonary disease: benefit of endurance training. *Muscle Nerve*. 2008 Jan;37(1):27-35.
- Vogiatzis I, Williamson AF, Miles J, Taylor IK. Physiological response to moderate exercise workloads in a pulmonary rehabilitation program in patients with varying degrees of airflow obstruction. *Chest*. 1999 Nov;116(5):1200-7.
- Vogiatzis I, Terzis G, Nanas S, Stratakos G, Simoes DC, Georgiadou O, Zakynthinos S, Roussos C. Skeletal muscle adaptations to interval training in patients with advanced COPD. *Chest*. 2005 Dec;128(6):3838-45.
- Vogiatzis I, Simoes DC, Stratakos G, Kourepini E, Terzis G, Manta P, Athanasopoulos D, Roussos C, Wagner PD, Zakynthinos S. Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD. *Eur Respir J*. 2010 Aug;36(2):301-10.
- Vogiatzis I, Terzis G, Stratakos G, Cherouveim E, Athanasopoulos D, Spetsioti S, Nasis I, Manta P, Roussos C, Zakynthinos S. Effect of pulmonary rehabilitation on peripheral muscle fiber remodeling in patients with COPD in GOLD stages II to IV. *Chest*. 2011 Sep;140(3):744-52

Voorrips LE, Ravelli AC, Dongelmans PC, Deurenberg P, Van Staveren WA. A physical activity questionnaire for the elderly. *Med Sci Sports Exerc.* 1991 Aug;23(8):974-9.

W

Walda IC, Tabak C, Smit HA, Räsänen L, Fidanza F, Menotti A, Nissinen A, Feskens EJ, Kromhout D. Diet and 20-year chronic obstructive pulmonary disease mortality in middle-aged men from three European countries. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Jul;56(7):638-43.

Wang L, Gill R, Pedersen TL, Higgins LJ, Newman JW, Rutledge JC. Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis releases neutral and oxidized FFAs that induce endothelial cell inflammation. *J Lipid Res.* 2009 Feb;50(2):204-13.

Watz H, Pitta F, Rochester CL, Garcia-Aymerich J, ZuWallack R, Troosters T, Vaes AW, Puhan MA, Jehn M, Polkey MI, Vogiatzis I, Clini EM, Toth M, Gimeno-Santos E, Waschki B, Esteban C, Hayot M, Casaburi R, Porszasz J, McAuley E, Singh SJ, Langer D, Wouters EF, Magnussen H, Spruit MA. An official European Respiratory Society statement on physical activity in COPD. *Eur Respir J.* 2014 Dec;44(6):1521-37.

Wei JP, Srinivasan C, Han H, Valentine JS, Gralla EB. Evidence for a novel role of copper-zinc superoxide dismutase in zinc metabolism. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48)

Woźniak A, Górecki D, Szpinda M, Mila-Kierzenkowska C, Woźniak B. Oxidant-antioxidant balance in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease after smoking cessation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:897075.

Z

Zavorsky GS, Kubow S, Grey V, Riverin V, Lands LC. An open-label dose-response study of lymphocyte glutathione levels in healthy men and women receiving pressurized whey protein isolate supplements. *Int J Food Sci Nutr.* 2007 Sep;58(6):429-36.

Zeng M, Li Y, Jiang Y, Lu G, Huang X, Guan K. Local and systemic oxidative stress status in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Can Respir J.* 2013 Jan-Feb;20(1):35-41.

Zhang H, Wang X, Lin J, Sun Y, Huang Y, Yang T, Zheng S, Fan M, Zhang J. Reduced regional gray matter volume in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a voxel-based morphometry study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013 Feb;34(2):334-9.

Zhao B, Tham SY, Lu J, Lai MH, Lee LK, Moochhala SM. Simultaneous determination of vitamins C, E and beta-carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Pharm Sci.* 2004 Jun 30;7(2):200-4.

Zhu J, Qiu Y, Valobra M, Qiu S, Majumdar S, Matin D, De Rose V, Jeffery PK. Plasma cells and IL-4 in chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Jun 1;175(11):1125-33. Epub 2007 Feb 22.

Zysman M, Patout M, Miravittles M, van der Molen T, Lokke A, Hausen T, Didier A, Cuvelier A, Roche N. [COPD and perception of the new GOLD document in Europe. Workshop from the Société de pneumologie de langue française (SPLF)]. *Rev Mal Respir.* 2014 Jun;31(6):499-51.

RESUME

Résumé

Dysfonction musculaire périphérique et réhabilitation respiratoire dans la BPCO : intérêt d'une supplémentation en antioxydants

La réhabilitation respiratoire tient une place importante dans la prise en charge des patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) stables en induisant des bénéfices au niveau de la tolérance à l'effort, la fonction et la masse musculaire périphérique. La présence d'un stress oxydant élevé à l'état basal, considéré comme un des principaux facteurs impliqués dans l'atteinte musculaire périphérique, est bien admise malgré les discordances rapportées dans la littérature notamment au niveau du système antioxydant. L'absence d'amélioration des marqueurs du stress oxydant au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire constitue une limite probable aux adaptations musculaires escomptées. Cependant, même si une supplémentation en antioxydants semble être une intervention adaptée permettant de réduire le stress oxydant et d'améliorer l'atteinte musculaire périphérique, son efficacité reste toujours à prouver chez les patients BPCO.

Ainsi, nos objectifs étaient de déterminer et caractériser l'hétérogénéité des marqueurs du stress oxydant en vue d'étudier les effets d'une supplémentation en antioxydants adaptée sur des marqueurs spécifiques de l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO stables.

A travers une analyse globale intégrant toute la complexité du stress oxydant, ce travail de thèse a montré que les principaux déficits en antioxydants chez les patients BPCO stables se situent au niveau de l'équilibre vitamine C/E, du zinc et du sélénium. De plus, nos résultats ont permis de déterminer des profils de patients caractérisés notamment par des sous-groupes de femmes ayant une majoration des taux de peroxydes lipidiques. Basé sur les principaux déficits identifiés et malgré l'importante hétérogénéité des réponses, nous avons montré qu'une supplémentation en antioxydants permettait d'optimiser les bénéfices d'un programme de réhabilitation respiratoire en améliorant la force maximale isométrique volontaire, la consommation maximale d'oxygène et la surface de section transversale (SSt) des fibres musculaires de patients BPCO stables. Ainsi, dans l'optique d'une approche par phénotypes, l'utilisation de valeurs de référence de la SSt, comme établies dans notre seconde étude, semble constituer un biomarqueur adapté mais celles-ci doivent être optimisées afin d'être applicables chez les patients BPCO.

Pour conclure, outre l'intérêt de l'utilisation d'une supplémentation en antioxydants au cours d'un programme de réhabilitation respiratoire, nos résultats contribuent à améliorer les connaissances sur le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de l'atteinte musculaire périphérique des patients BPCO. De plus, une meilleure compréhension et caractérisation de l'hétérogénéité, à la fois du stress oxydant et de l'atteinte musculaire périphérique, ouvre des perspectives de recherche prometteuses dans l'optique d'une adaptation de la prise en charge des patients BPCO.

Mots clés : *BPCO, atteinte musculaire périphérique, stress oxydant, hétérogénéité, réhabilitation respiratoire, supplémentation en antioxydants.*

Abstract

Peripheral muscle dysfunction and pulmonary rehabilitation in COPD : benefits of an antioxidant supplementation

Pulmonary rehabilitation is considered as a major component in the management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients by inducing benefits on exercise capacity, peripheral function and muscle mass. Elevated oxidative stress at baseline, considered as one of the main factors involved in peripheral muscle impairment, is well accepted despite the discrepancies reported in the literature especially on antioxidant system. The absence of oxidative stress marker improvement following a pulmonary rehabilitation program is a likely limit to the expected muscle adaptations. However, although antioxidant supplementation seems to be an appropriate intervention for reducing oxidative stress and improving peripheral muscle impairment, its effectiveness remains to be proven in COPD patients.

Thus, our objectives were to determine and characterize the oxidative stress marker heterogeneity in order to study the effects of a suitable antioxidant supplementation on specific peripheral muscle markers in stable COPD patients.

Through a comprehensive analysis integrating the oxidative stress complexity, this work showed that the main antioxidant deficits in stable COPD patients are on the vitamin C/E balance, zinc and selenium. Moreover, our results allowed to determine patient profiles characterized in particular by a women subgroup with an increased rate of lipid peroxides. Based on the main identified deficits and despite the large response heterogeneity, we have shown that antioxidant supplementation may optimize the benefits of a pulmonary rehabilitation program by improving especially maximal isometric voluntary strength, cross-sectional area (CSA) muscle fibers and maximal oxygen consumption of stable COPD patients. Thus, from the perspective of a phenotype approach, the use of CSA reference values, as established in our second study, appears to be a suitable biomarker but these should be optimized in order to be relevant in COPD patients.

Finally, besides the benefits of using an antioxidant supplementation during pulmonary rehabilitation program, our results contribute to improve our knowledge about the role of oxidative stress in the pathophysiology of peripheral muscle impairment in COPD patients. Furthermore, a better understanding and characterization of heterogeneity of both oxidative stress and peripheral muscle impairment opens up promising research prospects with a view of adjusting the management of COPD patients.

Key words : *COPD, peripheral muscle impairment, oxidative stress, heterogeneity, pulmonary rehabilitation, antioxidant supplementation.*