

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



**Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

Année universitaire 2010/2011

N° attribué par la bibliothèque :

Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Strasbourg

*Discipline* : Sciences du Vivant

*Domaine* : Physiologie et Biologie des Organismes, Populations Interactions

# **ETUDE DES EFFETS DES STATINES SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES MUSCLES CARDIAQUE ET SQUELETTIQUE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Jamal BOUITBIR**

Le 03 décembre 2010

**Membres du jury :**

**Directeur de Thèse : Docteur François PIQUARD**

**Examineur Interne : Docteur Joffrey ZOLL**

**Examineur Interne : Docteur Luc DUPUIS**

**Rapporteur Externe : Professeur Valdur SAKS**

**Rapporteur Externe : Professeur Hans HOPPELER**

**Examineur Externe : Docteur Alain LACAMPAGNE**

**Membre invité : Professeur Bernard GENY**

**Strasbourg**

**Strasbourg**

**Strasbourg**

**Grenoble**

**Bern**

**Montpellier**

**Strasbourg**



**Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

Année universitaire 2010/2011

N° attribué par la bibliothèque :

Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Strasbourg

*Discipline* : Sciences du Vivant

*Domaine* : Physiologie et Biologie des Organismes, Populations Interactions

# **ETUDE DES EFFETS DES STATINES SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES MUSCLES CARDIAQUE ET SQUELETTIQUE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Jamal BOUITBIR**

Le 03 décembre 2010

**Membres du jury :**

**Directeur de Thèse : Docteur François PIQUARD**

**Examineur Interne : Docteur Joffrey ZOLL**

**Examineur Interne : Docteur Luc DUPUIS**

**Rapporteur Externe : Professeur Valdur SAKS**

**Rapporteur Externe : Professeur Hans HOPPELER**

**Examineur Externe : Docteur Alain LACAMPAGNE**

**Membre invité : Professeur Bernard GENY**

**Strasbourg**

**Strasbourg**

**Strasbourg**

**Grenoble**

**Bern**

**Montpellier**

**Strasbourg**

## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les membres de mon jury, le **Professeur Valsur Saks**, le **Professeur Hans Hoppeller**, le **Docteur Alain Lacampagne** et le **Docteur Luc Dupuis**, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le **Docteur Joffrey Zoll** de m'avoir encadré et de m'avoir accordé son plus grand soutien. Sa présence était essentielle à la réalisation de ma thèse. Joffrey est quelqu'un de très humain et généreux qui a su partager avec moi ses compétences scientifiques et m'a beaucoup apporté sur le plan pédagogique, humain et avant tout intellectuel. Je le remercie également de s'être toujours montré présent et accessible.

Je remercie le **Docteur François Piquard** pour ses conseils et son soutien permanent.

Je tiens également à remercier le **Professeur Bernard Gény**, directeur de l'EA3072 : « Mitochondries, stress oxydant et protection musculaire » qui m'a donné cette grande opportunité de m'accueillir dans son laboratoire. Je ne le remercierai jamais assez pour sa confiance et pour m'avoir trouvé un financement durant cette thèse.

J'aimerais remercier ma « jumelle » de bureau **Anne-Laure**. J'ai été ravi de faire ta connaissance et d'avoir tissé une amitié au fil des jours. Je me souviens des fou-rires dans le bureau souvent pour n'importe quoi. Ces moments resteront à jamais gravés dans ma mémoire. (Et plein d'autres choses mais cela, on le garde pour nous !).

Je remercie également **Frédéric**. C'est à ton contact, à l'UPEBM, que j'ai débuté ma carrière scientifique. Même si nos thématiques ne sont pas forcément communes, tu étais toujours là pour me dépanner et répondre à mes questions.

J'aimerais également remercier **Isabelle**, **Fabienne** et **Claudine** les techniciennes du laboratoire pour votre aide durant cette thèse.

J'aimerais remercier tous les thésards du laboratoire : **Paola**, **Irina**, **Olivier**, **Michel**, **Julien**, **Ziad** et **Hélène** pour votre joie de vivre et la bonne ambiance que vous faites régner dans le

laboratoire. A mes yeux, c'est quelque chose de primordial pour la bonne réussite du laboratoire.

J'aimerais remercier le service de physiologie et d'explorations fonctionnelles : **Professeure Anne Charloux, Docteur Stéphane Doutreleau, Docteur Olivier Royer, Docteure Monique Ostwald, Professeur Ruddy Richard, Docteur Samy Talha** ainsi que toutes les techniciennes.

J'aimerais remercier tout particulièrement **Laurence, Stéphane** et **Fabrice** pour leurs conseils.

J'aimerais faire un coucou à tous les masters que j'ai côtoyé au cours de ces années : **Anne-Sophie** « je suis fatigué, à 9h du matin », **Max** « j'ai faim, qui veut un sandwich de chez Thierry, à 10h du matin », **Sébastien** « la pile à mitochondries de patate », **Dany** « spécialiste du Fink software », **Eric** « C'est quoi la taurine ? C'est une enzyme !!! », **Antoine** « Monsieur marquage de 240 lames en une fois » et **Floriane** « je le savais !!! ».

Je remercie toutes les personnes extérieures avec qui j'ai collaboré: **Marie, Delphine, Judith.**

A ceux que j'ai oublié, veuillez me pardonner !!

N'oubliez jamais la devise du labo « **L'idée, c'est qu'en théorie, y a pas de problème** ».

D'un point de vue plus personnel, j'aimerais « remercier » mon épouse **Sanae** qui me supporte depuis 7 ans (cela fait déjà 7 ans que nous sommes mariés !!!!). Cet amour nous a permis de donner naissance à deux « anges » **Israe** et **Abdoullah**.

Enfin, je ne peux finir ce chapitre sans témoigner mon amour à **mes parents** qui ont « lutté » quotidiennement pour m'offrir une éducation, un confort et de l'amour.

**À Israe et Abdoullah  
À Sanae  
À mes parents,  
Et à Toi.**

**« L'aveugle se détourne de la fosse où le clairvoyant se laisse tomber »**  
Averroès, médecin et philosophe de l'Andalousie, 1126-1198.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>8</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>11</b>
<b>PREAMBULE .....</b>	<b>12</b>
<b>1. LE MUSCLE .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Le muscle squelettique .....</b>	<b>13</b>
1.1.1. Organisation de l'appareil contractile.....	13
1.1.2. Organisation et fonctionnement du sarcomère .....	14
1.1.3. Classification des fibres musculaires striées squelettiques .....	17
a. Les fibres à contraction lente .....	18
b. Les fibres à contraction rapide.....	19
1.1.4. Les différents phénotypes métaboliques.....	21
<b>1.2. Muscle cardiaque.....</b>	<b>22</b>
1.2.1. Description générale .....	22
a. Anatomie microscopique du muscle cardiaque.....	23
<b>1.3. Phosphorylation oxydative .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4. Le couplage Excitation-Contraction .....</b>	<b>25</b>
1.4.1. Dans le muscle squelettique.....	25
1.4.2. Dans le muscle cardiaque .....	26
<b>2. LA MITOCHONDRIE .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Structure .....</b>	<b>29</b>
2.1.1. La membrane externe .....	29
2.1.2. L'espace inter-membranaire .....	30
2.1.3. La membrane interne .....	30
2.1.4. La matrice mitochondriale.....	31
<b>2.2. Distribution des mitochondries dans la cellule musculaire.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3. Fonctionnement de la mitochondrie .....</b>	<b>32</b>
2.3.1. La chaîne de transport des électrons .....	32
2.3.2. La phosphorylation oxydative .....	32
a. <i>Complexe I : NADH déshydrogénase</i> .....	33
b. <i>Complexe II : Succinate déshydrogénase</i> .....	34
c. <i>Complexe III : Complexe b-c1 ou ubiquinone-cytochrome c réductase</i> .....	34
d. <i>Complexe IV : cytochrome c oxydase</i> .....	35
e. <i>ATP synthase</i> .....	35
2.3.3. Rendement de la phosphorylation oxydative.....	36
2.3.4. Régulation de la phosphorylation oxydative.....	37
a. <i>Les substrats de l'oxydation</i> .....	37
b. <i>ADP et ATP</i> .....	38
<b>2.4. Régulation transcriptionnelle mitochondriale .....</b>	<b>38</b>
2.4.1. L'ADN mitochondrial .....	38
2.4.2. Contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale.....	39

a. Peroxisome proliferator –activated receptor gamma co-activator 1 (PGC-1) .....	39
b. Nuclear respiratory factors (NRFs).....	41
c. Le facteur de transcription mitochondriale A (TFAM).....	42
<b>3. LE STRESS OXYDANT .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1. Introduction .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2. Différentes formes de radicaux libres.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3. Source cellulaire des radicaux libres .....</b>	<b>46</b>
3.3.1. La xanthine oxydase .....	47
3.3.2. La NADPH oxydase .....	47
3.3.3. Le réticulum endoplasmique.....	47
3.3.4. Les peroxysomes .....	47
3.3.5. La mitochondrie.....	48
<b>3.4. Systèmes antioxydants .....</b>	<b>51</b>
3.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques .....	51
a. Superoxyde dismutase (SOD).....	51
b. Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR) .....	52
c. Catalase .....	52
3.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques .....	52
a. Oligoéléments .....	53
b. Glutathion .....	53
c. Ubiquinones et cytochrome c.....	53
d. Vitamine E et vitamine C.....	53
<b>3.5. Dégâts cellulaires .....</b>	<b>54</b>
3.5.1. Peroxydation lipidique.....	54
3.5.2. Oxydation des protéines .....	55
3.5.3. Dommages de l'ADN.....	55
3.5.4. Activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) .....	56
<b>3.6. L'apoptose.....</b>	<b>58</b>
<b>3.7. Le concept de l'hormèse mitochondriale ou mitohormesis.....</b>	<b>60</b>
<b>4. STATINES ET MUSCLES CARDIAQUE ET SQUELETTIQUE .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. Définition.....</b>	<b>62</b>
4.1.1. Effets « pléiotropes » des statines.....	63
4.1.2. Symptômes cliniques.....	65
a. Myalgie .....	66
b. Myopathie .....	66
c. Faiblesse musculaire .....	66
d. Rhabdomyolyse .....	66
<b>4.2. Etat actuel des connaissances .....</b>	<b>67</b>
4.2.1. Etudes préliminaires .....	67
4.2.2. Aspects mécanistiques .....	67
4.2.3. Interactions avec d'autres médicaments .....	68
<b>4.3. Statines et mitochondries.....</b>	<b>68</b>
4.3.1. Effets des statines sur l'ubiquinone ou CoQ <sub>10</sub> .....	68
4.3.2. Effets des statines sur la chaîne de respiration mitochondriale musculaire .....	69
4.3.3. Statines et exercice .....	70
a. Effets bénéfiques de l'exercice .....	70
b. Effets des statines sur l'exercice physique.....	71
<b>PROBLEMATIQUES.....</b>	<b>73</b>
<b>1. Problématique générale .....</b>	<b>74</b>
<b>2. Etude 1 : Effets de l'atorvastatine in vitro sur la fonction mitochondriale sur les muscles contrôlés et entraînés.....</b>	<b>74</b>
<b>3. Etude 2 : Effet d'un traitement avec l'atorvastatine sur un exercice exhaustif.....</b>	<b>75</b>



**4. Etude 3 : Effet d'un traitement avec l'atorvastatine sur la fonction mitochondriale : mise en évidence du concept de « mitohormesis »..... 75**

**MATERIELS ET METHODES ..... 77**

**1.1. Modèle humain ..... 78**

1.1.1. Biopsies d'oreillettes humaines ..... 78

1.1.2. Biopsies du muscle deltoïde ..... 78

**1.2. Modèle animal ..... 79**

1.2.1. Protocole expérimental ..... 79

a. Effets de l'atorvastatine in vitro sur la fonction mitochondriale sur les muscles contrôles et entraînés.  
..... 79

b. Effet d'un exercice exhaustif sur les muscles de rats traités avec l'atorvastatine ..... 79

c. Etude de l'effet d'un co-traitement avec l'atorvastatine et la quercétine sur la fonction mitochondriale  
..... 80

1.2.2. Prélèvements musculaires..... 80

**1.3. Modèle cellulaire..... 80**

1.3.1. Cardiomyocytes H<sub>9</sub>C<sub>9</sub>..... 80

1.3.2. Myotubes L<sub>6</sub> Woody..... 81

**2. Techniques ..... 81**

**2.1. Protocole d'étude de la respiration mitochondriale ..... 81**

2.1.1. Solutions ..... 81

2.1.2. Préparation des fibres ..... 82

2.1.3. Protocole d'étude de la chaîne de respiration mitochondriale ..... 82

**2.2. Protocole de détection des ROS par résonance paramagnétique électronique (RPE) ..... 83**

2.2.1. Solutions ..... 83

2.2.2. Préparation des fibres ..... 83

2.2.3. Protocole d'étude de la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène ..... 83

**2.3. Protocole de mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale..... 84**

2.3.1. Solution..... 84

2.3.2. Préparation des fibres ..... 84

2.3.3. Protocole d'étude de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale ..... 84

**2.4. Evaluation du niveau d'expression des ARNm par RT-PCR..... 85**

2.4.1. Extraction de l'ARN ..... 85

2.4.2. Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)..... 86

2.4.3. Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel..... 86

**2.5. Marquage des radicaux libres avec le dihydroéthidium ..... 86**

**2.6. Mesure du glutathion GSH..... 87**

**2.7. Analyse du potentiel de membrane mitochondriale ..... 87**

**RESULTATS ..... 88**

**DISCUSSION.....93**

**CONCLUSION/PERSPECTIVES GENERALES.....103**

**BIBLIOGRAPHIE.....104**

## **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS FAISANT L'OBJET DE CETTE THESE**

**1. Bouitbir J, Daussin F, Charles A-L, Rasseneur L, Dufour S, Burelle Y Richard R, Piquard P, Geny B and Zoll J. *Exercise training protected mitochondria against acute exposure to atorvastatin in glycolytic skeletal muscle. Soumis.***

**2. Bouitbir J, Charles A-L, Piquard P, Geny B and Zoll J. *Exercise capacity was decreased in atorvastatin-treated animals: implication of mitochondrial alterations and oxidative stress. Soumis.***

**3. Bouitbir J, Charles A-L, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx Y, Piquard P, Geny B and Zoll J. *Statins Protect Mitochondria of Cardiac Muscle: A "Mitohormesis" Mechanism Involving Reactive Oxygen Species and PGC-1. Soumis.***

### **Communication orale :**

**1. Bouitbir J, Daussin F, Piquard F, Geny B, Zoll J. *Atorvastatin chronically impaired mitochondrial Function of glycolytic skeletal muscle while cardiac muscle was protected. European Heart Journal; Vol.29 (Abstract Supplement): 941. European Society of Cardiology September 2008. Munich.***

**2. Bouitbir J, Charles A-L, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx Y, Piquard P, Geny B, Zoll J. *Etude des effets moléculaires et cellulaires des statines sur la fonction mitochondriale musculaire. Congrès Mito@Strass Mai 2010. Strasbourg.***

### **Communication par poster:**

**1. Bouitbir J, Daussin F, Piquard F, Geny B, Zoll J. *Atorvastatin chronically impaired mitochondrial function of glycolytic skeletal muscle while cardiac muscle was protected. Société de physiologie Avril 2008. Clermont-Ferrand***

**2. Bouitbir J, Daussin F, Piquard F, Geny B, Zoll J. *Atorvastatin chronically impaired mitochondrial function of glycolytic skeletal muscle while cardiac muscle was protected. Groupe de reflexion sur la recherche cardiovasculaire. Printemps de la cardiologie. Mai 2008. Montpellier.***

**3. Bouitbir J, Daussin F, Piquard F, Geny B, Zoll J. *Atorvastatin chronically impaired mitochondrial function of glycolytic skeletal muscle while cardiac muscle was protected. Mito@Strass Mai 2008. Strasbourg.***

**PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS NE FAISANT PAS L'OBJET DE CETTE  
THESE**

1. Thaveau F, Zoll J, **Bouitbir J**, Ribera F, Di Marco P, Chakfe N, Kretz JG, Piquard F, Geny B. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *The Journal of Surgical Research*. Jul 2009 ; 155(1) :65-69.
2. Thaveau F, Zoll J, **Bouitbir J**, N'Guessan B, Plobner P, Chakfe N, Kretz JG, Richard R, Piquard F, Geny B. Effect of chronic pre-treatment with angiotensin converting enzyme inhibition on skeletal muscle mitochondrial recovery after ischemia/reperfusion. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. Aug 14 2009.
3. Charles A-L, Guilbert A-S, **Bouitbir J**, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, Piquard F, Geny B. Effect of post-conditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Accepté au British Journal of Surgery*.

## RESUME

Les statines sont des médicaments très efficaces dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Cependant, elles entraînent des effets délétères qui se traduisent par l'apparition de douleurs musculaires. Il a été clairement établi que la mitochondrie était une cible privilégiée des statines et était la principale source des radicaux libres. Cependant, aucune étude n'a été consacrée sur l'effet de statines sur cette production de radicaux libres.

La première partie de ma thèse a démontré que, *in vitro*, l'atorvastatine diminue la respiration mitochondriale musculaire, quel que soit le phénotype, et augmente la production de ROS. Par contre, un entraînement en endurance prévient ces effets délétères sur les muscles squelettiques. Par ailleurs, nous avons démontré que, sur des rats traités chroniquement avec l'atorvastatine, les capacités d'endurance sont diminuées.

La seconde partie de ma thèse a montré que ces statines agissent selon le concept du « mitohormesis ». En effet, elles entraînent dans le muscle squelettique une augmentation importante de radicaux libres débordant le système antioxydant et entraînant une désactivation de la biogenèse mitochondriale et une altération des capacités oxydatives musculaires. Par contre, dans le cœur où les capacités antioxydantes sont importantes, elles entraînent une augmentation modérée des ROS qui permet l'activation de voies de signalisation menant à la biogenèse mitochondriale.

Ces travaux ont permis de comprendre pourquoi et comment les statines agissaient différemment dans le cœur et les muscle squelettiques et d'ouvrir des pistes dans le traitement des douleurs musculaires suite à un traitement avec des statines.

## ABSTRACT

Statins is very effective drugs in the treatment of hypercholesterolemia. However, statins induced deleterious effects including muscular pains. It was clearly established that mitochondria were a privileged target of statins and were the principal source of free radicals. However, no study concerned the effect of statins on this ROS production.

The first part of my thesis demonstrated that *in vitro*, atorvastatin decreased mitochondrial respiration whatever the phenotype and increased the ROS production. On the other hand, a chronically endurance training decreased these deleterious effects in skeletal muscles. Besides, we demonstrated that on treated rats chronically with atorvastatin, the endurance capacities decreased.

The second part of my thesis showed that statins acted according to the concept of “mitohormesis”. Indeed, statins induced in glycolytic muscle an important increase of ROS extending beyond the antioxidant system inducing a deactivation of the mitochondrial biogenesis and a decrease of muscular oxidative capacities. On the other hand, in the cardiac muscle where the antioxidant capacities are important, statins induced a moderate increase of ROS which allowed to the activation of the mitochondrial biogenesis.

These works allowed understanding why and how statins acted differently in cardiac and skeletal muscles and opening perspectives in the treatment of the muscular pains following a treatment with statins.

## LISTE DES ABREVIATIONS

$\Delta\psi$	potentiel de membrane
<b>AA</b>	antimycine A
<b>Ach</b>	acétycholine
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	adénosine-5'-diphosphate
<b>ANT</b>	transporteur des nucléotides adényliques
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ATP</b>	adénosine-5'-triphosphate
<b>ATPase F0-F1</b>	ATP synthase
<b>BSA</b>	albumine de sérum bovin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ion calcium
<b>CK</b>	créatine kinase
<b>Cox</b>	cytochrome c oxydase
<b>CRC</b>	complexe de relachement du calcium
<b>Cu/Zn-SOD</b>	superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc
<b>CYP</b>	enzyme cytochrome P450
<b>Cyt C</b>	cytochrome c
<b>DHPR</b>	récepteurs des dihydropyridines
<b>FADH<sub>2</sub>/FAD<sup>+</sup></b>	flavine adénine dinucléotide réduite/oxydée
<b>GPx</b>	glutathion peroxydase
<b>GR</b>	glutathion reductase
<b>GSH/GSSG</b>	glutathion réduit/oxydé
<b>HDL-C</b>	high density lipoprotein-cholesterol
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b>LDL-C</b>	low density lipoprotein-cholesterol
<b>mi-CK</b>	créatine kinase mitochondriale
<b>Mn-SOD</b>	superoxyde dismutase associée au manganèse
<b>mPTP</b>	Pore de transition de perméabilité mitochondrial
<b>mtADN</b>	ADN mitochondrial
<b>NADH, H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé
<b>NADPH, H<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup></b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé

<b>O<sub>2</sub></b>	dioxygène
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	anion superoxyde
<b>OH<sup>-</sup></b>	ion hydroxyde
<b>OH<sup>•</sup></b>	radical hydroxyle
<b>Q</b>	quinone
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	peroxisome proliferator –activated receptor gamma co-activator alpha
<b>PGC-1<math>\beta</math></b>	peroxisome proliferator –activated receptor gamma co-activator beta
<b>Pi</b>	phosphate inorganique
<b>mPTP</b>	pore de transition de perméabilité
<b>NRF</b>	nuclear respiratory factor
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species ou espèces réactives oxygénées
<b>rRNA</b>	ARN ribosomique
<b>RyR</b>	récepteur à la ryanodine
<b>SIRT1</b>	sirtuin 1
<b>SERCA</b>	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>SOD1</b>	superoxyde dismutase 1
<b>SOD2</b>	superoxyde dismutase 2
<b>TFAm</b>	mitochondrial transcription factor A
<b>TMPD</b>	N, N, N', N' tétraméthyl-1,4-phenylènediamine
<b>TnC</b>	troponine C
<b>TnI</b>	troponine I
<b>TnT</b>	troponine T
<b>tRNA</b>	ARN de transfert
<b>Ub</b>	ubiquinone
<b>UbH<sup>•</sup></b>	ubisemiquinone
<b>UbH<sub>2</sub></b>	ubiquinol
<b>UCP</b>	protéine découplante (UnCoupling Protein)
<b>VDAC</b>	Voltage dependant anion channel

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Liste des figures :

<b><u>Figure 1</u></b> : Organisation du muscle squelettique.	p.14
<b><u>Figure 2</u></b> : La structure du muscle squelettique: du muscle à l'unité contractile.	p.15
<b><u>Figure 3</u></b> : Structure du sarcomère.	p.16
<b><u>Figure 4</u></b> : La contraction musculaire nécessite de l'ATP et du $Ca^{2+}$ .	p.17
<b><u>Figure 5</u></b> : Marquage au NADH sur une coupe transversale d'un muscle squelettique.	p.18
<b><u>Figure 6</u></b> : Section longitudinale des fibres rapides, intermédiaires et lentes d'un muscle triceps brachial d'une femme âgée de 25 ans.	p.21
<b><u>Figure 7</u></b> : Image en microscopie électronique d'un muscle cardiaque de chien.	p.23
<b><u>Figure 8</u></b> : Représentation schématique d'une fibre musculaire cardiaque.	p.24
<b><u>Figure 9</u></b> : Schéma général du cycle de Krebs.	p.24
<b><u>Figure 10</u></b> : Le couplage excitation contraction au niveau de la triade.	p.26
<b><u>Figure 11</u></b> : Structure d'une mitochondrie.	p.31
<b><u>Figure 12</u></b> : Chaîne de transport des électrons.	p.33
<b><u>Figure 13</u></b> : Structure de l'ATP synthase $F_0F_1$ -ATPase.	p.36
<b><u>Figure 14</u></b> : Schéma représentant les cibles de NRF1 et NRF2.	p.42
<b><u>Figure 15</u></b> : Schéma représentant la biogenèse mitochondriale.	p.43
<b><u>Figure 16</u></b> : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.	p.50
<b><u>Figure 17</u></b> : Localisation des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule musculaire.	p.54
<b><u>Figure 18</u></b> : Structure du mPTP.	p.57
<b><u>Figure 19</u></b> : Production de ROS, ouverture du mPTP et apoptose.	p.58
<b><u>Figure 20</u></b> : Schéma représentant la voie mitochondriale de l'apoptose.	p.60
<b><u>Figure 21</u></b> : Action des statines sur la voie de synthèse du cholestérol.	p.62
<b><u>Figure 22</u></b> : Effets pléiotropes vasculaires des statines.	p.65
<b><u>Figure 23</u></b> : Schéma mécanistique proposé des statines sur la mitochondrie du muscle cardiaque.	p.100
<b><u>Figure 24</u></b> : Schéma mécanistique proposé des statines sur la mitochondrie du muscle squelettique glycolytique.	p.101

### Liste des tableaux :

<b><u>Tableau 1</u></b> : Caractéristiques des fibres de type I et de type II des muscles squelettiques et leurs principales sources d'énergie.	p.20
<b><u>Tableau 2</u></b> : Identité moléculaire, origine et demi-vie des principales espèces oxygénées réactives (ROS) pouvant influencer le muscle squelettique.	p.46
<b><u>Tableau 3</u></b> : Liste des différentes statines et leurs caractéristiques.	p.63



# **INTRODUCTION GENERALE**

## PREAMBULE

Le muscle se caractérise par sa complexité et par l'importante diversité de ses éléments constitutifs. Cette diversité a pour but d'assurer la spécialisation d'un type de muscle dans un rôle fonctionnel bien précis et traduit aussi sa « plasticité » et ses propriétés d'adaptation aux différents facteurs de son environnement immédiat. C'est également un tissu susceptible de présenter des signes de désadaptation et de déconditionnement en réponse à certaines pathologies telle l'insuffisance cardiaque. A une fonction musculaire lente ou rapide correspond une organisation cellulaire et des phénotypes contractile et métabolique particuliers, incluant les systèmes enzymatiques impliqués dans la mise en place et la régulation du métabolisme énergétique.

Les statines sont des médicaments très efficaces dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Ces médicaments présentent la particularité de présenter de nombreux effets « pléiotropes » bénéfiques au niveau cardiovasculaire. Cependant, 5 à 7% des patients présentent des effets indésirables qui se caractérisent par l'apparition de douleurs musculaires, de myopathie et l'apparition de rhabdomyolyse entraînant la mort de certains patients. Les mécanismes responsables de ces effets restent mal connus. Plusieurs mécanismes ont été proposés dont une qui implique la mitochondrie. C'est cette orientation que nous avons privilégiée afin de mieux comprendre les effets des statines sur la fonction mitochondriale à la fois sur le muscle squelettique et cardiaque, ce qui permettra d'étudier des muscles avec des phénotypes contractile et métabolique très différents. Nous avons essayé de mieux comprendre pourquoi et comment une même molécule peut entraîner des effets différents en fonction du type de muscle.

Dans ce manuscrit, nous avons tout d'abord exposé, dans les deux premiers chapitres de l'introduction, les propriétés du muscle squelettique et cardiaque. Etant donné notre intérêt pour la mitochondrie, nous avons tout particulièrement développé dans le deuxième chapitre la structure, la fonction et la biogenèse mitochondriale. Nous avons ensuite exposé, dans un troisième chapitre, la nature et les lieux de production des radicaux libres puis dans un quatrième chapitre une revue de la littérature sur les effets des statines sur les propriétés des muscles squelettique et cardiaque. Puis suivent les parties matériels et méthodes, nos résultats et une discussion générale et pour terminer, les perspectives de ce travail de thèse.

# 1. LE MUSCLE

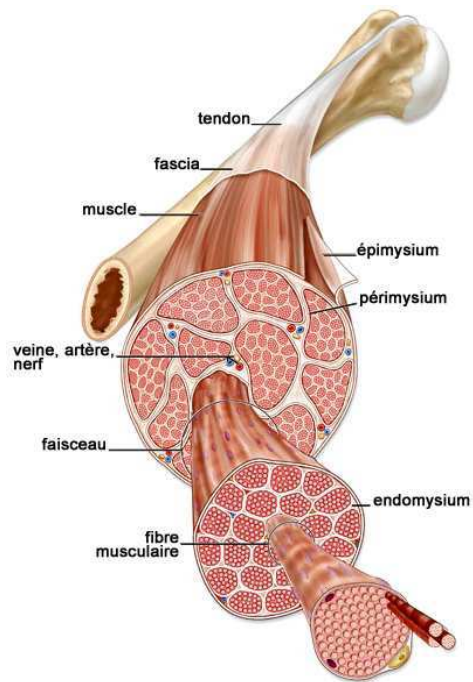
## 1.1. Le muscle squelettique

Les muscles forment l'ensemble de tissus le plus important de l'organisme. Ils représentent environ la moitié du poids du corps. Les muscles squelettiques, à eux seuls, forment environ 40% du poids du corps chez l'homme et 32% chez la femme. Chez les vertébrés, le rôle principal des muscles squelettiques est de permettre le déplacement dans l'espace. La contraction musculaire est à l'origine de la mise en mouvement des membres. Les muscles squelettiques montrent des particularités fonctionnelles importantes, notamment au niveau des vitesses de contraction, de la force développée et de la résistance à la fatigue. De plus, ils exposent une plasticité élevée en réponse aux contraintes environnementales, basée sur le potentiel de la fibre musculaire à subir des changements dans sa cytoarchitecture et dans sa composition en isoformes de protéines musculaires.

### 1.1.1. Organisation de l'appareil contractile

Les muscles squelettiques sont fixés sur le squelette osseux par leurs deux extrémités myotendineuses. Chaque muscle est composé de faisceaux de fibres musculaires, les cellules musculaires, qui s'étendent d'une extrémité à l'autre du muscle. Les cellules musculaires sont entourées d'une gaine conjonctive, l'endomysium. Elles sont rassemblées en plusieurs faisceaux enrobés d'une enveloppe commune à toutes les fibres: le pérимыsium. Il y a plusieurs faisceaux par muscle, compactés à l'intérieur d'une enveloppe aponévrotique: l'épимыsium. Le muscle est également entouré de fascias. Aux deux extrémités du muscle, le fascia fusionne avec l'endomysium qui entoure chaque cellule et forme les fibres tendineuses qui se rassemblent ensuite en tendons.

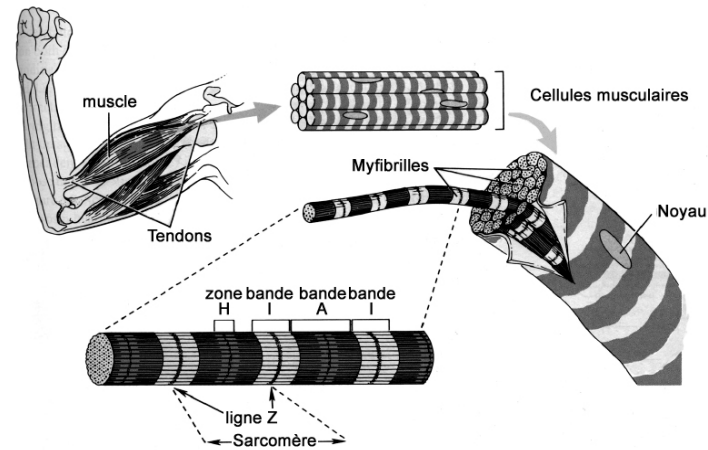
Après avoir traversé l'épимыsium, les vaisseaux sanguins qui assurent la vascularisation du muscle donnent naissance à un fin réseau de capillaires qui gagne le pérимыsium puis l'endomysium pour vasculariser chaque fibre musculaire. Les prolongements des nerfs gagnent également le pérимыsium. Ils se finissent en arborisation dont les ramifications se terminent dans la jonction neuromusculaire pour innover les différentes fibres musculaires (Figure 1).



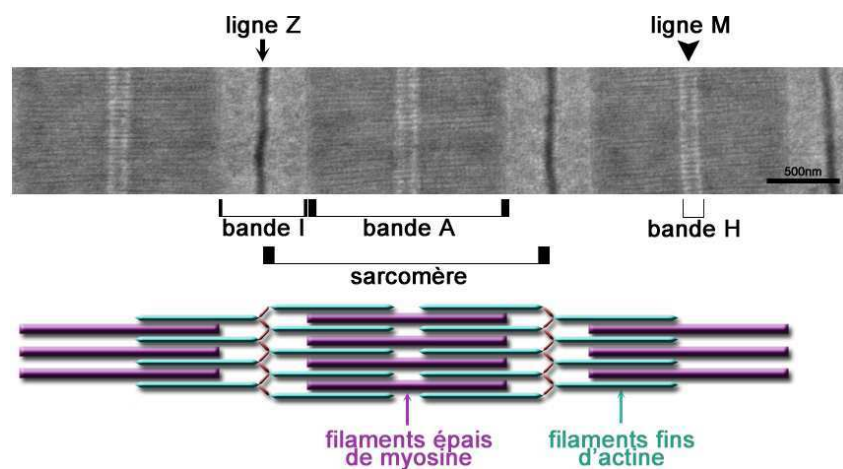
**Figure 1: Organisation du muscle squelettique.** Schéma adapté du site <http://academic.kellogg.cc.mi.us/>

### 1.1.2. Organisation et fonctionnement du sarcomère

Chaque faisceau musculaire est formé d'un ensemble de fibres musculaires qui sont de longues cellules cylindriques dont le diamètre varie de 10 à 100  $\mu\text{m}$  et la longueur de plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  à plusieurs dizaines de mm. C'est un syncysium résultant de la fusion de plusieurs cellules qui contient de nombreux noyaux situés à la périphérie, juste au-dessous de la membrane plasmique ou sarcolemme, le centre de la fibre étant occupé par les myofibrilles. Le cytoplasme des cellules musculaires (ou sarcoplasme) est occupé à 85%-90% par les myofibrilles, composées de sarcomères, les sous-unités contractiles du muscle (Figure 2A). Les sarcomères sont des assemblages de filaments fins et épais qui sont les protéines contractiles du muscle strié. En microscopie électronique, ces filaments apparaissent sous forme d'une alternance de bandes claires (bandes I: isotropes) et de bandes sombres (bandes A: anisotropes) (Figure 2 B). Un sarcomère est composé d'une bande A et de deux demies bandes I, séparées en leur centre par la ligne Z. Les bandes A sont composées de filaments épais de myosine qui chevauchent les filaments fins d'actine. Les bandes I sont dépourvues de myosine et sont composées des filaments fins d'actine.



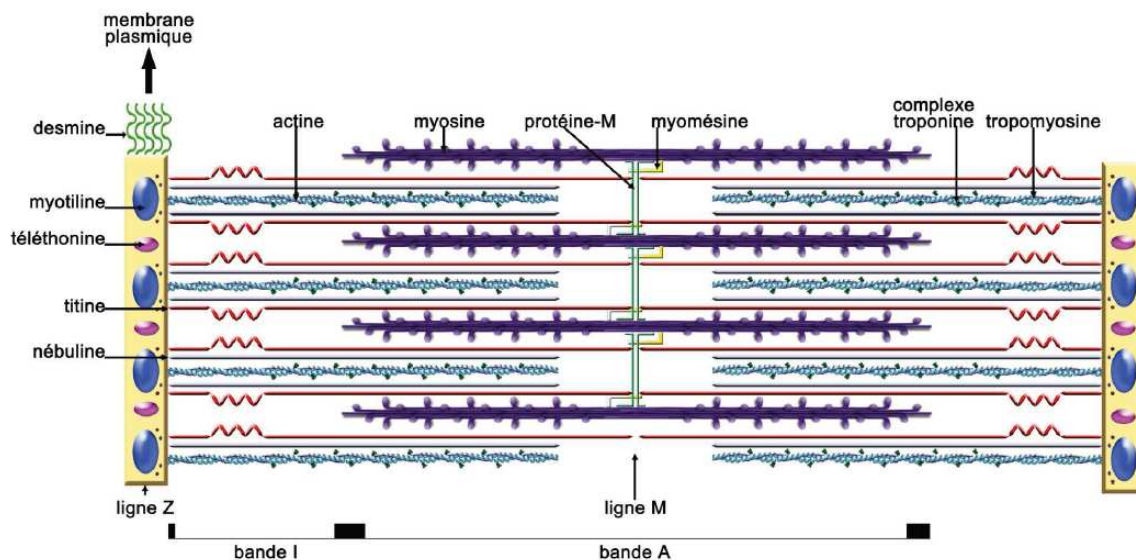
**B**



**Figure 2: La structure du muscle squelettique: du muscle à l'unité contractile.** **A.** La fonction de contraction du muscle est réalisée par les myofibrilles, l'appareil contractile des cellules musculaires, composées d'une succession de sarcomères. *Adaptation de (Goll et al., 2008).* **B.** Trois sarcomères d'une myofibrille de muscle squelettique de souris en coupe longitudinale observés au microscope électronique. Les filaments épais de la bande A sont constitués de myosine, les filaments fins de la bande I, d'actine.

La myosine de la bande A est composée d'une chaîne légère en forme de bâtonnet flexible et de la queue de la chaîne lourde de myosine qui porte les têtes de myosine (Figure 3, en violet). La bande H correspond à la région où les filaments épais de myosine ne chevauchent pas les filaments fins d'actine. Au milieu de la bande H se trouve la ligne M, qui apparaît sous forme de trois à cinq lignes en fonction du type de fibre. La bande M est composée, entre autres, de myoméline (Figure 3, en jaune) et de protéine M (Figure 3, en vert), qui stabilisent la myosine en connectant les filaments entre eux. Chaque filament de myosine est entouré de six filaments d'actine (Figure 3, en turquoise). Ces filaments d'actine (actine F) sont des polymères d'actine globulaire (actine G), ils sont arrangés en double hélice et centrés sur un axe de tropomyosine à laquelle ils sont rattachés. Les filaments d'actine sont reliés à la ligne

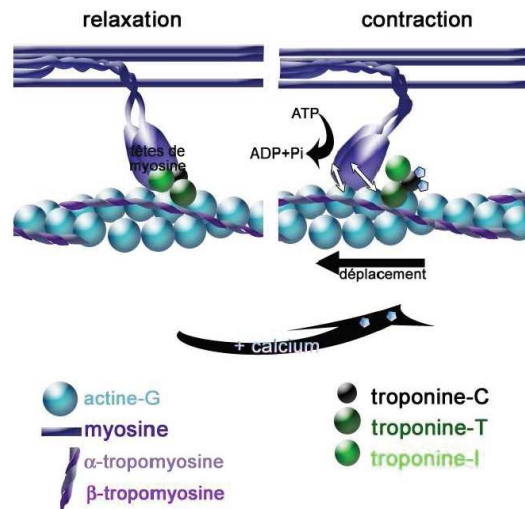
Z, elle-même composée d'un assemblage macromoléculaire où se trouvent entre autres les protéines  $\alpha$ -actinine, téléthonine,  $\gamma$ -filamine, myotiline, obscurine, titine (en rouge) et nébuline (en gris clair). La titine, avec ses 3000 kDa, est la plus grande protéine connue. Elle s'étend sur la longueur d'un demi-sarcomère (soit sur 1,2 à 1,5  $\mu\text{m}$ ), son domaine N-terminal est dans la ligne Z et son C-terminal dans la ligne M. La titine est une protéine qui confère des propriétés élastiques aux sarcomères. Le complexe des troponines est ancré à intervalles réguliers sur la tropomyosine. Ce complexe est formé de la troponine C (TnC) qui lie le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de la troponine I (TnI, Inhibitrice) qui, au repos, masque les sites de fixation de la myosine sur l'actine, et de la troponine T (TnT) responsable de la liaison du complexe avec la tropomyosine.



**Figure 3: Structure du sarcomère.** Représentation schématique de l'organisation des protéines principales du sarcomère. Les filaments d'actine sont ancrés à la ligne Z. L'extrémité N-terminal de la titine est dans la ligne Z et la protéine s'étend jusqu'à la ligne M.

Au repos, la tropomyosine et la TnI (Figure 4, en vert clair) masquent les sites de fixation des têtes de myosine sur l'actine. La contraction se produit lorsque la TnC (Figure 4, en noir), après avoir fixé du  $\text{Ca}^{2+}$ , change de conformation et déplace la TnI et la tropomyosine. Les têtes de myosine (en violet) ont alors accès à leurs sites de fixation sur l'actine (en turquoise). Elles hydrolysent une molécule d'ATP et se replient pour se rapprocher de leur site de fixation et ne libèrent le phosphate inorganique qu'une fois la liaison établie. Le relargage de l'ADP permet aux têtes de myosine de se replier complètement ce qui provoque le raccourcissement des sarcomères. Le décrochage des têtes de myosine est induit par la

fixation d'un nouvel ATP et par la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  de la TnC. Le sarcomère se rallonge, le muscle se relâche.



**Figure 4: La contraction musculaire nécessite de l'ATP et du  $\text{Ca}^{2+}$ .** La TnI ne démasque les sites de fixation de la myosine sur l'actine que lorsque la TnC a lié du  $\text{Ca}^{2+}$  et change de conformation. Une fois la tropomyosine déplacée avec le complexe troponine, la myosine accède à son site de fixation sur l'actine. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet le relâchement de la tête de myosine qui vient s'associer avec l'actine. La libération de l'ADP provoque le mouvement de la tête de myosine vers l'extérieur du sarcomère, ce qui raccourcit la myofibrille et réalise la contraction musculaire. Au repos, la myosine est liée à une molécule d'ATP.

### 1.1.3. Classification des fibres musculaires striées squelettiques

A l'intérieur d'un muscle, les fibres musculaires striées squelettiques ne sont pas toutes identiques. Elles possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles variables. Plusieurs classifications, basées sur la révélation des propriétés contractiles ou métaboliques, ont été établies. L'activité ATPasique des fibres a tout d'abord été utilisée pour les classer selon leur vitesse de contraction. La combinaison de plusieurs pH d'incubation des fibres selon la méthode de Brooke et Kaiser (Brooke & Kaiser, 1970), a permis de distinguer 3 types de fibres :

- les fibres I appelées fibres lentes,
- les fibres IIA et IIB appelées fibres rapides.

D'autres auteurs ont combiné la révélation du type contractile par l'activité ATPasique, avec le type métabolique par l'analyse de l'activité du métabolisme oxydatif telle que la succinate déshydrogénase (Nemeth & Pette, 1981). Enfin, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les chaînes lourdes de la myosine (MHC) a permis de déterminer un quatrième type de fibres de type intermédiaire, les fibres IIX.

La composition en fibres de type I ou de type II est variable d'un muscle à l'autre et il existe une certaine corrélation entre le type de cellules musculaires striées et les propriétés contractiles du muscle. La majorité des muscles possède environ 50% de chaque sorte d'unités. Mais certains muscles sont plus riches en fibres lentes (les muscles posturaux) et d'autres en fibres rapides (les muscles de l'activité gestuelle). La proportion de chaque espèce de fibres détermine, une fois l'âge adulte atteint, l'aptitude d'un mammifère à réaliser un certain type de performance. L'entraînement peut modifier spécifiquement chaque type de fibre mais dans des proportions toutes relatives. En effet, le déterminisme génétique joue également un rôle important.

L'ensemble des cellules musculaires striées qui dépendent d'un même neurone moteur est appelé une unité motrice. Ces cellules ont une topographie dispersée au sein du muscle. Toutes les cellules musculaires d'une unité motrice sont d'un même type, et il semble que le type des cellules musculaires soit déterminé par la cellule nerveuse qui exerce une influence permanente sur elles.



**Figure 5 :** Marquage au NADH sur une coupe transversale d'un muscle squelettique. Les fibres très colorées correspondent aux fibres de type I alors que les fibres peu colorées correspondent aux fibres de type II.

#### *a. Les fibres à contraction lente*

La fibre de type I, également dénommée S.T. (slow twitch) est une fibre rouge, à contraction lente et à métabolisme essentiellement aérobie oxydatif (Tableau 1). A l'intérieur de cette fibre, l'ATP produit est essentiellement issue du processus de phosphorylation oxydative intra-mitochondriale (Figure 6). Elle a une forte teneur en myoglobine. Elle est entourée d'un riche réseau capillaire et elle est spécifiquement équipée pour un métabolisme aérobie et une activité prolongée à faible tension. La vitesse de contraction et la force développée sont



faibles mais la fibre de type I est très peu fatigable (Schiaffino, 2010). On retrouve ce type de fibres notamment chez les marathoniens.

*b. Les fibres à contraction rapide*

- *La fibre de type IIA*

C'est une classification basée sur le polymorphisme des chaînes lourdes de myosine du muscle squelettique, également dénommée F.T.A (fast twitch A). C'est une fibre blanche rapide mais qui utilise à la fois un métabolisme oxydatif et glycolytique pour produire de l'ATP (Tableau 1).

Elle est riche en glycogène et en enzymes glycolytiques et dans une moindre mesure en mitochondries (Figure 6). Elle est moins oxydative que la fibre de type I. C'est une fibre relativement résistante à la fatigue, elle est le point de départ d'une activité phasique prolongée (Schiaffino, 2010).

- *La fibre de type IIB*

Elle est également dénommée F.T.B (fast twitch B). C'est une fibre blanche phasique. Son métabolisme est essentiellement anaérobie. Elle est pauvre en mitochondries et en enzymes oxydatives. Elle est riche en glycogène et a une très forte activité glycolytique (Tableau 1). Elle est très sensible à la fatigue. Cette fibre est à l'origine d'une puissante activité physique développant une grande force mais de courte durée (Schiaffino, 2010). On retrouve donc ce type de fibres notamment chez les sprinters.

On évoque également des fibres de type II X, aux caractéristiques (métabolisme oxydatif / glycolytique) intermédiaires entre les fibres de type II A et II B.

- *Les fibres intermédiaires*

Appelées aussi fibres de transition, d'autres types de fibres musculaires sont trouvées à l'intérieur du muscle : les fibres II AB et les fibres II C. Ces fibres semblent davantage correspondre à des étapes de transition d'un type de fibre à un autre (Figure 6).

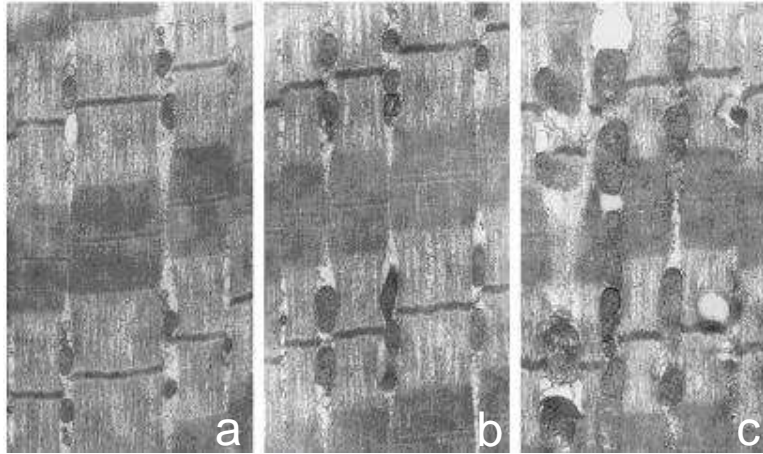
Les fibres musculaires présentent en effet cette particularité de pouvoir évoluer d'un type à un autre, et ce, en fonction de la nature du travail auquel le muscle est le plus fréquemment

soumis. Les fibres de type II X, par exemple, sont retrouvées chez les jeunes sujets et réapparaissent lors d'une immobilisation prolongée.

La plupart des muscles squelettiques, spécialement chez l'Homme, sont mixtes et composés de fibres oxydatives et glycolytiques.

Type de fibres/MHC	Fibre I ou ST	Fibre II A ou FT-A	Fibre II B ou FT-B
<b>Couleur</b>	Rouge	Blanche	
<b>Composition intracellulaire dominante</b>	Mitochondries +++ Myoglobine	Mitochondries +/- ATPase de la myosine	
<b>Voie de synthèse de l'ATP</b>	Aérobie	Aéro-anaérobie	Anaérobie
<b>Capacité anaérobie Métabolisme glycolytique</b>	Faible	Moyenne	Elevée
<b>Vitesse de contraction</b>	Lente	Rapide	
<b>Résistance à la fatigue</b>	Elevée	Moyenne	Faible
<b>Force développée</b>	Limitée	Moyenne	Importante
<b>Taille motoneurone</b>	Petite	Grande	
<b>Source énergétique principale d'ATP</b>	Glucose sanguin et acides gras libres Métabolisme oxydatif aérobie	Créatine phosphate Puis Glucose dérivé du glycogène musculaire et métabolisé par la glycolyse anaérobie	
<b>Utilisation du glycogène musculaire</b>	Lentement épuisé	Rapidement épuisé	
<b>Effort type</b>	Marathon	Sprint	

**Tableau 1 : Caractéristiques des fibres de type I et de type II des muscles squelettiques et leurs principales sources d'énergie**



**Figure 6: Section longitudinale des fibres rapides, intermédiaires et lentes d'un muscle triceps brachial d'une femme âgée de 25 ans.** Ces trois types de muscles ont 2 mitochondries de part et d'autres de la bande I. **a)** la fibre rapide possède des petites mitochondries de 0.3  $\mu\text{m}$  de diamètre. **b)** les fibres intermédiaires ont une taille intermédiaire avec une taille de 0.6  $\mu\text{m}$ . **c)** les fibres lentes ont de grandes mitochondries avec un diamètre de 0.9  $\mu\text{m}$ . (Tiré de l'article (Ogata & Yamasaki, 1997))

#### 1.1.4. Les différents phénotypes métaboliques

Le muscle strié squelettique est constitué de cellules ou fibres musculaires hautement différenciées, compartimentées et spécialisées dans la contraction. Les myofibrilles assurent la contraction, le réticulum sarcoplasmique permet la régulation du calcium et les mitochondries, ainsi que les complexes glycolytiques, la synthèse d'ATP. Le muscle squelettique est ainsi constitué d'une variété de fibres ayant des propriétés fonctionnelles, structurales, biochimiques et métaboliques adaptées à leur activité contractile (Schiaffino & Reggiani, 1994; Schiaffino, 2010). Le muscle rapide glycolytique est adapté à un besoin énergétique intense et bref grâce à une disponibilité immédiate du stock d'énergie cytosolique (phosphocréatine et ATP), grâce à un effet tampon important et dépendant de la réaction catalysée par la créatine kinase et enfin grâce à une activité glycolytique importante (Kushmerick *et al.*, 1992). Il est également caractérisé par la prédominance de fibres contractiles rapides de type IIB (Brooke & Kaiser, 1970), contenant peu de mitochondries et pauvres en myoglobine et en capillaires (ce qui leur donnent un aspect blanc). Elles sont par contre riches en glycogène. Ce type de muscle a donc un métabolisme essentiellement glycolytique basé sur d'importantes réserves énergétiques rapidement mobilisables, une fatigabilité importante et une récupération décalée dans le temps et assez lente. Les muscles lents à activité soutenue (muscle postural) ou cyclique (cœur) sont essentiellement composés de fibres à contraction lente de type I et à activité ATPasique lente. Ces muscles sont riches

en myoglobine (aspect rouge), présentent un réseau capillaire bien développé, une faible réserve en phosphocréatine et un métabolisme essentiellement oxydatif puisque les phosphorylations oxydatives sont la source principale d'énergie chimique utilisée par les myofibrilles durant la contraction. Il est apte à soutenir un effort prolongé, ce qui implique un couplage efficace entre l'utilisation et le renouvellement énergétique et permet un flux énergétique stable et bien ajusté (Ventura-Clapier *et al.*, 1998; Saks *et al.*, 2001). Il existe également des phénotypes intermédiaires comme le muscle rapide-oxydatif composé de fibres IIA et riche en mitochondries.

## **1.2. Muscle cardiaque**

### 1.2.1. Description générale

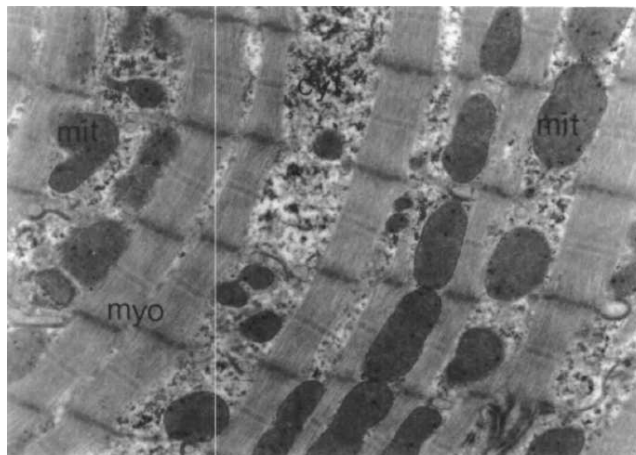
Le muscle cardiaque présente des caractéristiques structurales et fonctionnelles remarquables. Il est strié comme le muscle squelettique mais involontaire comme le muscle lisse. Comme pour le muscle squelettique, ses contractions sont puissantes et consomment une grande quantité d'énergie, comme pour le muscle lisse, elles sont continues et initiées par des mécanismes intrinsèques.

Les fibres cardiaques se ramifient librement et sont reliées par des disques intercalaires (épaississements transversaux irréguliers de la membrane plasmique). Ces disques intercalaires contiennent des desmosomes et des jonctions ouvertes. Les desmosomes empêchent les cellules cardiaques de se séparer pendant la contraction. Quant aux jonctions ouvertes, elles laissent passer librement les ions d'une cellule à l'autre et permettent la transmission directe du potentiel d'action dans tout le tissu cardiaque. Les jonctions ouvertes couplent électriquement toutes les fibres cardiaques permettant au myocarde de se comporter comme un syncysium, c'est-à-dire fonctionne d'un seul bloc (électriquement et mécaniquement). En outre, le cœur est également constitué d'1% de cellules non contractiles ou cellules cardionectrices qui présentent un automatisme leur permettant de déclencher d'elles-mêmes des potentiels d'action. Ces cellules forment le système de conduction du cœur ou système cardionecteur qui est composé du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire, du faisceau auriculo-ventriculaire et de ses branches ainsi que des myofibrilles de conduction cardiaque. Ce système coordonne la dépolarisation et les battements du cœur. Comme le nœud sinusal a la fréquence de dépolarisation spontanée la plus rapide, il constitue

le centre rythmogène. Des hormones et divers neurotransmetteurs du système nerveux autonome peuvent influencer sur ce centre régulateur et en modifier la fréquence cardiaque.

*a. Anatomie microscopique du muscle cardiaque*

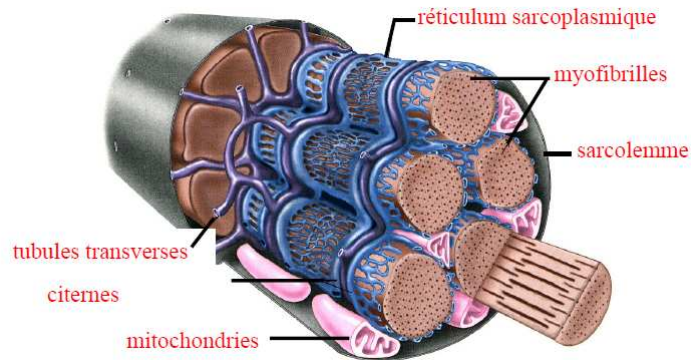
La description parfaite de la structure des cellules cardiaques a été faite par plusieurs équipes scientifiques (Barth *et al.*, 1992). Les mesures morphologiques quantitatives de cellules cardiaques provenant d'espèces animales différentes ont montré que le sarcoplasme occupe 10 à 20% du volume cellulaire, les myofibrilles occupent 50 à 60% et les mitochondries 25 à 35% du volume cellulaire (Schaper *et al.*, 1985; Barth *et al.*, 1992). Les myocytes ventriculaires sont de longues cellules cylindriques, 50 à 100 µm de longueur et 10 à 25 µm de diamètre. Les cardiomyocytes possèdent également un ou deux noyaux situés en leur centre et entourés de sarcomères (Figure 7).



**Figure 7 : Image en microscopie électronique d'un muscle cardiaque de chien.** Myo : myofibrille ; mit : mitochondrie et Cyt : cytoplasme.

Le sarcolemme s'invagine pour former des tubules transverses qui pénètrent dans les fibres musculaires. Ce système de tubules transverses ou tubules T (Figure 8) permet la contraction synchronisée de tous les sarcomères d'une fibre musculaire. Possédant une lumière avec l'espace extracellulaire, il permet ainsi de rapprocher l'extérieur et l'intérieur de la cellule et de faciliter les échanges ioniques.

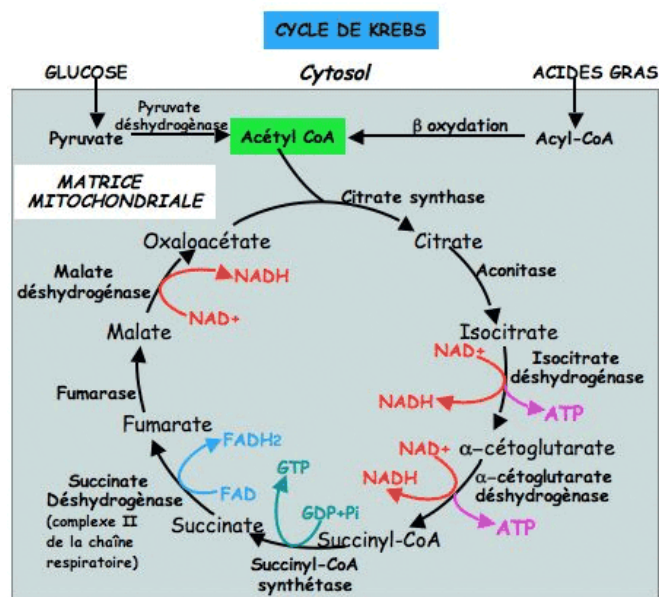
Le réticulum sarcoplasmique (Figure 8) est un réseau de tubes étanches et flexibles qui entourent les myofibrilles. Ces tubes sont dilatés à leurs extrémités et forment les citernes terminales qui sont accolées aux tubules T. Le réticulum sarcoplasmique est le lieu de stockage du  $Ca^{2+}$ .



**Figure 8 : Représentation schématique d'une fibre musculaire cardiaque.** (Source: Vander et coll. Physiologie humaine, Edition Maloine, 1989)

### 1.3. Phosphorylation oxydative

Les voies de dégradation des lipides et des hydrates de carbones se rejoignent au niveau de la mitochondrie avec l'acétyl CoA qui est métabolisé au cours du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs (Krebs & Johnson, 1937) (Figure 9). À la fin du cycle, une molécule d'acétyl CoA fournira 2 molécules de  $\text{CO}_2$ , 3 molécules de NADH, 1 molécule de  $\text{FADH}_2$  et une molécule d'ATP. Les transporteurs d'hydrogène et d'électrons NADH et  $\text{FADH}_2$ , réagissent ensuite avec les enzymes de la chaîne respiratoire pour réduire l'oxygène en eau et synthétiser de l'ATP : c'est la phosphorylation oxydative, le processus majeur de fourniture d'énergie pour les fibres des muscles squelettiques et cardiaque. Cet aspect sera développé dans le chapitre suivant consacré à la mitochondrie.



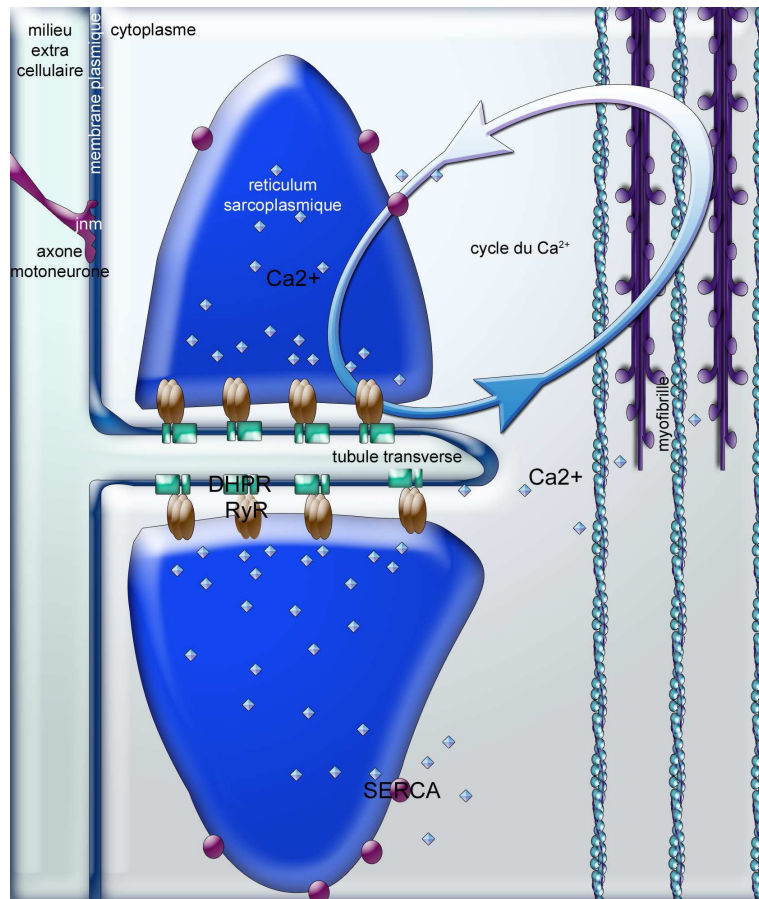
**Figure 9 : Schéma général du cycle de Krebs.**

## 1.4. Le couplage Excitation-Contraction

### 1.4.1. Dans le muscle squelettique

A la jonction entre les tubules T et le réticulum sarcoplasmique, les deux membranes se trouvent face à face, et forment une structure appelée triade. Le couplage excitation-contraction (couplage-EC) qui prend place à la triade, est la transformation d'un signal électrique en travail mécanique via une libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du réticulum sarcoplasmique et vers le cytoplasme. Il est réalisé par un assemblage macromoléculaire: le complexe de relâchement du calcium (CRC). Le CRC est composé, entre autre, de deux canaux calciques couplés physiquement: le récepteur des dihydropyridines (DHPR), un canal calcique voltage dépendant de la membrane plasmique du tubule-transverse (Figure 10, en vert) et le récepteur de la ryanodine (RyR) dans la membrane du réticulum sarcoplasmique qui lui fait face (Figure 10, en orange).

La synapse entre le neurone moteur et la cellule musculaire est la jonction neuromusculaire. L'acétylcholine (ACh) libérée par le neurone moteur à la jonction neuromusculaire se fixe sur son récepteur au niveau de la membrane plasmique de la cellule musculaire ce qui provoque une entrée de  $\text{Na}^+$ , dépolarisant ainsi la membrane. Cette dépolarisation se propage sur toute la surface de la cellule et jusqu'à l'intérieur de celle-ci grâce aux tubules T, les invaginations de la membrane plasmique. La dépolarisation produit un changement de conformation du DHPR qui induit l'ouverture du RyR par couplage physique direct. L'ouverture du RyR permet au  $\text{Ca}^{2+}$  de sortir du réticulum sarcoplasmique selon son gradient électrochimique (gradient de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$ : 100  $\mu\text{M}$  dans le réticulum sarcoplasmique contre 100 nM dans le cytoplasme). Le calcium libéré va se fixer sur la TnC dans le complexe des troponines et ainsi déclencher la contraction musculaire. Le muscle se relâche lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  est repompé dans la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique par la pompe calcium ATPase (Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA) localisée dans toute la membrane de la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique sauf dans la partie jonctionnelle, face au tubule-T.



**Figure 10:** Le couplage excitation contraction au niveau de la triade.

#### 1.4.2. Dans le muscle cardiaque

Le couplage-EC du muscle squelettique fonctionne donc sur le mode « VICR »: (Voltage Induced Calcium Release), par opposition au « CICR » (Calcium Induced Calcium Release) dans le muscle cardiaque. L'évènement déclenchant la contraction musculaire est une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Au repos, cette concentration est d'environ  $0,1 \mu\text{M}$ . Lors d'une stimulation, elle peut augmenter jusqu'à  $1 \mu\text{M}$  soit 10 fois plus. La différence de potentiel transmembranaire des cellules cardiaques « pacemaker », créée par la sortie du  $\text{K}^+$  et l'entrée du  $\text{Na}^+$ , induit l'ouverture des canaux voltage-dépendent et l'apparition du potentiel d'action sans intervention d'un neurone excitateur. Le potentiel d'action est transmis aux autres cellules musculaires cardiaques reliées les unes aux autres par des jonctions communicantes. La vague de dépolarisation de la membrane plasmique ouvre les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  des récepteurs de dihydropyridines (DHPR). Le flux calcique déclenche l'ouverture des récepteurs ryanodine du réticulum sarcoplasmique, entraînant la libération du



$\text{Ca}^{2+}$  par un mécanisme spécifique (Libération du Calcium Induit par le Calcium" (calcium induced calcium release, CICR). La concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  est dépendant du fonctionnement de quatre structures : l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers le sarcolemme, la libération et la séquestration du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique, la liaison et la dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  de la troponine et les flux calciques mitochondriaux (Gordon *et al.*, 2001). La plupart du  $\text{Ca}^{2+}$  libéré dans le cytosol suite au potentiel d'action se fixe à la troponine. Moins de 1% entre dans la mitochondrie et moins de 1% reste en état libre dans le cytosol (Yaniv *et al.*, 2008). Le rôle du réticulum sarcoplasmique ne se limite pas à la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ , mais il participe à l'évacuation du  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu intracellulaire via la pompe ATP dépendante, la SERCA-ATPase du réticulum sarcoplasmique. La SERCA-ATPase transfère le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique contre le gradient de concentration en utilisant l'énergie libéré par l'hydrolyse de l'ATP.

### **En résumé.**

*A la lumière de la comparaison entre muscle squelettique et muscle cardiaque, il apparaît que leurs points communs permettent de les classer dans une même catégorie, celle des muscles striés, mais que leurs différences, aussi bien structurales que fonctionnelles, imposent de les séparer en deux sous-catégories. La production d'énergie aérobie dans ces muscles est dépendante de la capacité à produire de l'énergie lors du processus de la phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. La mitochondrie est un organe composé d'une multitude de complexes protéiques qui sont tous finement régulés en fonction des besoins et des conditions du milieu cellulaire. La mitochondrie qui a un rôle fondamental dans la production d'énergie est aussi un lieu privilégié de production de radicaux libres oxygénés qui sont à l'origine de réactions bénéfiques ou délétères pour l'équilibre de la cellule suite à un stress tel qu'un exercice ou un traitement avec des substances chimiques.*

## 2. LA MITOCHONDRIE

La mitochondrie est un organite riche en composants biochimiques dont le rôle majeur est la production d'énergie. Elle comporte plusieurs exemplaires de son propre ADN (mtADN) distinct de l'ADN nucléaire (Wiesner *et al.*, 1992). Cependant, le mtADN encode seulement pour une fraction de 13 protéines fondamentales pour la fonction mitochondriale et plus particulièrement pour les complexes de la chaîne respiratoire (Taylor & Turnbull, 2005). Les protéines restantes (environ 850) sont encodées dans le noyau et transportées dans la mitochondrie. En plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en énergie, les mitochondries ont d'autres rôles vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule. Elles participent à l'homéostasie calcique, à la régulation du pH intracellulaire, à la synthèse d'hormones stéroïdes et des hèmes, ainsi qu'à la régulation de la thermogenèse. De plus, elles constituent un des principaux sites de production des radicaux libres qui semble jouer un rôle clé dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire.

### 2.1. Structure

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé dans la transformation d'énergie, elle est de forme longitudinale et contient deux membranes (Figure 11).

#### 2.1.1. La membrane externe

C'est une membrane rigide dans laquelle un nombre important de protéines sont enchâssées. Ces protéines permettent les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en formant des pores qui autorisent, d'une part, la translocation de protéines (TOM), et d'autre part, permettent les échanges de métabolites de petit poids moléculaire via des porines. La porine, également appelée voltage dépendant anion channel (VDAC) est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale. Les trois isoformes dénombrés chez les mammifères (VDAC1, VDAC2, VDAC3) présentent des différences de perméabilité et joueraient un rôle différent dans la régulation de la fonction mitochondriale (Anflous *et al.*, 1998)

### 2.1.2. L'espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire se situe entre les deux membranes et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire (Duchen, 2004). La créatine kinase mitochondriale (mi-CK) occupe un rôle prépondérant dans le transfert d'énergie. Fixée sur la membrane interne, elle a un accès privilégié à l'ATP, généré dans la matrice mitochondriale et transporté dans l'espace inter-membranaire par l'adénine nucléotide translocase (ANT). La mi-CK, également couplée à la membrane externe, pourrait être impliquée dans la régulation de l'importation de créatine dans l'espace inter-membranaire et dans l'exportation de la phosphocréatine dans le cytosol (Ventura-Clapier *et al.*, 2004).

### 2.1.3. La membrane interne

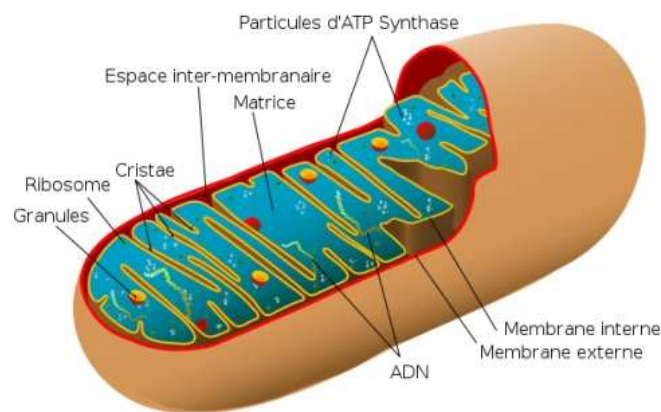
La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective, elle forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites. Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie :

- Les complexes de la chaîne respiratoire sont représentés par 5 complexes protéiques, dont l'ATP synthase, ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de proton et la formation d'ATP.
- L'ANT est constituée de deux sous-unités de 32 kDa et d'un site unique de liaison à l'ATP ou l'ADP. Selon sa conformation, elle fait face, alternativement, à la matrice ou à l'espace inter-membranaire. L'ATP mitochondriale est échangée par l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1. L'ANT est exprimé par trois isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. Chez l'Homme et le rat, ANT1 est l'isoforme exprimée de manière prédominante dans le muscle cardiaque et squelettique, ANT2 est ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus en quantité variable en fonction de l'activité respiratoire du tissu. ANT3 a un faible niveau d'expression dans le cerveau, le foie, le rein, le cœur et les muscles squelettiques.
- Les protéines découplantes (UCPs) sont enchâssées dans la membrane interne et permettent le passage de protons de la matrice à l'espace inter-membranaire. Ce phénomène de fuite induit un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Une partie de l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur. Concernant le rôle physiologique de ce découplage, il se pourrait que cette fuite des

protons permette de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone, et donc minimise le stress oxydant et les dégâts inhérents au niveau de l'ADN (Brand, 2000). Les UCPs joueraient donc un rôle de protection contre le stress oxydant (Echtay *et al.*, 2002).

#### 2.1.4. La matrice mitochondriale

La matrice est le compartiment interne de la mitochondrie délimité par la membrane interne, et contient des centaines d'enzymes nécessaires au cycle de Krebs et à la  $\beta$ -oxydation des acides gras, ainsi que l'ADN mitochondrial codant pour des protéines composant certaines sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, des ribosomes mitochondriaux, des tRNA, des rRNA et des enzymes nécessaires à l'expression de l'ADN.



**Figure 11 : Structure d'une mitochondrie.** La mitochondrie est composée de deux membranes, externe et interne, délimitant un espace inter-membranaire et une matrice. Les replis caractéristiques de la membrane interne sont appelés crêtes mitochondriales ou cristae.

## 2.2. Distribution des mitochondries dans la cellule musculaire

L'utilisation de sondes fluorescentes a permis de décrire la mitochondrie comme un réticulum ou un réseau dynamique et continu qui entre continuellement en fusion ou en fission (Duchen, 2004). Cependant, une étude récente a montré que les mitochondries des cellules cardiaques adultes du rat en conditions physiologiques normales ne sont pas soumises aux processus de fusion et fission (Beraud *et al.*, 2009).

Ces analyses ont permis de regrouper les mitochondries en deux groupes : les mitochondries inter-fibrillaires et subsarcolemmales. Ces deux populations présentent des propriétés

biochimiques et des niveaux d'activité enzymatique différents et semblent répondre différemment au stress métabolique (Lesnefsky & Hoppel, 2003). Les mitochondries sont ancrées dans la cellule grâce à des protéines du cytosquelette et peuvent se déplacer grâce à des protéines dites motrices telles que les myosines, la dynéine ou la kinésine.

Les mitochondries occupent environ 30 à 40 % du volume de la cellule cardiaque. Dans les cellules musculaires oxydatives, les mitochondries inter-myofibrillaires ont un arrangement cytoarchitectural assimilable à un cristal permettant d'optimiser le transfert d'énergie (Vendelin *et al.*, 2005).

Les muscles squelettiques possèdent un contenu variable en mitochondries. Elles peuvent occuper 1% du volume cellulaire dans les muscles glycolytiques et jusqu'à 6 à 30 % dans les muscles oxydatifs.

## **2.3. Fonctionnement de la mitochondrie**

### 2.3.1. La chaîne de transport des électrons

Les éléments clés constituant la mitochondrie sont d'une part, les réactions enzymatiques d'oxydation des substrats énergétiques et d'autre part, la chaîne de transport des électrons ou chaîne respiratoire. L'oxydation des substrats par le cycle de Krebs ou la  $\beta$ -oxydation entraîne la réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$  et du  $\text{FAD}^{2+}$  en  $\text{FADH}_2$ . Ces intermédiaires sont appelés équivalents réducteurs et fournissent des électrons à la chaîne respiratoire. Cette dernière est composée de cinq complexes :

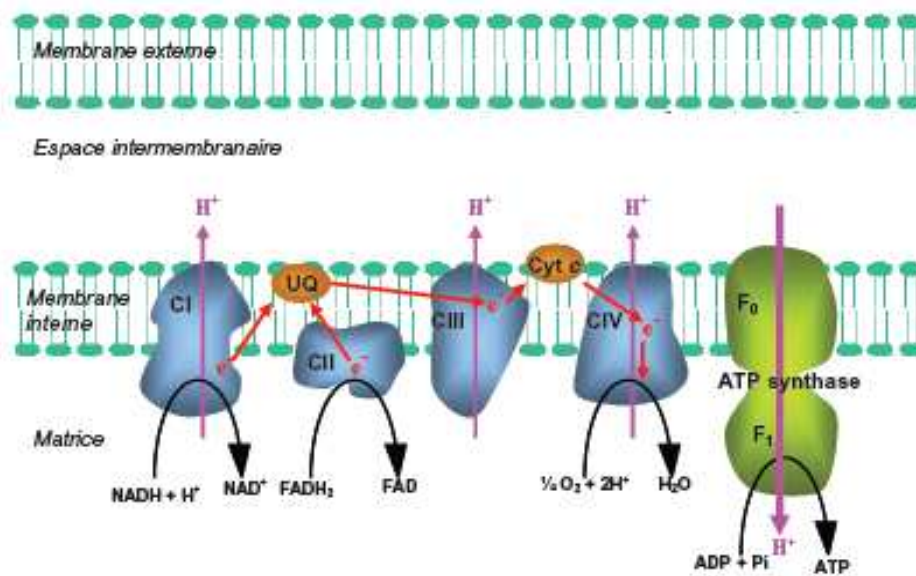
- le complexe I ou NADH déshydrogénase
- le complexe II ou succinate déshydrogénase
- le complexe III ou ubiquinol cytochrome c réductase
- le complexe IV ou cytochrome c oxydase
- le complexe V ou ATP synthase

Tous sont composés de plusieurs sous-unités protéiques. Seul le complexe II est entièrement codé dans le noyau tandis que les autres complexes résultent de l'association de protéines codées par les ADN nucléaire et mitochondrial (Kirby *et al.*, 2004).

### 2.3.2. La phosphorylation oxydative

Les électrons sont transportés par le  $\text{NADH}$  et le  $\text{FADH}_2$ , respectivement aux complexes I et II qui transfèrent l'électron à l'ubisemiquinone, cette dernière l'acheminant au complexe III.

L'arrivée de l'électron au complexe IV constitue la fin de la chaîne d'oxydoréduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les réactions associées au passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP (Figure 12) (Stock *et al.*, 1999).



**Figure 12 : Chaîne de transport des électrons.** Les électrons sont apportés au niveau de la chaîne respiratoire par les équivalents réducteurs : NADH (complexe I) et FADH<sub>2</sub> (complexe II).

L'électron est ensuite amené au niveau du complexe IV où il est utilisé pour former de l'eau. Le passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraîne le passage de protons (H<sup>+</sup>) dans l'espace inter-membranaire et crée un gradient protonique qui va permettre la formation ATP lors du passage des protons au niveau de l'ATP synthase.

#### a. Complexe I : NADH déshydrogénase

C'est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à la translocation de quatre protons au travers de la membrane, ce qui participe à la force proton-motrice (Sazanov, 2007). Cette enzyme est constituée d'environ 45 sous-unités, la plupart (38) sont codées par le génome nucléaire, tandis que 7 autres sont codées par le génome mitochondrial. Avec son poids moléculaire de 980 kDa environ, elle constitue l'un des plus gros complexes protéiques membranaires. Le domaine hydrophile de ce complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine

mononucléotide qui est le premier accepteur d'électrons et neuf centres Fer/Soufre (FeS) constituant le centre catalytique de l'enzyme (Sazanov, 2007). Le système de pompage des protons est quant à lui localisé dans la partie membranaire du complexe (Kao *et al.*, 2003).

#### *b. Complexe II : Succinate déshydrogénase*

Il joue un rôle important dans la mitochondrie puisqu'il fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Il est composé de quatre sous-unités (A à D). Les sous-unités A et B constituent le domaine hydrophile de l'enzyme dépassant dans la matrice tandis que les sous-unités C et D constituent le domaine d'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale. Les quatre gènes codant pour ces quatre sous-unités font partie du génome nucléaire. Ce complexe qui oxyde le succinate en fumarate peut cependant, dans certaines conditions, fonctionner dans le sens inverse. De plus, dans certains tissus tels que le rein, la quantité de complexes II est particulièrement élevée par rapport à certaines autres enzymes matricielles (la citrate synthase par exemple). Dans ce cas, la succinate déshydrogénase délivre aux ubiquinones une quantité d'électrons supérieure à ce que le cytochrome c peut transporter ce qui favorise une suroxydation des ubiquinones. Ce phénomène peut entraîner un flux reverse d'électrons au travers du complexe I (Favier *et al.*, 2005), entraînant une réduction plus importante de ce complexe, ce qui favorise la production de radicaux libres. Des défauts d'activité de ce complexe ont été corrélés au développement de pathologies telles que l'ataxie de Friedrich (Rotig *et al.*, 1997), la maladie de Huntington (Butterworth *et al.*, 1985) ou certaines encéphalopathies infantiles rares (Bourgeron *et al.*, 1995). Des mutations de sous-unités du complexe II ont également été décrites à plusieurs reprises comme étant un facteur important de tumorigénèse (Baysal, 2006).

#### *c. Complexe III : Complexe b-c1 ou ubiquinone-cytochrome c réductase*

Il contient quatre groupes prosthétiques redox actifs : 2 cytochromes b (bL et bH), le cytochrome c1 et un centre Fer/Soufre. Ce complexe est composé de 11 sous-unités protéiques parmi lesquelles les sous-unités III, IV et V constituent les groupes redox, les 8 autres sous-unités ne comportant pas de groupement prosthétique. La majorité de ces sous-unités est codée par le génome nucléaire, seule la sous-unité comprenant les cytochromes b est codée par le génome mitochondrial (Borisov, 2002). Cette enzyme catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette étape est associée au transfert de 4



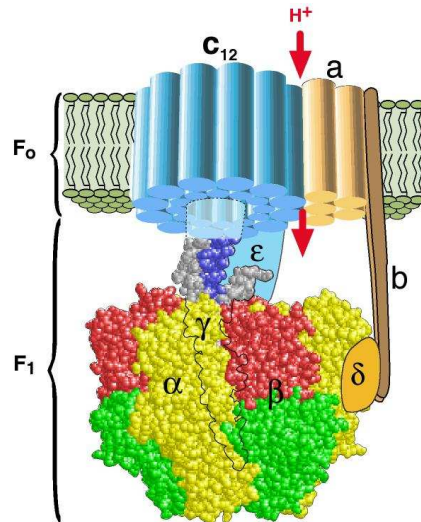
protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire grâce au cycle Q décrit par Mitchell (1975). Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme ce qui permet le pompage des protons (Mitchell, 1975).

#### *d. Complexe IV : cytochrome c oxydase*

Il appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Son isoforme humaine est composée de 13 sous-unités dont trois (Cox I, Cox II et Cox III) sont codées par le génome mitochondrial (Borisov, 2002). Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre CuA puis sont transférés successivement à l'hème a puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau (Abramson, 2001). Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Des défauts d'activité de cette enzyme ont été associés au développement de différentes myopathies (Rahman *et al.*, 1999).

#### *e. ATP synthase*

Elle est composée de deux sous-complexes (Figure 13). La partie  $F_0$  est insérée dans la membrane interne mitochondriale et conduit les protons depuis l'espace inter-membranaire vers la matrice. Cette partie, chez les mammifère est composée de 5 sous-unités (A6, b, c, d et Oligomycin Sensitivity Conferral Protein). Le segment  $F_1$  est matriciel, au contact de la membrane interne et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP et vice versa. Il est composé de 5 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  dans un ratio 3, 3, 1, 1, 1). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont également associées à ce complexe. Le fonctionnement de ce dernier repose sur les sous-unités c (au nombre de 10) de la partie  $F_0$  qui, connectées à la sous-unité  $\gamma$  de  $F_1$ , agissent comme un rotor qui utilise le passage des protons à travers le stator (sous-unités A6, b, d et OSCP) pour fonctionner. La sous-unité  $\gamma$  cause, quant à elle, un changement conformationnel dans le trimère circulaire de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la partie  $F_1$  et permet ainsi successivement la liaison de l'ADP puis la réaction avec le phosphate inorganique pour générer l'ATP et enfin le relargage de l'ATP.



**Figure 13 : Structure de l'ATP synthase  $F_0F_1$ -ATPase.**  
Tiré de l'article (Wang & Oster, 1998).

### 2.3.3. Rendement de la phosphorylation oxydative

Les équivalents réduits,  $NADH$ ,  $H^+$  et  $FADH_2$  sont respectivement oxydés au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Court-circuitant le complexe I, le nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène durant l'oxydation du  $FADH_2$  est plus faible que celui de l'oxydation du  $NADH$ ,  $H^+$ . Ainsi, le rendement de la phosphorylation oxydative, qui peut être mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène ( $J_{ATP}/J_O$ ), est plus faible avec  $FADH_2$  qu'avec  $NADH$ ,  $H^+$ . De ce fait, la différence essentielle entre le catabolisme du glucose et celui des acides gras tient à la proportion relative des équivalents réduits fournis à la chaîne respiratoire : le rapport  $NADH$ ,  $H^+$  sur  $FADH_2$  est respectivement de 4 lors de l'oxydation du glucose et de 2 pour celle des acides gras. Cette différence est donc à l'origine de la perte de rendement de la phosphorylation oxydative pour les acides gras.

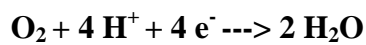
Chance conclut que le premier facteur du contrôle de la phosphorylation oxydative est la concentration d'ADP extra-mitochondriale (Chance, 1965). En effet, il observe une relation hyperbolique entre le niveau de respiration mitochondriale et cette concentration en ADP. Ceci implique que l'adénine nucléotide translocase (ANT), qui permet la sortie de l'ATP et l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie, contribue également à la régulation de la respiration. Toutefois, l'ADP extra-mitochondriale n'est pas le seul paramètre contrôlant la phosphorylation oxydative. En effet, d'autres facteurs jouent des rôles déterminants :

- 1°) la concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique ( $P_i$ )
- 2°) l'approvisionnement en  $H^+$ , fourni par les différents substrats

3°) l'activité du cytochrome c oxydase (complexe IV) (Tager *et al.*, 1983).

Dans les conditions de métabolisme basal, 90% de l'O<sub>2</sub> est consommé au niveau de la mitochondrie. De cette consommation mitochondriale, 80% sont utilisés pour la synthèse d'ATP et 20% lors de la fuite de protons. La fuite de protons est caractérisée par le retour passif de protons dans la matrice (proton leak) et ceci sans passer par l'ATP synthase donc sans générer d'ATP. Ces fuites membranaires diminuent la force protomotrice et induisent une baisse de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante (Murphy, 1989).

Le cytochrome c oxydase (Cox), accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire (Weibel *et al.*, 1991), est une enzyme cruciale pour la respiration mitochondriale. Elle fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire, et permet de catalyser la réaction suivante :



Cette réaction représente une étape participant à la limitation de la vitesse de la phosphorylation oxydative.

#### 2.3.4. Régulation de la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est régulée au niveau de sa vitesse de synthèse d'ATP, et donc de respiration, et au niveau de son efficacité.

Deux facteurs principaux peuvent être impliqués dans le contrôle de la respiration mitochondriale : les substrats de l'oxydation et les substrats et produits de la phosphorylation (ADP et ATP).

##### *a. Les substrats de l'oxydation*

Une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>). Une augmentation de l'apport en substrats respiratoires stimule la respiration mitochondriale. Néanmoins cette stimulation de la respiration par l'augmentation de la concentration en substrats est tissu-dépendante. En effet, une modification du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> mitochondrial *via* un changement de la concentration en substrats respiratoires entraîne une augmentation de la vitesse de respiration et de la synthèse d'ATP sur mitochondries isolées de foie (Koretsky & Balaban, 1987), et de cœur (Moreno-Sanchez *et al.*, 1990), mais ces résultats n'ont pas été retrouvés dans le muscle cardiaque *in vivo* (Jobsis & Stainsby, 1968), ni dans le muscle squelettique *in vivo* (Wendt & Chapman, 1976) ou *in situ* sur fibres perméabilisées (Kunz *et al.*, 1993). De la même manière,

en fonction du substrat utilisé (pyruvate, acides gras), la vitesse maximale de respiration mitochondriale varie au sein d'un même muscle et n'atteint pas le même niveau en fonction du type de muscles (Ponsot *et al.*, 2005).

#### *b. ADP et ATP*

Les premiers travaux sur mitochondries isolées menés par Lardy et Wellman (1952) ont montré que la vitesse de respiration mitochondriale est fortement augmentée en présence d'un système de régénération de l'ADP (hexokinase + glucose) (Lardy & Wellman, 1952; Chance, 1965). Ces observations aboutirent à la notion de "contrôle respiratoire", défini comme étant le contrôle de la vitesse de transport des électrons le long de la chaîne respiratoire par la concentration cytosolique en ADP. La théorie chimiosmotique permet d'expliquer ce phénomène puisque l'ajout d'ADP stimule le fonctionnement de l'ATP synthase et induit ainsi une augmentation de la consommation du gradient de protons. La diminution de ce gradient stimule alors le fonctionnement des pompes à protons mitochondriales et donc la respiration.

## **2.4. Régulation transcriptionnelle mitochondriale**

La mitochondrie possède son propre génome, mais celui-ci ne code que pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Cette double origine des protéines mitochondriales nécessite une régulation fine et coordonnée de leur expression (Scarpulla, 2006). Par conséquent, il existe des facteurs régulateurs clés codés par le génome nucléaire qui vont permettre d'une part la transcription du génome mitochondrial et d'autre part l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

### 2.4.1. L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (mtADN) humain est une molécule bicaténaire circulaire d'environ 16 kilobases dépourvue d'introns et d'histones. Chaque mitochondrie possède un nombre variable de copies (2 à 10) et une mutation de cet ADN peut être présente sur toutes les copies (homoplasmie) ou seulement sur une partie des copies (hétéroplasmie).

L'ADNmt code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiques.

## 2.4.2. Contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale

### a. *Peroxisome proliferator –activated receptor gamma co-activator 1 (PGC-1)*

#### ➤ PGC-1 $\alpha$

La découverte de PGC1- $\alpha$  fut un évènement majeur dans la compréhension des mécanismes de la biogenèse mitochondriale. PGC1- $\alpha$  est considéré comme un des cofacteurs centraux de la régulation de la biogenèse mitochondriale (Wu *et al.*, 1999). L'augmentation de l'expression de PGC1- $\alpha$  dans le muscle squelettique est induite par l'exercice aussi bien chez les rongeurs que l'Homme (Baar *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2003).

La compréhension de la fonction de PGC1- $\alpha$  dans la biogenèse mitochondriale a été améliorée par l'utilisation de modèles animaux permettant un gain ou une perte de fonction de ce facteur.

Lin *et al.* ont réalisé la surexpression de PGC1- $\alpha$  sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase, spécifiquement dans les fibres rapides du muscle squelettique (Lin *et al.*, 2002b). Cette surexpression résulte en une conversion de fibres rapides IIB en fibres de type IIA ainsi qu'en fibres lentes de type I (20 et 10 % respectivement) dans le plantaris. A l'inverse, des souris déficientes pour PGC1- $\alpha$  présentent une diminution du nombre de mitochondries et une diminution des capacités oxydatives dans les muscles lents (Leone *et al.*, 2005). Récemment, Handschin *et al.* ont montré que des souris, chez lesquelles PGC1- $\alpha$  est inactivé spécifiquement dans le muscle squelettique présentaient une conversion de fibres lentes en fibres rapides, étaient moins résistantes à l'exercice avec des dommages au niveau des fibres musculaires suite à l'exercice (Handschin *et al.*, 2007).

Il a été également démontré que PGC-1 $\alpha$  induisait une surexpression de la Cox et du cytochrome c. PGC-1 $\alpha$  pourrait également être associé à une intensification de la production de ROS. Or, une publication récente montre que l'expression des enzymes détoxifiantes s'accroît parallèlement avec celle de PGC-1 $\alpha$  (St-Pierre *et al.*, 2006).

Mais les modifications post-traductionnelles occupent également une place prépondérante dans la régulation de cette activité. Il a été montré que la désacétylation de PGC-1 $\alpha$  augmente son activité transactivatrice au niveau de gènes hépatiques impliqués dans la néoglucogénèse (Rodgers *et al.*, 2005) et, plus récemment, au niveau de gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial du tissu adipeux brun et du muscle squelettique (Rodgers *et al.*,

2005). Ces travaux rapportent que la désacétylation de PGC-1 $\alpha$  s'effectue par l'intermédiaire de SIRT1, un des sept orthologues chez les mammifères de la protéine Sir2 (*silent information regulator 2*) de *S. cerevisiae*, membre fondateur de la famille des sirtuins (Frye, 1999). SIRT1 est une désacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup> qui exerce son activité enzymatique sur les histones mais également sur des régulateurs transcriptionnels, modulant par ce biais leur activité. Elle est ainsi impliquée dans de nombreux processus cellulaires. En particulier, SIRT1 est capable de moduler la longévité chez différents organismes. Certes SIRT1 n'a pas PGC-1 pour seule cible. Il a notamment été démontré que les facteurs de transcription de la famille Forkhead de classe O (FoxO) sont capables de répondre à la présence d'un stress oxydant lorsqu'ils sont activés par une désacétylation attribuée à SIRT1 (Brunet *et al.*, 2004). Ils induisent alors le ralentissement des processus apoptotiques et favorisent la détoxification cellulaire par l'activation des gènes codant la SOD2 et la catalase, mais ils n'ont en revanche jamais été identifiés, au contraire de PGC-1, comme intervenant dans l'énergétique cellulaire. Enfin, PGC-1 $\alpha$  serait plus impliqué dans la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique (Scarpulla, 2002). Le resveratrol, un polyphénol présent dans le raisin noir et ses produits dérivés, est connu pour ses propriétés antioxydantes et il induit une activation de SIRT1 et PGC1- $\alpha$  (Lagouge *et al.*, 2006).

#### ➤ PGC-1 $\beta$

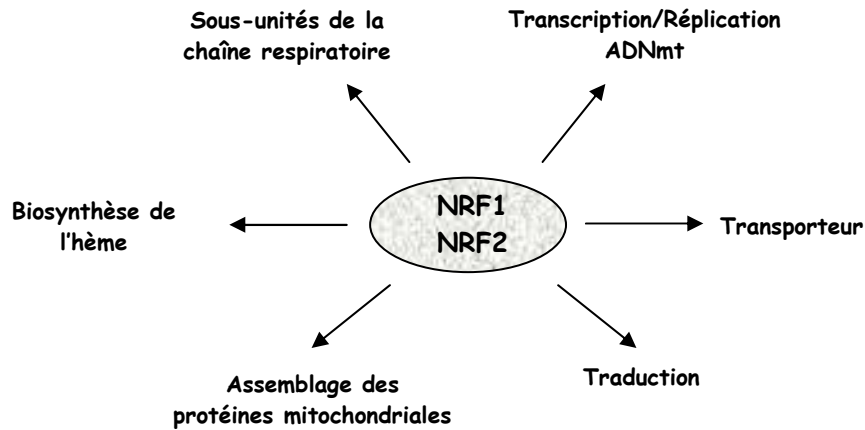
Ce co-activateur transcriptionnel présente une forte homologie de structure avec celle de PGC-1 $\alpha$  (Lin *et al.*, 2002a). PGC-1 $\beta$  coactive en partie les mêmes facteurs de transcription que PGC-1 $\alpha$  pour induire l'expression de gènes cibles communs tels que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial (Kressler *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002a). Cependant, PGC-1 $\beta$  régule d'autres facteurs de transcription qui ne sont pas des cibles de PGC-1 $\alpha$ . Il semblerait que le rôle de PGC-1 $\alpha$  soit moins prépondérant que celui de PGC-1 $\beta$ . Cependant, PGC-1 $\beta$  possède la capacité d'interagir avec NRF1 et donc est un régulateur potentiel de l'activité de facteur de transcription de NRF1 (Lin *et al.*, 2005). De plus, la surexpression de PGC-1 $\beta$  entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène et de la biogenèse mitochondriale dans le muscle (St-Pierre *et al.*, 2003). Enfin, PGC-1 $\beta$  semble jouer un rôle plus important dans le cœur que PGC-1 $\alpha$  au niveau de la biogenèse mitochondriale (Scarpulla, 2002; Ventura-Clapier *et al.*, 2008). Par ailleurs, il semble que l'exercice n'entraîne pas d'activation de PGC-1 $\beta$  dans le muscle squelettique contrairement à PGC1- $\alpha$  (Meirhaeghe *et al.*, 2003).

### *b. Nuclear respiratory factors (NRFs)*

NRF1 a été identifié pour la première fois par Evans et Scarpulla (Evans & Scarpulla, 1989) comme le principal activateur transcriptionnel du gène du cytochrome c de rat. Par la suite, des éléments de liaison à NRF1 ont été trouvés dans le promoteur de plusieurs gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que dans le promoteur de gènes impliqués dans la réplication de la transcription de l'ADN mitochondrial (Garesse & Vallejo, 2001). Par son large rôle de régulateur transcriptionnel, NRF1 est un élément majeur des processus de biogenèse mitochondriale.

NRF2 se fixe sous forme de tétramère sur le promoteur de plusieurs sous-unités du cytochrome c oxydase et régule ainsi leur transcription (Scarpulla, 2002). Les facteurs NRF1 et NRF2 régulent en aval deux facteurs impliqués dans la réplication et la transcription mitochondriale : TFAM permettant ainsi une expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux afin d'assurer un fonctionnement mitochondrial correct.

Il a été montré que NRF1 était particulièrement impliqué dans la régulation de l'expression de la Cox mais aussi dans la régulation de la voie de synthèse de l'hème. Un deuxième facteur de transcription nucléaire, NRF2, est également impliqué dans la régulation de l'expression des gènes liés au métabolisme mitochondrial, notamment une sous-unité du complexe IV de la chaîne respiratoire (Cox4) (Scarpulla, 2008). Cependant, la régulation de la synthèse des protéines mitochondriales par différents facteurs de transcription implique qu'il existe un facteur prépondérant qui contrôle à lui seul l'activité de ces différents facteurs de transcription. Parmi l'ensemble des co-activateurs associés à PGC-1, NRF1 et NRF2 sont ceux qui sont le plus impliqués dans la régulation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire. Le couple de co-activateurs NRF1 et NRF2 est ainsi associé à la régulation de gènes qui codent pour des protéines qui composent les complexes de la chaîne respiratoire et ce chez le rat, la souris mais également l'homme (Scarpulla, 2008).



**Figure 14** : Schéma représentant les cibles de NRF1 et NRF2  
Tiré de l'article (Scarpulla, 2006).

*c. Le facteur de transcription mitochondriale A (TFAm)*

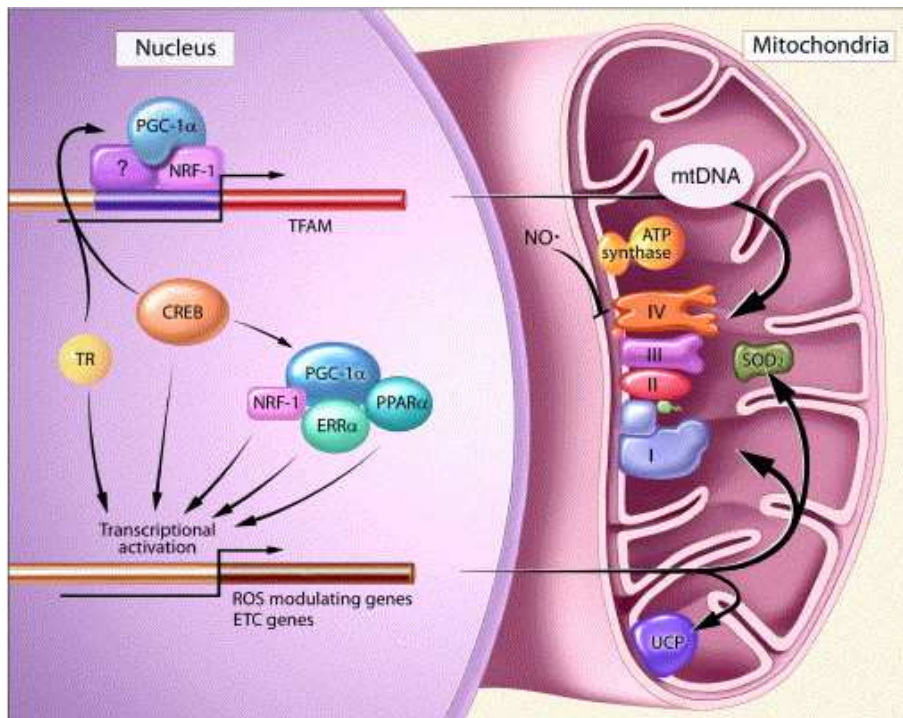
Le facteur TFAm est également une protéine bi-fonctionnelle. Il assure un rôle de facteur de transcription (Fisher & Clayton, 1988) et il est indispensable au maintien et à la réplication du génome mitochondrial (Ekstrand *et al.*, 2004).

A présent, il est établi que le facteur mitochondrial TFAm (Transcription factor A, mitochondrial) ainsi que les facteurs NRF1 et 2 sont requis pour la réplication de l'ADN mitochondrial (Scarpulla, 1997).

L'expression de ces facteurs est observée suite à une expression ectopique de PGC-1  $\alpha$  dans des cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> mais le ou les partenaire(s) de PGC-1  $\alpha$  dans cette régulation transcriptionnelle sont encore mal connus (Wu *et al.*, 1999). Cependant, il a été montré que NRF1 et NRF2 peuvent tous deux induire l'expression de TFAm (Scarpulla, 2006) et l'équipe de Wu a mis en évidence qu'une interaction directe entre PGC-1 $\alpha$  et NRF1 permettait l'induction de l'expression de TFAm (Wu *et al.*, 1999).

A son rôle essentiel dans la transcription mitochondriale, s'ajoute un rôle la stabilisation et la réplication de l'ADN mitochondriale (Ekstrand *et al.*, 2004).





**Figure 15 :** Schéma représentant la biogenèse mitochondriale.

### En résumé.

*La production d'énergie aérobie dans le muscle est dépendante de la capacité à produire de l'énergie lors du processus de la phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. La mitochondrie est un organite composé d'une multitude de complexes protéiques qui sont tous finement régulés en fonction des besoins et des conditions du milieu cellulaire. La mitochondrie qui a un rôle fondamental dans la production d'énergie est aussi un lieu privilégié de production de radicaux libres oxygénés qui sont à l'origine de réactions délétères pour l'équilibre de la cellule.*

*La biogenèse mitochondriale est régulée par de nombreux co-activateurs, il semblerait cependant que PGC-1  $\alpha$  et  $\beta$  ait un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité de ces cofacteurs. Les cofacteurs PGC-1s se trouvent ainsi au centre d'un système complexe de régulation du métabolisme énergétique. Son action sur de nombreux co-activateurs permet de réguler l'expression de gènes liés à de nombreuses fonctions métaboliques impliquées dans la réponse aux besoins énergétiques cellulaires. PGC-1s se trouvent ainsi au centre de la régulation de l'apport en substrat et de leur utilisation au sein de la cellule. PGC-1s sont également au centre de la régulation de l'expression de protéines constituant de la chaîne respiratoire et donc régulent par ce biais l'utilisation des substrats et la synthèse de l'ATP. Par cette faculté, les PGC-1s apparaissent ainsi comme les acteurs centraux de l'adaptation du métabolisme énergétique aux besoins énergétiques cellulaires.*

### 3. LE STRESS OXYDANT

#### 3.1. Introduction

Les organismes multicellulaires possèdent tous des réseaux complexes de signalisation intra- et extracellulaire qui contrôlent et harmonisent les fonctions cellulaires dans les différents processus physiologiques tels que l'organogénèse, l'intégrité et l'homéostasie tissulaire, et la réponse aux événements pathologiques.

Les espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) produites par les cellules ont été traditionnellement considérées comme des produits toxiques du métabolisme. Le stress oxydant intracellulaire peut être défini comme un déséquilibre de la balance entre la production des ROS d'un côté et son élimination de l'autre. La capacité à éliminer les ROS est appelée « capacité antioxydante » de la cellule, et permet d'empêcher les lésions oxydatives. Une surproduction de ROS et/ou un déficit en systèmes protecteurs antioxydants est d'ailleurs fortement impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies tels que le diabète, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

#### 3.2. Différentes formes de radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule.

L' $O_2$  est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitales externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en  $O_2^{\bullet-}$  puis en  $H_2O_2$ . Il est ainsi à l'origine de la formation des ROS.

L'appellation ROS inclut les radicaux libres dérivés de l'oxygène : anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

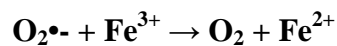
L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet  $O_2^{\bullet-}$

entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>), en un ion OH<sup>-</sup> et un radical hydroxyle (OH•) :



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde (O<sub>2</sub>•-) qui régénère Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> selon la réaction d'Haber-Weiss :



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), d'anion superoxyde (O<sub>2</sub>•-) et de fer permet la production de radical hydroxyle (OH•). L'OH•, 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• apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (Tableau 2).

ROS	Origine	Demi-vie (seconde)
Radical hydroxyle (OH•)	Réaction de Fenton	10 <sup>-9</sup>
Anion superoxyde (O <sub>2</sub> •-)	Chaîne respiratoire Xanthine oxydase NADPH oxydase	10 <sup>-4</sup>
Oxygène singlet ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	Photolyse	10 <sup>-3</sup>
Radical peroxyde (ROO•)	Peroxydation des lipides	0.1
Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Chaîne respiratoire Xanthine oxydase NADPH oxydase	1

**Tableau 2 : Identité moléculaire, origine et demi-vie des principales espèces oxygénées réactives (ROS) pouvant influencer le muscle squelettique.** (Adapté de (Lawler *et al.*, 1998))

### 3.3. Source cellulaire des radicaux libres

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et les mitochondries.

### 3.3.1. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet-}$  (McKelvey *et al.*, 1988).

### 3.3.2. La NADPH oxydase

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Babior, 1999). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\bullet-}$  au niveau des vaisseaux. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Krause, 2004).

### 3.3.3. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Turrens, 2003). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (Morel & Barouki, 1999). Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.

### 3.3.4. Les peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production d' $H_2O_2$  cellulaire (Boveris *et al.*, 1972). Toutefois, l' $H_2O_2$  est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' $H_2O_2$  produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

### 3.3.5. La mitochondrie

La principale source de ROS est la mitochondrie et plus précisément au niveau de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (Balaban *et al.*, 2005).

La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisée par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS (Boveris & Chance, 1973). Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (Hansford *et al.*, 1997). Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III (Figure 16).

Le complexe III a longtemps été considéré comme le plus important site de production d'O<sub>2</sub>•- et le complexe I comme un acteur secondaire. Cependant, ces premières études utilisaient comme substrat respiratoire du succinate (fournisseur de FADH<sub>2</sub>) combiné à de la roténone (inhibiteur du complexe I). Or, en ajoutant successivement le succinate puis la roténone, de récentes mesures ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux inverse d'électrons.

Ce flux d'électrons issus de l'oxydation du FADH<sub>2</sub> remonte du complexe II vers le complexe I atteignant ainsi le site de production de ROS du complexe I. Il a alors été clairement défini que la source majeure de ROS était le complexe I via ce flux inverse d'électrons (Hansford *et al.*, 1997; Barja, 1999). Ce flux d'électrons entraîne également la réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH (Liu *et al.*, 2002).

Ceci implique que la production de ROS est directement dépendante des équivalents réduits fournis aux mitochondries. La quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite en présence de substrat fournissant du FADH<sub>2</sub> au complexe II (succinate, flux inverse d'e-) est en effet plus importante qu'avec des substrats fournissant du NADH, H<sup>+</sup> au complexe I (glutamate/malate ou pyruvate/malate, flux normal d'e-) (Votyakova & Reynolds, 2001; Liu *et al.*, 2002; Sanz *et al.*, 2004). Concernant la production de ROS liée au flux normal d'électrons, elle est plus élevée avec du glutamate/malate qu'avec du pyruvate/malate bien que ces deux substrats fournissent du NADH, H<sup>+</sup> (Sanz *et al.*, 2004). Cette différence pourrait s'expliquer par les propriétés antioxydantes du pyruvate.

A ce jour, le site exact de la production de ROS du complexe I reste encore controversé.

Trois hypothèses sont émises : cette production aurait lieu au niveau :

1°) des quinones (Q)

2°) du groupe des flavines mononucléotides (FMN) (Liu *et al.*, 2002)

3°) du groupe fer-soufre [Fe/S] (Genova *et al.*, 2001)

Comme ces trois structures sont très proches les unes des autres et interagissent les unes avec les autres (Herrero & Barja, 2000), il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de ROS.

La production de ROS au niveau du complexe III, quant à elle, résulte de la réduction partielle de l'ubiquinone. L'électron libre provenant du transfert à travers la chaîne respiratoire s'apparie avec l'ubiquinone (Ub) formant le radical semi-ubiquinone (UbH•) qui est instable. Un deuxième électron est donc nécessaire pour le stabiliser et permettre le transfert de proton grâce à l'intermédiaire ubiquinol (UbH<sub>2</sub>). Toutefois, il existe une probabilité pour que le radical semi-ubiquinone rencontre une molécule d'oxygène avant d'être stabilisé par le deuxième électron. La molécule d'oxygène va alors capter l'électron libre générant ainsi un anion superoxyde (Turrens *et al.*, 1985).

La production de ROS 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 matricielle ainsi que dans l'espace inter-membranaire (Chen *et al.*, 2003; Turrens, 2003; St-Pierre *et al.*, 2006).

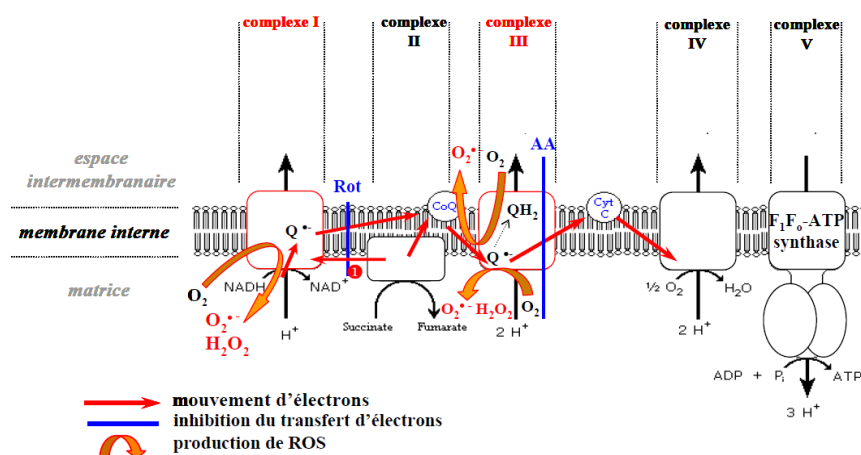
L'O<sub>2</sub>•- généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD), l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L'O<sub>2</sub>•- produit dans l'espace inter-membranaire est soit :

1°) transformé par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn-SOD)

2°) détoxifié par le cytochrome c

3°) transféré dans le cytoplasme via un canal voltage dépendant VDAC

L'O<sub>2</sub>•- est alors pris en charge par la Cu/Zn-SOD (Han *et al.*, 2003).



**Figure 16 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.** Deux sites de production d' $O_2^{\bullet-}$  sont reconnus : le complexe I et le complexe III. L'utilisation de la roténone (Rot) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I.

La vitesse de production de ROS est fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Cependant, cette production radicalaire semble également liée au potentiel redox et au potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ). D'une part, l'augmentation du potentiel redox entraîne une augmentation de la production de ROS (Ksenzenko *et al.*, 1984). D'autre part, dans leur étude, Korshunov et al (1997) montrent une relation directe entre la respiration mitochondriale, le  $\Delta\psi$  et la production de ROS (Korshunov *et al.*, 1997). Ainsi, une diminution du potentiel de membrane s'accompagne d'une augmentation de la respiration et d'une diminution de la production de ROS.

Puisque la consommation basale d'oxygène est associée à un potentiel de membrane élevé et donc à un état plus réduit des transporteurs d'électrons, la production de ROS dans ces conditions est la plus importante. Par contre, elle est drastiquement diminuée en condition d'oxydation phosphorylante (après ajout d'ADP). En effet, la présence d'ADP, stimulant la respiration, augmente l'oxydation des transporteurs d'électrons et ainsi diminue fortement le flux d'électrons s'échappant de la chaîne respiratoire pour réduire l' $O_2$  en  $O_2^{\bullet-}$  (Boveris & Chance, 1973; Herrero & Barja, 2000).

Néanmoins, la corrélation entre le potentiel de membrane et la production de ROS est à nuancer. La production de ROS liée à l'oxydation du NADH,  $H^+$  au niveau du complexe I ainsi que celle générée au niveau du complexe III sont peu sensibles aux variations du  $\Delta\psi$  (Korshunov *et al.*, 1997). Starkov & Fiskum en 2003 confirment ces données en observant



une quantité significative d' $H_2O_2$  produite en présence de substrats fournissant du NADH,  $H^+$  même en absence de  $\Delta\psi$  (30% de la valeur obtenue en  $\Delta\psi$  maximal) (Starkov & Fiskum, 2003). Ainsi, seul le flux inverse d'électrons est réellement sensible au  $\Delta\psi$  (Korshunov *et al.*, 1997); une légère dépolarisation étant suffisante pour inhiber complètement la production de ROS par cette voie (Votyakova & Reynolds, 2001). Il existe donc deux mécanismes dans la production de ROS : un mécanisme dépendant du potentiel de membrane de la mitochondrie et un mécanisme indépendant de ce potentiel.

### 3.4. Systèmes antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Powers *et al.*, 1999).

#### 3.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Figure 17).

##### *a. Superoxyde dismutase (SOD)*

Cette enzyme catalyse la dismutation de  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ . 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 ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2) et une forme extracellulaire (EC-SOD ou SOD3). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001; Sturtz *et al.*, 2001). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD<sup>-/-</sup> n'est que de

22 jours pour certains types de mutations (Huang *et al.*, 2001). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD-/- soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD+/+ (130 semaines vs 180 semaines) (Sentman *et al.*, 2006).

#### *b. Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)*

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates *et al.*, 1999). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Mates *et al.*, 1999).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

#### *c. Catalase*

La catalase est également responsable de l'élimination d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une transformation en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Mates *et al.*, 1999; Powers *et al.*, 1999). Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

### 3.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C (Figure 17).

### *a. Oligoéléments*

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, 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).

### *b. Glutathion*

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (Mates *et al.*, 1999). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji *et al.*, 1991).

### *c. Ubiquinones et cytochrome c*

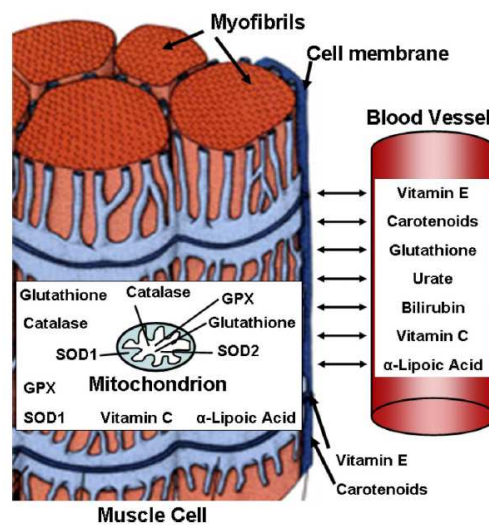
Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Podda *et al.*, 1996).

Le cytochrome c présent dans l'espace inter-membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l'H<sub>2</sub>O (Skulachev, 1998).

### *d. Vitamine E et vitamine C*

Les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importantes dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique.

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$  et l' $OH^{\bullet}$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E.



**Figure 17 : Localisation des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule musculaire.** GPX, glutathione peroxydase; SOD1, superoxyde dismutase 1; SOD2, superoxyde dismutase 2. (Tiré de l'article de (Powers *et al.*, 2008))

### 3.5. Dégâts cellulaires

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP).

#### 3.5.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont

très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS (Echtay *et al.*, 2002). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de ROS.

### 3.5.2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Stadtman & Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$ , peuvent être classées en deux catégories :

- 1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique
- 2°) celles qui modifient les peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (Stadtman & Levine, 2002). L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur. Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS.

### 3.5.3. Dommages de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au

stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter *et al.*, 1988).

Les mécanismes explicatifs proposés sont :

1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial

2°) sa localisation proche de la membrane interne,

3°) des mécanismes de réparations frustrés

4°) une structure circulaire sans introns, augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Richter *et al.*, 1988).

L'idée d'un "cercle vicieux" ou d'une théorie avec un *feed-back* positif est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dans certaines pathologies : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (Beckman & Ames, 1998). Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais engageant également la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose avec l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).

#### 3.5.4. Activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

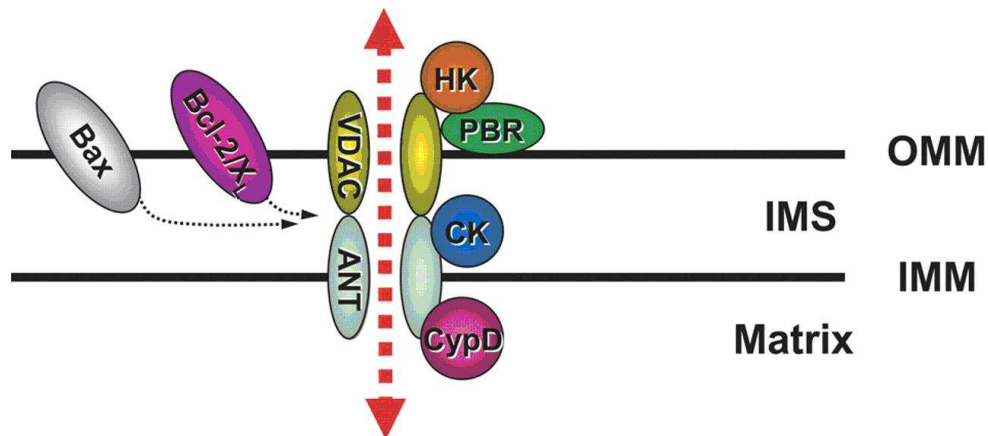
Bien que la nature moléculaire du mPTP reste encore à ce jour inconnue, il apparaît que le mPTP est un complexe multiprotéique avec de nombreuses protéines candidates dont le VDAC, l'ANT, la cyclophiline D (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998) ([Figure 18](#)), le complexe I (Fontaine *et al.*, 1998). La cyclosporine A, inhibiteur de référence du mPTP, retarde le processus d'apoptose (Fontaine *et al.*, 1998) confirmant le rôle clé du mPTP dans la mort cellulaire.

Succinctement, l'ouverture du mPTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs. Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF (Apoptose Inducing Factor)).

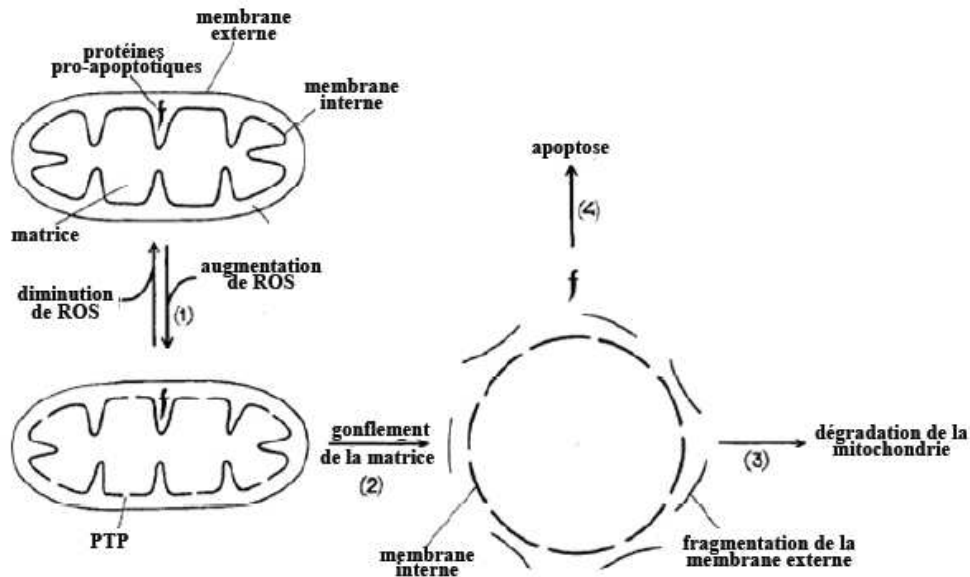
L'ouverture du mPTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant (Bernardi, 1999).

Les ROS agissent directement sur l'ouverture du mPTP, pore qui intervient dans le processus d'apoptose (Figure 19) (Skulachev, 1996; Chen *et al.*, 2009). Selon l'équipe de Vercesi, l'ouverture du mPTP induit par les ROS serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (Vercesi *et al.*, 1997).

Il se peut également que ce pore s'ouvre de façon transitoire conduisant à la diffusion d'ions de petite taille, tels  $\text{Ca}^{2+}$ , dépendant du pH et déclenchant la fermeture du pore. Cette situation protégerait les cellules d'une lésion irréversible en évitant le gonflement et la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c (Hausenloy *et al.*, 2004).



**Figure 18 : Structure du mPTP.** Il est formé par le complexe VDAC-ANT-Cyp-D, l'héxokinase II (HKII), la créatine kinase mitochondriale (CK), le récepteur au benzodiazépine (PBR), et la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, and Bax) sont considérés comme des éléments régulateurs de ce complexe.



**Figure 19 : Production de ROS, ouverture du mPTP et apoptose. D'après (Skulachev, 1996).**

(1) L'augmentation de la production de ROS entraîne l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP). (2) Un déséquilibre osmotique entre la matrice et l'espace intermembranaire se crée, ayant pour conséquence le gonflement de la matrice et la fragmentation de la membrane externe (3) La mitochondrie est alors dégradée (sélection mitochondriale). (4) Les protéines pro-apoptotiques séquestrées dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol initiant une cascade de réactions qui aboutit à l'apoptose (sélection cellulaire).

### 3.6. L'apoptose

On distingue 2 grandes voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire. La première, appelé voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

Quel que soit le mode d'induction (intrinsèque ou extrinsèque), les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont similaires, à savoir une réduction de la taille de la cellule, une condensation de la chromatine, un clivage des chromosomes, une rupture de la membrane plasmique et une transformation des organites cellulaires en vésicules appelées corps apoptotiques. Nous allons durant ce chapitre nous consacrer uniquement à la voie intrinsèque (mitochondriale) (Figure 20).

Depuis une dizaine d'années, il est clairement établi que la mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose. Son intervention dans ce processus ne s'explique pas par une « simple perte de fonction » ayant pour conséquence un déficit énergétique, mais est reconnue plutôt comme un



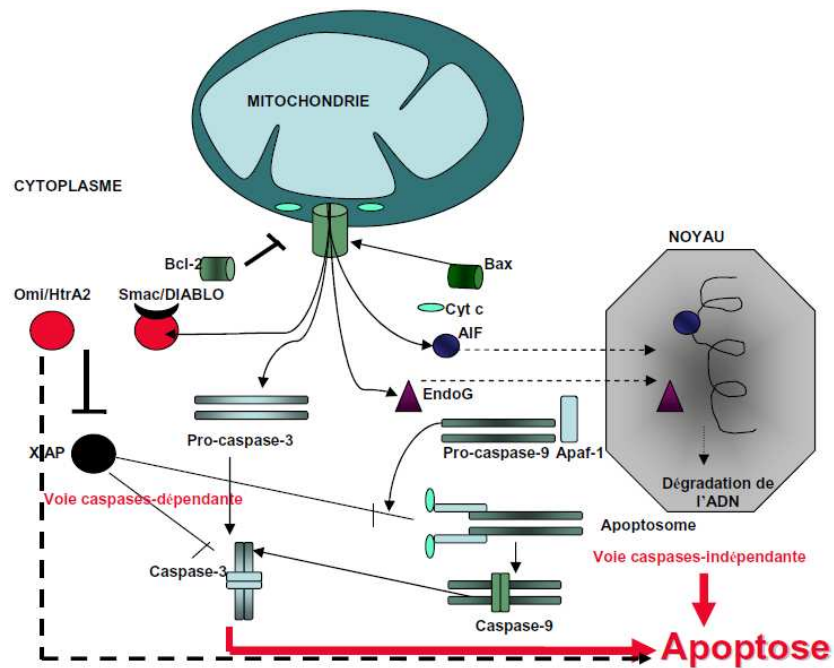
mécanisme actif s'accompagnant de profonds remaniements. On observe une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale – liée à une dissipation du potentiel de membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) – et la libération dans le cytoplasme de protéines apoptogènes comme le cytochrome c.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment, lors d'un signal de mort, l'ouverture du pore de transition et la dissipation du  $\Delta\Psi_m$  peuvent être impliquées dans l'induction du relargage de molécules apoptogènes (Ly *et al.*, 2003).

De nombreuses molécules participent à l'apoptose comme les caspases mais aussi le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). Les caspases constituent deux groupes. D'un côté les caspases initiatrices (tels que les caspases 2, 8 et 9) qui clivent et activent plusieurs enzymes ou protéines impliquées dans l'apoptose. L'ouverture du mPTP semble être contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 (pour B cell leukemia/lymphoma-2). Cette famille regroupe des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bad et Bid) et anti-apoptotiques (tels que Bcl-2 et Bcl-xL). L'activation intrinsèque de l'apoptose conduit à l'insertion de protéines pro-apoptotiques dans la membrane des mitochondries où elles s'oligomérisent. Ces complexes multimériques provoquent la rupture des membranes mitochondriales et l'ouverture du mPTP. La conséquence est d'une part la perte du gradient électrochimique entre la membrane interne et la matrice. D'autre part, des protéines pro-apoptotiques sont libérées dans le cytoplasme comme AIF (Apoptosis-Inducing Factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase, Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein with Low pI) et le cytochrome c.

Le cytochrome c libéré dans le cytoplasme s'associe à Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1). Le complexe ainsi formé ou apoptosome, clive et active la pro-caspase 9.

Il est important de noter que Bossy-Wetzel et al ont décrit un système où la libération du cytochrome c et l'activation de caspases pouvaient avoir eu lieu sans aucune dissipation du  $\Delta\Psi_m$  et dans lequel l'ouverture du mPTP est consécutive à la formation de l'apoptosome (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998).



**Figure 20** : Schéma représentant la voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose.

### 3.7. Le concept de l'hormèse mitochondriale ou mitohormesis

L'hormesis est défini comme l'activation des propriétés cellulaires protectrice et réparatrice induite par un stress physiologique modéré (Schwartz & Sack, 2008). Depuis quelques décennies, il était admis que l'augmentation des radicaux libres était le principal responsable du processus du vieillissement et de la diminution de la durée de vie des organismes (Harman, 1956). Durant ces années, un certain nombre d'études se sont efforcées de diminuer le stress oxydant à l'aide de molécules antioxydantes. Cependant, les résultats de ces études furent surprenants. En effet, elles ont démontré que les molécules antioxydantes avaient peu ou pas d'effets mais surtout que les ROS étaient essentiels à l'activation de voies de signalisation aboutissant à une augmentation de la durée de vie des organismes. Par ailleurs, il a été démontré qu'une supplémentation en molécules antioxydantes inhibe les effets bénéfiques de l'activité physique (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Ristow *et al.*, 2009). Par ailleurs, Piantadosi *et al.* ont démontré un lien entre la production de ROS mitochondriaux et la biogenèse mitochondriale (Piantadosi *et al.*, 2008).

Ces différentes études ont permis de mettre à jour un nouveau concept nommé « mitohormesis ». En effet, la génération de ROS mitochondriaux peut activer la biogenèse mitochondriale et la défense contre ces radicaux libres. Ce concept nous permis d'avoir un autre regard sur les radicaux libres qui furent longtemps associés à des pathologies.

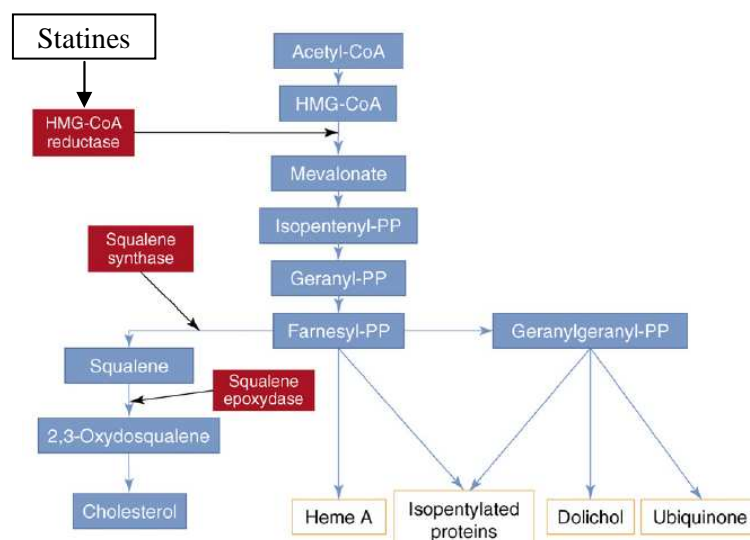
### **En conclusion,**

*L'émergence du rôle des ROS dans la modulation de la signalisation intracellulaire, et de ce fait dans celle de certaines fonctions cellulaires, est reconnue par de nombreux travaux réalisés ces quinze dernières années. Elle est étayée par des données bien établies : de nombreux ligands de récepteurs cellulaires génèrent la formation intracellulaire de ROS ; les molécules antioxydantes ou inhibant les systèmes enzymatiques pro-oxydants partiellement ou totalement ces effets ; l'addition par voie exogène de molécules pro-oxydantes reproduit partiellement ou totalement l'effet de la fixation des ligands à leur récepteur spécifique. Les études expérimentales poursuivent l'exploration des mécanismes impliquant les ROS dans la cellule, et font progresser les connaissances, malgré certains écueils liés à l'approche in vitro parmi lesquels : la difficulté de doser spécifiquement une espèce radicalaire donnée sans interférence d'une autre et d'apprécier les modifications de compartimentalisation cellulaire des ROS. Cependant, certaines questions restent sans réponse à l'heure actuelle et font l'objet d'études approfondies. Quelles sont, par exemple, les spécificités d'action des différents radicaux libres in vivo ? Le champ d'investigation est donc encore vaste, mais tout indique aujourd'hui que ces molécules simples mais très réactives que sont les ROS sont des modulateurs majeurs des fonctions cellulaires, de leur régulation en conditions physiologiques et des dysfonctionnements cellulaires à l'origine des pathologies.*

## 4. STATINES ET MUSCLES CARDIAQUE ET SQUELETTIQUE

### 4.1. Définition

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité en France et l'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur dans le développement de ces pathologies. Il est donc essentiel de diminuer le cholestérol chez ces patients, et parmi les médicaments développés pour réduire la concentration du cholestérol plasmatique, on trouve les statines, inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase, qui réduisent la production de cholestérol en bloquant la synthèse de mévalonate, une étape intermédiaire de la biosynthèse du cholestérol (Assmann *et al.*, 1999). Ce traitement permet de réduire le « mauvais » cholestérol à savoir le LDL-Cholesterol (Low Density Lipoprotein ; Figure 21).



**Figure 21** : Action des statines sur la voie de synthèse du cholestérol.

Tiré de l'article (Sirvent *et al.*, 2008).

Actuellement environ 3 millions de patients en France sont traités par statines quotidiennement (source Afssaps). Cinq statines sont couramment utilisées et sont commercialisées sous différents noms : atorvastatine (Tahor®), fluvastatine (Lescol®), lovastatine (Mevacor®), pravastatine (Pravachol®) et simvastatine (Zocor®).

<b>Molécules</b>	<b>Nom commerciale</b>	<b>Année de mise en marché</b>	<b>Posologie mg/j</b>	<b>Diminution du cholestérol LDL (%)</b>
<b>Simvastatine</b>	Zocor	1998	5-40	15-40
<b>Pravastatine</b>	Pravachol	1989	10-40	15-35
<b>Fluvastatine</b>	Lescol	1996	20-40	20-30
<b>Atorvastatine</b>	Tahor	1997	10-80	25-60
<b>Lovastatine</b>	Mevacor	1991	20-40	20-30

**Tableau 3 : Liste des différentes statines et leurs caractéristiques.**

Les HDL-C (High density Lipoprotein-Cholesterol) assurent le captage du cholestérol excédentaire de l'organisme en l'apportant au foie. Une quantité trop élevée de LDL-C (Low density Lipoprotein-Cholesterol) aura des conséquences négatives. En effet, s'il y a plus de cholestérol transporté par les LDL que les cellules n'en ont besoin, ces LDL ne seront pas utilisées par les cellules et resteront dans le sang (puisqu'elles ne sont plus internalisées par endocytose). En conséquence, elles vont se déposer sur les parois des vaisseaux sanguins, formant des plaques d'athéromes qui diminuent le diamètre des vaisseaux ce qui peut provoquer un accident vasculaire. C'est pourquoi les LDL-C sont appelées « mauvais cholestérol ».

L'efficacité des statines dans la réduction du taux de LDL-C et la prévention des accidents cardiovasculaires est très largement démontrée dans la littérature. La Rosa *et al.* ont reporté les résultats d'une méga analyse de 3 des 6 statines sur 30000 participants sur une durée de 5 ans (LaRosa *et al.*, 1999). Ces résultats indiquent que les statines entraînent une diminution du cholestérol total de 18% à 28%, une diminution du LDL-C de 25% à 36% et une augmentation du 'bon ' cholestérol ou (HDL-C) de 5% à 7%.

Ainsi, l'utilisation de statines permet une réduction des accidents coronariens de 30% sans distinction de sexe ou d'âge (Pierro *et al.*, 1995).

#### 4.1.1. Effets « pléiotropes » des statines

Les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase ou statines ont été initialement développés dans le traitement de l'hypercholestérolémie. De nombreuses études ont mis en évidence des effets pléiotropes notamment dans le domaine cardiovasculaire, à savoir (Davignon *et al.*, 2004):

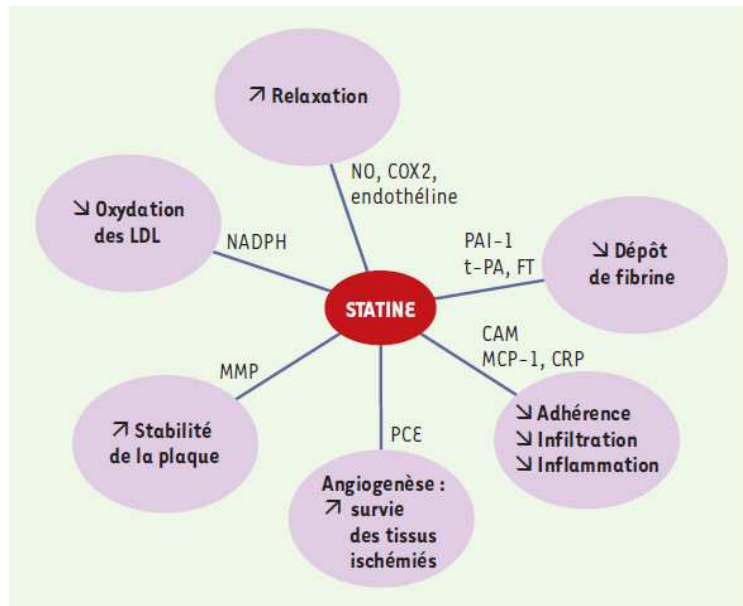
- une réduction de l'inflammation, probablement par diminution des molécules d'adhésion intercellulaire participant au recrutement des leucocytes.
- un effet antioxydant, lié majoritairement à la voie de la NADPH oxydase.
- une modulation de l'activation du système rénine-angiotensine, par diminution du nombre de récepteurs de l'angiotensine II de type 1 et une inhibition directe de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.
- une stabilisation de la plaque athéromateuse, par diminution de l'inflammation et une inhibition de l'activité des métalloprotéinases de la matrice produite par les macrophages.
- une protection vis-à-vis de la dysfonction endothéliale, par activation de la NOS 3.
- une diminution de la thrombogénicité, par son action sur la dysfonction endothéliale et la plaque athéromateuse.
- une augmentation du taux de cellules progénitrices endothéliales circulantes, et donc potentiellement une action d'activation de la néoangiogénèse.
- un effet anti-arythmique.
- une diminution du remodelage et de l'hypertrophie ventriculaires.

La majorité des effets bénéfiques suscités peut s'expliquer par le mécanisme d'action moléculaire des statines (Adam & Laufs, 2008). Les statines inhibent de manière réversible l'HMG-CoA reductase en se liant à son site actif. L'HMG-CoA ne peut donc être convertie en acide mévalonique, précurseur du cholestérol. Les intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol à partir de l'acide mévalonique comportent de nombreux isoprénoides. Ces derniers sont des lipides nécessaires aux modifications post-traductionnelles de protéines variées, dont les protéines d'attachement du guanosine tri-phosphate : Rho, Ras et Rac. L'isoprénylation de ces protéines est nécessaire pour leur translocation du cytoplasme, où elles sont sous forme inactive, vers la membrane cellulaire, leur site d'activation.

La protéine RhoA est impliquée dans l'activation des cytokines et chémokines pro-inflammatoires, ainsi que dans l'expression des gènes et la stabilisation des ARN messagers, dont ceux de la eNOS. La protéine Ras est responsable de la prolifération cellulaire. La protéine Rac1 joue un rôle dans l'assemblage des différentes sous-unités de la NADPH oxydase.

Les statines inhibent ainsi l'isoprénylation de ces protéines, menant à l'accumulation de leur forme inactive dans le cytoplasme et la régulation négative de leur voie de signalisation. L'absence de synthèse de l'acide mévalonique entraîne par ailleurs l'activation de la voie du phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase / protéine kinase Akt, aboutissant à la

phosphorylation et l'activation de la NOS 3, ainsi que la promotion de l'angiogénèse (Kureishi *et al.*, 2000).



**Figure 22 : Effets pléiotropes vasculaires des statines.** PAI-1: inhibiteur des activateurs du plasminogène de type I; t-PA: activateur du plasminogène tissulaire; FT: facteur tissulaire; CAM: cellular adhesion molecules; MCP-1: facteur chimio-attracteur des monocytes; CRP: protéine C réactive; PCE: progéniteurs de cellules endothéliales; MMP: métalloprotéases matricielles.

Par contre, à l'heure actuelle, aucune investigation n'a été menée pour caractériser les effets des statines sur les mitochondries cardiaques. En effet, sachant que 30% en volume du cœur est occupé par des mitochondries, l'intérêt de mener cette étude nous paraît primordial pour caractériser les effets des statines sur la fonction mitochondriale dans l'hypothèse de mettre à jour de nouveaux effets bénéfiques.

#### 4.1.2. Symptômes cliniques

Bien que ces statines soient très efficaces, un certain nombre d'effets secondaires ont été identifiés chez environ 5 à 7% de ces patients. Ces effets délétères se caractérisent par des douleurs musculaires, mais peuvent également se traduire par le développement de véritables myopathies, allant jusqu'à la rhabdomyolyse entraînant la mort de certains patients (Liao, 2002). Ces effets secondaires peuvent apparaître avec ou sans augmentation du niveau de créatine kinase, qui est une enzyme mesurée dans le plasma caractérisant les dommages causés aux muscles (Ballantyne *et al.*, 2003).

#### *a. Myalgie*

La myalgie est caractérisée par des douleurs musculaires diffuses et une faiblesse musculaire. Les muscles des extrémités sont le plus souvent affectés et le niveau de créatinine kinase est normal ou légèrement augmenté. Il s'agit de l'effet délétère le plus retrouvé chez les patients qui sont traités avec des statines (Evans 2002).

#### *b. Myopathie*

La myopathie est définie comme une douleur ou faiblesse musculaire qui nécessite une consultation chez un médecin. Elle est caractérisée par une augmentation anormale de la créatinine kinase (> 3 fois la normale supérieure). Elle est associée à des douleurs notamment au niveau des extrémités des membres supérieurs. Des examens histologiques peuvent révéler une infiltration des cellules inflammatoires. L'incidence pour les patients qui sont traités uniquement avec des statines se trouve entre 1 et 5% (Thompson *et al.*, 2003). Ce chiffre s'élève rapidement jusqu'à 10% pour les patients qui sont en polymédication et cela augmente le risque d'apparition des effets délétères (Ballantyne *et al.*, 2003).

#### *c. Faiblesse musculaire*

Elle est associée ou non à une augmentation du niveau de créatinine kinase. Les biopsies ont révélé une variation de la taille des fibres associée à une nécrose et une infiltration de cellules inflammatoires.

#### *d. Rhabdomyolyse*

La rhabdomyolyse est caractérisée par une destruction des fibres de muscle squelettique. Elle est caractérisée par une augmentation anormale de la créatinine kinase (> 10 fois la normale supérieure). Elle est également caractérisée par une myoglobulinurie et une faiblesse, des douleurs et des crampes au niveau musculaire. La myoglobine relargée par les muscles en quantité importante cause un changement de couleur dans l'urine. Elle peut également provoquer d'autres pathologies comme une cardiomyopathie et des difficultés respiratoires. L'incidence est très faible (0.1 à 0.2%) (Tomlinson & Mangione, 2005).



## 4.2. Etat actuel des connaissances

### 4.2.1. Etudes préliminaires

Initialement, lors d'études *in vivo* chez des animaux recevant de fortes doses produisant des niveaux sanguins très élevés de lovastatine, aucun effet de la lovastatine sur le muscle n'a été constaté, et ce aussi bien après une évaluation fonctionnelle (niveaux sériques de créatine kinase (CK) que morphologique (sections histologiques du muscle squelettique) (MacDonald *et al.*, 1988). Depuis, des études *in vitro* ont démontré qu'un traitement avec des statines pouvait être associé à des myopathies dans des cultures de myotubes squelettiques de rat et, *in vivo*, à des myopathies et rhabdomyolyse chez le rat, le lapin et chez l'humain (Belo *et al.*, 1993; Flint *et al.*, 1997; Nakahara *et al.*, 1998). *In vitro*, la pravastatine s'est avérée moins myotoxique que la lovastatine ou la simvastatine (Fukami *et al.*, 1993; Nakahara *et al.*, 1994; Masters *et al.*, 1995; Pierno *et al.*, 1995). Un plus grand effet myotoxique de la simvastatine a également rapporté dans les myocytes squelettiques de rats nouveau-nés, comparé avec la pravastatine (Masters *et al.*, 1995). On cite l'inhibition du mécanisme de réparation des myotubes comme mécanisme de myopathie. Ces données jumelées à la réversibilité de la toxicité par l'acide mévalonique soutiennent l'hypothèse que l'inhibition de l'HMG-CoA réductase est le facteur le plus important dans la toxicité musculaire induite par les statines.

### 4.2.2. Aspects mécanistiques

Les mécanismes induisant ces effets délétères sont mal connus. Le mévalonate, dont la synthèse est réduite suite à la prise de statines, est un précurseur important, non seulement pour le cholestérol mais également pour l'ubiquinone et d'autres isoprénoides (Evans & Rees, 2002), qui sont des composés impliqués dans des fonctions cellulaires essentielles. Ainsi, la diminution de la synthèse d'un de ces composés peut entraîner une augmentation de la vulnérabilité de certaines fonctions cellulaires, notamment suite à des événements myotoxiques. Cette hypothèse est renforcée par une observation indiquant que la myotoxicité des statines sur des myocytes *in vitro* est diminuée par addition de mévalonate (Flint *et al.*, 1997; Guijarro *et al.*, 1999). Plusieurs mécanismes ont été explorés pour tenter d'expliquer les différences observées (Sonoda *et al.*, 1994; Pierno *et al.*, 1995; Fujioka & Tsujita, 1997). À cet effet, on a rapporté que la lovastatine inhibait la fusion des myoblastes en affectant la synthèse du dolichol (Belo *et al.*, 1993). Cette inhibition pourrait constituer un facteur additionnel prédisposant aux myopathies observées ultérieurement. Il a également été

démontré que la simvastatine induisait une réduction de la conduction membranaire chez le rat. Il a été montré qu'un traitement chronique avec la simvastatine augmente la concentration calcique dans la fibre musculaire (Pierno *et al.*, 2009). Il a également été montré qu'une application en aigu d'une dose de statine provoque une sortie massive de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique via les récepteurs à la ryanodine et ceci de façon dose-dépendant (Inoue *et al.*, 2003; Sacher *et al.*, 2005). Mais il semble que cette libération de calcium ait pour origine une dépolarisation des membranes mitochondriales conduisant à la libération du calcium mitochondriale, ce qui participerait à la libération massive de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique (Sirvent *et al.*, 2005a; Sirvent *et al.*, 2005b). Ce qui voudrait dire que les perturbations calciques auraient, au moins en partie, la mitochondrie pour origine.

#### 4.2.3. Interactions avec d'autres médicaments

L'incidence de myopathie associée à une rhabdomyolyse, pouvant mener à une insuffisance rénale (Prendergast & George, 1993), est accrue chez les sujets prenant en association de l'acide nicotinique et des fibrates (Spach *et al.*, 1991). Le mibefradil a été retiré du marché en raison des cas de rhabdomyolyse rapportés lors de son administration concomitante avec une statine. Il y a une augmentation de myosite, et même de rhabdomyolyse chez des sujets prenant de la cyclosporine en concomitance (Corpier *et al.*, 1988). Des interprétations ont été suggérées pour expliquer certaines de ces interactions cinétiques. L'utilisation concomitante de cyclosporine altère la clairance des statines et résulte en une exposition tissulaire plus élevée (Smith *et al.*, 1992). On rapporte que l'acide mévalonique a amélioré les lésions tandis qu'il n'y a pas eu de changement avec l'ubiquinone.

### 4.3. Statines et mitochondries

#### 4.3.1. Effets des statines sur l'ubiquinone ou CoQ<sub>10</sub>

Parmi les composés dont la synthèse est diminuée suite à la prise de statines, l'ubiquinone nous intéresse particulièrement. En effet, l'ubiquinone est essentiel pour le transport des électrons entre les différents complexes de la chaîne respiratoire. Lors de la prise de statine, il a été observé une réduction du taux d'ubiquinone de l'ordre de 40% (Ghirlanda *et al.*, 1993). De façon intéressante, une diminution d'ubiquinone est présente dans des formes spécifiques de myopathies résultant d'altérations de la chaîne de transport des électrons au sein de la mitochondrie, ce qui a pour conséquence une diminution de la synthèse d'adénosine

triphosphate (Ogasahara *et al.*, 1989; Di Giovanni *et al.*, 2001), essentielle pour le bon fonctionnement cellulaire. Par ailleurs, des études au microscope électronique ont été réalisées sur des biopsies de muscle de patients atteints de myopathies mitochondriales et de patients atteints de myopathies suite à un traitement aux statines et ont présenté une diminution de la taille des fibres, une nécrose et une infiltration identique des cellules inflammatoires dans l'endomysium (Giordano *et al.*, 1997). Par ailleurs, une étude récente a montré des anomalies biochimiques d'origine génétique dans le muscle squelettique chez 50% des patients atteints de myopathies associées aux statines. Ceci suggère qu'au moins une partie des patients atteints de troubles musculaires, suite à la prise de statines, puisse avoir des prédispositions génétiques (Vladutiu *et al.*, 2006). Néanmoins, si les prédispositions génétiques semblent jouer un rôle important dans le développement d'une myopathie suite à la prise de statines, les causes et les mécanismes responsables de l'apparition de ces altérations musculaires restent très mal connus.

#### 4.3.2. Effets des statines sur la chaîne de respiration mitochondriale musculaire

Dans une étude réalisée *in vitro*, Sirvent *et al.* ont mesuré les effets directs de la simvastatine sur la consommation d'oxygène d'un muscle glycolytique humain et de rat par polarographie. Ils ont montré que cette statine bloque le complexe I de la chaîne respiratoire et bloque ainsi le transfert d'électrons entre les complexes, aussi bien chez l'homme que l'animal. Les effets délétères de la simvastatine semblent donc important sur la fonction mitochondriale des muscles squelettiques (Sirvent *et al.*, 2005a). Les auteurs suggèrent que les statines pourraient induire une transition de perméabilité mitochondriale provoquant un changement morphologique de la mitochondrie ainsi que l'activation des voies apoptotiques (Bergman *et al.*, 2003). Par ailleurs, Kaufmann *et al.* ont démontré clairement sur des mitochondries isolées, que les différentes statines entraînent une diminution de la respiration mitochondriale sauf pour la pravastatine (Kaufmann *et al.*, 2006). Ces altérations mitochondriales seraient dues à une dissipation du potentiel électrique à travers la membrane interne mitochondriale. Une diminution du potentiel de membrane mitochondrial peut mener à une perméabilisation de cette membrane, ce qui est considéré comme le point de non-retour à l'initiation de l'apoptose (19, 20). Par contre, les effets directs des statines sur la respiration mitochondriale des fibres cardiaques n'ont, à notre connaissance, jamais été étudiés. Nous posons l'hypothèse que le muscle cardiaque est mieux protégé des effets délétères des statines, puisque premièrement les statines sont décrites comme étant protectrices au niveau cardiaque, et

deuxièmement aucune myopathie cardiaque n'a été décrite dans la littérature contrairement au muscle squelettique.

#### 4.3.3. Statines et exercice

##### *a. Effets bénéfiques de l'exercice*

Il a été clairement établi que l'entraînement permet de mettre en place une séquence de processus adaptatifs par laquelle le muscle acquiert des caractéristiques structurales, physiologiques et biochimiques qui permettent au muscle entraîné de produire une plus importante puissance mécanique en aérobie. Ainsi, l'entraînement, qui augmente de façon chronique l'activité contractile, active la biogenèse mitochondriale dans le muscle. Cette biogenèse mitochondriale est une conséquence de changements dans le métabolisme musculaire se produisant au cours de l'exercice. Plus la quantité de mitochondries sera importante par gramme de muscle, et plus l'intensité de l'exercice pourra être importante, avant que les mitochondries ne se rapprochent de leur vitesse maximale de fonctionnement, diminuant ainsi la part de la glycolyse anaérobie (Hood, 2001). Ces adaptations aboutissent donc à un changement conséquent du métabolisme énergétique, avec comme principale conséquence l'amélioration de la résistance à la fatigue. Structurellement, il a été clairement démontré une densité volumétrique mitochondriale plus élevée dans les muscles de sujets entraînés en endurance comparé à des sujets contrôles. D'autre part, le volume mitochondrial dans les muscles squelettiques augmente en proportion directe de la consommation d'oxygène globale dans les espèces athlétiques, comparées aux espèces normales. Taylor propose que ce serait uniquement l'augmentation du nombre de mitochondries qui, ayant toutes la même structure, permettraient d'ajuster la production d'énergie à la demande plutôt que la variation des vitesses de réaction des enzymes de la chaîne respiratoire (Taylor, 1987). De plus, les changements dans les activités d'enzymes oxydatives sont proportionnels aux changements dans la densité volumétrique des mitochondries (Hoppeler, 1986). Plus précisément, Hoppeler et al. (1985) démontrèrent que l'entraînement en endurance provoque préférentiellement la prolifération des mitochondries sous-sarcolemmales, qui normalement représentent seulement 10 à 15% du volume total mais peuvent atteindre jusqu'à 30% chez les cyclistes professionnels (Hoppeler & Lindstedt, 1985). Lorsque l'on regarde les adaptations en fonction du type de fibre, on s'aperçoit que ce sont les fibres de type IIA qui montrent une augmentation relative de leur volume mitochondrial plus importante par rapport aux fibres de type I ou IIX (Howald *et al.*, 1985), même si le type de protocole d'entraînement (intensité

élevée en intermittent ou faible intensité pendant une longue période) peut faire varier les proportions (Dudley *et al.*, 1982). Seuls les muscles voyant leur production énergétique augmentée au cours de l'exercice sont affectés par l'entraînement en endurance alors que les autres muscles ont même plutôt tendance à diminuer leur volume mitochondrial (Saltin *et al.*, 1976). Au vu de ces différents éléments, nous émettons l'hypothèse qu'un entraînement physique préventif pourrait rendre le muscle squelettique plus résistant aux effets délétères des statines.

#### *b. Effets des statines sur l'exercice physique*

Il a été clairement établi que les statines peuvent provoquer des problèmes musculaires. Thompson *et al.* ont été les premiers à décrire le niveau de créatine kinase suite à un exercice après un traitement avec la lovastatine (Thompson *et al.*, 1991). Cette observation est associée à une élévation de la créatine kinase. La prévalence des douleurs musculaires pendant un traitement avec des statines augmente avec l'exercice. En effet, les patients traités avec des statines présentent des problèmes musculaires durant et après un exercice (Franc *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est reporté que sur un groupe de 22 athlètes professionnels, seulement 20% tolèrent les statines en raison de l'apparition de douleurs musculaires pendant et après un exercice physique et ces effets secondaires peuvent apparaître avec ou sans augmentation du niveau de créatine kinase, qui est une enzyme mesurée dans le plasma caractérisant les dommages causés aux muscles (Sinzinger & O'Grady, 2004). Thompson *et al.* ont examiné le taux de CK après un exercice physique chez 59 hommes avec un niveau de LDL-C élevé qui reçoivent soit 40mg/j de lovastatine soit un placebo (Thompson *et al.*, 2006). Le taux de CK dans le groupe traité avec la lovastatine augmente rapidement dans les 24h qui suivent l'exercice physique comparé au groupe non traité. De plus, 25% des patients sous statines qui font de l'exercice ont eu une expérience de fatigue musculaire, de faiblesse musculaire et de crampes (Tomlinson & Mangione, 2005). Ces résultats tendent à démontrer que l'ajout d'un stress comme celui de l'exercice physique, en augmentant la contrainte musculaire et/ou la demande énergétique, provoque une augmentation du risque d'apparition des symptômes. Ces problèmes musculaires impactent la qualité de vie des patients en diminuant la réalisation de certains gestes de la vie quotidienne ainsi que la pratique de leurs activités physiques. Les mécanismes qui entraînent des problèmes musculaires, durant et après un exercice, induits par les statines restent encore inconnus.

### **En résumé,**

*Les statines sont des molécules qui bloquent la biosynthèse de novo de cholestérol. Ils sont les médicaments les plus communément prescrits dans le cadre du traitement de l'hyperlipidémie. Ils permettent la diminution du risque de survenue (prévention primaire) ou de récurrence (prévention secondaire) de maladies résultant du rétrécissement ou de l'occlusion d'artères. Ils présentent également la propriété d'avoir des effets « pléiotropes » bénéfiques notamment au niveau cardiovasculaire. Néanmoins, un certain nombre d'effets secondaires ont été identifiés chez environ 5 à 7% de ces patients. Ces effets délétères se caractérisent par des douleurs musculaires, mais peuvent également se traduire par le développement de véritables myopathies, allant jusqu'à la rhabdomyolyse entraînant la mort de certains patients. Les causes et les mécanismes responsables de l'apparition de ces altérations musculaires restent bien mal connus.*

# **PROBLEMATIQUES**

## **1. Problématique générale**

Les statines exercent des effets bénéfiques dans le cœur mais des effets délétères dans le muscle squelettique. Comment la même molécule peut elle exercer des effets opposés sur le muscle ? Par ailleurs, nous voulions savoir pourquoi durant un traitement avec des statines, les patients souffrent fréquemment de douleurs musculaires et de myalgies. Notre hypothèse s'est focalisée sur la mitochondrie dans ces muscles. En effet, la mitochondrie produit des radicaux libres qui sont tamponnés par le système antioxydant. Quelle est le rôle joué par le stress oxydant et les capacités antioxydantes durant le traitement avec des statines ? Un entraînement permet-il de rendre le muscle plus résistant aux effets délétères des statines ? Quelle est l'effet d'un exercice aigu sur le muscle traité avec des statines ?

## **2. Etude 1 : Effets de l'atorvastatine *in vitro* sur la fonction mitochondriale de muscles contrôlés et entraînés**

La mitochondrie joue un rôle central à la fois dans la production énergétique du muscle et dans la production de ROS. Plusieurs études ont montré par ailleurs que l'une des cibles privilégiées des statines était la mitochondrie. En effet, les statines entraînent une diminution de la synthèse d'ubiquinone et inhibent la respiration mitochondriale.

Il a été clairement établi que l'entraînement permet de mettre en place une séquence de processus adaptatifs par laquelle le muscle acquiert des caractéristiques structurales, physiologiques et biochimiques qui permettent au muscle entraîné de produire une plus importante puissance mécanique en aérobie. Ainsi, l'entraînement qui augmente de façon chronique l'activité contractile, active la biogenèse mitochondriale dans le muscle. Cette biogenèse mitochondriale est une conséquence de changements dans le métabolisme musculaire se produisant au cours de l'exercice. Elle permet une amélioration des capacités antioxydantes.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons réalisé une étude *in vitro* sur les effets de l'atorvastatine sur la fonction mitochondriale de muscles contrôlés et entraînés ayant des phénotypes différents : le soléaire (muscle squelettique oxydatif) et le plantaris (muscle squelettique glycolytique). Nous voulions savoir si un muscle entraîné est moins sensible aux effets des statines. Notre objectif était donc de caractériser les dysfonctionnements mitochondriaux en fonction du phénotype musculaire en explorant précisément les atteintes



au niveau de la chaîne respiratoire. Notre hypothèse de travail est que l'entraînement améliore la fonction mitochondriale et qu'il protège des effets délétères de l'atorvastatine *in vitro*.

### **3. Etude 2 : Effet d'un traitement avec l'atorvastatine sur un exercice exhaustif**

Dans l'étude précédente, nous avons voulu étudier si les muscles entraînés étaient plus résistants aux statines au niveau des muscles squelettiques et si une cible importante des statines était bien la mitochondrie. Il a été clairement établi que les patients qui sont traités avec des statines ont beaucoup de difficultés à réaliser un exercice physique. Une étude a montré que 25% des patients traités avec des statines présentent des myalgies suite à un exercice physique, sans que les causes en soient clairement établies. Pour cela, nous avons réalisé un exercice aigu sur des animaux traités chroniquement avec de l'atorvastatine. Notre objectif était de caractériser les capacités à l'exercice et les atteintes au niveau de la fonction mitochondriale sur les animaux traités et qui réalisent cet exercice aigu.

### **4. Etude 3 : Effet d'un traitement avec l'atorvastatine sur la fonction mitochondriale : mise en évidence du concept de « mitohormesis »**

La troisième partie de cette thèse en représente l'étude centrale. Dans les études précédentes, nous avons montré que les statines induisent des radicaux libres. A présent, nous voulions comprendre pourquoi les statines sont bénéfiques dans le cœur et délétères dans le muscle ? Notre objectif était de démontrer le rôle central du stress oxydant dans les effets contradictoires. Pour cela, nous avons utilisé différents modèles (humain, animal et cellulaire). Notre hypothèse de travail est que les effets contradictoires observés au niveau du muscle cardiaque et des muscles squelettiques sont dus à la production des ROS qui influence la biogenèse mitochondriale, de façon positive ou négative suivant son niveau de production nette. Les statines agiraient donc selon le concept de « mitohormesis ». Les statines auraient donc des effets différents différemment selon le phénotype musculaire :

- soient elles augmentent modérément les radicaux libres : cela entraîne une activation de la biogenèse mitochondriale. On retrouve ces effets dans le cœur.

- soient elles augmentent les radicaux libres de façon exagérée et comme le système antioxydant ne peut faire face, cela va entraîner une diminution de la biogenèse mitochondriale. On retrouve ces effets dans le muscle squelettique.

# **MATERIELS ET METHODES**

# 1. Modèles utilisés durant cette thèse

## 1.1. Modèle humain

### 1.1.1. Biopsies d'oreillettes humaines

Les biopsies proviennent de patients opérés dans le service de chirurgie cardiaque du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg. Les opérations étaient réalisées par sternotomie médiane et sous circulation extra-corporelle (CEC) par le Docteur Michel Kindo. De l'héparine était administrée à la dose de 300 UI/kg IV. La canulation artérielle était réalisée via l'aorte ascendante distale. Un fragment de l'auricule droit était systématiquement prélevé permettant la canulation veineuse avant le démarrage de la CEC et était immédiatement conservé dans de la solution S (voir ci-dessous pour la composition) à 4°C (Seppet *et al.*, 2005). Durant une intervention de chirurgie cardiaque, la mise en place de canules est nécessaire, avec ablation obligatoire d'un fragment d'oreillette, considérée comme déchet opératoire. Cette étude n'engendre ainsi ni geste ni risque supplémentaire durant l'opération, la partie récupérée étant le fragment d'oreillette nécessairement enlevé pour l'intervention. Tous les patients ont signé un consentement éclairé afin de donner leur accord pour participer à cette étude.

14 biopsies d'oreillettes ont ainsi été recueillies en deux groupes : groupe CONT (n=6) de patients non traités avec des statines et groupe STAT (n=8) de patients traités avec des statines. Environ 100 mg d'oreillettes étaient récupérés, dont une partie a été congelée dans l'azote liquide pour les études ultérieures et l'autre partie est utilisée pour l'étude des paramètres de la respiration mitochondriale et de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (voir ci-dessous).

### 1.1.2. Biopsies du muscle deltoïde

Ces biopsies musculaires du deltoïde ont été prélevées, sous anesthésie locale, par le Docteur Andoni Echaniz-Laguna dans le service de neurologie du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg. Nous avons pu étudier les biopsies musculaires de 5 patients (groupe M-STAT) ayant développés une myopathie aux statines et pour lesquelles les atteintes s'estompent après l'arrêt du traitement. Les patients ayant une myopathie non induite par les statines ont été exclus du protocole. Le groupe contrôle était composé de 5 sujets (groupe M-CONT) chez lesquels toute atteinte musculaire a pu être levée.

Environ 50 mg de muscles étaient récupérés, dont une partie est congelée dans l'azote liquide pour les études ultérieures et l'autre partie utilisée pour l'étude des paramètres de la respiration mitochondriale et de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (voir ci-dessous). Tous les patients ont signé un consentement éclairé afin de donner leur accord pour participer à cette étude.

## **1.2. Modèle animal**

L'ensemble de l'expérimentation animale de cette étude a été réalisé selon les recommandations en recherche animale en vigueur et après obtention des autorisations du comité d'éthique en recherche animale de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

### **1.2.1. Protocole expérimental**

*a. Effets de l'atorvastatine in vitro sur la fonction mitochondriale sur les muscles contrôles et entraînés.*

Cette expérience a été réalisée sur 20 rats répartis en 2 groupes : un groupe de 10 rats contrôles (Cont) et un autre groupe de 10 rats entraînés (Training). Les rats du groupe Training ont réalisés un entraînement sur un tapis roulant (Treadmill Control, Leticia, Espagne). Ils sont préalablement acclimatés à l'exercice une semaine avant le début du protocole. Pour contrôler les effets du bruit et des autres stress associés à l'exercice, ce protocole a lieu dans une cage close. L'acclimatation a consisté en un exercice de 10 minutes par jour à une vitesse de 20 cm/s. Durant l'étude, les rats ont réalisé un exercice durant 30 minutes à une vitesse de 40 cm/s avec une pente de 15% pendant 10 jours. Les rats sont stimulés à l'exercice par des chocs électriques au niveau d'une grille métallique. Le critère d'arrêt de l'exercice est la présence de l'animal sur cette grille.

*b. Effet d'un exercice exhaustif sur les muscles de rats traités avec l'atorvastatine*

2 groupes de 10 rats traités (ATO+EXE) ou non (CONT+EXE) avec l'atorvastatine pendant 14 jours à une dose de 10 mg/kg/jour sont soumis à un exercice exhaustif sur tapis roulant le jour du sacrifice à savoir un exercice soutenu durant 40 min à une vitesse de 40 cm/s suivi d'une augmentation par palier de 5 cm/s toutes les deux minutes jusqu'à 60 cm/s. A l'aide d'un scalpel, on réalise une petite incision au bout de la queue. La mesure du lactate

s'effectue par le placement d'une goutte de sang sur une bandelette reliée à un lactomètre (Lactate Pro Test, Meter, Japan), avant et après l'exercice physique.

### *c. Etude de l'effet d'un co-traitement avec l'atorvastatine et la quercétine sur la fonction mitochondriale*

Pour l'étude chronique, 32 rats adultes males Wistar (IFFA CREDO, France) pesant 250-300g ont été utilisés. Après une semaine d'acclimatation, les rats sont subdivisés en 4 groupes : un groupe de 8 rats contrôles (CONT), un groupe de 8 rats traités à 10 mg/kg/jour d'atorvastatine (ATO), un groupe de 8 rats traités à 25 mg/kg/jour avec un antioxydant, la quercétine (QUERC), et un groupe de 8 rats traités l'atorvastatine et la quercétine aux mêmes doses (QUERC+ATO).

L'atorvastatine (Tahor®) nous a été généreusement fournie par le laboratoire Pfizer. Le traitement a été administré aux rats par gavage via une canule une fois par jour. Le traitement avec l'atorvastatine a duré 14 jours et celui avec la quercétine 19 jours. En effet, le traitement préventif avec la quercétine a commencé 5 jours avant celui de l'atorvastatine.

#### 1.2.2. Prélèvements musculaires

Le jour du sacrifice, les rats sont anesthésiés au pentobarbital (0,1 mL/100g). Le ventricule gauche (très oxydatif), le muscle soléaire (oxydatif) et la partie superficielle du muscle plantaris (glycolytique) ont été prélevés et ensuite mis dans les différentes solutions à 4°C pour réalisation des différentes expériences. Une partie des muscles ainsi que le plasma ont été congelés pour des études ultérieures.

### **1.3. Modèle cellulaire**

#### 1.3.1. Cardiomyocytes H<sub>9</sub>C<sub>2</sub>

Les cardiomyocytes H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> ont été mis en culture à 37°C et 5% de DMEM dans 10% de FCS (Foetal Calf Serum).

Nous avons réalisé deux protocoles avec ces cellules :

- 1) Les cellules sont cultivées en présence d'atorvastatine (1µmol/L) avec ou sans un antioxydant, la N-AcetylCystéine (NAC ; 1mmol/L)) durant 48 heures.

2) Les cellules sont cultivées en présence d'atorvastatine pendant 48H puis de la doxorubicine (0.5 $\mu$ mol/L), qui est connue pour sa cardiotoxicité cellulaire, est ajouté au milieu pendant une heure. Les cellules ont ensuite été marquées à la dihydroéthidium pour caractériser le stress oxydant, pour le marquage au TMRE pour caractériser le potentiel de membrane mitochondriale et à la q-RT-PCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) pour quantifier le niveau d'expression de transcrits.

### 1.3.2. Myotubes L<sub>6</sub> Woody

Les myocytes L<sub>6</sub> Woody ont été mis en culture à 37°C et 5% de DMEM dans 20% de FCS. Ces myocytes sont considérés comme des myotubes après 5 jours de différenciation induit par un remplacement du milieu de culture avec du DMEM à 1g/L glucose contenant 2.5% de FCS. L'adénovirus codant pour PGC-1 $\alpha$  nous a été généreusement fourni par le Pr Johan Auwerx (Canto *et al.*, 2010). Les myotubes ont été lavés avec du PBS et laissés pendant 1 heure dans du DMEM contenant la quantité appropriée de particules virales. Ces myotubes, surexprimant ou non PGC-1 $\alpha$ , ont été incubés avec l'atorvastatine (1 $\mu$ mol/L) avec ou sans la NAC (1mmol/L) durant 48 heures. Les cellules ont ensuite été marquées à la dihydroéthidium pour caractériser le stress oxydant et à la q-RT-PCR pour quantifier le niveau d'expression de transcrits.

## 2. Techniques

### 2.1. Protocole d'étude de la respiration mitochondriale

#### 2.1.1. Solutions

Les solutions de pelage (S) et de respiration (R) utilisées reconstituent le contenu en ions intracellulaire de la fibre musculaire. Les solutions S et R ont une base commune : CaK<sub>2</sub>EGTA 2.77 mM, K<sub>2</sub>EGTA 7,23 mM (100 nM de Ca<sup>2+</sup> libre), MgCl<sub>2</sub> 6,56 mM (1mM de Mg<sup>2+</sup> libre), imidazole 20 mM, taurine 20 mM, dithiothreitol 0,5 mM, K-sulfonate de méthane 50mM (160mM de force ionique). Le pH des solutions ont été ajusté à 7. La solution S contient également : Na<sub>2</sub>ATP 5,7 mM et PCr 15 mM. La solution R contient quant à elle : 5 mM de glutamate, 2 mM de malate, 3 mM de phosphate, à laquelle est ajoutée 2 mg/ml d'albumine (BSA).

### 2.1.2. Préparation des fibres

Après prélèvement musculaire, l'échantillon tissulaire (30-50mg) est immédiatement placé dans la solution S, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées à l'aide de pinces de précision, sous loupe binoculaire. Cette étape est essentielle afin de permettre l'accès de la saponine aux membranes des fibres musculaires. Puis, intervient l'étape de perméabilisation, les fibres étant placées dans un tube de solution S + saponine (50 µg/ml) sous agitation durant 30 minutes à 4°C (Kuznetsov *et al.*, 2008). Cette étape permet de détruire sélectivement le sarcolemme sans endommager les membranes mitochondriales, moins riches en cholestérol. Les fibres sont ensuite replacées dans un tube de solution S pendant 10 minutes, toujours sous agitation, afin d'éliminer la saponine. Finalement, elles sont placées dans des tubes contenant de la solution R (2x5 minutes), afin d'éliminer l'ATP, l'ADP et la PCr, tout en maintenant l'homéostasie cellulaire.

### 2.1.3. Protocole d'étude de la chaîne de respiration mitochondriale

Les analyses se font dans des chambres oxygraphiques thermostatées reliées à un bain-marie à 22,1°C (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). Pour mesurer la décroissance de la concentration d'oxygène dans les chambres, des électrodes de Clark sont utilisées, reliées à un logiciel qui analyse les variations de concentration en oxygène (Oxygen 571<sup>®</sup>). Ceci va permettre de calculer la vitesse de consommation d'oxygène pour les différentes chambres qui est un reflet de l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale. Différents substrats sont injectés pour activer les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale :

- Initialement, les fibres musculaires sont placées dans la solution R, contenant les substrats qui vont générer du NADH, équivalent réducteur qui donne ces électrons au complexe I : glutamate (5mM) et malate (2mM). La consommation d'oxygène ainsi mesurée correspond à l'activité de base de la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV ( $V_o$ ).
- on injecte ensuite de l'ADP (2mM), permettant une stimulation maximale de la chaîne de respiration mitochondriale au travers de ces complexes I, III et IV ( $V_{max}$ ).
- l'adjonction d'amytal (0,02mM) va bloquer le complexe I et entraîner un arrêt du fonctionnement de la chaîne de respiration mitochondriale.



- l'adjonction de succinate (25mM), substrat qui va générer du FADH<sub>2</sub> grâce à la succinate déshydrogénase, va permettre de stimuler la chaîne respiratoire à partir du complexe II, (activation des complexes II, III et IV ( $V_{succ}$ )).

- L'adjonction du TMPD (0,5mM) et de l'ascorbate (0,5mM) stimule l'activité du complexe IV à son maximum, ce qui permet son étude indépendamment du fonctionnement des autres complexes ( $V_{tmpd/asc}$ ). A la fin de la manipulation, les fibres sont récupérées, déshydratées et pesées. Toutes les vitesses sont ainsi exprimées en  $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  de fibres en poids sec.

## **2.2. Protocole de détection des ROS par résonance paramagnétique électronique (RPE)**

### 2.2.1. Solutions

La solution tampon utilisée est du Krebs-Hepes. Il contient : NaCl 99 mM, KCl 4,69 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,03 mM, D(+) Glucose 5,6 mM, Na-Hepes 20 mM. Il a été ajouté à cette solution 25 $\mu\text{M}$  de déféroxamine et 5 $\mu\text{M}$  de DETC, afin d'éviter une auto-oxydation de la CMH par la solution de Krebs. La CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine HCl) est une sonde moléculaire qui s'oxyde en présence des électrons non appariés des espèces réactives de l'oxygène, sous une forme stable dans le temps. C'est cette CMH oxydée que l'on va ensuite mesurer.

### 2.2.2. Préparation des fibres

Après prélèvement musculaire, l'échantillon tissulaire (20-30mg) est immédiatement placé dans la solution de Krebs, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées et coupées en fragments de 1 à 2 mm<sup>3</sup>, sous loupe binoculaire à 4°C. Les fragments tissulaires sont finalement rincés deux fois dans la solution de Krebs.

### 2.2.3. Protocole d'étude de la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène

L'incubation du tissu avec la CMH est réalisée dans un incubateur thermo-régulé et sous atmosphère contrôlée (NOXYGEN<sup>®</sup>, Allemagne). Les fragments tissulaires sont ainsi placés

dans une plaque multi-puits, en présence de Krebs et de CMH (200 $\mu$ M). La plaque est mise à incuber pendant 30 minutes à 37°C, avec comme paramètres atmosphériques : N<sub>2</sub> 97,8%, O<sub>2</sub> 2,8% et +20mmHg de pression pour reproduire la pression partielle d'oxygène présente au niveau tissulaire. La quantification des radicaux libres dérivés de l'oxygène est réalisée sur un aliquot de 40 $\mu$ L de surnageant par résonance paramagnétique électronique thermorégulé à 15°C (Noxygen<sup>®</sup>, Allemagne).

Ainsi, 40 $\mu$ l de surnageant sont prélevés sur la plaque et analysés par résonance paramagnétique électronique. Les paramètres de réglages permettant de détecter la CMH oxydée sont les suivants : center field  $g = 2$ , field sweep 60 G, microwave power 60 mW, modulation amplitude 2,48 G, conversion time 10,24 ms, time constant 40,96 ms.

La quantité de CMH oxydée, et donc la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène, est mesurée par l'intensité du signal de résonance recueilli. A la fin de la manipulation, les fragments tissulaires sont récupérés, déshydratés et pesés. La production des radicaux libres dérivés de l'oxygène est exprimée en  $\mu$ mol/min/mg de fibres en poids sec.

### **2.3. Protocole de mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale**

#### 2.3.1. Solution

On utilise la solution Z comme tampon. Elle contient : K-MES 110 mM, KCl 35 mM, EGTA 1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, glutamate 5mM, malate 2mM avec 0,5 mg/ml BSA.

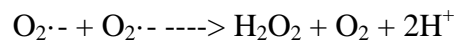
#### 2.3.2. Préparation des fibres

L'échantillon tissulaire est disséqué et perméabilisé de manière identique au protocole de respiration mitochondriale. Les fibres sont ensuite placées dans des bains successifs de solution Z (3x9 minutes), sous agitation et à 4°C.

#### 2.3.3. Protocole d'étude de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale

Les analyses se font au travers d'une cuve en quartz placée dans un spectrofluoromètre thermostaté relié à un bain-marie à 37°C (FLUOROMAX-4 spectrophotometer, HORIBA JOBIN YVON<sup>®</sup>, New Jersey, Etats-Unis). La production d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesurée par la réaction entre l'Amplex Red et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (produite par les mitochondries) catalysé par l'HRP

(horseradish peroxidase) pour donner de la résorufine et de l'oxygène moléculaire, sous agitation magnétique et température contrôlée à 37°C. La fluorescence est mesurée en continu. La résorufine est excitée à une longueur d'onde de 563 nm et émet à une longueur d'onde de 587 nm. Initialement, les fibres sont placées dans une cuve contenant la solution Z (0.6ml), l'HRP (0,5 U/ml) et l'Amplex Red (5 µM). On injecte alors du glutamate (5mM) et du malate (2mM), substrats du complexe I, permettant d'activer la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV. Une partie du flux d'électrons créé au niveau des complexes I et III va réagir avec l'oxygène pour former de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Cet O<sub>2</sub><sup>-</sup> réagit avec la superoxyde dismutase mitochondriale pour donner de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :



A la fin de la manipulation, les fibres sont récupérées, déshydratées et pesées. Toutes les vitesses sont ainsi exprimées en pmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de fibres en poids sec.

## **2.4. Evaluation du niveau d'expression des ARNm par q-RT-PCR**

### **2.4.1. Extraction de l'ARN**

L'ARN total est extrait avec le TRIzol® selon le protocole du fournisseur Invitrogen. Le TRIzol® est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN tout en détruisant les cellules et en dissolvant les autres composés cellulaires. Les échantillons tissulaires (environ 50 mg) sont broyés mécaniquement dans l'azote liquide puis placés immédiatement dans 1 ml de TRIzol®. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont ensuite laissés au repos pendant 5 minutes à température ambiante. L'adjonction de chloroforme (0,2 ml par échantillon) est suivie d'une agitation vigoureuse pendant 15 secondes puis d'un contact prolongé à température ambiante (5 à 10 minutes). Les échantillons sont centrifugés à 11000 rpm pendant 15 minutes à 4°C ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement l'ARN. On récupère uniquement la phase supérieure. L'ARN est ensuite précipité dans la phase aqueuse supérieure par addition de 0,5 volume d'isopropanol. Les tubes sont ensuite agités pendant 30 secondes, laissés à température ambiante pendant dix minutes puis centrifugés à 11000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 75 % et centrifugé pendant 5 minutes à 7000 rpm à 4°C. Le culot est récupéré et séché à l'air puis

remis en suspension dans 10 µl d'eau à 0,1% de diéthyl-pyrocarbonate (DEPC), un inhibiteur de nucléase. La pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (Nanodrop). Un rapport égal ou supérieur à 1,7 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par l'ADN.

#### 2.4.2. Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)

Cette étape est réalisée à l'aide d'un enzyme : le SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). La transcription réverse (RT) est réalisée dans un volume de 20 µl, en présence de 2 µg d'ARN dans 10µl d'eau DEPC, 5µl Buffer 5X, 0.5µl de transcriptase réverse, 2µl de DTT (0.1M), 1.5 µl désoxynucléotides triphosphates (10 mM) et 1 µL d'héxamères p(dN)<sub>6</sub> (200µM). Ce mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer l'ARNm. L'ADNc est ensuite synthétisé à 42°C pendant 50 minutes. La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 72°C pendant 15 minutes.

#### 2.4.3. Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel

L'ADNc a été amplifié par le LightCycler (Roche Diagnostic, Meylan, France), en utilisant le kit Invitrogen. La PCR quantitative est également réalisée dans un volume de 8 µl en présence d'amorces spécifiques sens et antisens du gène d'intérêt (10 µM) mais cette fois-ci avec 4 µl tampon de réaction MasterMix (Roche) et 2.5 µl d'ADNc. Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). Chaque échantillon a été analysé en triple et quantifié selon le protocole du fournisseur (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de la β-actin considérée comme le gène domestique.

### **2.5. Marquage des radicaux libres avec le dihydroéthidium**

Des coupes cryostat de muscles d'une épaisseur de 10 µm sont incubées pendant 30 minutes à 37°C avec la DHE (dihydroéthidium ; 2.5 µM). La DHE produit une fluorescence rouge

quand elle est oxydée en éthidium bromide par les ROS (Mulsch *et al.*, 2001). Les coupes sont ensuite montées dans du Vectashield® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). On examine ensuite les coupes sous un microscope à épifluorescence avec un objectif X20 (Nikon Eclipse E800).

Sur les cellules, le protocole est identique sauf pour la concentration en DHE (5µM) et l'objectif du microscope X40.

## **2.6. Mesure du glutathion GSH**

Le GSH est mesurée sur les différents tissus selon la méthode d'Akerboom et Sies (Akerboom & Sies, 1981). Elle est basée sur la réduction du 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) en 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) par le GSH à une longueur d'onde à 412 nm.

## **2.7. Analyse du potentiel de membrane mitochondriale**

Le potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\psi_m$ ) est évalué par le tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE ; Molecular Probes). Le TMRE (100 nmol/L) est appliqué sur les cardiomyocytes H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> pendant 20 minutes dans le noir à 37°C. On examine les cardiomyocytes sur un microscope à épifluorescence avec un objectif X40 (Nikon Eclipse E800) et un filtre Zeiss 573-637 nm. On a mesuré l'intensité de fluorescence sur 20-25 cardiomyocytes isolés pour chaque condition (Adobe Photoshop 6.0, USA). On observe un marquage de la membrane mitochondriale. Une dissipation du potentiel de membrane mitochondriale se traduit par une diminution de la fluorescence.

# **RESULTATS**

## **1. Etude 1 : Effets de l'atorvastatine *in vitro* sur la fonction mitochondriale sur les muscles contrôlés et entraînés**

Il a été clairement établi que l'exercice physique exerce des effets bénéfiques sur la fonction mitochondriale. Cependant, l'analyse du bénéfice/risque du traitement avec des statines est compliquée par le fait que l'exercice semble augmenter le risque de myopathies induites par les statines. Les mécanismes par lesquels les statines produisent des symptômes myopathiques restent inconnus. Le but de cette étude a été d'évaluer les effets *in vitro* de l'atorvastatine sur la fonction mitochondriale sur le plantaris (glycolytique) de rats sédentaires et entraînés. Nous émettons l'hypothèse que l'entraînement physique de par ses effets bénéfiques sur la fonction mitochondriale protégerait ce muscle après exposition avec l'atorvastatine.

Cette étude a montré que l'entraînement physique augmente les capacités oxydatives maximales dans le plantaris, que ces capacités oxydatives maximales sont diminuées après exposition avec l'atorvastatine et cette diminution est dose-dépendante, que cet exercice permet de réduire cette diminution de la respiration mitochondriale et que cette protection est probablement due à cette augmentation de la respiration mitochondriale et des capacités antioxydantes.

Ces résultats ont également montré qu'un stress cellulaire comme l'exercice induit des adaptations musculaires qui rendent les mitochondries plus résistantes à un important stress métabolique comme l'exposition avec l'atorvastatine.

# **Exercise training protects mitochondria of skeletal muscle against acute exposure to atorvastatin**

Jamal Bouitbir<sup>1,2</sup>, Frédéric Daussin<sup>1,2</sup>, Anne-Laure Charles<sup>1,2</sup>, Laurence Rasseneur<sup>2</sup>, Stéphane Dufour<sup>2</sup>, Yann Burelle<sup>3</sup>, Ruddy Richard<sup>1,2</sup>, François Piquard<sup>1,2</sup>, Bernard Geny<sup>1,2</sup> and Joffrey Zoll<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CHRU of Strasbourg, Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, B.P. 426, 67091 Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Physiology Department, Strasbourg University, EA 3072, Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Department of Kinesiology, University of Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**Manuscript statistics:** 4785 words (213 words in abstract) and 4 figures.

Correspondence to : Dr Joffrey Zoll, PhD, CHRU of Strasbourg, Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, B.P. 426, 67091, Strasbourg, France.

Phone: +33 390243436; Fax: +33 390243444; E-mail: Zoll.Joffrey@unistra.fr

**Running Title:** mitochondria, oxidative stress and statins.



## Abstract

**Background and purpose:** Statins protect against cardiovascular-related mortality but are associated with adverse skeletal muscle effects. The objective of this study was to determine if exercise training reduce deleterious effects of acute exposure to atorvastatin in skeletal muscle.

**Experimental approach:** 20 rats were divided in 2 groups: a control group (n=10; Cont) and a 10 days training group (n=10; Training). Using permeabilized fibers we explored the mitochondrial function (mitochondrial respiration and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production).

**Results:** In cont group, atorvastatin exposure increased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and decreased maximal mitochondrial respiration ( $V_{max}$ ) and this diminution was dose dependant. Ten days of endurance training increased  $V_{max}$  without altering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Interestingly, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of atorvastatin was higher in Training group than Cont group (238 vs. 73  $\mu$ M respectively,  $p < 0.05$ ). On the other hand, mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was higher in trained muscle after atorvastatin exposure suggesting a higher detoxifying capacity of this muscle. Indeed, mRNA levels of catalase, Cox1 and Cox4i1 were higher in skeletal muscle of Training group compared to Cont group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.05$  respectively).

**Conclusions and implications:** In conclusion, these results suggested that endurance training, by inducing improvements of oxidative capacities as well as antioxidant capacities, could induce some adaptations protecting skeletal muscle against deleterious effects of atorvastatin on mitochondrial function.

**Keywords:** glycolytic muscle; statins; mitochondrial respiration; oxidative stress.

## Introduction

Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) are the most prescribed medications in developed countries. They impair hepatocellular cholesterol production by inhibiting the synthesis of mevalonate, a critical intermediary product in the cholesterol pathway (25). Statins reduce the cardiovascular-related morbidity and mortality in patients with or without coronary artery disease (10). It is generally well-accepted that statins have pleiotropic beneficial effects at the cardiovascular level (2, 26). However, even if statins are generally well-tolerated, they could provoke a variety of dose-dependent adverse reactions, ranging from muscle pain to rhabdomyolysis (17).

Little is known regarding the mechanisms by which statins altered skeletal muscles. Some experiments suggested that lipophilic statins affected mitochondrial function, affecting the electron transport chain and the dissipation of the electric potential across the inner mitochondrial membrane (12). Sirvent *et al.* showed that simvastatin interfered with mitochondrial calcium homeostasis and inhibited complex I of the electron transport chain in human skeletal muscle (24). These studies clearly indicated that mitochondrial function of skeletal muscles was impaired by statins exposure, but the mechanism of these mitochondrial alterations remained elusive.

Maintenance of mitochondrial integrity is crucial to the preservation of cellular energy homeostasis. Mitochondria is also responsible for the majority of the reactive oxygen species (ROS) production in cells (14). The ROS formation occurs when unpaired electrons escape the electron transport chain and react with molecular oxygen, generating superoxide. Superoxide is then rapidly dismutated into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by superoxide dismutase (MnSOD).  $H_2O_2$  can be further reduced to water by catalase or glutathione peroxidase, or alternatively to the hydroxyl radical in the presence of reduced copper or iron (5). The effects of ROS on DNA, protein, and/or lipid oxidation can cause irreversible cellular damage that has been associated with the underlying pathogenesis of a wide variety of diseases (9). Recent studies have suggested that oxidative stress may play a role in the cytotoxic activity of statins (21). Subsequently, we hypothesized that statins by interfering with mitochondrial respiration could induce an augmentation of ROS production in muscles which could be the mechanism by which statins provoke adverse effects in skeletal muscles.

Physical training leads to biochemical and physiological adaptations that permit humans and animals to increase their exercise capacity before fatigue occurs (3). Resistance to muscle fatigue is partly related to the ability of skeletal muscle to sustain ATP levels through

increased oxidative metabolism and it was clearly established that physical exercise exerts beneficial effects on mitochondrial function and antioxidant defense systems (31, 33).

The risk/benefit analysis of statin therapy and dosing is further complicated by the common finding that exercise seems to increase the risk for statin-induced myopathy. The prevalence of muscle pains dramatically rises to as high as 25% among statin users who also exercise (18, 28) and it may be over 75% in statin-treated athletes (23). It is clear that exercise generate free radicals and that prolonged and intense exercise can result in oxidative damage to cellular constituents (20). On the other hand, degeneration induced by statin treatment was specific to fast-glycolytic muscles, leaving slow-oxidative muscles, such as the soleus, unaffected (22, 30). Because endurance training is known to induce transition from fast-glycolytic to slow-oxidative muscle (20), we hypothesized that a trained muscle could be more resistant to toxic effects of statins than untrained muscle due to higher oxidative and antioxidant capacities.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of atorvastatin on mitochondrial function (mitochondrial respiration and ROS production) in plantaris skeletal muscle of sedentary and trained rats.

## **Methods**

### ***Animals***

Experiments were performed on adult male Wistar rats (Depré, France) weighing  $\approx$  250-300 g. They housed in neutral temperature environment ( $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) on a 12:12 hour photoperiod and were provided food and water *ad libitum*. After one week of acclimation, 20 rats were randomly divided into two groups as follows: (1) control animals (Cont, n=10); (2) animals realizing exercise training (Training, n=10). This investigation was carried out in accordance with the Helsinki Recommendations for Humane Treatment of Animals during Experimentation.

### ***Exercise training protocol***

Animals were acclimated to treadmill (LE 8710, Bioseb, France) one week before initiation of study using three sessions at a speed of 40 cm/s, 15% gradient, during 5 min. Three days after, animals were exercised for 30 min at 40 cm/s, 15% gradient during 10 days. Rats exhibiting difficulty in running were removed promptly from the treadmill. Non exercised controls were handled daily. To control for effects of noise and other stresses associated with treadmill use, treadmills were operated in close proximity to cages of the sedentary animals.

### ***Tissue Processing***

16h after the last training session, animals were anesthetized with isoflurane (Aerane, SAS Baxter). The superficial part of the plantaris was excised and cleaned of adipose and connective tissues. Muscles were immediately used for the study of respiratory parameters. A part of each muscle tissue was immediately frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen and then stored in the latter until required for analysis.

### ***Study of mitochondrial respiration***

This technique ensured determination of global mitochondrial function, reflecting both the density as well as the functional properties of the skeletal muscle mitochondria (15, 32). The mitochondrial respiration was studied in saponin-skinned fibers in order to keep mitochondria in their architectural environment. Briefly, fibers were separated under binocular microscope in S solution at  $4^{\circ}\text{C}$  (see below). After dissection, fibers were transferred into S solution containing  $50\mu\text{g/mL}$  of saponin and incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  under intense shaking during 30 minutes for complete permeabilization of the sarcolemma. Permeabilized (skinned) fibers were then

washed in S solution for 10 minutes under intense shaking to completely remove saponin. Before oxygraphic measurements, the fibers were washed twice in the respiration R solution for 5 minutes to remove any trace amount of high-energy phosphates and were transferred in a 3-mL water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland) equipped with a Clark electrode. R and S solution contained 2.77 mM calcium potassium (CaK<sub>2</sub>) ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 7.23 mM K<sub>2</sub>EGTA (100 nM free Ca<sup>2+</sup>), 6.56 mM magnesium chloride (1mM free Mg<sup>2+</sup>), 20 mM taurine, 0.5 mM dithiothreitol, 50 mM K-methane sulfonate (160 mM ionic strength), and 20 mM imidazole (pH 7.1). S solution also contained 5.7 mM Na<sub>2</sub>ATP, and 15 mM creatine phosphate, and solution R contained 5 mM glutamate, 2 mM malate, 3 mM phosphate and 2 mg/mL fatty-acid-free bovine serum. After the determination of the basal oxygen consumption ( $V_0$ ), the maximal fibers respiration rates were measured at 22°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of adenosine diphosphate (ADP; 2mM) as a phosphate acceptor ( $V_{max}$ ). After the experiments, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C, and the respiration rates were expressed as  $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight. The results were also reported in percentage to control group.

### ***In vitro effects of atorvastatin in animal's tissues***

The pure form of atorvastatin was obtained generously by Pfizer (USA).  $V_{max}$  was first determined in the presence of 2 mM ADP with glutamate and malate as substrates and then increasing concentrations of atorvastatin were adding to the solution of respiration. The range of atorvastatin concentrations was: 4-10-40-100-200-400  $\mu\text{M}$ .

### ***H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in permeabilized fibers***

The permeabilized bundles were then placed in ice-cold buffer Z containing 110 mM K-methane sulfonate, 35 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM H<sub>2</sub>O, 0.05 mM glutamate, and 0.02 mM malate with 0.5 mg/ml BSA (pH 7.1, 295 mosmol/kg H<sub>2</sub>O). Permeabilized fibers remained in buffer Z on a rotator at 4°C until analysis without any deterioration in mitochondrial function. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured with Amplex Red (Invitrogen) which reacted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a 1:1 stoichiometry catalyzed by HRP (Horse Radish Peroxidase; Invitrogen) to yield the fluorescent compound resorufin and molar equivalent O<sub>2</sub> (1, 19). Resorufin has excitation/emission characteristics of 563 nm/587 nm and is extremely stable once formed. Fluorescence was measured continuously with a Fluoromax 3 (Jobin Yvon) spectrofluorometer with temperature control and magnetic stirring. After baseline

(reactants only) was established, the reaction was initiated by addition of a permeabilized fibers bundle to 600  $\mu$ L of buffer Z containing 5 mM Amplex Red and 0.5 U/ml HRP, with 5 mM glutamate and 2 mM malate for complex I substrate at 37°C.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production rate was calculated from the slope of  $\Delta F/\text{sec}$ , after subtracting background, from a standard curve established with the appropriate reaction conditions. At the conclusion of each experiment, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C. The results were reported in pmol/min/mg dry weight and in percentage to control group.

### ***In vitro effects of atorvastatin in animal's tissues***

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was first determined with glutamate and malate as substrates. We added atorvastatin (100 $\mu$ M) in buffer Z with glutamate and malate as substrates.

### ***Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (q-RT-PCR)***

Total RNA was obtained from the heart using Trizol reagent™ (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA). RNA was stored at -70°C until to the reverse transcription reaction being performed. cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamer primers (29). To perform the real time PCR reaction, 2.5 $\mu$ L of cDNA was used in a final volume of 8 $\mu$ L, containing 10  $\mu$ M of each primer (sense and antisense), and SYBR green (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA) as fluorescent dye and H<sub>2</sub>O. The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed in triplicate using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the LightCycler System (Roche Diagnostics, Meylan, France). The sequences of the primers were designed using information contained in the public database GeneBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The following primer sets were used: Catalase\_ forward, 5\_-ACTCAGGTGCGGACATTC-3\_, and Catalase\_ reverse, 5\_GGAGTTGTACTGGTCCAGAAGAGCC-3\_; Cox1\_ forward, 5\_-CCCAGAGTCATGAGTCGAAGGAG-3\_, and Cox1\_ reverse, 5\_-CAGGCGCATGAGTACTTCTCGG-3\_; Cox4i1\_ forward, 5\_-GTTGGCTACCAGGGCACTTA-3\_, and Cox4i1\_ reverse, 5\_-CACATCAGGCAAGGGGTAGT-3\_;  $\beta$ -actin forward, 5\_-TTCAATTCCATCATGAAGTGTG-3\_, and  $\beta$ -actin reverse, 5\_CTGATCCACATCTGCTGGAAGGTG -3. Quantification of gene expression was carried out using  $\beta$ -actin gene as inner control, which is the most stable gene for real time RT-PCR

measurements in muscles. Relative mRNA levels were calculated using the  $\Delta\Delta CT$  method (16).

### ***Statistical analysis***

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using Student's *t* test, 1-way or 2-way ANOVA followed by a Tukey post test (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was displayed as \*  $P < 0.05$  or \*\*  $P < 0.01$  or \*\*\*  $P < 0.001$ .

## Results

### 1) Atorvastatin decreased maximal oxidative capacity and enhanced mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in glycolytic muscle (Figure 1).

We first examined the effects of atorvastatin on mitochondrial respiration rates ( $V_{\max}$  in presence of 2mM ADP) in plantaris muscles from control animals. Since in permeabilized fibers the whole mitochondrial population participates in the measured oxygen consumption, when normalized to fiber dry weight,  $V_{\max}$  represents the maximal oxidative capacities in tissue.  $V_{\max}$  was reduced by atorvastatin, and this reduction was concentration-dependant (Figure 1A). This diminution became significant from 4 $\mu$ M ( $P < 0.01$ ).

Figure 1B represents mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from permeabilized plantaris fibers bundles. Addition of atorvastatin (100 $\mu$ M) in control plantaris increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from 215% (4.9 $\pm$ 2.0 vs. 15.4 $\pm$ 3.4 pmol/min/mg dry weight;  $p < 0.05$ ).

### 2) Exercise training increased maximal oxidative capacities (Figure 2).

Figure 2 represents the effects of exercise training on  $V_{\max}$  in plantaris.  $V_{\max}$  increased in training group compared to Cont group (10.4 $\pm$ 0.3 vs. 8.0 $\pm$ 0.8  $\mu$ mol O<sub>2</sub>/min/g dry weight;  $p < 0.05$ ).

### 3) Exercise training protected skeletal muscle against atorvastatin deleterious effects (Figure 3).

We examined the effects of atorvastatin on maximal rates ( $V_{\max}$ ) of skinned fibers from plantaris. The effects of increased concentrations of atorvastatin (from 4 to 400 $\mu$ M) on  $V_{\max}$  in plantaris are presented in Figure 3A.

In order to test the possible protecting effect of exercise training against atorvastatin, rats were trained during 10 days in order to induce muscular adaptations. Interestingly, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of atorvastatin in Training group was higher than Cont group (238 vs. 73  $\mu$ M respectively,  $p < 0.05$ ).

In training muscles, it appeared that  $V_{\max}$  was less affected by atorvastatin in glycolytic muscles. Furthermore, the difference became significant from 100  $\mu$ M between both groups ( $P < 0.001$ ).

In order to understand why we observed difference in  $V_{\max}$  at 100 $\mu$ M between groups, we added atorvastatin so as to measure H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. This addition increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from 215% in Cont and from 375% in Training group ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  respectively; Figure 3B) and this augmentation was higher in Training group compared to



Cont group showing that training increased the capacity to detoxify ROS production following atorvastatin exposure.

**4) Exercise training increased skeletal muscle antioxidant defense and mitochondrial metabolism (Figure 4).**

To approach the antioxidant defense and to further understand the molecular basis of these effects, we analyzed the transcript level of catalase by q-RT-PCR in plantaris.

We found that catalase mRNA level was increased by ~3-fold in Training group compared to Cont group ( $p < 0.05$ ; Figure 4A).

We next analysed the transcript levels of Cox1 and Cox4i1 implicated in mitochondrial metabolism. Cox1 and Cox4i1 mRNA levels increased in Training group compared to Cont group ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$  respectively; Figures 4B and C respectively).

## Discussion

The results of the present study show that (1) Exercise training improved oxidative capacities as well as antioxidant capacities in plantaris muscle; (2) Oxidative capacities were reduced after statin exposure, and this reduction was dose-dependant; (3) Exercise training allows to reduce the inhibition of mitochondrial respiration after atorvastatin exposure in glycolytic muscle; (4) This protection could be link to some adaptations at the level of the mitochondrial function following exercise training.

### 1) Acute atorvastatin exposure impaired skeletal muscle mitochondrial function

Tissue oxidative capacity is determined by the number and size of mitochondria (*i.e.* mitochondrial volume density) and by the respiratory function of individual mitochondria. By using a permeabilized fiber approach on plantaris, we showed that maximal oxidative capacities were reduced after statin exposure, and this reduction was dose-dependant. These results are in accordance with a study carried out with biopsies from human skeletal muscle showing that mitochondria are impaired after acute statins exposure. In this study they showed that simvastatin-induced mitochondria impairments result from inhibition of respiratory chain complex I (24). But the mechanisms by which simvastatin inhibited complex I remained to be elucidated. Compared with this study, atorvastatin inhibited mitochondrial respiration for a lower concentration (4 $\mu$ M) than simvastatin (10 $\mu$ M). This could be explained by the fact that chemicals properties of the statins were different, especially in term of lipophilic nature (11). Indeed, Kaufmann *et al.* reported that lipophilic statins (*i.e.* atorvastatin) were toxic for mitochondria, affecting the electron transport chain, and decoupling oxidative phosphorylation and/or mitochondrial  $\beta$ -oxidation. These impairments of mitochondrial function seems to be associated with dissipation of the electric potential across the inner mitochondrial membrane (12). Interestingly, statins increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in skeletal muscle. This could be due to the fact that atorvastatin inhibited mitochondrial complexes I and III, phenomenon which is known to induce ROS formation (1). This augmentation ROS activated antioxidant defense in order to maintain ROS at tolerable physiological levels. Then H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production reflected both the increase production of ROS following statin exposition as well as the activation of antioxidant defense. Indeed, we detected O<sub>2</sub><sup>-</sup> production originating from the mitochondria after conversion to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by endogenous matrix SOD. But this augmentation of ROS generation could surpass the antioxidant capacities and then induce oxidative damage to mitochondria at the level of proteins, lipid and DNA, altering maximal mitochondrial respiration.

## **2) Exercise training protected mitochondrial function against acute atorvastatin exposure**

It was clearly established that physical exercise exerts beneficial effects on metabolism, mitochondrial function and antioxidant defense systems (6, 7, 32, 33). However, exercise appears to increase the likelihood for the development of myopathy in patients taking statins (23).

In this report, exercise training during ten days improved maximal mitochondrial respiration ( $V_{max}$ ) in plantaris muscle. When we exposed muscles to acute dose of atorvastatin, we showed that mitochondrial respirations of all training muscles were well-protected as shown by the large increase of  $IC_{50}$ . Moreover, whereas exercise training did not increase basal  $H_2O_2$  production, acute exposure to atorvastatin largely increased it in trained muscle, exceeding the  $H_2O_2$  production of the control skeletal muscle. These results, together with the fact that mRNA level of antioxidant enzyme was increased indicated that trained muscle improved its capacity to detoxified ROS, suggesting a reduction of intracellular oxidative stress in this trained muscle after statin exposition. Our results are in line with the fact that exercise training provides muscular protection due to several biochemical/molecular changes including induction of muscular heat shock proteins, nitric oxide production, improvement of function of sarcolemma and mitochondrial adenosine triphosphate (ATP)-sensitive potassium channels and increased antioxidant capacities (13, 20). Then, we can postulate that cellular adaptations notably at the level of antioxidant capacities following exercise training allowed to strengthen mitochondrial function against deleterious effects of atorvastatin.

On the other hand, 25% of statin users who exercise may experience muscle complaints due to statin therapy and potentially dismissed by the patient and physician (27). In fact, it has been postulated that statins may adversely affect the muscle's ability to appropriately respond to physical exertion (8). In clinical practice, it has been reported that the incidence of muscle pain increases with the level of physical activity, with a great number of patients avoiding even moderate exertion during every day activities (4). It is also well known that the great majority of professional athletes with severe familial hypercholesterolemia do not tolerate any of the statins available because of muscle side effects (23). Then, even if exercise training prevents from the deleterious acute mitochondrial effects of atorvastatin, it seems that physical exercise, when coupled to statins treatment, are not well-tolerated. Because exercise as well as statins exposure increased ROS production in glycolytic skeletal muscle (i.e. plantaris muscle), this suggests that muscular ROS concentration could overwhelm the antioxidant capacities of this vulnerable muscle and then triggering some deleterious effects at

the cellular level responsible of muscle pain and myalgia. But these adverse reactions have been shown in specific populations of patients (i.e. sedentary patients taken statins as well as athletes who trained several hours every day). Then, we can hypothesize that an endurance training well-calibrated at low or moderate intensity, even if coupled with statins treatment, could be beneficial by inducing muscular adaptations, reducing the potential muscular deleterious effect of statins treatment, but without the overwhelm of antioxidant capacities.

In summary, we showed that acute exposure to atorvastatin impaired mitochondrial function of glycolytic muscles in rats. On the other hand, exercise training reduced these mitochondrial impairments. Then, a chronic cellular stress as exercise training could induce some muscular adaptations making mitochondria more resistant to an important metabolic stress as atorvastatin exposure. Because current evidence strongly supports a systematic use of high doses statins prior to cardiac intervention, it is of first importance to find strategy in order to limit side effects of these molecules, notably at the level of mitochondria. Our results suggest that well-calibrated exercise training seem to be a good candidate.

**Acknowledgements**

We are grateful to I. Bentz and F. Goupilleau for technical assistance.

**Disclosures**

None.

**Conflict of interest**

The authors have declared that no conflict of interest exists.

## References

1. **Anderson EJ, and Neuffer PD.** Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C844-851, 2006.
2. **Bao N, Minatoguchi S, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Iwasa M, Yamaki T, Sumi S, Misao Y, Arai M, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara T, and Fujiwara H.** Pravastatin reduces myocardial infarct size via increasing protein kinase C-dependent nitric oxide, decreasing oxyradicals and opening the mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in rabbits. *Circ J* 71: 1622-1628, 2007.
3. **Booth FW, and Thomason DB.** Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71: 541-585, 1991.
4. **Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, and Begaud B.** Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther* 19: 403-414, 2005.
5. **Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, and Camello PJ.** Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1082-1088, 2006.
6. **Daussin FN, Ponsot E, Dufour SP, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Geny B, Piquard F, and Richard R.** Improvement of [Formula: see text] by cardiac output and oxygen extraction adaptation during intermittent versus continuous endurance training. *European journal of applied physiology* 101: 377-383, 2007.
7. **Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, Ventura-Clapier R, Mettauer B, Piquard F, Geny B, and Richard R.** Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104: 1436-1441, 2008.
8. **Draeger A, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Hoppeler H, Mueller M, Breil F, Mohaupt MG, and Babiychuk EB.** Statin therapy and the expression of genes that regulate calcium homeostasis and membrane repair in skeletal muscle. *The American journal of pathology* 177: 291-299.
9. **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
10. **Jasinska M, Owczarek J, and Orszulak-Michalak D.** Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 59: 483-499, 2007.
11. **Katsiki N, Tziomalos K, Chatzizisis Y, Elisaf M, and Hatzitolios AI.** Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental? *Atherosclerosis* 211: 9-14, 2010.
12. **Kaufmann P, Torok M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, and Krahenbuhl S.** Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 63: 2415-2425, 2006.
13. **Kavazis AN.** Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med* 39: 923-935, 2009.
14. **Kitahara T, Li-Korotky HS, and Balaban CD.** Regulation of mitochondrial uncoupling proteins in mouse inner ear ganglion cells in response to systemic kanamycin challenge. *Neuroscience* 135: 639-653, 2005.
15. **Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, and Kunz WS.** Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3: 965-976, 2008.

16. **Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, and Auwerx J.** Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-1122, 2006.
17. **Liao JK, and Laufs U.** Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 89-118, 2005.
18. **Meador BM, and Huey KA.** Statin-associated myopathy and its exacerbation with exercise. *Muscle & nerve* 42: 469-479, 2010.
19. **Picard M, Godin R, Sinnreich M, Baril J, Bourbeau J, Perrault H, Taivassalo T, and Burelle Y.** The mitochondrial phenotype of peripheral muscle in chronic obstructive pulmonary disease: disuse or dysfunction? *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1040-1047, 2008.
20. **Powers SK, Quindry JC, and Kavazis AN.** Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44: 193-201, 2008.
21. **Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Kim SK, Cai DQ, Teng YC, Shim KY, and Lee KJ.** Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine CT26 colon carcinoma cells. *Toxicology letters* 2010.
22. **Schaefer WH, Lawrence JW, Loughlin AF, Stoffregen DA, Mixson LA, Dean DC, Raab CE, Yu NX, Lankas GR, and Frederick CB.** Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 194: 10-23, 2004.
23. **Sinzinger H, and O'Grady J.** Professional athletes suffering from familial hypercholesterolaemia rarely tolerate statin treatment because of muscular problems. *Br J Clin Pharmacol* 57: 525-528, 2004.
24. **Sirvent P, Bordenave S, Vermaelen M, Roels B, Vassort G, Mercier J, Raynaud E, and Lacampagne A.** Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1426-1434, 2005.
25. **Staffa JA, Chang J, and Green L.** Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 346: 539-540, 2002.
26. **Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, and Liao JK.** Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 108: 1429-1437, 2001.
27. **Thompson PD, Clarkson P, and Karas RH.** Statin-associated myopathy. *Jama* 289: 1681-1690, 2003.
28. **Tomlinson SS, and Mangione KK.** Potential adverse effects of statins on muscle. *Physical therapy* 85: 459-465, 2005.
29. **Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, and Auwerx J.** Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113: 1408-1418, 2004.
30. **Westwood FR, Bigley A, Randall K, Marsden AM, and Scott RC.** Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol Pathol* 33: 246-257, 2005.
31. **Zoll J, Koulmann N, Bahi L, Ventura-Clapier R, and Bigard AX.** Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *Journal of cellular physiology* 194: 186-193, 2003.
32. **Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, and Mettauer B.** Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543: 191-200, 2002.

33. **Zoll J, Steiner R, Meyer K, Vogt M, Hoppeler H, and Fluck M.** Gene expression in skeletal muscle of coronary artery disease patients after concentric and eccentric endurance training. *European journal of applied physiology* 96: 413-422, 2006.



## Figures legends

### Figure 1

**Atorvastatin decreased skeletal muscle mitochondrial maximal oxidative capacity and enhanced mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production.** Oxygen consumption and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission were measured in saponin permeabilized muscle fibers with glutamate (5mM) and malate (2mM) as substrates. Values in figure 1A are expressed in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  dry weight and  $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$  dry weight in figure 1B.

Values are means  $\pm$  SEM of 8 independent experiments; \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to  $V_{\text{max}}$  in figure 1A; \*P<0.05 compared to Glu+Mal condition of the same group.

### Figure 2

**Exercise training increased maximal oxidative capacities.** Values are expressed as percentage of  $V_{\text{max}}$  of Cont group. Values are means  $\pm$  SEM of 8 independent experiments; \*P<0.05 compared to Cont.

### Figure 3

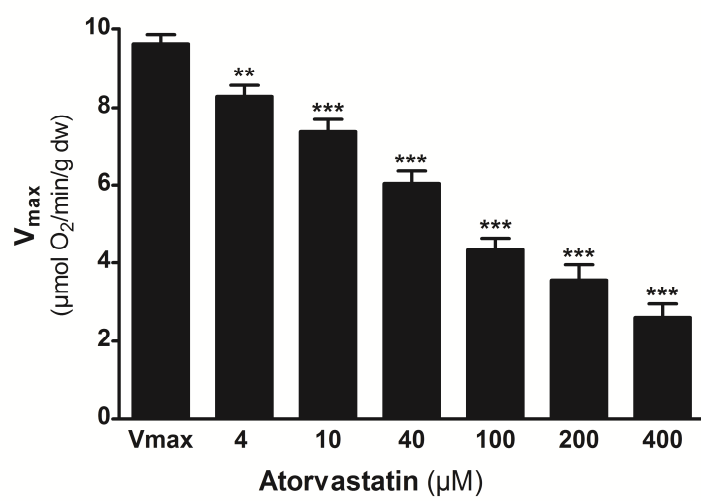
**Exercise training protected skeletal muscle against atorvastatin deleterious effects.** Values are means  $\pm$  SEM of 8 independent experiments. Values in figure 3A are expressed in percentage of  $V_{\text{max}}$  of each group; \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to  $V_{\text{max}}$ ; \$P<0.05, \$\$P<0.01 and \$\$\$P<0.001 between groups in the same atorvastatin concentration. Values in figure 3B are expressed in percentage of Glu+Mal condition; \*P<0.05 and \*\*\*P<0.001 compared to Glu+Mal condition of the same group.

### Figure 4

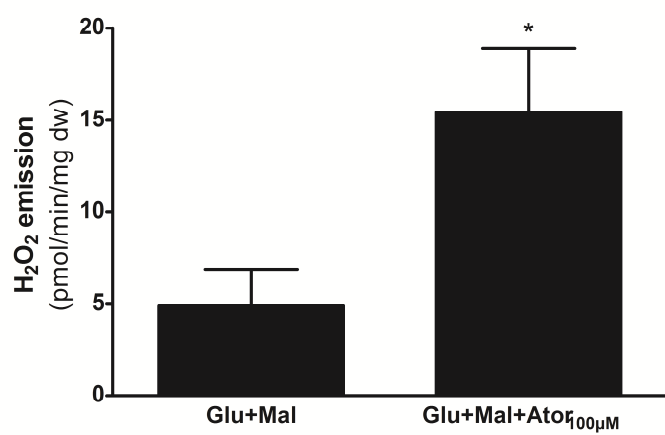
**Exercise training increased antioxidant defense and mitochondrial metabolism.** Relative mRNA expression level from catalase (A), Cox1 (B) and Cox4i1 (C) in plantaris measured by q-RT-PCR. Values are means  $\pm$  SEM of 8 experiments on each group. \*P<0.05 and \*\*\*P<0.001 compared to Cont group.

Figure 1

A



B



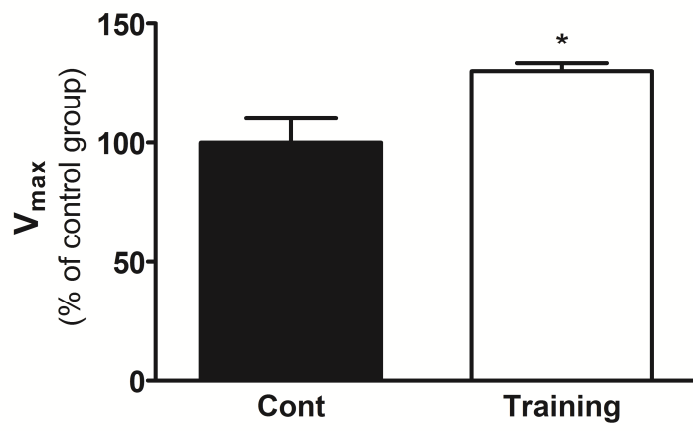
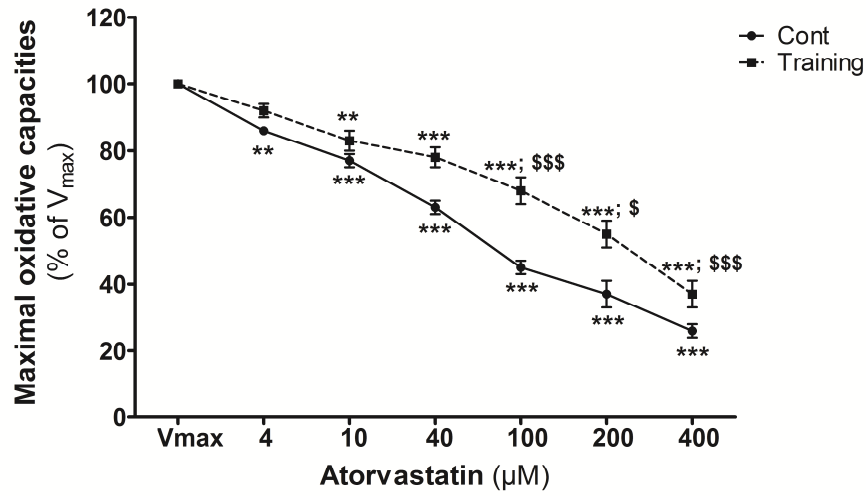
**Figure 2**

Figure 3

A



B

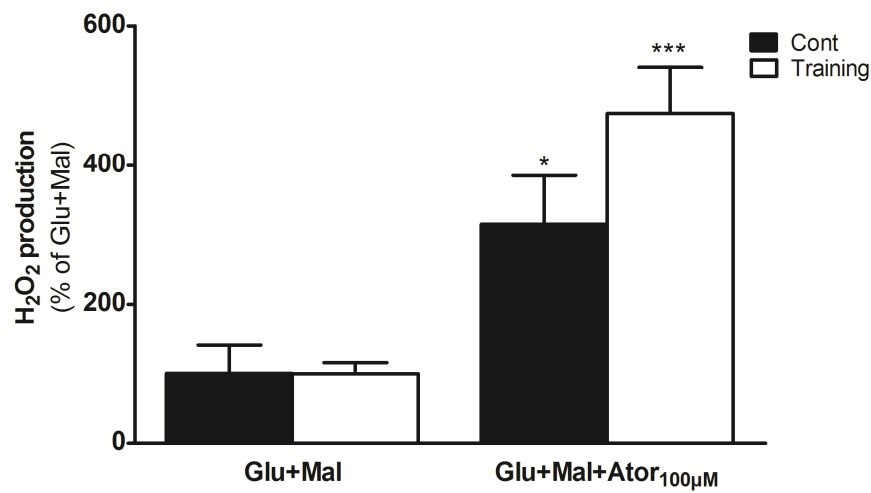
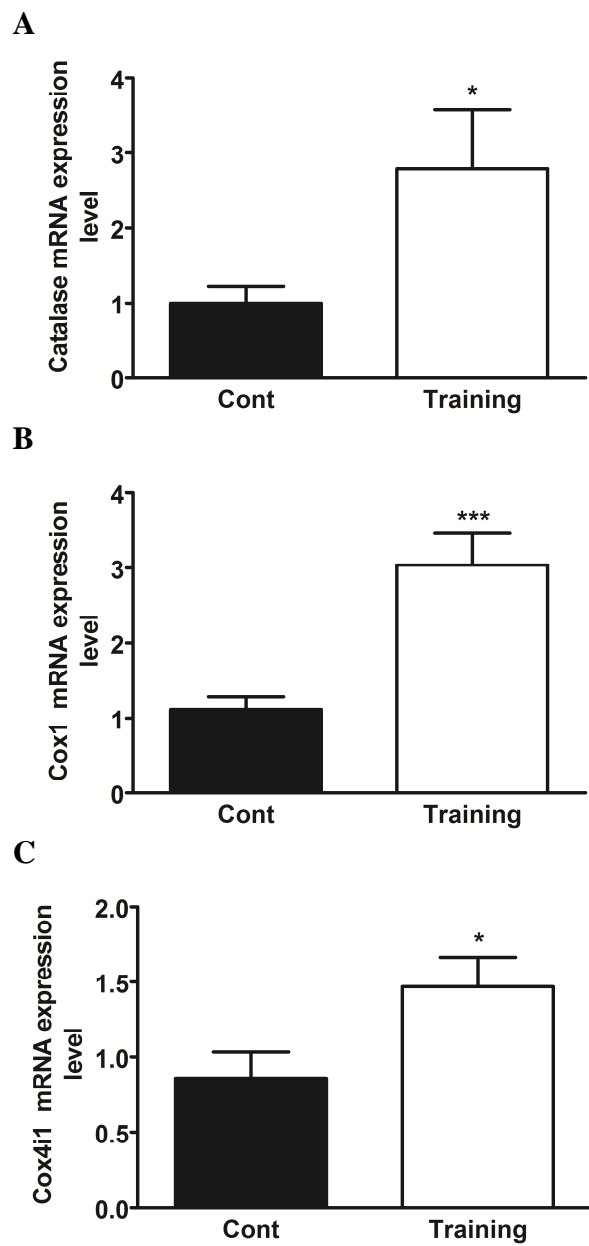


Figure 4



## **2. Etude 2 : Effet d'un traitement avec l'atorvastatine sur un exercice exhaustif**

Les statines sont des médicaments très efficaces dans le traitement de l'hypercholestérolémie et présentent de nombreux effets pléiotropes bénéfiques notamment au niveau cardiovasculaire. Par contre, ce bénéfice devient compliqué du fait que l'exercice semble augmenter le risque de myopathies induites par les statines. En effet, la prévalence augmente dramatiquement à 25 % des patients sous statines qui font de l'exercice et atteint 75 % des athlètes professionnels sous statines. Dans cette étude, nous avons montré qu'un traitement de deux semaines avec de l'atorvastatine à une dose de 10mg/kg/jour diminue les capacités à l'exercice de rats. Ce traitement entraîne également une dysfonction mitochondriale et induit une augmentation importante de ROS. L'exercice aigu entraîne une augmentation de la respiration mitochondriale qui est abolie par l'atorvastatine.

Ces résultats nous indiquent clairement que les douleurs musculaires consécutives à un exercice chez les patients sous statines ont pour origine, en partie, la fonction mitochondriale.

# **Exercise training protects mitochondria of skeletal muscle against acute exposure to atorvastatin**

Jamal Bouitbir<sup>1,2</sup>, Frédéric Daussin<sup>1,2</sup>, Anne-Laure Charles<sup>1,2</sup>, Laurence Rasseneur<sup>2</sup>, Stéphane Dufour<sup>2</sup>, Yann Burelle<sup>3</sup>, Ruddy Richard<sup>1,2</sup>, François Piquard<sup>1,2</sup>, Bernard Geny<sup>1,2</sup> and Joffrey Zoll<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CHRU of Strasbourg, Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, B.P. 426, 67091 Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Physiology Department, Strasbourg University, EA 3072, Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Department of Kinesiology, University of Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**Manuscript statistics:** 4785 words (213 words in abstract) and 4 figures.

Correspondence to : Dr Joffrey Zoll, PhD, CHRU of Strasbourg, Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, B.P. 426, 67091, Strasbourg, France.

Phone: +33 390243436; Fax: +33 390243444; E-mail: Zoll.Joffrey@unistra.fr

**Running Title:** mitochondria, oxidative stress and statins.

## Abstract

**Background and purpose:** Statins protect against cardiovascular-related mortality but are associated with adverse skeletal muscle effects. The objective of this study was to determine if exercise training reduce deleterious effects of acute exposure to atorvastatin in skeletal muscle.

**Experimental approach:** 20 rats were divided in 2 groups: a control group (n=10; Cont) and a 10 days training group (n=10; Training). Using permeabilized fibers we explored the mitochondrial function (mitochondrial respiration and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production).

**Results:** In cont group, atorvastatin exposure increased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and decreased maximal mitochondrial respiration ( $V_{max}$ ) and this diminution was dose dependant. Ten days of endurance training increased  $V_{max}$  without altering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Interestingly, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of atorvastatin was higher in Training group than Cont group (238 vs. 73  $\mu$ M respectively,  $p < 0.05$ ). On the other hand, mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was higher in trained muscle after atorvastatin exposure suggesting a higher detoxifying capacity of this muscle. Indeed, mRNA levels of catalase, Cox1 and Cox4i1 were higher in skeletal muscle of Training group compared to Cont group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.05$  respectively).

**Conclusions and implications:** In conclusion, these results suggested that endurance training, by inducing improvements of oxidative capacities as well as antioxidant capacities, could induce some adaptations protecting skeletal muscle against deleterious effects of atorvastatin on mitochondrial function.

**Keywords:** glycolytic muscle; statins; mitochondrial respiration; oxidative stress.



## Introduction

Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) are the most prescribed medications in developed countries. They impair hepatocellular cholesterol production by inhibiting the synthesis of mevalonate, a critical intermediary product in the cholesterol pathway (25). Statins reduce the cardiovascular-related morbidity and mortality in patients with or without coronary artery disease (10). It is generally well-accepted that statins have pleiotropic beneficial effects at the cardiovascular level (2, 26). However, even if statins are generally well-tolerated, they could provoke a variety of dose-dependent adverse reactions, ranging from muscle pain to rhabdomyolysis (17).

Little is known regarding the mechanisms by which statins altered skeletal muscles. Some experiments suggested that lipophilic statins affected mitochondrial function, affecting the electron transport chain and the dissipation of the electric potential across the inner mitochondrial membrane (12). Sirvent *et al.* showed that simvastatin interfered with mitochondrial calcium homeostasis and inhibited complex I of the electron transport chain in human skeletal muscle (24). These studies clearly indicated that mitochondrial function of skeletal muscles was impaired by statins exposure, but the mechanism of these mitochondrial alterations remained elusive.

Maintenance of mitochondrial integrity is crucial to the preservation of cellular energy homeostasis. Mitochondria is also responsible for the majority of the reactive oxygen species (ROS) production in cells (14). The ROS formation occurs when unpaired electrons escape the electron transport chain and react with molecular oxygen, generating superoxide. Superoxide is then rapidly dismutated into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by superoxide dismutase (MnSOD).  $H_2O_2$  can be further reduced to water by catalase or glutathione peroxidase, or alternatively to the hydroxyl radical in the presence of reduced copper or iron (5). The effects of ROS on DNA, protein, and/or lipid oxidation can cause irreversible cellular damage that has been associated with the underlying pathogenesis of a wide variety of diseases (9). Recent studies have suggested that oxidative stress may play a role in the cytotoxic activity of statins (21). Subsequently, we hypothesized that statins by interfering with mitochondrial respiration could induce an augmentation of ROS production in muscles which could be the mechanism by which statins provoke adverse effects in skeletal muscles.

Physical training leads to biochemical and physiological adaptations that permit humans and animals to increase their exercise capacity before fatigue occurs (3). Resistance to muscle fatigue is partly related to the ability of skeletal muscle to sustain ATP levels through

increased oxidative metabolism and it was clearly established that physical exercise exerts beneficial effects on mitochondrial function and antioxidant defense systems (31, 33).

The risk/benefit analysis of statin therapy and dosing is further complicated by the common finding that exercise seems to increase the risk for statin-induced myopathy. The prevalence of muscle pains dramatically rises to as high as 25% among statin users who also exercise (18, 28) and it may be over 75% in statin-treated athletes (23). It is clear that exercise generate free radicals and that prolonged and intense exercise can result in oxidative damage to cellular constituents (20). On the other hand, degeneration induced by statin treatment was specific to fast-glycolytic muscles, leaving slow-oxidative muscles, such as the soleus, unaffected (22, 30). Because endurance training is known to induce transition from fast-glycolytic to slow-oxidative muscle (20), we hypothesized that a trained muscle could be more resistant to toxic effects of statins than untrained muscle due to higher oxidative and antioxidant capacities.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of atorvastatin on mitochondrial function (mitochondrial respiration and ROS production) in plantaris skeletal muscle of sedentary and trained rats.

## **Methods**

### ***Animals***

Experiments were performed on adult male Wistar rats (Depré, France) weighing  $\approx$  250-300 g. They housed in neutral temperature environment ( $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) on a 12:12 hour photoperiod and were provided food and water *ad libitum*. After one week of acclimation, 20 rats were randomly divided into two groups as follows: (1) control animals (Cont, n=10); (2) animals realizing exercise training (Training, n=10). This investigation was carried out in accordance with the Helsinki Recommendations for Humane Treatment of Animals during Experimentation.

### ***Exercise training protocol***

Animals were acclimated to treadmill (LE 8710, Bioseb, France) one week before initiation of study using three sessions at a speed of 40 cm/s, 15% gradient, during 5 min. Three days after, animals were exercised for 30 min at 40 cm/s, 15% gradient during 10 days. Rats exhibiting difficulty in running were removed promptly from the treadmill. Non exercised controls were handled daily. To control for effects of noise and other stresses associated with treadmill use, treadmills were operated in close proximity to cages of the sedentary animals.

### ***Tissue Processing***

16h after the last training session, animals were anesthetized with isoflurane (Aerane, SAS Baxter). The superficial part of the plantaris was excised and cleaned of adipose and connective tissues. Muscles were immediately used for the study of respiratory parameters. A part of each muscle tissue was immediately frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen and then stored in the latter until required for analysis.

### ***Study of mitochondrial respiration***

This technique ensured determination of global mitochondrial function, reflecting both the density as well as the functional properties of the skeletal muscle mitochondria (15, 32). The mitochondrial respiration was studied in saponin-skinned fibers in order to keep mitochondria in their architectural environment. Briefly, fibers were separated under binocular microscope in S solution at  $4^{\circ}\text{C}$  (see below). After dissection, fibers were transferred into S solution containing  $50\mu\text{g/mL}$  of saponin and incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  under intense shaking during 30 minutes for complete permeabilization of the sarcolemma. Permeabilized (skinned) fibers were then

washed in S solution for 10 minutes under intense shaking to completely remove saponin. Before oxygraphic measurements, the fibers were washed twice in the respiration R solution for 5 minutes to remove any trace amount of high-energy phosphates and were transferred in a 3-mL water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland) equipped with a Clark electrode. R and S solution contained 2.77 mM calcium potassium ( $\text{CaK}_2$ ) ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 7.23 mM  $\text{K}_2\text{EGTA}$  (100 nM free  $\text{Ca}^{2+}$ ), 6.56 mM magnesium chloride (1mM free  $\text{Mg}^{2+}$ ), 20 mM taurine, 0.5 mM dithiothreitol, 50 mM K-methane sulfonate (160 mM ionic strength), and 20 mM imidazole (pH 7.1). S solution also contained 5.7 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , and 15 mM creatine phosphate, and solution R contained 5 mM glutamate, 2 mM malate, 3 mM phosphate and 2 mg/mL fatty-acid-free bovine serum. After the determination of the basal oxygen consumption ( $V_0$ ), the maximal fibers respiration rates were measured at 22°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of adenosine diphosphate (ADP; 2mM) as a phosphate acceptor ( $V_{\text{max}}$ ). After the experiments, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C, and the respiration rates were expressed as  $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight. The results were also reported in percentage to control group.

### ***In vitro effects of atorvastatin in animal's tissues***

The pure form of atorvastatin was obtained generously by Pfizer (USA).  $V_{\text{max}}$  was first determined in the presence of 2 mM ADP with glutamate and malate as substrates and then increasing concentrations of atorvastatin were adding to the solution of respiration. The range of atorvastatin concentrations was: 4-10-40-100-200-400  $\mu\text{M}$ .

### ***H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in permeabilized fibers***

The permeabilized bundles were then placed in ice-cold buffer Z containing 110 mM K-methane sulfonate, 35 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mM glutamate, and 0.02 mM malate with 0.5 mg/ml BSA (pH 7.1, 295 mosmol/kg  $\text{H}_2\text{O}$ ). Permeabilized fibers remained in buffer Z on a rotator at 4°C until analysis without any deterioration in mitochondrial function.  $\text{H}_2\text{O}_2$  production was measured with Amplex Red (Invitrogen) which reacted with  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a 1:1 stoichiometry catalyzed by HRP (Horse Radish Peroxidase; Invitrogen) to yield the fluorescent compound resorufin and molar equivalent  $\text{O}_2$  (1, 19). Resorufin has excitation/emission characteristics of 563 nm/587 nm and is extremely stable once formed. Fluorescence was measured continuously with a Fluoromax 3 (Jobin Yvon) spectrofluorometer with temperature control and magnetic stirring. After baseline

(reactants only) was established, the reaction was initiated by addition of a permeabilized fibers bundle to 600  $\mu$ L of buffer Z containing 5 mM Amplex Red and 0.5 U/ml HRP, with 5 mM glutamate and 2 mM malate for complex I substrate at 37°C.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production rate was calculated from the slope of  $\Delta F/\text{sec}$ , after subtracting background, from a standard curve established with the appropriate reaction conditions. At the conclusion of each experiment, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C. The results were reported in pmol/min/mg dry weight and in percentage to control group.

### ***In vitro effects of atorvastatin in animal's tissues***

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was first determined with glutamate and malate as substrates. We added atorvastatin (100 $\mu$ M) in buffer Z with glutamate and malate as substrates.

### ***Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (q-RT-PCR)***

Total RNA was obtained from the heart using Trizol reagent™ (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA). RNA was stored at -70°C until to the reverse transcription reaction being performed. cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamer primers (29). To perform the real time PCR reaction, 2.5 $\mu$ L of cDNA was used in a final volume of 8 $\mu$ L, containing 10  $\mu$ M of each primer (sense and antisense), and SYBR green (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA) as fluorescent dye and H<sub>2</sub>O. The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed in triplicate using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the LightCycler System (Roche Diagnostics, Meylan, France). The sequences of the primers were designed using information contained in the public database GeneBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The following primer sets were used: Catalase\_ forward, 5\_-ACTCAGGTGCGGACATTC-3\_, and Catalase\_ reverse, 5\_GGAGTTGTACTGGTCCAGAAGAGCC-3\_; Cox1\_ forward, 5\_-CCCAGAGTCATGAGTCGAAGGAG-3\_, and Cox1\_ reverse, 5\_-CAGGCGCATGAGTACTTCTCGG-3\_; Cox4i1\_ forward, 5\_-GTTGGCTACCAGGGCACTTA-3\_, and Cox4i1\_ reverse, 5\_-CACATCAGGCAAGGGGTAGT-3\_;  $\beta$ -actin forward, 5\_-TTCAATTCCATCATGAAGTGTG-3\_, and  $\beta$ -actin reverse, 5\_CTGATCCACATCTGCTGGAAGGTG -3. Quantification of gene expression was carried out using  $\beta$ -actin gene as inner control, which is the most stable gene for real time RT-PCR

measurements in muscles. Relative mRNA levels were calculated using the  $\Delta\Delta CT$  method (16).

### ***Statistical analysis***

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using Student's *t* test, 1-way or 2-way ANOVA followed by a Tukey post test (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was displayed as \*  $P < 0.05$  or \*\*  $P < 0.01$  or \*\*\*  $P < 0.001$ .

## Results

### 1) Atorvastatin decreased maximal oxidative capacity and enhanced mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in glycolytic muscle (Figure 1).

We first examined the effects of atorvastatin on mitochondrial respiration rates ( $V_{\max}$  in presence of 2mM ADP) in plantaris muscles from control animals. Since in permeabilized fibers the whole mitochondrial population participates in the measured oxygen consumption, when normalized to fiber dry weight,  $V_{\max}$  represents the maximal oxidative capacities in tissue.  $V_{\max}$  was reduced by atorvastatin, and this reduction was concentration-dependant (Figure 1A). This diminution became significant from 4 $\mu$ M ( $P < 0.01$ ).

Figure 1B represents mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from permeabilized plantaris fibers bundles. Addition of atorvastatin (100 $\mu$ M) in control plantaris increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from 215% (4.9 $\pm$ 2.0 vs. 15.4 $\pm$ 3.4 pmol/min/mg dry weight;  $p < 0.05$ ).

### 2) Exercise training increased maximal oxidative capacities (Figure 2).

Figure 2 represents the effects of exercise training on  $V_{\max}$  in plantaris.  $V_{\max}$  increased in training group compared to Cont group (10.4 $\pm$ 0.3 vs. 8.0 $\pm$ 0.8  $\mu$ mol O<sub>2</sub>/min/g dry weight;  $p < 0.05$ ).

### 3) Exercise training protected skeletal muscle against atorvastatin deleterious effects (Figure 3).

We examined the effects of atorvastatin on maximal rates ( $V_{\max}$ ) of skinned fibers from plantaris. The effects of increased concentrations of atorvastatin (from 4 to 400 $\mu$ M) on  $V_{\max}$  in plantaris are presented in Figure 3A.

In order to test the possible protecting effect of exercise training against atorvastatin, rats were trained during 10 days in order to induce muscular adaptations. Interestingly, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of atorvastatin in Training group was higher than Cont group (238 vs. 73  $\mu$ M respectively,  $p < 0.05$ ).

In training muscles, it appeared that  $V_{\max}$  was less affected by atorvastatin in glycolytic muscles. Furthermore, the difference became significant from 100  $\mu$ M between both groups ( $P < 0.001$ ).

In order to understand why we observed difference in  $V_{\max}$  at 100 $\mu$ M between groups, we added atorvastatin so as to measure H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. This addition increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from 215% in Cont and from 375% in Training group ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  respectively; Figure 3B) and this augmentation was higher in Training group compared to

Cont group showing that training increased the capacity to detoxify ROS production following atorvastatin exposure.

**4) Exercise training increased skeletal muscle antioxidant defense and mitochondrial metabolism (Figure 4).**

To approach the antioxidant defense and to further understand the molecular basis of these effects, we analyzed the transcript level of catalase by q-RT-PCR in plantaris.

We found that catalase mRNA level was increased by ~3-fold in Training group compared to Cont group ( $p < 0.05$ ; Figure 4A).

We next analysed the transcript levels of Cox1 and Cox4i1 implicated in mitochondrial metabolism. Cox1 and Cox4i1 mRNA levels increased in Training group compared to Cont group ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$  respectively; Figures 4B and C respectively).



## Discussion

The results of the present study show that (1) Exercise training improved oxidative capacities as well as antioxidant capacities in plantaris muscle; (2) Oxidative capacities were reduced after statin exposure, and this reduction was dose-dependant; (3) Exercise training allows to reduce the inhibition of mitochondrial respiration after atorvastatin exposure in glycolytic muscle; (4) This protection could be link to some adaptations at the level of the mitochondrial function following exercise training.

### 1) Acute atorvastatin exposure impaired skeletal muscle mitochondrial function

Tissue oxidative capacity is determined by the number and size of mitochondria (*i.e.* mitochondrial volume density) and by the respiratory function of individual mitochondria. By using a permeabilized fiber approach on plantaris, we showed that maximal oxidative capacities were reduced after statin exposure, and this reduction was dose-dependant. These results are in accordance with a study carried out with biopsies from human skeletal muscle showing that mitochondria are impaired after acute statins exposure. In this study they showed that simvastatin-induced mitochondria impairments result from inhibition of respiratory chain complex I (24). But the mechanisms by which simvastatin inhibited complex I remained to be elucidated. Compared with this study, atorvastatin inhibited mitochondrial respiration for a lower concentration (4 $\mu$ M) than simvastatin (10 $\mu$ M). This could be explained by the fact that chemicals properties of the statins were different, especially in term of lipophilic nature (11). Indeed, Kaufmann *et al.* reported that lipophilic statins (*i.e.* atorvastatin) were toxic for mitochondria, affecting the electron transport chain, and decoupling oxidative phosphorylation and/or mitochondrial  $\beta$ -oxidation. These impairments of mitochondrial function seems to be associated with dissipation of the electric potential across the inner mitochondrial membrane (12). Interestingly, statins increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in skeletal muscle. This could be due to the fact that atorvastatin inhibited mitochondrial complexes I and III, phenomenon which is known to induce ROS formation (1). This augmentation ROS activated antioxidant defense in order to maintain ROS at tolerable physiological levels. Then H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production reflected both the increase production of ROS following statin exposition as well as the activation of antioxidant defense. Indeed, we detected O<sub>2</sub><sup>-</sup> production originating from the mitochondria after conversion to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by endogenous matrix SOD. But this augmentation of ROS generation could surpass the antioxidant capacities and then induce oxidative damage to mitochondria at the level of proteins, lipid and DNA, altering maximal mitochondrial respiration.

## **2) Exercise training protected mitochondrial function against acute atorvastatin exposure**

It was clearly established that physical exercise exerts beneficial effects on metabolism, mitochondrial function and antioxidant defense systems (6, 7, 32, 33). However, exercise appears to increase the likelihood for the development of myopathy in patients taking statins (23).

In this report, exercise training during ten days improved maximal mitochondrial respiration ( $V_{\max}$ ) in plantaris muscle. When we exposed muscles to acute dose of atorvastatin, we showed that mitochondrial respirations of all training muscles were well-protected as shown by the large increase of  $IC_{50}$ . Moreover, whereas exercise training did not increase basal  $H_2O_2$  production, acute exposure to atorvastatin largely increased it in trained muscle, exceeding the  $H_2O_2$  production of the control skeletal muscle. These results, together with the fact that mRNA level of antioxidant enzyme was increased indicated that trained muscle improved its capacity to detoxified ROS, suggesting a reduction of intracellular oxidative stress in this trained muscle after statin exposition. Our results are in line with the fact that exercise training provides muscular protection due to several biochemical/molecular changes including induction of muscular heat shock proteins, nitric oxide production, improvement of function of sarcolemma and mitochondrial adenosine triphosphate (ATP)-sensitive potassium channels and increased antioxidant capacities (13, 20). Then, we can postulate that cellular adaptations notably at the level of antioxidant capacities following exercise training allowed to strengthen mitochondrial function against deleterious effects of atorvastatin.

On the other hand, 25% of statin users who exercise may experience muscle complaints due to statin therapy and potentially dismissed by the patient and physician (27). In fact, it has been postulated that statins may adversely affect the muscle's ability to appropriately respond to physical exertion (8). In clinical practice, it has been reported that the incidence of muscle pain increases with the level of physical activity, with a great number of patients avoiding even moderate exertion during every day activities (4). It is also well known that the great majority of professional athletes with severe familial hypercholesterolemia do not tolerate any of the statins available because of muscle side effects (23). Then, even if exercise training prevents from the deleterious acute mitochondrial effects of atorvastatin, it seems that physical exercise, when coupled to statins treatment, are not well-tolerated. Because exercise as well as statins exposure increased ROS production in glycolytic skeletal muscle (i.e. plantaris muscle), this suggests that muscular ROS concentration could overwhelm the antioxidant capacities of this vulnerable muscle and then triggering some deleterious effects at

the cellular level responsible of muscle pain and myalgia. But these adverse reactions have been shown in specific populations of patients (i.e. sedentary patients taken statins as well as athletes who trained several hours every day). Then, we can hypothesize that an endurance training well-calibrated at low or moderate intensity, even if coupled with statins treatment, could be beneficial by inducing muscular adaptations, reducing the potential muscular deleterious effect of statins treatment, but without the overwhelm of antioxidant capacities.

In summary, we showed that acute exposure to atorvastatin impaired mitochondrial function of glycolytic muscles in rats. On the other hand, exercise training reduced these mitochondrial impairments. Then, a chronic cellular stress as exercise training could induce some muscular adaptations making mitochondria more resistant to an important metabolic stress as atorvastatin exposure. Because current evidence strongly supports a systematic use of high doses statins prior to cardiac intervention, it is of first importance to find strategy in order to limit side effects of these molecules, notably at the level of mitochondria. Our results suggest that well-calibrated exercise training seem to be a good candidate.

**Acknowledgements**

We are grateful to I. Bentz and F. Goupilleau for technical assistance.

**Disclosures**

None.

**Conflict of interest**

The authors have declared that no conflict of interest exists.

## References

1. **Anderson EJ, and Neuffer PD.** Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C844-851, 2006.
2. **Bao N, Minatoguchi S, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Iwasa M, Yamaki T, Sumi S, Misao Y, Arai M, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara T, and Fujiwara H.** Pravastatin reduces myocardial infarct size via increasing protein kinase C-dependent nitric oxide, decreasing oxyradicals and opening the mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in rabbits. *Circ J* 71: 1622-1628, 2007.
3. **Booth FW, and Thomason DB.** Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71: 541-585, 1991.
4. **Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, and Begaud B.** Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther* 19: 403-414, 2005.
5. **Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, and Camello PJ.** Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1082-1088, 2006.
6. **Daussin FN, Ponsot E, Dufour SP, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Geny B, Piquard F, and Richard R.** Improvement of [Formula: see text] by cardiac output and oxygen extraction adaptation during intermittent versus continuous endurance training. *European journal of applied physiology* 101: 377-383, 2007.
7. **Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, Ventura-Clapier R, Mettauer B, Piquard F, Geny B, and Richard R.** Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104: 1436-1441, 2008.
8. **Draeger A, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Hoppeler H, Mueller M, Breil F, Mohaupt MG, and Babiychuk EB.** Statin therapy and the expression of genes that regulate calcium homeostasis and membrane repair in skeletal muscle. *The American journal of pathology* 177: 291-299.
9. **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
10. **Jasinska M, Owczarek J, and Orszulak-Michalak D.** Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 59: 483-499, 2007.
11. **Katsiki N, Tziomalos K, Chatzizisis Y, Elisaf M, and Hatzitolios AI.** Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental? *Atherosclerosis* 211: 9-14, 2010.
12. **Kaufmann P, Torok M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, and Krahenbuhl S.** Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 63: 2415-2425, 2006.
13. **Kavazis AN.** Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med* 39: 923-935, 2009.
14. **Kitahara T, Li-Korotky HS, and Balaban CD.** Regulation of mitochondrial uncoupling proteins in mouse inner ear ganglion cells in response to systemic kanamycin challenge. *Neuroscience* 135: 639-653, 2005.
15. **Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, and Kunz WS.** Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3: 965-976, 2008.

16. **Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, and Auwerx J.** Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-1122, 2006.
17. **Liao JK, and Laufs U.** Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 89-118, 2005.
18. **Meador BM, and Huey KA.** Statin-associated myopathy and its exacerbation with exercise. *Muscle & nerve* 42: 469-479, 2010.
19. **Picard M, Godin R, Sinnreich M, Baril J, Bourbeau J, Perrault H, Taivassalo T, and Burelle Y.** The mitochondrial phenotype of peripheral muscle in chronic obstructive pulmonary disease: disuse or dysfunction? *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1040-1047, 2008.
20. **Powers SK, Quindry JC, and Kavazis AN.** Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44: 193-201, 2008.
21. **Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Kim SK, Cai DQ, Teng YC, Shim KY, and Lee KJ.** Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine CT26 colon carcinoma cells. *Toxicology letters* 2010.
22. **Schaefer WH, Lawrence JW, Loughlin AF, Stoffregen DA, Mixson LA, Dean DC, Raab CE, Yu NX, Lankas GR, and Frederick CB.** Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 194: 10-23, 2004.
23. **Sinzinger H, and O'Grady J.** Professional athletes suffering from familial hypercholesterolaemia rarely tolerate statin treatment because of muscular problems. *Br J Clin Pharmacol* 57: 525-528, 2004.
24. **Sirvent P, Bordenave S, Vermaelen M, Roels B, Vassort G, Mercier J, Raynaud E, and Lacampagne A.** Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1426-1434, 2005.
25. **Staffa JA, Chang J, and Green L.** Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 346: 539-540, 2002.
26. **Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, and Liao JK.** Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 108: 1429-1437, 2001.
27. **Thompson PD, Clarkson P, and Karas RH.** Statin-associated myopathy. *Jama* 289: 1681-1690, 2003.
28. **Tomlinson SS, and Mangione KK.** Potential adverse effects of statins on muscle. *Physical therapy* 85: 459-465, 2005.
29. **Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, and Auwerx J.** Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113: 1408-1418, 2004.
30. **Westwood FR, Bigley A, Randall K, Marsden AM, and Scott RC.** Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol Pathol* 33: 246-257, 2005.
31. **Zoll J, Koulmann N, Bahi L, Ventura-Clapier R, and Bigard AX.** Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *Journal of cellular physiology* 194: 186-193, 2003.
32. **Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, and Mettauer B.** Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543: 191-200, 2002.

33. **Zoll J, Steiner R, Meyer K, Vogt M, Hoppeler H, and Fluck M.** Gene expression in skeletal muscle of coronary artery disease patients after concentric and eccentric endurance training. *European journal of applied physiology* 96: 413-422, 2006.

## Figures legends

### Figure 1

**Atorvastatin decreased skeletal muscle mitochondrial maximal oxidative capacity and enhanced mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production.** Oxygen consumption and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission were measured in saponin permeabilized muscle fibers with glutamate (5mM) and malate (2mM) as substrates. Values in figure 1A are expressed in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  dry weight and  $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$  dry weight in figure 1B.

Values are means  $\pm$  SEM of 8 independent experiments; \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to V<sub>max</sub> in figure 1A; \*P<0.05 compared to Glu+Mal condition of the same group.

### Figure 2

**Exercise training increased maximal oxidative capacities.** Values are expressed as percentage of V<sub>max</sub> of Cont group. Values are means  $\pm$  SEM of 8 independent experiments; \*P<0.05 compared to Cont.

### Figure 3

**Exercise training protected skeletal muscle against atorvastatin deleterious effects.** Values are means  $\pm$  SEM of 8 independent experiments. Values in figure 3A are expressed in percentage of V<sub>max</sub> of each group; \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to V<sub>max</sub>; \$P<0.05, \$\$P<0.01 and \$\$\$P<0.001 between groups in the same atorvastatin concentration. Values in figure 3B are expressed in percentage of Glu+Mal condition; \*P<0.05 and \*\*\*P<0.001 compared to Glu+Mal condition of the same group.

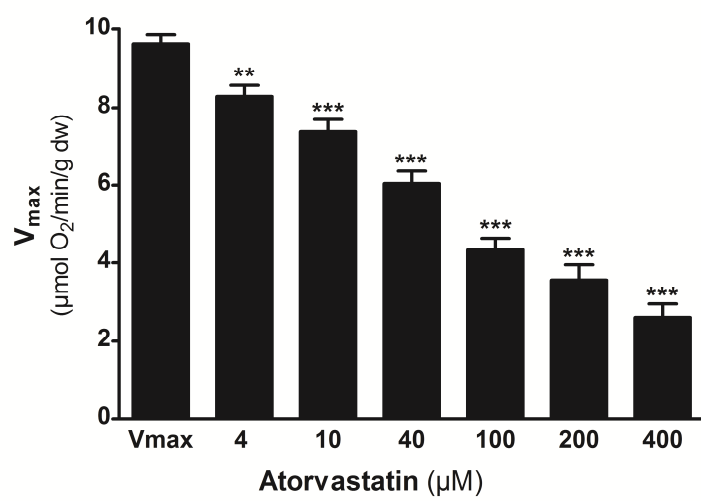
### Figure 4

**Exercise training increased antioxidant defense and mitochondrial metabolism.** Relative mRNA expression level from catalase (A), Cox1 (B) and Cox4i1 (C) in plantaris measured by q-RT-PCR. Values are means  $\pm$  SEM of 8 experiments on each group. \*P<0.05 and \*\*\*P<0.001 compared to Cont group.

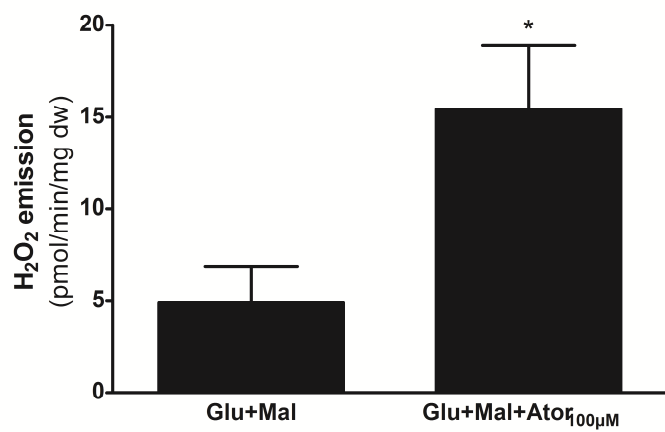


Figure 1

A



B



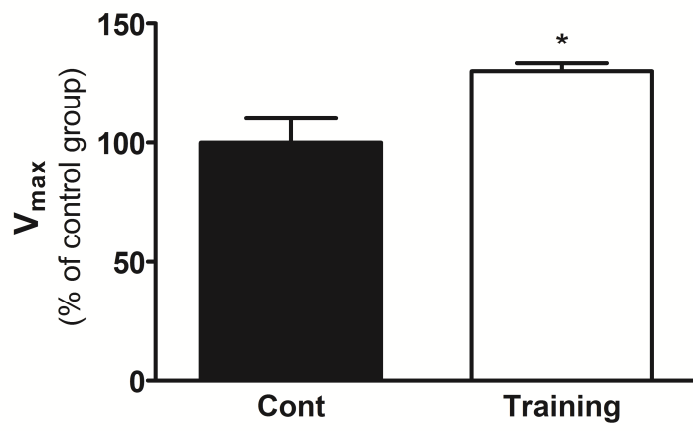
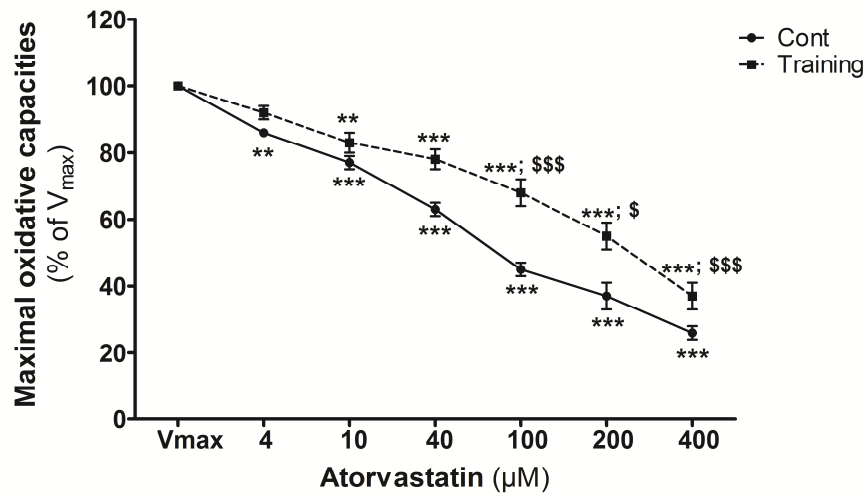
**Figure 2**

Figure 3

A



B

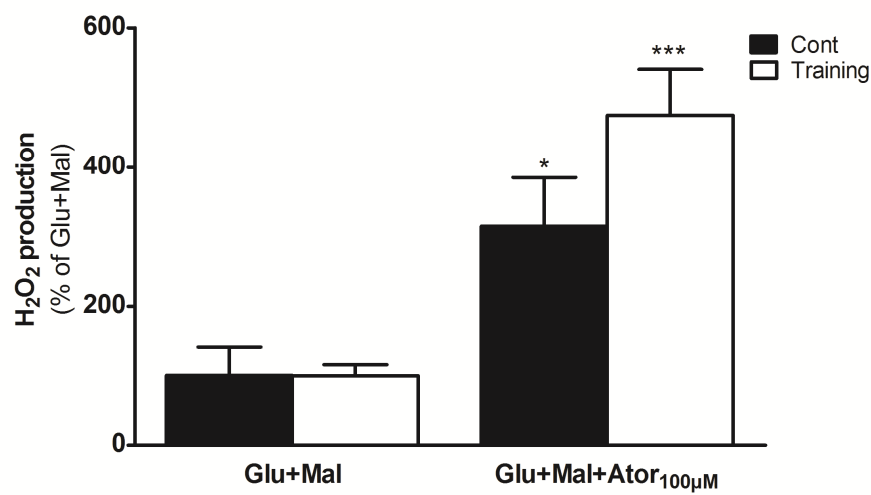
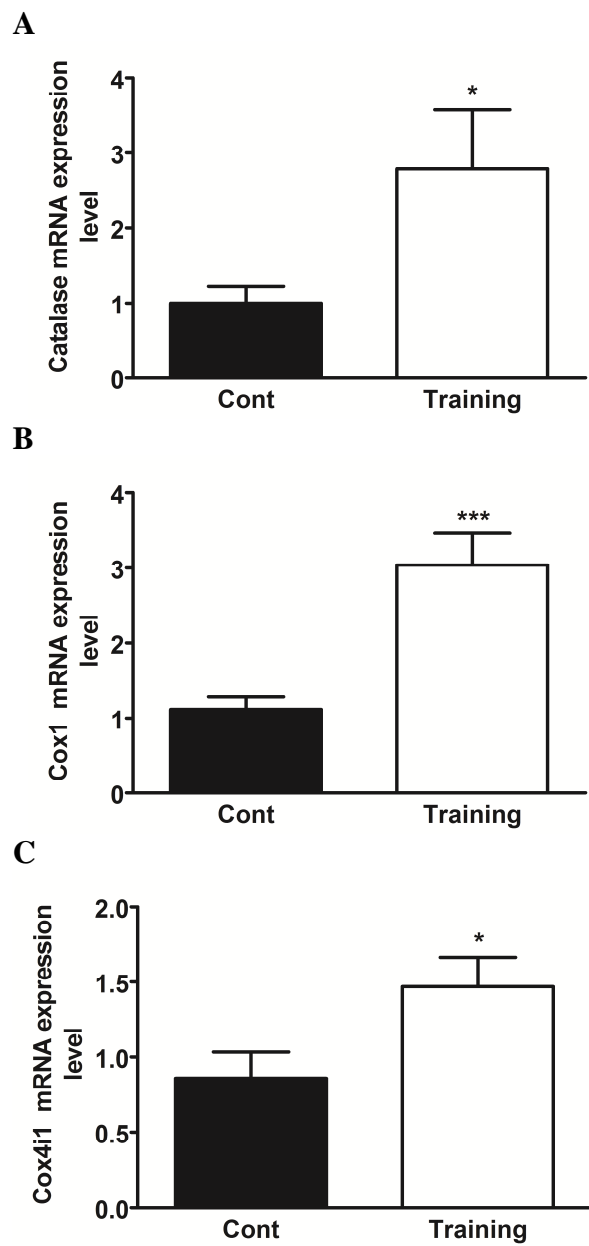


Figure 4



### **3. Etude 3 : Effet d'un traitement avec l'atorvastatine sur la fonction mitochondriale : mise en évidence du concept de « mitohormesis »**

Dans les deux premières études, nous avons montré que les statines avaient pour cible la mitochondrie. L'objectif suivant a été de comprendre pourquoi une même molécule avait des effets bénéfiques dans le cœur mais délétères dans le muscle squelettique.

Dans cette étude, nous avons donc étudié les effets d'un traitement avec des statines sur la production de ROS et la biogenèse mitochondriale dans le muscle cardiaque et squelettique chez l'Homme, l'animal et sur des modèles de cultures cellulaires.

Nous avons démontré que les statines induisent une augmentation modérée des ROS dans le muscle cardiaque qui à son tour active la biogenèse mitochondriale et le système antioxydant par la voie de signalisation impliquant PGC-1. Par contre, dans le muscle squelettique, les statines induisent une augmentation intense de la production de ROS qui va désactiver la biogenèse mitochondriale et entraîner les effets délétères sur la fonction mitochondriale.

Ces résultats ont démontré que les statines agissent selon le mécanisme du « mitohormesis »

**Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles:  
a “mitohormesis” mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1**

Jamal Bouitbir, PhD; Anne-Laure Charles, PhD; Andoni Echaniz-Laguna, MD, PhD; Michel Kindo, MD; Frédéric Daussin, PhD; Johan Auwerx, MD, PhD; François Piquard, PhD;  
Bernard Geny, MD, PhD; Joffrey Zoll, PhD

From the Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, Strasbourg, France (J.B., A.-L.C., F.D., F.P., B.G., J.Z.); Faculty of Medicine, Physiology Department, EA 3072, Strasbourg University, France (J.B., A.-L.C., M.K., F.D., F.P., B.G., J.Z.); Neurology Department, New Civil Hospital, Strasbourg, France (A.-E.L.); Cardiac Surgery Department, New Civil Hospital, Strasbourg, France (M.K.) and Institute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland (J.A.).

Correspondence to **Dr Joffrey Zoll**, PhD, CHRU of Strasbourg, Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, B.P. 426, 67091, Strasbourg, France.

E-mail: Joffrey.Zoll@unistra.fr

**Manuscript statistics:** 5164 words (241 words in abstract), 8 figures, supplemental methods, 1 supplemental figure and 3 supplemental tables.

**Running Title:** Statins and Mitohormesis

## **Abstract**

**Aims:** Statins protect against cardiovascular-related mortality but induce skeletal muscle toxicity. To investigate mechanisms of statins, we tested the hypothesis that statins optimized cardiac mitochondrial function but impaired vulnerable skeletal muscle by inducing different level of reactive oxygen species (ROS).

**Methods and results:** In atrium of patients treated with statins, ROS production was decreased and oxidative capacities were enhanced together with an extensive augmentation of mRNAs expression of PGC-1 family. However, in deltoid biopsies from patients with statin-induced muscular myopathy, oxidative capacities were decreased together with ROS increase and a collapse of PGC-1 mRNA expression. Several animal and cell culture experiments were conducted and showed by using ROS scavengers that ROS production was the triggering factor responsible of atorvastatin-induced activation of mitochondrial biogenesis pathway as well as improvement of antioxidant capacities. Conversely, in skeletal muscle, the large ROS production augmentation following treatment induced mitochondrial impairments, and reduced mitochondrial biogenesis mechanisms. Quercetin, an antioxidant molecule, was able to counteract skeletal muscle deleterious effects of atorvastatin in rat.

**Conclusion:** Statins acted *via* a “mitohormesis mechanism”: when they induced low ROS production as in cardiac muscle, they activated mitochondrial biogenesis and protected them, whereas when they highly increased ROS production as in glycolytic skeletal muscle, they impaired muscular oxidative capacities, and deactivated mitochondrial biogenesis. These findings identify statins as a new activating factor of cardiac mitochondrial biogenesis and showed importance of ROS/PGC-1 signalling pathway as a key element in regulation of muscular mitochondrial function.

## Introduction

Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) are the most frequently prescribed medication in developed countries. They impair cholesterol synthesis by inhibiting the synthesis of mevalonate, the rate-limiting step in cholesterol biosynthetic pathway (1). Statins reduce cardiovascular-related morbidity and mortality in patients with or without coronary artery disease (2). It is widely-accepted that statins have pleiotropic beneficial effects at the cardiovascular level (3, 4), particularly by enhancing the bioavailability of vascular NOS-derived NO. Statins are generally well tolerated but can provoke a variety of skeletal muscle-associated, dose-dependant adverse reactions, ranging from muscle pain to rhabdomyolysis that sometimes persist several months after treatment withdrawal (5). As a result, less than half of patients with an indication of statin treatment currently receive this therapy (3).

Little is known about the molecular mechanisms by which statins protect against cardiovascular-related morbidity but lead to skeletal muscle injury. *In vivo* studies documenting the effects of statins on cardiac mitochondria are rare. In cardiomyocytes cultures, Jones et *al.* showed that simvastatin protected mitochondria from oxidative stress (6). At the skeletal muscle level, *in vitro* investigations have shown that simvastatin inhibited complex I of the mitochondrial electron transport chain (7). Moreover, several studies have shown that mitochondrial impairments could be largely implicated in the deleterious effects of statins (8, 9).

The role of mitochondria also extends far beyond energy production (10), as they are important generators of reactive oxygen species (ROS), which can act either as second messengers or as a source of cellular damage, depending on the produced amount (11-14). As a vital organ rich in mitochondria and with high oxygen use, the heart is prone to oxidative damage. Furthermore, metabolic and apoptotic pathway converge on mitochondria and are



both recognized as playing a major role in disease (15, 16). It is thus crucial to clearly characterize the mechanisms of statin-associated mitochondrial modifications in different muscle phenotypes (7, 9, 17, 18).

Advances in molecular biology have started to elucidate the transcriptional events governing mitochondrial biogenesis. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator (PGC-1 $\alpha$ ) is considered to be the major regulator of mitochondrial biogenesis (19). Interestingly, a new concept proposes that mitochondrial biogenesis could be triggered by low doses of mitochondrial ROS to counteract stressor challenges and to re-establish homeostasis. This concept called mitochondrial hormesis or “mitohormesis” (13, 20, 21).

However, the effects of statin treatment on the molecular events controlling mitochondrial biogenesis have never been investigated according to the muscular metabolic phenotype, although this may be a potential mechanism to control muscular mitochondrial function.

In the present study, we investigated the effects of statin treatment on ROS production-induced mitochondrial biogenesis in cardiac and skeletal muscles in humans, animals and cell culture models. We demonstrated that statin treatment produced a low amount of ROS in cardiac muscle, which activated mechanisms of mitochondrial biogenesis and the antioxidant system *via* the PGC-1 signalling pathway. In contrast, in patients with statin-induced myopathy as well as in skeletal muscle of rats, a large amount of ROS following statin treatment down-regulated mitochondrial biogenesis, and triggered deleterious effects on mitochondrial function. Altogether, our results demonstrated that statins acted *via* a “mitohormesis” mechanism in order to activate mitochondrial biogenesis and protected cardiac metabolism.

## **Methods**

### **Surgical procedure and human atrial appendage sampling**

All surgeries were performed through a full median sternotomy incision and under cardiopulmonary bypass. Heparin (300 U/kg IV) was given. Arterial cannulation was performed *via* the distal ascending aorta. Single venous cannulation with a cavoatrial cannula was introduced *via* the right atrial appendage. The right atrial appendage was systematically harvested allowing the venous cannulation before starting cardiopulmonary bypass and was immediately rinsed in ice-cold Buffer S solution (22). Excess buffer was removed and subendocardial myocardial layer was harvested. A sample was immediately frozen in liquid nitrogen. Right atrial biopsies were obtained from 6 patients treated with statins and 8 patients not treated with statins (Supplemental Table 1). Informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the institutional ethical review board of Strasbourg University.

### **Human deltoid biopsies**

We studied biopsies from deltoid muscles in 5 patients with statin-induced myopathy, i.e. patients who developed muscle weakness and/or rhabdomyolysis while treated with a statin, in whom muscle weakness and rhabdomyolysis regressed after statin treatment discontinuation, and in whom other causes of myopathy were excluded. Muscle biopsy parameters were compared to those of 5 normal voluntary subjects (Supplemental Table 2). All subjects signed a consent form approved by the institutional review board of New Civil Hospital of Strasbourg.

## **Animal experiments**

Experiments were performed on adult male Wistar rats (Depré, France) weighing  $\approx$  250-300g. They housed in neutral temperature environment ( $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) on a 12:12 hour photoperiod and were provided food and water *ad libitum*. Animal procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and were approved by our local ethic committee. Atorvastatin (Tahor®) was generously provided by Pfizer and quercetin was kindly provided by C. Damgé and D. Betbeder (Lille, France). After one week of acclimation, 32 rats were randomly divided into four groups as followed: (1) animals treated with water (CONT, n=8); (2) animals treated with atorvastatin (ATO, n=8, 10 mg/kg/day); (3) animals treated with quercetin (QUERC, n=8, 25 mg/kg/day) and (4) animals treated with atorvastatin and quercetin (QUERC+ATO; n=8; 25 mg/kg/day and 10 mg/kg/day respectively). ATO animals were treated with atorvastatin during two weeks by oral gavage and animals treated with quercetin began the treatment five days before atorvastatin treatment.

## **Statistical analysis**

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using Student's *t* test, 1-way or 2-way ANOVA followed by a Tukey post test (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was displayed as \*  $P < 0.05$  or \*\*  $P < 0.01$  or \*\*\*  $P < 0.001$ .

## **Results**

### **Statins promoted mitochondrial function and mitochondrial biogenesis in human cardiac muscle.**

The patient's population underwent surgery for valvular aortic stenosis. The clinical characteristics are similar in both groups (Supplemental Table 1). We studied different parameters in atrial muscles of 14 patients treated (n=6, STAT group) or not (n=8, CONT group) with statins. Dihydroethidium staining showed that ROS content was reduced in STAT group (- 51 %, Figure 1A). PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  mRNA expression levels, both crucial transcriptional co-activators of numerous genes coding for mitochondrial proteins, were higher in STAT group compared to CONT group (Figures 1B). Cytosolic SOD1 and mitochondrial SOD2 mRNA levels were increased in cardiac muscle of patients treated with statins (Figures 1C). Maximal oxidative capacities ( $V_{\max}$ ) were increased in these patients (Figure 1D).

### **Mitochondrial function and biogenesis were impaired and ROS production increased in muscle biopsies of patients with statin-induced myopathy.**

We analyzed different parameters in deltoid muscles of patients (n=5, M-STAT group) suffering from statin-induced myopathy as well as in age-matched control subjects (n=5, M-CONT group). Plasmatic creatine kinase level was significantly higher in M-STAT group compared to CONT group (Supplemental Table 2). ROS production measured with DHE staining was highly enhanced in M-STAT patients (Figure 1A). PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  (Figure 1B) as well as SOD1 and SOD2 mRNA levels (Figure 1C) were reduced in biopsies of these patients.  $V_{\max}$  was largely lower in M-STAT group (Figure 1D). In order to characterize and to explore the mechanisms responsible of these alterations, we studied the effects of two-week atorvastatin treatment with or without antioxidant treatment in rats.

### **Atorvastatin decreased total cholesterol in rats.**

Total Cholesterol (TC) decreased by 20% in ATO and QUERC+ATO groups compared to CONT and QUERC groups (Supplemental Figure 1A), whereas HDL-cholesterol level was not significantly different between groups (Supplemental Figure 1B).

### **Atorvastatin treatment altered molecular pathways controlling mitochondrial biogenesis in muscles and antioxidant treatment abolished it.**

We explored the principal factors governing mitochondrial biogenesis mechanisms in two muscle types (oxidative cardiac and glycolytic skeletal muscles) after two-week treatment with atorvastatin. A co-treatment with antioxidant quercetin was used in order to demonstrate the role played by ROS production. Expression of several genes implicated in mitochondrial biogenesis was analyzed by q-RT-PCR (Supplemental Table 3).

PGC-1 $\alpha$  mRNA level was not modified in cardiac muscle but largely decreased in skeletal muscle after treatment with atorvastatin (Figure 2A). Expression of the co-activator PGC-1 $\beta$  mRNA which is a central factor controlling mitochondrial biogenesis was largely increased in cardiac muscle but significantly reduced in skeletal muscle after atorvastatin treatment (Figure 2B).

The nuclear respiratory factor 1 (NRF1) mRNA expression, which is implicated in mitochondrial biogenesis downstream from PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$ , and cytochrome oxidase 1 (Cox1) mRNA expression implicated in mitochondrial metabolism were both increased in cardiac muscle but were largely decreased in skeletal muscle after atorvastatin treatment (Figures 2C and 2D respectively). Interestingly, when quercetin treatment was added to the atorvastatin treatment, alterations of all these mRNA expression levels were abolished.

These data clearly demonstrated that atorvastatin activated the mechanisms of mitochondrial biogenesis in cardiac muscle but inhibited it in glycolytic skeletal muscle. These alterations

were largely prevented by an antioxidant treatment suggesting that modifications of redox potential could be responsible of the beneficial as well as deleterious effects of statins. In order to verify this hypothesis we firstly explored the effects of statins as well as antioxidant treatment on ROS concentration in different muscle types.

**ROS were reduced in cardiac muscle, but largely increased in glycolytic skeletal muscle after chronic atorvastatin treatment.**

Total ROS production was measured in muscles by electron paramagnetic resonance (EPR). Interestingly, total ROS production was reduced in cardiac muscle of rats treated with atorvastatin and/or quercetin (Figure 3A). On the other hand, in glycolytic plantaris muscle treated with statin, total ROS production was increased and co-treatment with quercetin abolished this effect (Figure 3A).

The dihydroethidium staining indicated that ROS concentration was decreased in cardiac muscle treated with atorvastatin and quercetin (Figure 3B). In plantaris muscle, ROS concentration was increased after statin treatment and this effect was abolished by antioxidant treatment (Figure 3B).

**Antioxidant capacities were improved in cardiac muscle but importantly reduced in glycolytic skeletal muscle following atorvastatin treatment and antioxidant treatment prevented this reduction.**

GSH (reduced glutathione) was 3-fold higher in cardiac muscle compared to glycolytic skeletal muscle (Figure 3C). In this skeletal muscle, atorvastatin reduced GSH content, but co-treatment with quercetin prevented this deleterious atorvastatin effect (Figure 3C).

Superoxide dismutase (SOD2) mRNA level was increased in cardiac muscle after both

treatments (Figure 3D) but in plantaris muscle, it decreased by ~2-fold after atorvastatin treatment and co-treatment with quercetin prevented these alterations (Figure 3D).

### **Quercetin protected mitochondrial respiration of glycolytic muscle against deleterious effects of atorvastatin in rats.**

$V_{\max}$  and  $V_{\text{succ}}$  were neither modified nor by statins nor by quercetin treatment or both in cardiac muscle (Figures 4A and 4B respectively). In plantaris muscle,  $V_{\max}$  and  $V_{\text{succ}}$  were lower in rats treated with atorvastatin, and co-treatment with quercetin prevented these deleterious effects (Figures 4A and 4B respectively).

### **Atorvastatin activated mitochondrial biogenesis and protected mitochondria by a ROS-mechanism in H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> cardiomyocytes.**

To further understand the mechanisms explaining cardiac beneficial effects of atorvastatin, we used a cell culture model. First, ROS production was evaluated with dihydroethidium staining method in H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> cardiomyocytes after acute exposure with atorvastatin (1 $\mu$ mol/L, 48 hours). Short term exposure with atorvastatin enhanced ROS production and when NAC (1mmol/L), a ROS scavenger, was added to the medium during 48 hours, it largely prevented this augmentation (Figure 5A). PGC-1 $\alpha$  and citrate synthase mRNA expression levels increased after atorvastatin incubation, but NAC abolished these effects (Figures 5B and 5C respectively).

Interestingly, we showed that cellular adaptations following 48 hours atorvastatin exposure (1 $\mu$ mol/L) protected these cardiomyocytes from doxorubicin treatment (Dox; 0.5 $\mu$ mol/L; Figure 5D). Dox toxicity was characterized by a decrease of TMRE fluorescence intensity, suggesting a loss of mitochondrial membrane potential, and 48 hours of atorvastatin pre-treatment prevented this deleterious effect.

### **Statin impaired mitochondria by a ROS-mechanism in L<sub>6</sub> myotubes.**

The same protocol was realized with skeletal myotubes differentiated from L<sub>6</sub> myoblasts and divided in 6 groups. Control myotubes, myotubes incubated with NAC (1mmol/L), or atorvastatin or both, myotubes infected with adenovirus encoding PGC-1 $\alpha$  incubated or not with atorvastatin (1 $\mu$ mol/L) during 48 hours. Acute atorvastatin treatment largely enhanced ROS production and when NAC was added to the medium, it largely decreased this production. Overexpression of PGC-1 $\alpha$  in myotubes also abolished ROS augmentation following acute treatment with atorvastatin (Figure 6A). Interestingly, PGC-1 $\alpha$  mRNA expression decreased after atorvastatin incubation, but NAC abolished these alterations (Figure 6B). As expected, PGC-1 $\alpha$  overexpression efficiently increased PGC-1 $\alpha$  mRNA expression (Figure 6B).

### ***In vitro* addition of atorvastatin increased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production lightly in cardiac but largely in glycolytic fibers of rats.**

We measured the *in vitro* capacity of atorvastatin to directly induce mitochondrial ROS in function of muscle phenotype. During the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurement, atorvastatin (100 $\mu$ mol/L) was added in presence of muscle fibers from rat cardiac and plantaris muscles. Interestingly, atorvastatin enhanced mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cardiac muscle (+97 %, Figure 7A) whereas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production increased robustly in plantaris (+215 %, Figure 7B) with an increase significantly higher in skeletal muscle compared to myocardium.



## Discussion

This study provides two major findings: 1) in human as well as in rat, statins triggered transcriptional activation of mitochondrial biogenesis in myocardium (increase of PGC-1 $\alpha$  and - $\beta$  expression levels) as well as antioxidant capacities *via* a mechanism implicating ROS signalling pathway, 2) in skeletal muscle of patients with statin-induced myopathy as well as in rat skeletal muscle with low antioxidant capacities, these molecules induced high oxidative stress, responsible of transcriptional deactivation of mitochondrial biogenesis as well as mitochondrial dysfunctions. Altogether, we showed that statins increased ROS production differently in heart and skeletal muscle and could be represent as a double-edged sword: they are beneficial by playing an important role in cell signalling involved in antioxidant defence network in cardiac muscle, but could be harmful by inducing excessive oxidative stress in vulnerable skeletal muscle (21). We proposed that activation of PGC-1 expression could be triggered by low doses of mitochondrial ROS generation following atorvastatin treatment, in order to counteract stressor challenges and hence re-establish homeostasis. This phenomenon was called mitochondrial hormesis or “mitohormesis” (13, 20). Our data clearly demonstrated that statins acted through this mitohormesis mechanism.

With atrial tissues obtained during coronary bypass surgery of patients treated or not with statins, we studied the mitochondrial respiration in skinned atrial fibers (22). Interestingly, maximal mitochondrial respiration as well as genes expression of antioxidant enzymes and factors controlling mitochondrial biogenesis was higher in myocardium of treated patients. In particular our results showed for the first time that statins treatment activated PGC1- $\alpha$  and - $\beta$  which were considered as the major regulators of several crucial aspects of energy metabolism. By increasing these central factors, statins could strengthen human cardiac muscle defence against metabolic stress by improving antioxidant defence, which seems to be the case since expression of SOD1 and SOD2 were higher in atrium of patients treated with

statins. However, in deltoid biopsies of patients with statin-induced myopathy, mitochondrial function was impaired together with an abnormally high induction of ROS production. In addition, PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  mRNA expressions were downregulated suggesting deactivation of mitochondrial biogenesis signalling pathway. These results are in accordance with some studies showing that skeletal muscle mitochondria are impaired after statins treatment or in acute conditions (7, 9) and give a molecular details of these muscular abnormalities. Sirvent *et al.* showed that simvastatin-induced mitochondrial impairment resulting from inhibition of the respiratory chain complex I in human skeletal muscle (7). Concerning genes expression, a recent study showed in skeletal muscle from statin-treated but non-myopathic patients, that expression of genes responsible for mitochondrial function was unaffected, suggesting that regulation of mitochondrial biogenesis was specifically impaired in skeletal muscle of patients with statin-induced myopathy (23).

In order to clearly demonstrate and explain why and how statins could induce opposite effects in muscles with different phenotypes (i.e. cardiac *vs.* glycolytic skeletal muscle), we carried out several experiments with animal and cell models. In particular, we studied the role played by muscular ROS production as well as the role played by co-factors PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  in the mechanisms of muscular mitochondrial adaptations and impairments following statin treatment.

In cardiac muscle of rats, chronic treatment with atorvastatin activated PGC-1 $\beta$  expression, improved antioxidant capacities and decreased cellular ROS concentration, confirming the effects observed in human patients treated with statins. Because it has been shown that PGC-1 $\beta$  plays an important role in controlling mitochondrial function and induce antioxidant enzymes (24, 25), we can postulate that molecular pathway by which statins induced improvement of ROS detoxification capacities in cardiac muscle could be controlled by this

transcriptional co-factor. These results are in accordance with St-Pierre *et al.* which demonstrated that PGC-1 $\alpha$  was a broad and powerful regulator of ROS metabolism (25). Interestingly, when cardiomyocytes in culture or permeabilized cardiac fibers were acutely exposed to atorvastatin, it induced an increase of mitochondrial ROS production, whereas two-week treatment with statins reduced basal ROS concentration in cardiac muscle of rats. These results suggested that it was this initial augmentation of ROS production following statins treatment which could trigger the improvement of antioxidant capacities and mitochondrial function allowing to reduced the basal ROS concentration in the following weeks. In order to verify these hypothesize, we used an antioxidant molecule in addition to atorvastatin treatment and tested it in our *in vivo* and *in vitro* models (quercetin and NAC treatments, respectively). We found that these treatments, by reducing the initial augmentation of ROS, prevented the enhancement of PGC1 expression as well as mRNA expression of antioxidant enzymes in cardiac cells. Altogether, we found that atorvastatin increased ROS production which initiated expression of PGC-1 $\alpha$  and - $\beta$ , leading to mitochondrial biogenesis and the augmentation of oxidative capacities in cardiac muscle. Moreover, this activation of PGC-1s initiated an anti-ROS program that prevented a rise in intracellular ROS levels, suggesting that statins, by a PGC-1s dependant-mechanism, could play a key role in the ROS homeostatic cycle in cardiac muscle. Next step was to determine if atorvastatin treatment were able to protect cardiomyocytes from a chemical stress. Toxic effects of doxorubicin was explored in cardiomyocytes, and showed that atorvastatin incubation prevented mitochondrial cardiotoxicity by reducing the loss of mitochondrial membrane potential and inducing mitochondrial biogenesis pathways. This is in accordance with studies showing that statins have antioxidant properties (26) and attenuated mitochondrial membrane depolarization after exposure to oxidant stress in cardiac myocytes (6). Then, statins treatment, by inducing

mitochondrial adaptations, reduced metabolic toxic effects of this molecule frequently used in clinical setting.

In glycolytic skeletal muscle with low glutathione content, statins robustly increased production of mitochondrial ROS *in vitro* as well as *in vivo* confirming the effects observed in deltoid biopsies of patients with statin-induced myopathy. These results and the fact that antioxidant treatments prevented skeletal muscle from deleterious effects of statins, suggested that high oxidative stress could be the triggering factor inducing mitochondrial dysfunction and downregulation of mitochondrial biogenesis mechanisms. Moreover, when PGC-1 $\alpha$  was overexpressed in L<sub>6</sub> myotubes, ROS production was decreased and deleterious effects were prevented, showing the central role played by this transcriptional co-factor in order to prevent deleterious effect of statins. Interestingly, the fact that quercetin treatment which is a powerful and natural antioxidant molecule (27), protect mitochondria of skeletal muscle in animals, suggest that it is possible to find therapeutical strategies consisting of reducing oxidative stress in skeletal muscle of patients with statin-associated myopathy.

In conclusion, our study clarified contradictory studies from the literature showing beneficial effects of statins in cardiac muscle while several studies demonstrated deleterious effects in skeletal muscle (8). We showed that statins acted through a “mitohormesis mechanism” and protected cardiac muscles, by stimulating mitochondrial biogenesis and antioxidant defence through ROS-induced PGC-1 family expression (Figure 8). Conversely, when ROS-detoxifying constituents were not sufficient to decrease the initial statin induced ROS production, as in glycolytic skeletal muscle of rat and in deltoid muscle of some patients, statins could be toxic for mitochondria and then an adequate antioxidant therapy should be applied.

## **Acknowledgements**

We thank and extend sincere appreciation to patients for participation in this study. We thank Auwerx laboratory including M. Lagouge and J. Feige, and Metzger laboratory (IGBMC, Illkirch, France), including D. Duteil and C. Chambon for technical help for q-RT-PCR. A.-M. Roussel and I. Hininger (INSERM U884, Grenoble, France) are acknowledged for technical assistance concerning glutathione measurement. We are grateful to I. Bentz, F. Goupilleau, S. Gaouar and D. Fumagalli for technical assistance. We thank C. Damgé and D. Betbeder (EA 2689, Lille, France) for providing quercetin. We are grateful to the Cardiovascular Operated Patients Association (ONCOVAS) for its help in funding the study.

## **Funding Sources**

This work was supported by grants of the Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, the Swiss National Science Foundation, Université de Strasbourg, NIH [DK59820], and EU Ideas programme [Sirtuins; ERC-2008-AdG-23118].

## **Disclosures**

None.

## References

1. Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 2002; **346**:539-540.
2. Jasinska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 2007; **59**:483-499.
3. Giordano N, Senesi M, Mattii G, Battisti E, Villanova M, Gennari C. Polymyositis associated with simvastatin. *Lancet* 1997; **349**:1600-1601.
4. Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? *European heart journal* 2003; **24**:225-248.
5. Echaniz-Laguna A, Mohr M, Tranchant C. Neuromuscular symptoms and elevated creatine kinase after statin withdrawal. *N Engl J Med* 2010; **362**:564-565.
6. Jones SP, Teshima Y, Akao M, Marban E. Simvastatin attenuates oxidant-induced mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003; **93**:697-699.
7. Sirvent P, Bordenave S, Vermaelen M, Roels B, Vassort G, Mercier J, Raynaud E, Lacampagne A. Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **338**:1426-1434.
8. Sirvent P, Mercier J, Lacampagne A. New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Current opinion in pharmacology* 2008; **8**:333-338.
9. Kaufmann P, Torok M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, Krahenbuhl S. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**:2415-2425.
10. Bindoff L. Mitochondria and the heart. *European heart journal* 2003; **24**:221-224.
11. Brookes PS. Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**:12-23.
12. Lecarpentier Y. Physiological role of free radicals in skeletal muscles. *J Appl Physiol* 2007; **103**:1917-1918.

13. Sano M, Fukuda K. Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ Res* 2008; **103**:1191-1193.
14. Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res* 2008; **103**:1232-1240.
15. Michelakis ED, Wilkins MR, Rabinovitch M. Emerging concepts and translational priorities in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2008; **118**:1486-1495.
16. Mettauer B, Zoll J, Sanchez H, Lampert E, Ribera F, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Epailly E, Lonsdorfer J, Ventura-Clapier R. Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure patients versus sedentary or active control subjects. *Journal of the American College of Cardiology* 2001; **38**:947-954.
17. Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* 2007; **282**:194-199.
18. Seachrist JL, Loi CM, Evans MG, Criswell KA, Rothwell CE. Roles of exercise and pharmacokinetics in cerivastatin-induced skeletal muscle toxicity. *Toxicol Sci* 2005; **88**:551-561.
19. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1{alpha}. *Cardiovasc Res* 2008; **79**:208-217.
20. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 2007; **6**:280-293.
21. Gems D, Partridge L. Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell Metab* 2008; **7**:200-203.

22. Seppet E, Eimre M, Peet N, Paju K, Orlova E, Ress M, Kovask S, Piirsoo A, Saks VA, Gellerich FN, Zierz S, Seppet EK. Compartmentation of energy metabolism in atrial myocardium of patients undergoing cardiac surgery. *Mol Cell Biochem* 2005; **270**:49-61.
23. Draeger A, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Hoppeler H, Mueller M, Breil F, Mohaupt MG, Babiychuk EB. Statin Therapy and the Expression of Genes that Regulate Calcium Homeostasis and Membrane Repair in Skeletal Muscle. *The American journal of pathology*; **177**: 291-299..
24. Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, Bjursell M, Parker N, Curtis K, Campbell M, Hu P, Zhang D, Litwin SE, Zaha VG, Fountain KT, Boudina S, Jimenez-Linan M, Blount M, Lopez M, Meirhaeghe A, Bohlooly YM, Storlien L, Stromstedt M, Snaith M, Oresic M, Abel ED, Cannon B, Vidal-Puig A. Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS biology* 2006; **4**:e369.
25. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006; **127**:397-408.
26. Davignon J, Jacob RF, Mason RP. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* 2004; **15**:251-258.
27. Bors W, Michel C, Saran M. Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol* 1994; **234**:420-429.



## Figure legends

### Figure 1.

**Exploration of cardiac atrial muscle biopsies from patients treated (STAT group) or not (CONT group) with statins and of human muscle biopsies from patients with statin myopathy (M-STAT group) compared to control subjects (M-CONT group).** (A)

Intensity of ROS fluorescence labelled with dihydroethidium. (B) PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  mRNA expression levels. (C) SOD1 and SOD2 mRNA expression levels. (D) Maximal mitochondrial respiration measured in presence of ADP and glutamate/malate as substrates ( $V_{\max}$ ). PGC-1 $\alpha$  and -1 $\beta$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha and beta; SOD1: superoxide dismutase 1; SOD2: superoxide dismutase 2.

Values were represented as mean $\pm$ SEM; n=5 to 8 patients in each group, \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ .

### Figure 2.

**Atorvastatin treatment altered molecular pathway of mitochondrial biogenesis in**

**muscles and antioxidant treatment abolished it.** PGC-1 $\alpha$  (A), PGC-1 $\beta$  (B), NRF1 (C) and

Cox1 (D) mRNA expression levels in cardiac and plantaris muscles. Values were represented

as mean  $\pm$  SEM; n=8; \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$  between groups.

### Figure 3.

**Reactive oxygen species were reduced in cardiac muscle after chronic atorvastatin**

**treatment, but were largely increased in glycolytic one.** (A) Total ROS production

measured by EPR in cardiac and plantaris muscles. (B) Intensity of ROS fluorescence labelled

with dihydroethidium in cardiac and plantaris muscles. (C) GSH measurement in cardiac and

plantaris muscles. (D) Relative mRNA level of mitochondrial SOD2 in cardiac and plantaris muscles. Values were represented as mean±SEM; n=8; \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$  between groups.

#### **Figure 4.**

**Quercetin protected mitochondrial respiration of glycolytic muscle against deleterious effects of atorvastatin treatment in rats.** Maximal mitochondrial respiration measured in presence of ADP and glutamate/malate ( $V_{max}$ ; Figure A) and succinate ( $V_{succ}$ ; Figure B) as substrates in cardiac muscle and plantaris respectively. Results were expressed as mean±SEM; n=8; \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$  between groups.

#### **Figure 5.**

**Atorvastatin induced expression of both citrate synthase and PGC-1 $\alpha$  mRNA expression levels by a mechanism implicating ROS production in H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> cardiomyocytes.** (A) Dihydroethidium staining in H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> cardiomyocytes treated with atorvastatin (1 $\mu$ mol/L) during 48 hours in the presence or not of the antioxidant molecule N-AcetylCysteine (NAC; 1mmol/L). (B-C) mRNA expression level of PGC-1 $\alpha$  (B) and citrate synthase (C) in different conditions. (D) TMRE-fluorescence intensity level in H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> cardiomyocytes exposed to doxorubicin (0.5 $\mu$ mol/L) pre-treated or not with atorvastatin (1 $\mu$ mol/L). Values were represented as mean±SEM; n=3; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$  between groups.

#### **Figure 6.**

**Atorvastatin decreased PGC-1 $\alpha$  mRNA expression levels due to the increase of ROS level in L<sub>6</sub> Woody myotubes.** (A) Dihydroethidium staining in L<sub>6</sub> myotubes infected or not with adenovirus encoding PGC-1 $\alpha$  treated with atorvastatin (1 $\mu$ mol/L) in the presence or not

of 1mmol/L of N-AcetylCysteine (NAC). (B) PGC-1 $\alpha$  mRNA expression in myotubes treated with atorvastatin (1 $\mu$ M) in the presence or not of 1mmol/L of N-AcetylCysteine (NAC).

Values were represented as mean $\pm$ SEM; n=3; \*P<0.05 compared to all others conditions;

‡‡P<0.01 compared to all others conditions and §§<0.01 compared to all others conditions.

### **Figure 7.**

***In vitro* atorvastatin increased slightly ROS production in cardiac muscle whereas it highly increased in plantaris muscle.** Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission in permeabilized fibers prepared from cardiac (A) and plantaris (B) muscles after addition of 100  $\mu$ mol/L atorvastatin.

Values represented mean $\pm$ SEM; n=8-10; \*P<0.05 and \*\*\*P<0.001.

### **Figure 8.**

**Scheme illustrating the action of statins according to muscular phenotype.** Statins acted through a “mitohormesis mechanism” and protected oxidative cardiac muscle, by stimulating the mitochondrial biogenesis through mild oxidative stress and improved metabolic health. Conversely, when ROS-detoxifying constituents were not sufficient to decrease the initial statin induced high oxidative stress in glycolytic skeletal muscle, they induced mitochondrial dysfunctions, downregulation of mitochondrial biogenesis and muscular pains or myopathy.

**Figure 1**

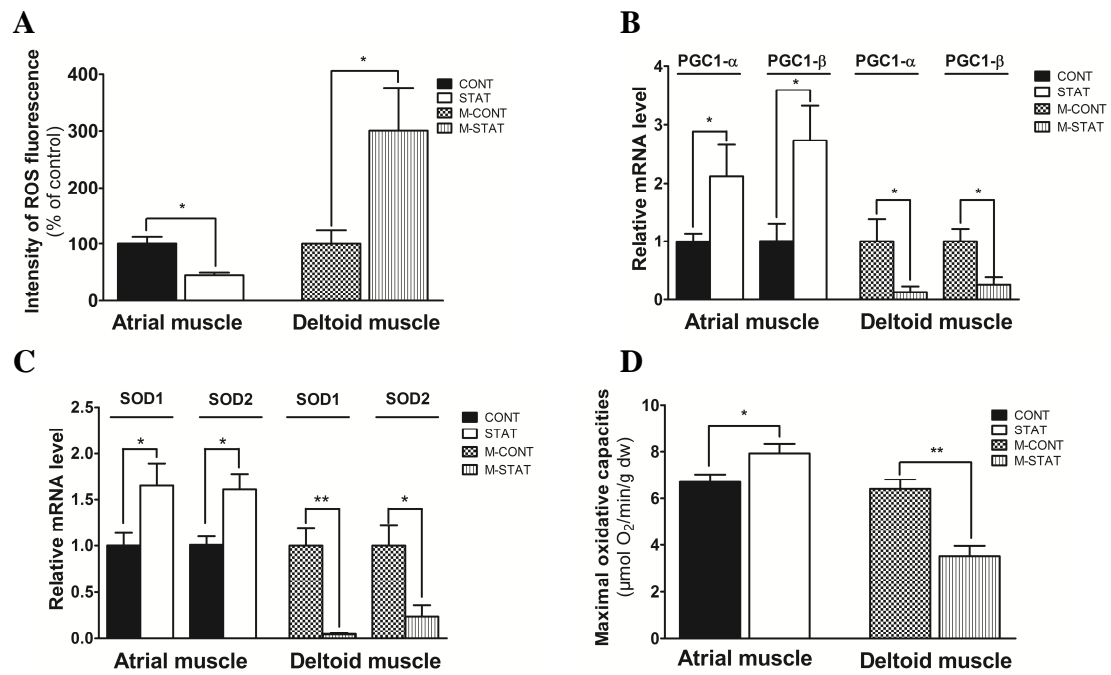
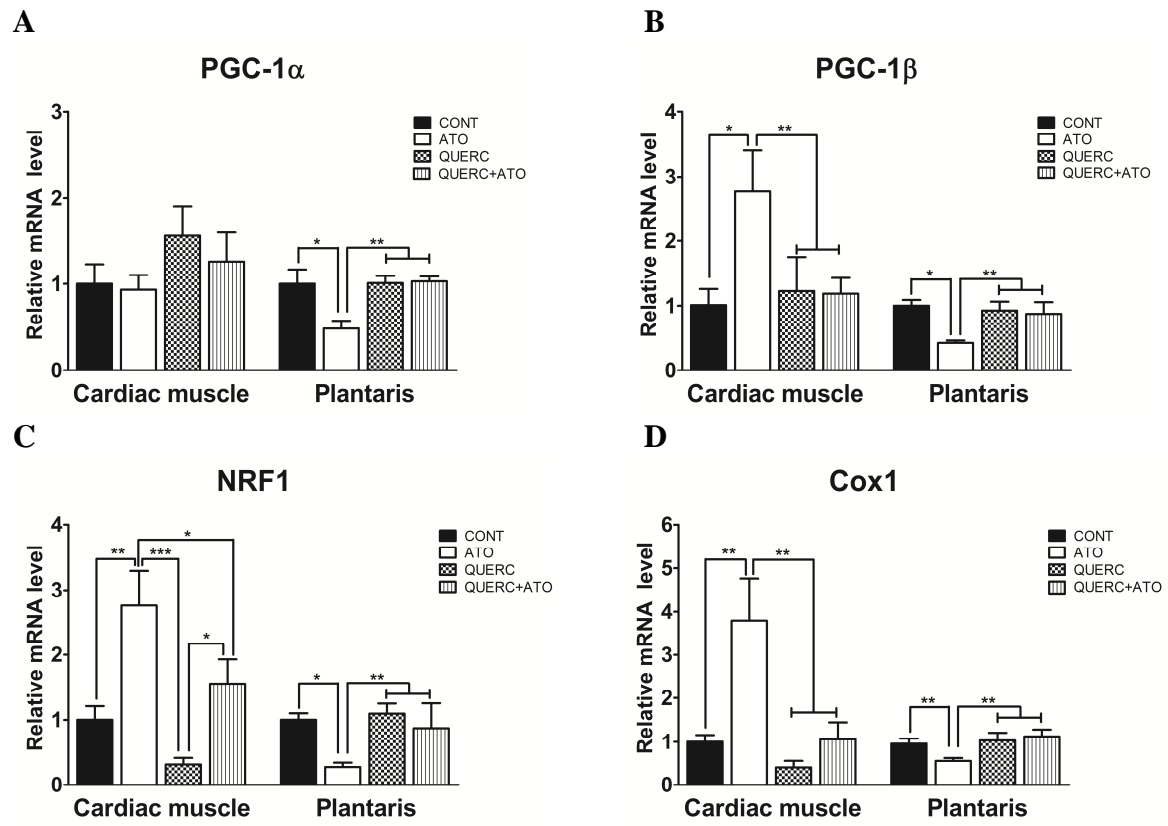
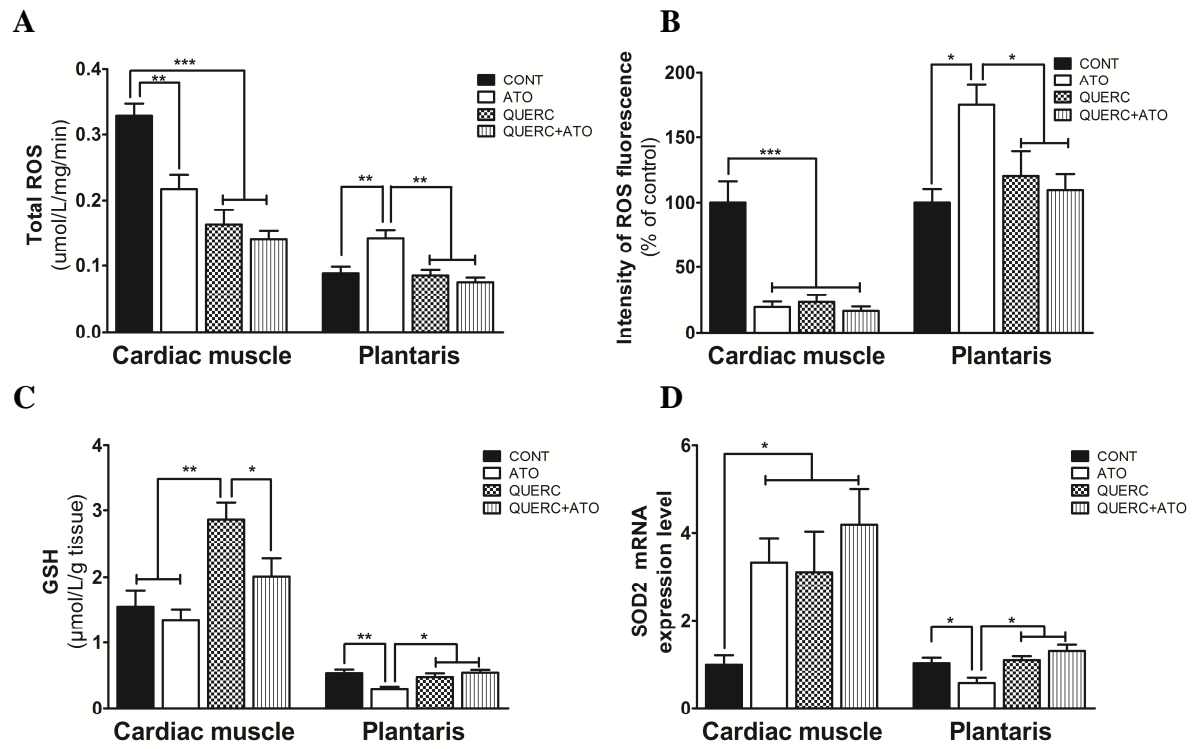


Figure 2

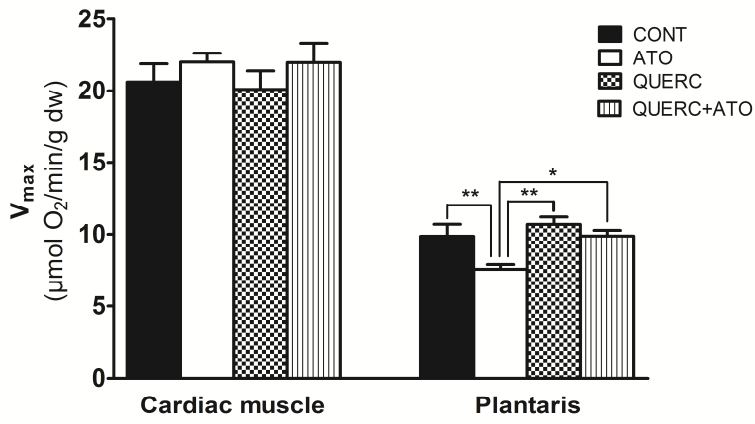


**Figure 3**

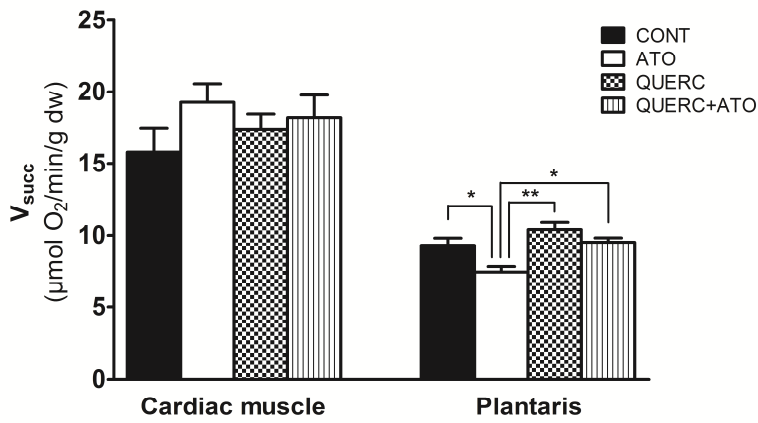


**Figure 4**

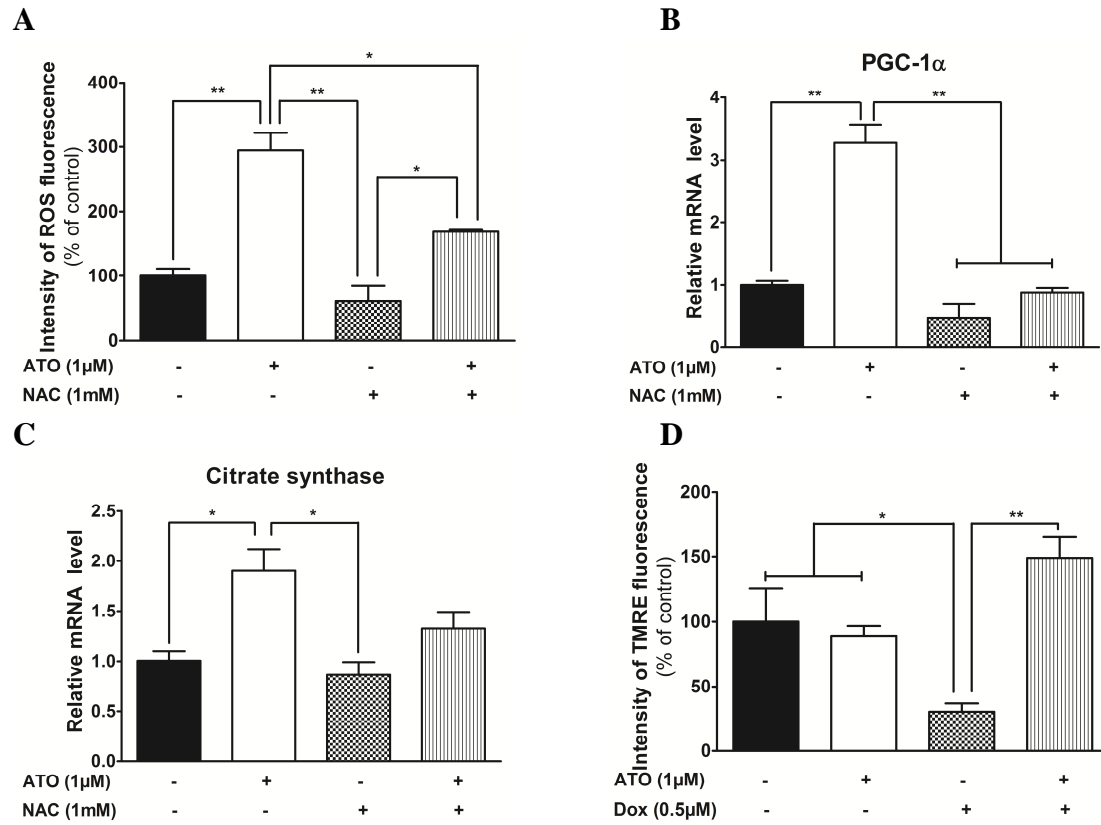
**A**



**B**



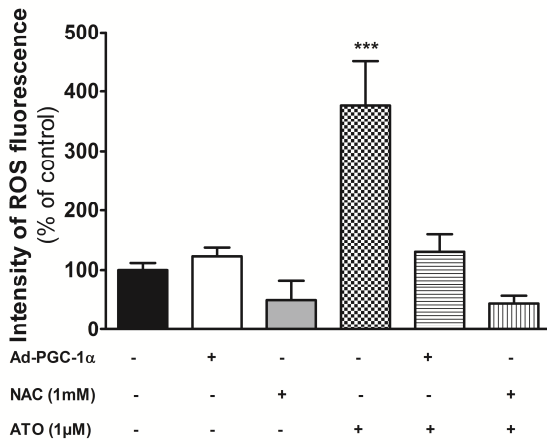
**Figure 5**



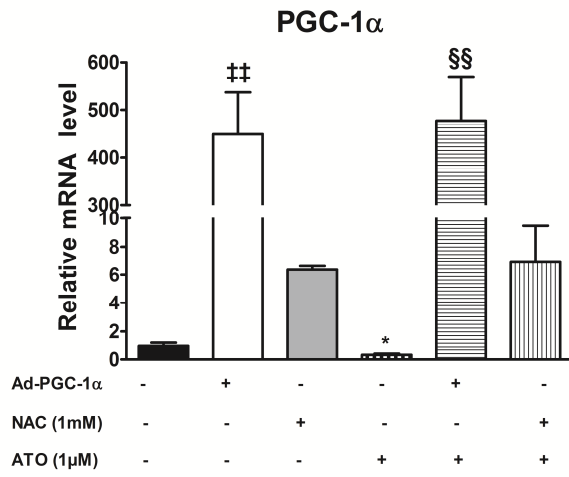


**Figure 6**

**A**

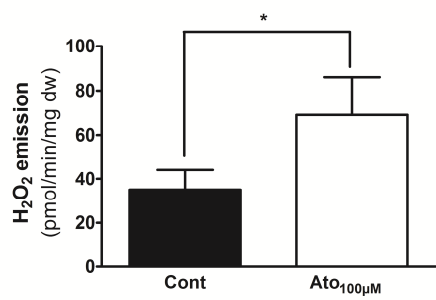


**B**



**Figure 7**

**A**



**B**

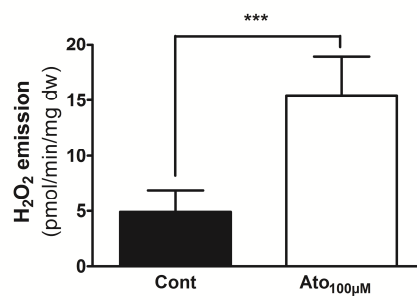
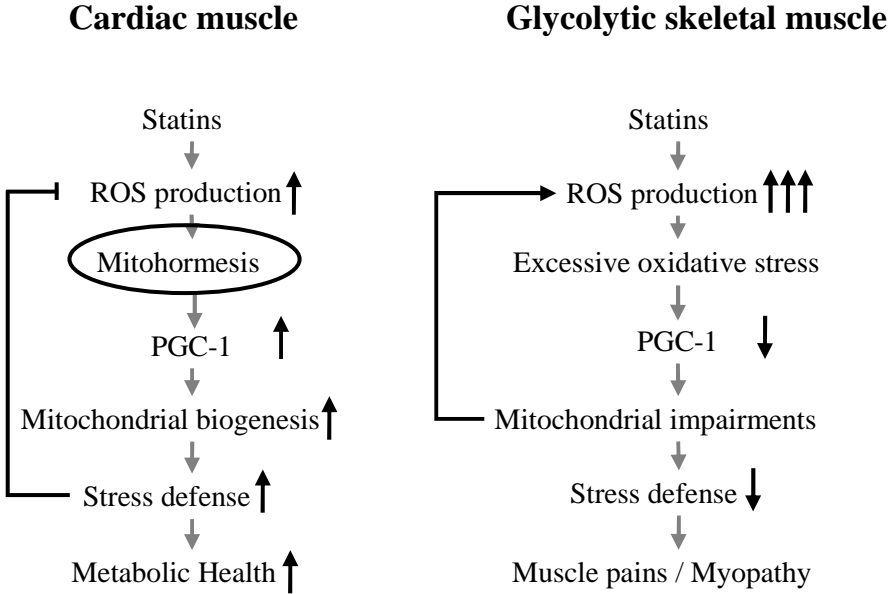


Figure 8



## **SUPPLEMENTAL MATERIALS**

### **Supplemental methods**

#### **Tissue processing**

Animals were anesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital 0.1ml/100g body weight. Left ventricle and the superficial part of the plantaris were excised and cleaned of adipose and connective tissues. Muscles are classified in function of mitochondrial content, myoglobin, lipid and glycogen content. Oxidative cardiac muscle is a muscle with high mitochondrial content whereas glycolytic plantaris muscle is a muscle with low mitochondrial content. A part of each muscle tissue was immediately frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen, and stored for a later analysis.

#### **Total Cholesterol and HDL-Cholesterol determination**

Blood was collected by cardiac puncture, soon before death, in ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) rinsed tubes and then centrifuged at 3400 rpm for 15 min at 4°C. The plasma was separated and stored at -20°C until assay. The analysis of plasma biochemical parameters were performed on randomly selected plasma samples. Total cholesterol and HDL-cholesterol were performed by standard spectrophotometric analysis by using diagnostic kit (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

#### **Study of muscle mitochondrial respiration**

This technique ensured determination of global mitochondrial function, reflecting both the density as well as the functional properties of the muscle mitochondria (1, 2). The mitochondrial respiration was studied from saponin-skinned fibers that keeping mitochondria in their architectural environment. After the determination of the basal oxygen consumption ( $V_0$ ), the maximal respiration rate was measured at 22.1°C under continuous stirring in the

presence of saturating amount of adenosine diphosphate (ADP; 2 mmol/L), a phosphate acceptor ( $V_{\max}$ ) with glutamate (5mmol/L) and malate (2mmol/L) as substrates. When  $V_{\max}$  was recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV. Complex I was blocked with amytal (2 mmol/L) and complex II was stimulated with succinate (25 mmol/L). Mitochondrial respiration in these conditions allowed determining complexes II, III, IV activities ( $V_{\text{succ}}$ ). After the experiments, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C and respiration rates were expressed as  $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight.

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in Permeabilized Fibers**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured with Amplex Red reagent (Invitrogen), which reacted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a 1:1 stoichiometry catalyzed by HRP (Horse Radish Peroxidase; Fluka Biochemika) to yield the fluorescent compound resorufin and molar equivalent O<sub>2(3)</sub>. Resorufin has excitation/emission characteristics of 563/587 nm and was extremely stable once formed. Fluorescence was measured continuously [change in fluorescence ( $\Delta F$ )/sec] with a Fluoromax 4 (Jobin Yvon) spectrofluorometer with temperature control and magnetic stirring. After a baseline,  $\Delta F$  (reactants only) was established; the reaction was initiated by addition of a permeabilized fiber bundle to 600  $\mu\text{l}$  of buffer Z with glutamate (5 mmol/L) and malate (2 mmol/L) as substrates. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production rate was calculated from the slope of  $\Delta F/\text{sec}$ , after subtracting background, from a standard curve established with the appropriate reaction conditions. At the conclusion of each experiment, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was expressed as pmol/min/mg dry weight.

### **Electron paramagnetic resonance (EPR)**

Small portions (15-20 mg) of different muscles from each animal were minced and placed into a 24-well plate with Krebs Hepes Buffer containing 25  $\mu\text{mol/L}$  deferoxamin and 5

$\mu\text{mol/L}$  DETC. Tissues were then washed twice with the same buffer and incubated at  $37^\circ\text{C}$  with the spin probe CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine HCl) for 30 minutes under 20 mmHg of oxygen partial pressure using Gas-Controller (Noxygen Sciences Transfer, Elzach, Germany). The incubation of tissues was stopped by placing the plate on ice. All tissue EPR experiments measuring the concentration of oxidized CM were conducted at  $15^\circ\text{C}$  in disposable capillary tubes as previously described (4). Detection of ROS was conducted under the following EPR settings: center field  $g = 2.002$  ; field sweep 60G; microwave power 21.85mW; modulation amplitude 2.48G; conversion time 10.24ms; time constant 40.96 ms.

### **Dihydroethidium staining**

Frozen muscles were cut on serial sections (10  $\mu\text{m}$ -thicks) with a cryostat microtome and thaw mounted into glass slides. After air-drying, slides were incubated (30 min at  $37^\circ\text{C}$ ) with dihydroethidium (DHE; 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ). DHE produced red fluorescence when oxidized to ethidium bromide (EtBr) by superoxide anion (5). After staining, sections were rinsed, air dried, mounted in Vectashield® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and coverslipped.

For isolated cells, ROS production was measured by DHE staining (10 $\mu\text{mol/L}$ ). We measured the fluorescence intensity of 20–24 isolated cells for each condition and then averaged values. They examined under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E800) with a 20X epifluorescence objective for tissues and 40X for cells and emission signal was recorded with a Zeiss 573-637 nm filter. We analyzed micrographs with Adobe Photoshop 6.0 (USA). The results were reported in percentage of control group.

### **Measurement of GSH**

GSH was measured in different tissues according to the Akerboom and Sies method (6) by monitoring the reduction of 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) by GSH at 412 nm. To determine the total glutathione content, tissue samples were mixed with cold 5% 5-sulfosalicylic acid, after 10-min incubation on ice, the mixture was centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C to remove proteins. The samples were then diluted (1/10) in 0.1 mol/L cold MOPS buffer containing 1 mmol/L EDTA, 0.3 mmol/L NADPH, 0.22 mmol/L DTNB, and thereafter diluted one more time (1/2 to 1/10) in MOPS, at ambient temperature. The diluted sample was added to a mixture of 10 µl glutathione reductase (24 units/ml) and 100 µl MOPS (0.1 mol/L). The absorbance was continuously monitored for 1 min, as an index of DTNB reduction by GSH.

### **Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (q-RT-PCR)**

Total RNA was obtained from muscles and cardiomyocytes using Trizol reagent™ (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA), as previously described (7) and following manufacturer indications. RNA was stored at -70°C until the reverse transcription reaction being performed. cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamer primers. To perform the real time PCR reaction, 2.5 µL of cDNA was used in a final volume of 8 µL, containing 10 µmol/L of each primer (sense and antisense), and SYBR green (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA) as fluorescent dye and H<sub>2</sub>O. The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed in triplicate using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the LightCycler System (Roche Diagnostics, Meylan, France). The sequences of the primers were designed using information contained in the public database GeneBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The

sequences of the primer sets used are listed on Supplemental Data Table 3. Quantification of gene expression was carried out by the method described by (8), using glucocerebrosidase (GCB) gene as inner control, which is the most stable gene for real time RT-PCR measurements in muscles. Amplification efficiency of each sample was calculated as described by (9).

### **Cell culture**

H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> and L<sub>6</sub> Woody cells were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM media with 10% and 20% fetal calf serum (FCS) respectively. They were incubated with atorvastatin (1μmol/L) with or not N-AcetylCysteine (1mmol/L; Sigma) during 48 hours. H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> cells were incubated with doxorubicin (0.5μmol/L) during one hour.

### **Adenoviral infection of myotubes**

The adenoviral expression vector for PGC-1α was kindly provided by Dr. J. Auwerx (10). L<sub>6</sub> Woody skeletal muscle cells were considered as myotubes after 5 days of differentiation. Differentiation was induced by switching to DMEM 1g/l glucose containing 2.5% fetal calf serum (FCS). Then, cells were washed with PBS and left for 1 hr in serum-free DMEM 1g/l glucose containing the appropriate amount of viral particles (moi = 100 per each virus used). Media was replaced with fresh differentiation media for an additional 48 hr before any treatment took place. The differentiation was confirmed by q-RT-PCR.

### **Analysis of mitochondrial membrane potential**

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was assessed by tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE; Molecular Probes). TMRE (100 nmol/L) was loaded for 20 minutes in the dark at 37°C. Cardiac myocytes were subjected to an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse



E800) with a 40X epifluorescence objective and emission signal was recorded with a Zeiss 573-637 nm filter. We measured TMRE fluorescence intensity in 20-25 isolated cardiomyocytes from each condition (Adobe Photoshop 6.0, USA).

## Supplemental Figures Legends

### Supplemental Figure 1

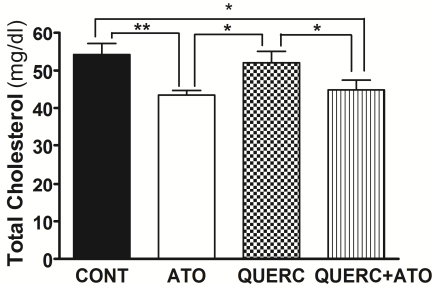
**Plasma analysis.** Total cholesterol (A), HDL (B) and CPK (C) measured in different groups.

Values were represented as mean±SEM; n=8 animals/group; \* $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ .

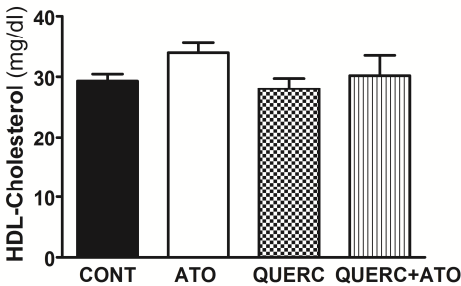
Supplemental Figures

Supplemental Figure 1

A



B



## Supplemental Tables

**Supplemental Table 1. Human Atrial Muscle Biopsies from Patients.**

<b>Group</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Sex</b>	<b>Statin molecule and dosing</b>	<b>Pre-operative medications</b>	<b>Clinical characteristics</b>	<b>LVEF (%)</b>
<b>Patients treated with statins (STAT)</b>	84	F	Atorvastatin 10 mg/d	Diuretic ARB	Hypertension	58
	66	M	Atorvastatin 10 mg/d	Beta-blocker ACE inhibitor Insulin Aspirin	Smoking	57
	89	F	Rosuvastatin 10 mg/d	ACE inhibitor Diuretic	Hypertension	61
	61	M	Simvastatin 20 mg/d	Beta-blocker Aspirin	Smoking	64
	68	M	Simvastatin 10 mg/d	Beta-blocker ACE inhibitor Aspirin	Hypertension Smoking	62
	74	M	Atorvastatin 80 mg/d	Beta-blocker ACE inhibitor ARB	Hypertension	59
<b>Patients non treated with statins (CONT)</b>	76	M	NA	NA	Hypertension	75
	53	M	NA	NA	Smoking	60
	51	M	NA	ACE inhibitor Diuretic	NA	41
	68	M	NA	NA	Smoking	66
	65	M	NA	ARB	Hypertension Smoking	70
	73	M	NA	Diuretic	Hypertension	45
	77	M	NA	NA	NA	62
69	M	NA	ARB	Hypertension	60	

ARB: Angiotensin II Receptor Blockers; ACE inhibitor: Angiotensin Converting Enzyme

Inhibitor; LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction; F: female; M: male; N: normal; NA: not applicable.

**Supplemental Table 2. Human Deltoid Muscle Biopsies from Patients.**

<b>Group</b>	<b>Sex</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Symptoms</b>	<b>CK levels (U/L)</b>	<b>EMG</b>	<b>Muscle pathology</b>	<b>Statin molecule, dosing, and treatment duration</b>
<b>Patients with statin-induced myopathy (M-STAT)</b>	F	58	Muscle pain and weakness	180	Myogenic features	N	Pravastatin 20 mg/d 6 months
	M	82	Muscle pain and weakness	1200	Myogenic features	Myopathic changes	Simvastatin 20 mg/d 24 months
	F	66	Muscle pain and weakness	190	N	Myopathic changes	Rosuvastatin 10 mg/d 60 months
	F	41	Muscle pain and weakness	5000	N	N	Atorvastatin 20 mg/d 48 months
	M	53	Muscle pain and weakness	340	Myogenic features	Myopathic changes	Simvastatin 20 mg/d 48 months
<b>Normal subjects (M-CONT)</b>	M	69	NA	N	N	N	NA
	F	60	NA	N	N	N	NA
	F	49	NA	N	N	N	NA
	M	47	NA	N	N	N	NA
	M	46	NA	N	N	N	NA

CK: creatine kinase; EMG: electromyography; F: female; M: male; N: normal; NA: not applicable; Normal CK levels: < 200 U/L.

### Supplemental Table. 3 Primer Sequences Used for Quantitative Real-Time PCR

#### Amplification.

Target gene	Organism	Forward primer 5' ----->3' Reverse primer 5' ----->3'	Accession number
PGC-1 $\alpha$	human	GCTGACAGATGGAGACGTGA TAGCTGAGTGTGGCTGGTG	NM 013261
PGC-1 $\beta$	human	TTATGCCTCCCTCACACCTC TGAAGCTGCGATCCTTACCT	NM 133263
SOD1	human	TGGCCGATGTGTCTATTGAA ACCTTTGCCCAAGTCATCTG	NM 000454
SOD2	human	GGTTGTTACGTAGGCCG CAGCAGGCAGCTGGCT	NM 001024466
GCB	human	TGGGCATTAAGGGACAGAG GGGAAAGTGAGTCACCCAAA	M19285
PGC-1 $\alpha$	rat	CACCAAACCCACAGAGAACAG GCAGTTCAGAGAGTTCACA	NM 031347
PGC-1 $\beta$	rat	CCCCAGTGTCTGAAGTGGAT TCTGGAAGTGGAGGCTGGTCT	NM 176075
NRF1	rat	GGCCCTTAACAGTGAAGCTG CATCTGGGCCATTAGCATCT	NM 001100708
SOD2	rat	CTGGACAAACCTGAGCCCTA GAACCTTGGACTCCCACAGA	NM 017051
Citrate synthase	rat	TATGGCATGACGGAGATGAA CATGGACTTGGGCCTTTCTA	DQ 403126
Cox1	rat	CCAGAGTCATGAGTCGAAGGA AGGCGCATGAGTACTTCTCGG	YP 665631
GCB	rat	GCACAACCTTCAGCCTCCCAGA CTTCCCATTACCGCTCCATT	BC 166732

## Supplemental References

1. Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, Mettauer B. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 2002; **543**:191-200.
2. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 1987; **892**:191-196.
3. Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; **290**:C844-851.
4. Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS, Zafari AM. Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochemical pharmacology* 2007; **73**:972-980.
5. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Munzel T. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 2001; **103**:2188-2194.
6. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; **77**:373-382.
7. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 2004; **113**:1408-1418.

8. Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 2002; **302**:52-59.
9. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003; **339**:62-66.
10. Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakci C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* 2010; **11**:213-219.



# **DISCUSSION GENERALE**

Les statines représentent la principale classe d'hypolipémiants qui diminuent le cholestérol total et le LDL-cholestérol. Elles sont très souvent prescrites et ont démontré une très grande efficacité pour prévenir les maladies cardiovasculaires. Il est important de noter que les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité dans la plupart des pays industrialisés. Elles résultent entre autres du développement de l'athérosclérose sous l'influence de multiples facteurs de risque dont l'hypercholestérolémie. Cette pathologie est traitée par les statines qui ont progressivement et profondément modifié la façon d'appréhender la prévention des complications cardiovasculaires ischémiques.

Cependant, elles sont aussi connues pour induire des problèmes musculaires allant de la myalgie à la myopathie avec une incidence de 5 à 7% (Maron, 2000; Sirvent *et al.*, 2008). Si le traitement est maintenu, une nécrose musculaire et une rhabdomyolyse peut apparaître avec une incidence de 0.04-0.2% (Ballantyne *et al.*, 2003).

La problématique qui se pose est donc la suivante : comment une même molécule peut-elle avoir des actions contradictoires sur des muscles striés ? En effet, elle est décrite comme étant protectrice au niveau du muscle cardiaque mais délétère dans le muscle squelettique.

### **1) Statines et exercice physique : est-ce une bonne chose pour la mitochondrie musculaire ?**

Il a été clairement établi que l'exercice permet des effets bénéfiques sur le métabolisme, la fonction mitochondriale et les systèmes de défense antioxydant (Zoll *et al.*, 2002; Zoll *et al.*, 2006; Daussin *et al.*, 2007; Daussin *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'exercice semble également augmenter le développement de myopathies chez des patients traités avec des statines (Sinzinger & O'Grady, 2004). Nous avons pu montrer qu'un entraînement modéré durant 10 jours aboutit à une augmentation des capacités oxydatives maximales uniquement dans le muscle plantaris. Ce résultat corrobore un certain nombre d'études qui démontrent que le muscle oxydatif n'est pas sensible à l'entraînement (Terblanche *et al.*, 2001; Matiello *et al.*, 2010) alors que d'autres études montrent une augmentation des capacités oxydatives dans le muscle glycolytique (Lumini-Oliveira *et al.*, 2009). Par ailleurs, il protège partiellement des effets délétères de l'atorvastatine sur les capacités oxydatives maximales dans les muscles oxydatifs et glycolytique. Ceci se démontre par le fait que la concentration qui inhibe 50% des capacités oxydatives maximales (IC<sub>50</sub>) augmente chez les rats entraînés. Cela nous montre que l'entraînement en préventif permet de se défendre contre les effets délétères des statines. Nous pensons que cet effet passerait par des adaptations cellulaires notamment au niveau des

capacités antioxydantes induites par l'entraînement, ce qui protégerait la fonction mitochondriale contre les effets délétères des statines.

Ainsi, dans la deuxième partie de notre étude, nous avons comparé un groupe de rats traités avec de l'atorvastatine à 10mg/kg/jour sur une durée de 14 jours avec un autre groupe de rats contrôle. Ils étaient également soumis à une épreuve physique exhaustive le jour du sacrifice pour observer les effets de l'exercice aigu suite à la prise de statine. En effet, les patients traités avec des statines présentent des problèmes musculaires durant et après un exercice (Franc *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est reporté que sur un groupe de 22 athlètes professionnels, seulement 20% tolèrent les statines en raison de l'apparition de douleurs musculaires pendant et après un exercice physique et ces effets secondaires peuvent apparaître avec ou sans augmentation du niveau de créatine kinase, qui est une enzyme mesurée dans le plasma caractérisant les dommages causés aux muscles (Sinzinger & O'Grady, 2004). Dans notre étude, les rats traités avec l'atorvastatine ont une durée d'épreuve d'effort inférieure aux rats contrôles alors qu'aucune différence n'est observée pour le lactate avant et après l'épreuve d'effort entre ces deux groupes. Des différences significatives ont été observées pour certains de ces mêmes paramètres suite à un traitement de deux semaines mais avec une autre statine, la cérivastatine, qui a été retiré du marché en 2001 suite à une cinquantaine de rhabdomyolyse (Ballantyne *et al.*, 2003). En effet, suite à ce traitement, le poids du muscle gastrocnémien (muscle glycolytique) avait diminué significativement alors que le soléaire restait protégé. Par ailleurs, le lactate avait augmenté significativement ( $p < 0,05$ ) chez les rats traités à la cérivastatine (1mg/kg/jour) comparés au rats contrôles. Ceci s'explique par le fait que le lactate s'est accumulé dans le muscle et le compartiment sanguin plus rapidement chez les rats traités à la cérivastatine suite à des dysfonctionnements des mitochondries, ce qui pourrait contribuer à l'apparition plus rapide de la fatigue lors de la réalisation d'un exercice. Cependant, les propriétés spécifiques de ces médicaments qui mènent à des effets différents sur la mitochondrie musculaire sont inconnues. Des résultats contradictoires existent sur le fait que l'exercice accentue ou pas les dommages causés aux muscles (Reust *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1997). Il est possible que l'exercice physique augmente l'incidence des dommages aux muscles suite à la prise de statines car il augmente le flux sanguin et par conséquent augmente la concentration de ce médicament dans les tissus musculaires actifs. La cérivastatine semble accentuer les dommages causés aux muscles suite à une épreuve d'effort. Ceci a pu être mis en évidence par microscopie électronique, par la

visualisation des dégâts au niveau de la structure des fibres musculaires et notamment au niveau de la mitochondrie.

Par contre, nous avons mis en évidence une activation de la fonction mitochondriale suite à la réalisation de l'exercice, ce qui avait déjà été observé dans des études réalisées chez l'Homme où les capacités oxydatives musculaires étaient augmentées d'environ 20% après la réalisation d'un exercice intense (Tonkonogi et al., 1998). De façon intéressante, l'atorvastatine empêche l'augmentation de la  $V_{max}$ , ce qui n'avait jamais été démontré. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la statine empêche l'activation de la respiration mitochondriale lors de l'exercice en inhibant l'activation des complexes de la chaîne respiratoire, et notamment le complexe I, ce qui pourrait contribuer à la diminution de la capacité à l'exercice que nous observons chez les rats traités à l'atorvastatine.

## 2) Les statines ont des effets différents en fonction du type de muscle

Dans l'étude suivante, notre but était de démontrer que l'atorvastatine (Tahor<sup>®</sup>) avait comme cible la mitochondrie. Nous avons mis en évidence dans le protocole aigu une altération globale de la fonction mitochondriale suite à l'injection de l'atorvastatine *in vitro*. Cette altération est dose dépendante et elle touche plusieurs muscles ayant des phénotypes métaboliques différents. Par ailleurs, la concentration qui inhibe 50% ( $IC_{50}$ ) des capacités oxydatives maximales ( $V_{max}$ ) est supérieure dans les muscles oxydatives. Ces résultats nous indiquent que ces muscles sont mieux protégés que le muscle glycolytique des effets délétères des statines *in vitro*. De plus, l'effet délétère de la statine ne semble pas spécifique de telle ou telle enzyme mais semble toucher l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, dans la littérature il avait été démontré que la simvastatine bloque spécifiquement le complexe I de la chaîne respiratoire (Sirvent *et al.*, 2005a) et ceci aussi bien chez l'homme que chez le rat. Si on compare notre étude à celle de Sirvent et al., l'atorvastatine inhibe la respiration mitochondriale pour des faibles concentrations à partir de 4 $\mu$ M alors la simvastatine l'inhibe à partir de 10 $\mu$ M. Cette différence pourrait s'expliquer par les propriétés physico-chimiques qui existent entre ces 2 molécules notamment en terme de lipophilicité (Katsiki *et al.*, 2010). De façon intéressante, il a été démontré que l'atorvastatine est plus néfaste que la simvastatine avec cette même technique mais sur des mitochondries isolées (Kaufmann et al., 2006). Par ailleurs, une étude menée sur 18 biopsies musculaires humaines traitées avec deux statines différentes a montré que la simvastatine possède un

faible taux d'apparition de myalgie alors qu'il est élevé avec l'atorvastatine (Silva et al., 2006). Ceci pourrait également expliquer les différences observées entre ces deux statines lipophiles.

En plus de l'effet direct de l'atorvastatine que nous avons donc pu mettre en évidence dans cette première partie, il est connu qu'un tel traitement va inhiber le mévalonate et donc la synthèse de cholestérol ainsi que de l'ubiquinone, ce qui va potentiellement entraîner une fragilisation de la membrane musculaire et provoquer des dysfonctionnements des complexes de la chaîne respiratoire (Evans & Rees, 2002). Pour essayer de comprendre à quel niveau l'atorvastatine inhibe la fonction mitochondriale, nous avons étudié quels étaient les effets de l'atorvastatine sur la production des radicaux libres. Pour cela, nous avons choisi une concentration de 100  $\mu\text{M}$  d'atorvastatine, afin de se situer à la concentration qui provoque une inhibition d'environ 50% de la vitesse de respiration mitochondriale dans les différents muscles. Nous avons mis en évidence une augmentation de la production de radicaux libres uniquement dans le muscle glycolytique alors que le muscle cardiaque semble être protégé. Ceci s'explique par le fait que les capacités antioxydantes sont plus importantes dans les muscles oxydatifs. Donc, ces résultats suggèrent que les statines agissent différemment selon le phénotype musculaire en fonction du capital antioxydant présent dans ce muscle.

Ces deux premières études ont permis de distinguer les effets des statines en fonction du phénotype musculaire. Ces effets délétères s'exercent préférentiellement dans le muscle glycolytique et un entraînement en endurance prévient, au moins en partie, de ces effets délétères dans ce type musculaire.

### **3) Les statines agissent selon le concept du « mitohormesis »**

Plusieurs études précédentes ont montré des effets délétères des statines sur le muscle squelettique alors qu'il a été clairement établi dans la littérature que les statines ont des effets bénéfiques dans le muscle cardiaque. L'objectif suivant a été de comprendre pourquoi une même molécule pouvait avoir des effets bénéfiques au niveau cardiaque et délétère au niveau du muscle squelettique.

Sur des groupes de patients traités ou non avec des statines, nous avons montré que dans l'oreillette humaine (muscle oxydatif), ce traitement active la biogenèse mitochondriale, augmente des capacités oxydatives maximales. En augmentant les facteurs contrôlant cette biogenèse, les statines protègent le muscle cardiaque humain contre le stress métabolique en

augmentant les capacités antioxydantes et en diminuant la production de radicaux libres. Par contre dans le muscle deltoïde humain de patients souffrant de myopathies induites par les statines (muscle mixte à majorité de fibres glycolytiques (Fayet *et al.*, 2001), nous avons montré que ce traitement désactive la biogenèse mitochondriale en diminuant les niveaux d'expression de PGC-1 $\alpha$  et PGC-1 $\beta$ . Ce traitement va diminuer les capacités oxydatives maximales, va diminuer les capacités antioxydantes et va augmenter la production des radicaux libres. Il semblerait donc que l'atorvastatine exerce son action délétère préférentiellement sur des muscles squelettiques glycolytiques. Ceci confirme des études indiquant que les muscles oxydatifs seraient insensibles aux dommages engendrés par la cérvastatine (Seachrist *et al.*, 2005). Une étude récente a montré qu'un traitement chez l'Homme à une forte dose de simvastatine (80mg/kg/jour) induit une augmentation du stress oxydant dans les fibres du muscle gastrocnémien (glycolytique), menant à la destruction des mitochondries et à la réduction du niveau de l'ADN mitochondrial (Schick *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été montré que, dans le muscle squelettique de patients traités avec des statines n'ayant pas induit de myopathies, les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la fonction mitochondriale n'étaient pas changés suite à ce traitement. Ces résultats suggèrent que la régulation de la biogenèse mitochondriale serait spécifiquement altérée dans le muscle squelettique de patients souffrant de myopathies induites par les statines.

Pour rentrer un peu plus dans les mécanismes mis en jeu dans ces effets, nous avons réalisé un protocole animal. L'hypothèse de notre travail est que ces effets contradictoires dans ces deux phénotypes musculaires avaient pour dénominateur commun le stress oxydant qui serait différent suite au traitement avec l'atorvastatine. Nous avons démontré dans cette étude que le traitement de deux semaines avec l'atorvastatine à une dose de 10mg/kg/jour entraîne sur le muscle cardiaque une activation de la biogenèse mitochondriale, une augmentation des capacités antioxydantes, une diminution du stress oxydant et une conservation des capacités oxydatives. Ces résultats confirment ceux observés chez l'Homme. Pour démontrer le rôle central du stress oxydant, nous avons co-traité des rats avec la quercétine, un antioxydant qui est un flavonoïde présent chez les plantes comme métabolite secondaire. De façon très intéressante, tous les effets bénéfiques observés dans le muscle cardiaque disparaissent avec ce co-traitement avec l'antioxydant. Pour rentrer encore plus dans la mécanistique et comprendre le schéma d'action des statines dans ces muscles, nous avons utilisé des cultures cellulaires de cardiomyocytes H<sub>9</sub>C<sub>2</sub>. Nous avons démontré que l'atorvastatine entraîne une augmentation de la production de radicaux libres dans les cardiomyocytes, ce qui va activer la

biogénèse mitochondriale puisque lorsque nous incubons ces cellules avec un antioxydant, la NAC, on ne retrouve pas cette activation.

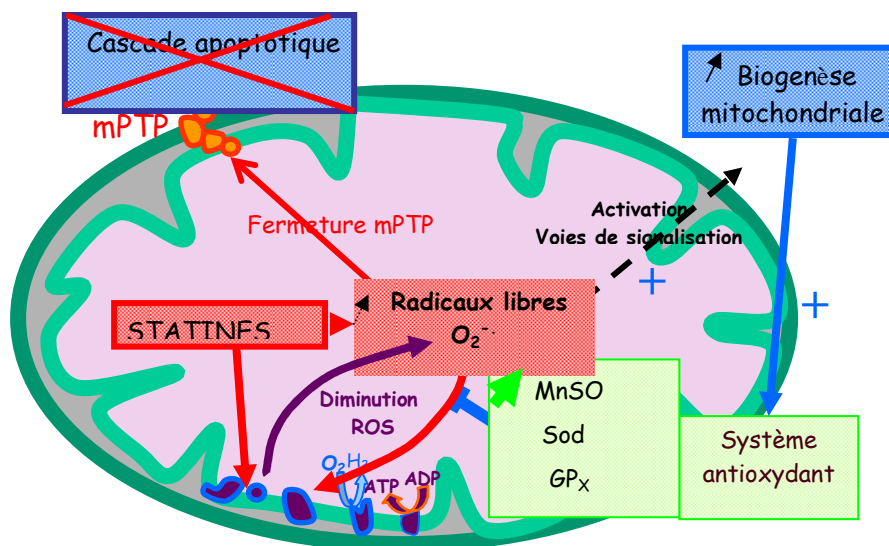
Ces résultats suggèrent qu'une exposition aux statines augmente la production de ROS alors que par contre, après deux semaines de traitement, les capacités antioxydantes sont augmentées et la concentration de ROS dans le muscle est diminuée. Ainsi, il semble donc que l'augmentation de la production des ROS en aigu suite à la prise de statines améliorerait la fonction mitochondriale et les capacités antioxydantes ce qui permettrait de réduire la concentration des ROS après plusieurs jours de traitement. Ensuite, nous voulions démontrer l'effet protecteur de ces statines sur des cardiomyocytes suite à un stress chimique avec la doxorubicine connue pour sa cardiotoxicité. Nous avons montré que l'incubation des cardiomyocytes avec de l'atorvastatine prévient la cardiotoxicité de la doxorubicine en réduisant la diminution du potentiel de membrane mitochondriale. Ces résultats sont en accordance avec des études qui ont démontré que les statines avaient des propriétés antioxydantes (Davignon *et al.*, 2004) et atténuaient la dépolarisation de la membrane mitochondriale après une exposition à un stress oxydant dans des cardiomyocytes (Jones *et al.*, 2003).

A l'opposé dans le muscle plantaris (glycolytique), ce même traitement chez le rat entraîne une désactivation de la biogénèse mitochondriale, une diminution des capacités antioxydantes, une augmentation du stress oxydant et une diminution des capacités oxydatives. Par contre, tous les effets délétères disparaissent avec ce co-traitement avec la quercétine. Ces résultats suggèrent que la quercétine protège la fonction mitochondriale du muscle glycolytique des effets délétères de l'atorvastatine. Ce traitement avec un antioxydant démontre clairement pour la première fois le rôle central des radicaux libres dans les phénomènes observés dans le muscle cardiaque et squelettique. Sur des myoblastes, l'atorvastatine en aigu va augmenter les radicaux libres de façon excessive, ce qui va désactiver la biogénèse mitochondriale. Lorsque nous incubons ces cellules avec la NAC, on inhibe cet effet délétère. En surexprimant PGC-1 $\alpha$  dans ces myotubes, nous n'observons plus ces effets délétères.

Cette étude a clarifié les études contradictoires dans la littérature en démontrant que les statines agissent selon le concept de « mitohormesis ». L'hormesis est défini comme l'activation des propriétés cellulaires protectrices et réparatrices induites par un stress physiologique modéré (Schwartz & Sack, 2008). Il a été retrouvé pour la première fois dans la restriction calorique qui a permis une augmentation de la capacité de réparation de l'ADN, des défenses antioxydantes et une activation de la biogénèse mitochondriale (Nisoli *et al.*,

2005). Dans une publication récente, Piantadosi et al. ont mis en évidence de nouveaux mécanismes d'interactions entre les ROS produits par les mitochondries et la biogenèse mitochondriale (Piantadosi *et al.*, 2008). L'hydropéroxydation des lipides régule l'expression de TFAM à travers la phosphorylation de NRF1 *via* l'activation Akt qui induit la translocation nucléaire de NRF1 et se lie au promoteur de TFAM. Cela a permis de mettre en évidence que les ROS peuvent constituer une épée à double tranchant : bien que les ROS puissent être toxiques pour les cellules, ils peuvent jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire impliquant notamment les défenses antioxydantes. De façon intéressante, il a été démontré qu'une supplémentation en vitamine C diminue l'efficacité de l'entraînement *via* la réduction de la biogenèse mitochondriale induite par l'exercice (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). Cette observation suggère que les ROS ne peuvent être considérée uniquement que comme des molécules toxiques. Elles peuvent également jouer un rôle important dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale. Les effets des statines dans le muscle strié rentrent complètement dans ce concept.

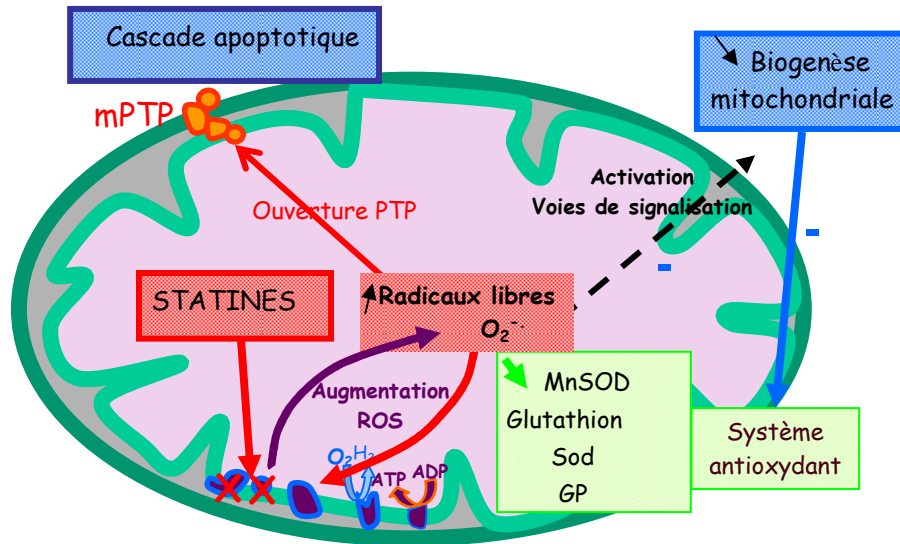
En effet, dans le muscle cardiaque, les statines entraînent en aigu une augmentation modérée des radicaux libres, ce qui à leur tour active la biogenèse mitochondriale qui à son tour augmente les capacités antioxydantes qui se traduit par une diminution des radicaux libres en chronique (Figure 23).



**Figure 23** : Schéma mécanistique proposé des statines sur la mitochondrie du muscle cardiaque.



Par contre, dans le muscle squelettique glycolytique, les statines entraînent une importante augmentation des radicaux libres qui entraînent une désactivation de la biogenèse mitochondriale d'où une diminution des capacités antioxydantes (Figure 24).



**Figure 24** : Schéma mécanistique proposé des statines sur la mitochondrie du muscle squelettique glycolytique.

# **CONCLUSION GENERALE/PERSPECTIVES**

La conservation de l'intégrité des fonctions musculaires est essentielle à l'homéostasie de l'organisme. Les statines ont démontré des avantages importants, en termes de protection cardiovasculaire. Ils ont un nombre important d'effets pléiotropes et ont des effets bénéfiques dans le cadre du traitement de diverses pathologies. Notamment les statines sont utilisés fréquemment dans le cadre du traitement des arythmies ventriculaire, chez les artéritiques, dans différents types de cardiomyopathies, le cancer, l'ostéoporose, le diabète. En 2004, plus de 100 millions de patients étaient traités quotidiennement avec des statines, et ce chiffre ne cesse d'augmenter puisque les maladies cardiovasculaires sont en constante augmentation. Durant cette thèse, nous avons trouvé un nouveau rôle pléiotrope des statines qui consiste en une activation de la biogenèse mitochondriale dans le cœur, permettant d'améliorer le métabolisme cardiaque et les défenses antioxydantes. Cette thèse a également permis de mettre en exergue le rôle central des ROS mitochondriaux dans la cardioprotection suite au traitement par les statines. La modulation de la fonction mitochondriale cardiaque a été proposée comme une nouvelle stratégie dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et les statines rentrent complètement dans cette stratégie. Nous pensons que les efforts apportés pour la protection de la biogenèse mitochondriale induite par les statines pourront améliorer l'index thérapeutique. Cependant, même si les statines sont généralement bien tolérées, elles peuvent entraîner une variété d'effets indésirables allant de la douleur musculaire à la rhabdomyolyse. Nous avons montré que ces statines, sur plusieurs modèles, induisent une production accrue de radicaux libres et une dysfonction mitochondriale, ce qui pourrait expliquer les complications retrouvés suite au traitement par les statines. Nous pensons que l'exercice physique serait un moyen efficace de se protéger des effets indésirables des statines. Ceci fera l'objet d'une étude ou l'on étudiera les effets protecteurs de l'entraînement physique sur ces effets néfastes. Par ailleurs, un co-traitement avec la quercétine qui est une molécule antioxydante naturelle permet de réduire ces effets délétères dans le muscle squelettique. Ces résultats nous donnent beaucoup d'espoir afin de trouver une molécule qui nous permette en plus de garder tous les effets bénéfiques et pléiotropes des statines, de réduire également les effets indésirables retrouvés dans le muscle.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abramson SB. (2001). Controversies in COX-2 inhibitor therapy. Introduction. *Clinical and experimental rheumatology* **19**, S1-2.
- Adam O & Laufs U. (2008). Antioxidative effects of statins. *Archives of toxicology* **82**, 885-892.
- Akerboom TP & Sies H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* **77**, 373-382.
- Anflous K, Blondel O, Bernard A, Khrestchatisky M & Ventura-Clapier R. (1998). Characterization of rat porin isoforms: cloning of a cardiac type-3 variant encoding an additional methionine at its putative N-terminal region. *Biochim Biophys Acta* **1399**, 47-50.
- Assmann G, Cullen P, Fruchart C, Lewis B, Mancini M & Carmena R. (1999). Coronary heart disease prevention task force. *Eur Heart J* **20**, 841-844.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP & Holloszy JO. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J* **16**, 1879-1886.
- Babior BM. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1476.
- Balaban RS, Nemoto S & Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Ballantyne CM, Corsini A, Davidson MH, Holdaas H, Jacobson TA, Leitersdorf E, Marz W, Reckless JP & Stein EA. (2003). Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. *Arch Intern Med* **163**, 553-564.
- Barja G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **31**, 347-366.
- Barth E, Stammli G, Speiser B & Schaper J. (1992). Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *Journal of molecular and cellular cardiology* **24**, 669-681.
- Baysal BE. (2006). Role of mitochondrial mutations in cancer. *Endocrine pathology* **17**, 203-212.

- Beckman KB & Ames BN. (1998). Mitochondrial aging: open questions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **854**, 118-127.
- Belo RS, Jamieson JC & Wright JA. (1993). Studies on the effect of mevinoxin (lovastatin) and mevastatin (compactin) on the fusion of L6 myoblasts. *Mol Cell Biochem* **126**, 159-167.
- Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tourneur Y & Saks V. (2009). Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating HL-1 cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **41**, 195-214.
- Bergman M, Salman H, Djaldetti M, Alexandrova S, Punskey I & Bessler H. (2003). Ultrastructure of mouse striated muscle fibers following pravastatin administration. *Journal of muscle research and cell motility* **24**, 417-420.
- Bernardi P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* **79**, 1127-1155.
- Borisov VB. (2002). Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Molecular aspects of medicine* **23**, 385-412.
- Bossy-Wetzell E, Newmeyer DD & Green DR. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* **17**, 37-49.
- Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A & Rotig A. (1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature genetics* **11**, 144-149.
- Boveris A & Chance B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**, 707-716.
- Boveris A, Oshino N & Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* **128**, 617-630.
- Brand MD. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental gerontology* **35**, 811-820.

- Brooke MH & Kaiser KK. (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of neurology* **23**, 369-379.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW & Greenberg ME. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011-2015.
- Butterworth J, Yates CM & Reynolds GP. (1985). Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *Journal of the neurological sciences* **67**, 161-171.
- Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakci C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR & Auwerx J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* **11**, 213-219.
- Chance B. (1965). Reaction of oxygen with the respiratory chain in cells and tissues. *The Journal of general physiology* **49**, Suppl:163-195.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL & Lesnefsky EJ. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**, 36027-36031.
- Chen YE, Yuan S, Du JB, Xu MY, Zhang ZW & Lin HH. (2009). Phosphorylation of photosynthetic antenna protein CP29 and photosystem II structure changes in monocotyledonous plants under environmental stresses. *Biochemistry* **48**, 9757-9763.
- Corpier CL, Jones PH, Suki WN, Lederer ED, Quinones MA, Schmidt SW & Young JB. (1988). Rhabdomyolysis and renal injury with lovastatin use. Report of two cases in cardiac transplant recipients. *Jama* **260**, 239-241.
- Daussin FN, Ponsot E, Dufour SP, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Geny B, Piquard F & Richard R. (2007). Improvement of [Formula: see text] by cardiac output and oxygen extraction adaptation during intermittent versus continuous endurance training. *European journal of applied physiology* **101**, 377-383.
- Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, Ventura-Clapier R, Mettauer B, Piquard F, Geny B & Richard R. (2008). Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **104**, 1436-1441.

- Davignon J, Jacob RF & Mason RP. (2004). The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* **15**, 251-258.
- Di Giovanni S, Mirabella M, Papacci M, Odoardi F, Silvestri G & Servidei S. (2001). Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome c oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies. *Mol Cell Neurosci* **17**, 696-705.
- Duchen MR. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular aspects of medicine* **25**, 365-451.
- Dudley GA, Abraham WM & Terjung RL. (1982). Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **53**, 844-850.
- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC & Brand MD. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99.
- Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hulthen K, Rustin P, Gustafsson CM & Larsson NG. (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human molecular genetics* **13**, 935-944.
- Evans M & Rees A. (2002). Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same? *Drug Saf* **25**, 649-663.
- Evans MJ & Scarpulla RC. (1989). Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* **264**, 14361-14368.
- Favier J, Briere JJ, Strompf L, Amar L, Filali M, Jeunemaitre X, Rustin P & Gimenez-Roqueplo AP. (2005). Hereditary paraganglioma/pheochromocytoma and inherited succinate dehydrogenase deficiency. *Hormone research* **63**, 171-179.
- Fayet G, Rouche A, Hogrel JY, Tome FM & Fardeau M. (2001). Age-related morphological changes of the deltoid muscle from 50 to 79 years of age. *Acta neuropathologica* **101**, 358-366.
- Fisher RP & Clayton DA. (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* **8**, 3496-3509.
- Flint OP, Masters BA, Gregg RE & Durham SK. (1997). HMG CoA reductase inhibitor-induced myotoxicity: pravastatin and lovastatin inhibit the geranylgeranylation of low-



- molecular-weight proteins in neonatal rat muscle cell culture. *Toxicol Appl Pharmacol* **145**, 99-110.
- Fontaine E, Ichas F & Bernardi P. (1998). A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **273**, 25734-25740.
- Franc S, Dejager S, Bruckert E, Chauvenet M, Giral P & Turpin G. (2003). A comprehensive description of muscle symptoms associated with lipid-lowering drugs. *Cardiovasc Drugs Ther* **17**, 459-465.
- Frye RA. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 273-279.
- Fujioka T & Tsujita Y. (1997). Effects of single administration of pravastatin sodium on hepatic cholesterol metabolism in rats. *European journal of pharmacology* **323**, 223-228.
- Fukami M, Maeda N, Fukushige J, Kogure Y, Shimada Y, Ogawa T & Tsujita Y. (1993). Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscles of rabbits. *Research in experimental medicine* **193**, 263-273.
- Garesse R & Vallejo CG. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1-16.
- Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G & Lenaz G. (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* **505**, 364-368.
- Ghirlanda G, Oradei A, Manto A, Lippa S, Uccioli L, Caputo S, Greco AV & Littarru GP. (1993). Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Pharmacol* **33**, 226-229.
- Giordano N, Senesi M, Mattii G, Battisti E, Villanova M & Gennari C. (1997). Polymyositis associated with simvastatin. *Lancet* **349**, 1600-1601.
- Goll DE, Neti G, Mares SW & Thompson VF. (2008). Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of animal science* **86**, E19-35.

- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J & Vina J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* **87**, 142-149.
- Gordon AM, Regnier M & Homsher E. (2001). Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci* **16**, 49-55.
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Massy ZA, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF & Egido J. (1999). Lipophilic statins induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int Suppl* **71**, S88-91.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D & Cadenas E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* **278**, 5557-5563.
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z & Spiegelman BM. (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* **282**, 30014-30021.
- Hansford RG, Hogue BA & Mildaziene V. (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **29**, 89-95.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* **11**, 298-300.
- Hausenloy D, Wynne A, Duchon M & Yellon D. (2004). Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* **109**, 1714-1717.
- Herrero A & Barja G. (2000). Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **32**, 609-615.
- Hood DA. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **90**, 1137-1157.
- Hoppeler H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International journal of sports medicine* **7**, 187-204.

- Hoppeler H & Lindstedt SL. (1985). Malleability of skeletal muscle in overcoming limitations: structural elements. *The Journal of experimental biology* **115**, 355-364.
- Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O & Straub R. (1985). Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch* **403**, 369-376.
- Huang WC, Chen PC, Jou SB & Cheng JT. (2001). Protein kinase C and changes in manganese superoxide dismutase gene expression in cultured glial cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **28**, 822-825.
- Inoue R, Tanabe M, Kono K, Maruyama K, Ikemoto T & Endo M. (2003). Ca<sup>2+</sup>-releasing effect of cerivastatin on the sarcoplasmic reticulum of mouse and rat skeletal muscle fibers. *J Pharmacol Sci* **93**, 279-288.
- Ji LL, Wu E & Thomas DP. (1991). Effect of exercise training on antioxidant and metabolic functions in senescent rat skeletal muscle. *Gerontology* **37**, 317-325.
- Jobsis FF & Stainsby WN. (1968). Oxidation of NADH during contractions of circulated mammalian skeletal muscle. *Respiration physiology* **4**, 292-300.
- Jones SP, Teshima Y, Akao M & Marban E. (2003). Simvastatin attenuates oxidant-induced mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* **93**, 697-699.
- Kao MC, Di Bernardo S, Matsuno-Yagi A & Yagi T. (2003). Characterization and topology of the membrane domain Nqo10 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **42**, 4534-4543.
- Katsiki N, Tziomalos K, Chatzizisis Y, Elisaf M & Hatzitolios AI. (2010). Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental? *Atherosclerosis* **211**, 9-14.
- Kaufmann P, Torok M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K & Krahenbuhl S. (2006). Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2415-2425.
- Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull DM, Thorburn DR & Taylor RW. (2004). Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *Journal of medical genetics* **41**, 784-789.

- Koretsky AP & Balaban RS. (1987). Changes in pyridine nucleotide levels alter oxygen consumption and extra-mitochondrial phosphates in isolated mitochondria: a  $^{31}\text{P}$ -NMR and NAD(P)H fluorescence study. *Biochim Biophys Acta* **893**, 398-408.
- Korshunov SS, Skulachev VP & Starkov AA. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* **416**, 15-18.
- Krause KH. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese journal of infectious diseases* **57**, S28-29.
- Krebs HA & Johnson WA. (1937). Acetopyruvic acid (alphagamma-diketovaleric acid) as an intermediate metabolite in animal tissues. *Biochem J* **31**, 772-779.
- Kressler D, Schreiber SN, Knutti D & Kralli A. (2002). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* **277**, 13918-13925.
- Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN & Ruuge EK. (1984). Relationships between the effects of redox potential, alpha-thenoyltrifluoroacetone and malonate on  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation by submitochondrial particles in the presence of succinate and antimycin. *FEBS Lett* **175**, 105-108.
- Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, Eichhorn K, Schild L, Striggow F, Bohnensack R, Neuhof S, Grasshoff H, Neumann HW & Gellerich FN. (1993). Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim Biophys Acta* **1144**, 46-53.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC & Walsh K. (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature medicine* **6**, 1004-1010.
- Kushmerick MJ, Moerland TS & Wiseman RW. (1992). Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7521-7525.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* **3**, 965-976.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P & Auwerx J. (2006).

- Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127**, 1109-1122.
- Lardy HA & Wellman H. (1952). Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J Biol Chem* **195**, 215-224.
- LaRosa JC, He J & Vupputuri S. (1999). Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama* **282**, 2340-2346.
- Lawler JM, Hu Z & Barnes WS. (1998). Effect of reactive oxygen species on K<sup>+</sup> contractures in the rat diaphragm. *J Appl Physiol* **84**, 948-953.
- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF & Kelly DP. (2005). PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS biology* **3**, e101.
- Lesnefsky EJ & Hoppel CL. (2003). Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **420**, 287-297.
- Liao JK. (2002). Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* **110**, 285-288.
- Lin J, Handschin C & Spiegelman BM. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* **1**, 361-370.
- Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P & Spiegelman BM. (2002a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* **277**, 1645-1648.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R & Spiegelman BM. (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801.
- Liu Y, Fiskum G & Schubert D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry* **80**, 780-787.

- Lumini-Oliveira J, Magalhaes J, Pereira CV, Aleixo I, Oliveira PJ & Ascensao A. (2009). Endurance training improves gastrocnemius mitochondrial function despite increased susceptibility to permeability transition. *Mitochondrion* **9**, 454-462.
- Ly JD, Grubb DR & Lawen A. (2003). The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**, 115-128.
- MacDonald JS, Gerson RJ, Kornbrust DJ, Kloss MW, Prahalada S, Berry PH, Alberts AW & Bokelman DL. (1988). Preclinical evaluation of lovastatin. *Am J Cardiol* **62**, 16J-27J.
- Marnett LJ. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* **424**, 83-95.
- Maron DJ. (2000). The epidemiology of low levels of high-density lipoprotein cholesterol in patients with and without coronary artery disease. *Am J Cardiol* **86**, 11L-14L.
- Masters BA, Palmoski MJ, Flint OP, Gregg RE, Wang-Iverson D & Durham SK. (1995). In vitro myotoxicity of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin, using neonatal rat skeletal myocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **131**, 163-174.
- Mates JM, Perez-Gomez C & Nunez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry* **32**, 595-603.
- Matiello R, Fukui RT, Silva ME, Rocha DM, Wajchenberg BL, Azhar S & Santos RF. (2010). Differential regulation of PGC-1 $\alpha$  expression in rat liver and skeletal muscle in response to voluntary running. *Nutrition & metabolism* **7**, 36.
- McKelvey TG, Hollwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U & Jones HP. (1988). Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *The American journal of physiology* **254**, G753-760.
- Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O'Rahilly S, Montague C & Vidal-Puig AJ. (2003). Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J* **373**, 155-165.
- Mitchell P. (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* **59**, 137-139.

- Morel Y & Barouki R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* **342 Pt 3**, 481-496.
- Moreno-Sanchez R, Hogue BA & Hansford RG. (1990). Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem J* **268**, 421-428.
- Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T & Munzel T. (2001). Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* **103**, 2188-2194.
- Murphy MP. (1989). Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **977**, 123-141.
- Nakahara K, Kuriyama M, Sonoda Y, Yoshidome H, Nakagawa H, Fujiyama J, Higuchi I & Osame M. (1998). Myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitors in rabbits: a pathological, electrophysiological, and biochemical study. *Toxicol Appl Pharmacol* **152**, 99-106.
- Nakahara K, Yada T, Kuriyama M & Osame M. (1994). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and cell damage in L6 rat myoblasts by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 1579-1585.
- Nemeth P & Pette D. (1981). Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat. *The Journal of physiology* **320**, 73-80.
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S & Carruba MO. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310**, 314-317.
- Ogasahara S, Engel AG, Frens D & Mack D. (1989). Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2379-2382.
- Ogata T & Yamasaki Y. (1997). Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *The Anatomical record* **248**, 214-223.
- Okado-Matsumoto A & Fridovich I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 38388-38393.

- Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A & Suliman HB. (2008). Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res* **103**, 1232-1240.
- Pierno S, Camerino GM, Cippone V, Rolland JF, Desaphy JF, De Luca A, Liantonio A, Bianco G, Kunic JD, George AL, Jr. & Conte Camerino D. (2009). Statins and fenofibrate affect skeletal muscle chloride conductance in rats by differently impairing ClC-1 channel regulation and expression. *British journal of pharmacology* **156**, 1206-1215.
- Pierno S, De Luca A, Tricarico D, Roselli A, Natuzzi F, Ferrannini E, Laico M & Camerino DC. (1995). Potential risk of myopathy by HMG-CoA reductase inhibitors: a comparison of pravastatin and simvastatin effects on membrane electrical properties of rat skeletal muscle fibers. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **275**, 1490-1496.
- Podda M, Weber C, Traber MG & Packer L. (1996). Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone. *Journal of lipid research* **37**, 893-901.
- Ponsot E, Zoll J, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Richard R, Veksler V, Ventura-Clapier R & Mettauer B. (2005). Mitochondrial tissue specificity of substrate utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *Journal of cellular physiology* **203**, 479-486.
- Powers SK, Ji LL & Leeuwenburgh C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and science in sports and exercise* **31**, 987-997.
- Powers SK, Quindry JC & Kavazis AN. (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* **44**, 193-201.
- Prendergast BD & George CF. (1993). Drug-induced rhabdomyolysis--mechanisms and management. *Postgraduate medical journal* **69**, 333-336.
- Rahman S, Taanman JW, Cooper JM, Nelson I, Hargreaves I, Meunier B, Hanna MG, Garcia JJ, Capaldi RA, Lake BD, Leonard JV & Schapira AH. (1999). A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *American journal of human genetics* **65**, 1030-1039.
- Reust CS, Curry SC & Guidry JR. (1991). Lovastatin use and muscle damage in healthy volunteers undergoing eccentric muscle exercise. *West J Med* **154**, 198-200.



- Richter C, Park JW & Ames BN. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6465-6467.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR & Bluher M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8665-8670.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM & Puigserver P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**, 113-118.
- Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A & Rustin P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature genetics* **17**, 215-217.
- Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP & Deriaz O. (2003). 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* **52**, 2874-2881.
- Sacher J, Weigl L, Werner M, Szegedi C & Hohenegger M. (2005). Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **314**, 1032-1041.
- Saks VA, Kaambre T, Sikk P, Eimre M, Orlova E, Paju K, Piirsoo A, Appaix F, Kay L, Regitz-Zagrosek V, Fleck E & Seppet E. (2001). Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* **356**, 643-657.
- Saltin B, Nazar K, Costill DL, Stein E, Jansson E, Essen B & Gollnick D. (1976). The nature of the training response; peripheral and central adaptations of one-legged exercise. *Acta physiologica Scandinavica* **96**, 289-305.
- Sanz A, Caro P & Barja G. (2004). Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **36**, 545-552.
- Sazanov LA. (2007). Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* **46**, 2275-2288.

- Scarpulla RC. (1997). Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **29**, 109-119.
- Scarpulla RC. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1576**, 1-14.
- Scarpulla RC. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* **97**, 673-683.
- Scarpulla RC. (2008). Transcriptional paradigms in Mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* **88**, 611-638.
- Schaper J, Meiser E & Stammer G. (1985). Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ Res* **56**, 377-391.
- Schiaffino S. (2010). Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta physiologica (Oxford, England)* **199**, 451-463.
- Schiaffino S & Reggiani C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* **77**, 493-501.
- Schick BA, Laaksonen R, Frohlich JJ, Paiva H, Lehtimaki T, Humphries KH & Cote HC. (2007). Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients treated with high-dose simvastatin. *Clin Pharmacol Ther* **81**, 650-653.
- Schwartz DR & Sack MN. (2008). Targeting the mitochondria to augment myocardial protection. *Current opinion in pharmacology* **8**, 160-165.
- Seachrist JL, Loi CM, Evans MG, Criswell KA & Rothwell CE. (2005). Roles of exercise and pharmacokinetics in cerivastatin-induced skeletal muscle toxicity. *Toxicol Sci* **88**, 551-561.
- Sentman ML, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S & Marklund SL. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* **281**, 6904-6909.
- Seppet E, Eimre M, Peet N, Paju K, Orlova E, Ress M, Kovask S, Piirsoo A, Saks VA, Gellerich FN, Zierz S & Seppet EK. (2005). Compartmentation of energy metabolism

- in atrial myocardium of patients undergoing cardiac surgery. *Mol Cell Biochem* **270**, 49-61.
- Silva MA, Swanson AC, Gandhi PJ, Tataronis GR, Silva M, Matthews ML, Jarvis C, Nolan NM, Belliveau P, Malloy M & Gandhi P. (2006). Statin-related adverse events: a meta-analysis  
Meta-analysis of drug-induced adverse events associated with intensive-dose statin therapy. *Clin Ther* **28**, 26-35.
- Sinzinger H & O'Grady J. (2004). Professional athletes suffering from familial hypercholesterolaemia rarely tolerate statin treatment because of muscular problems. *Br J Clin Pharmacol* **57**, 525-528.
- Sirvent P, Bordenave S, Vermaelen M, Roels B, Vassort G, Mercier J, Raynaud E & Lacampagne A. (2005a). Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1426-1434.
- Sirvent P, Mercier J & Lacampagne A. (2008). New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Current opinion in pharmacology*.
- Sirvent P, Mercier J, Vassort G & Lacampagne A. (2005b). Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca<sup>2+</sup> signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 1067-1075.
- Skulachev VP. (1996). Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* **397**, 7-10.
- Skulachev VP. (1998). Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* **423**, 275-280.
- Smith PF, Eydeloth RS, Grossman SJ, Stubbs RJ, Schwartz MS, Germershausen JI & MacDonald JS. (1992). Myopathy associated with HMG-CoA reductase inhibitors (HMGRIs) and cyclosporin A: evaluation in a rat model. *European heart journal* **13 Suppl B**, 2-6.
- Sonoda Y, Gotow T, Kuriyama M, Nakahara K, Arimura K & Osame M. (1994). Electrical myotonia of rabbit skeletal muscles by HMG-CoA reductase inhibitors. *Muscle & nerve* **17**, 891-897.
- Spach DH, Bauwens JE, Clark CD & Burke WG. (1991). Rhabdomyolysis associated with lovastatin and erythromycin use. *West J Med* **154**, 213-215.

- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R & Spiegelman BM. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**, 397-408.
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB & Spiegelman BM. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* **278**, 26597-26603.
- Stadtman ER & Levine RL. (2002). Why have cells selected reactive oxygen species to regulate cell signaling events? *Human & experimental toxicology* **21**, 83.
- Starkov AA & Fiskum G. (2003). Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of neurochemistry* **86**, 1101-1107.
- Stock D, Leslie AG & Walker JE. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R & Culotta VC. (2001). 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* **276**, 38084-38089.
- Tager JM, Wanders RJ, Groen AK, Kunz W, Bohnsack R, Kuster U, Letko G, Bohme G, Duszynski J & Wojtczak L. (1983). Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* **151**, 1-9.
- Taylor CR. (1987). Structural and functional limits to oxidative metabolism: insights from scaling. *Annual review of physiology* **49**, 135-146.
- Taylor RW & Turnbull DM. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature reviews* **6**, 389-402.
- Terblanche SE, Gohil K, Packer L, Henderson S & Brooks GA. (2001). The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). *Comparative biochemistry and physiology* **128**, 889-896.

- Thompson PD, Clarkson P & Karas RH. (2003). Statin-associated myopathy. *Jama* **289**, 1681-1690.
- Thompson PD, Clarkson PM & Rosenson RS. (2006). An assessment of statin safety by muscle experts. *Am J Cardiol* **97**, 69C-76C.
- Thompson PD, Gadaleta PA, Yurgalevitch S, Cullinane E & Herbert PN. (1991). Effects of exercise and lovastatin on serum creatine kinase activity. *Metabolism* **40**, 1333-1336.
- Thompson PD, Zmuda JM, Domalik LJ, Zimet RJ, Staggers J & Guyton JR. (1997). Lovastatin increases exercise-induced skeletal muscle injury. *Metabolism* **46**, 1206-1210.
- Tomlinson SS & Mangione KK. (2005). Potential adverse effects of statins on muscle. *Physical therapy* **85**, 459-465.
- Tonkonogi M, Harris B & Sahlin K. (1998). Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *J Physiol* **510** ( Pt 1), 279-286.
- Turrens JF. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335-344.
- Turrens JF, Alexandre A & Lehninger AL. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **237**, 408-414.
- Vendelin M, Beraud N, Guerrero K, Andrienko T, Kuznetsov AV, Olivares J, Kay L & Saks VA. (2005). Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C757-767.
- Ventura-Clapier R, Garnier A & Veksler V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1{alpha}. *Cardiovasc Res* **79**, 208-217.
- Ventura-Clapier R, Kaasik A & Veksler V. (2004). Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency. *Mol Cell Biochem* **256-257**, 29-41.
- Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E & Anflous K. (1998). Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* **184**, 231-247.

- Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR & Castilho RF. (1997). The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience reports* **17**, 43-52.
- Vladutiu GD, Simmons Z, Isackson PJ, Tarnopolsky M, Peltier WL, Barboi AC, Sripathi N, Wortmann RL & Phillips PS. (2006). Genetic risk factors associated with lipid-lowering drug-induced myopathies. *Muscle Nerve* **34**, 153-162.
- Votyakova TV & Reynolds IJ. (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Journal of neurochemistry* **79**, 266-277.
- Wang H & Oster G. (1998). Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* **396**, 279-282.
- Weibel ER, Taylor CR & Hoppeler H. (1991). The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10357-10361.
- Wendt IR & Chapman JB. (1976). Fluorometric studies of recovery metabolism of rat fast- and slow-twitch muscles. *The American journal of physiology* **230**, 1644-1649.
- Wiesner RJ, Kurowski TT & Zak R. (1992). Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **6**, 1458-1467.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124.
- Yaniv Y, Stanley WC, Saidel GM, Cabrera ME & Landesberg A. (2008). The role of Ca<sup>2+</sup> in coupling cardiac metabolism with regulation of contraction: in silico modeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1123**, 69-78.
- Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R & Mettauer B. (2002). Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* **543**, 191-200.

Zoll J, Steiner R, Meyer K, Vogt M, Hoppeler H & Fluck M. (2006). Gene expression in skeletal muscle of coronary artery disease patients after concentric and eccentric endurance training. *Eur J Appl Physiol* **96**, 413-422.