



L'EFFET DES STATINES SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE RAPIDE

Mémoire

Antoine Boulanger Piette

Maîtrise en physiologie-endocrinologie
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Antoine Boulanger Piette, 2015

Résumé

Les statines sont des inhibiteurs de l'enzyme HMG-CoA réductase, une étape limitant la biosynthèse du cholestérol [1]. Elles sont efficaces dans la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires [2-7]. L'utilisation de statines est associée à des effets néfastes au niveau du muscle squelettique d'environ 15% des patients, condition qui est nommée; myopathie induite par les statines (MIS) [8-15]. Les hypothèses concernant la MIS abondent mais il semble que les causes soient multifactorielles et que l'orchestration soit toujours mal comprise. Dans un premier temps, la structure générale et la compartimentalisation cellulaire seront abordées. Par la suite seront traités les acteurs et étapes du couplage excitation-contraction. Par après, les types de fibres et la plasticité phénotypique seront décrits. Puis, les mécanismes d'hypertrophie et d'atrophie seront passés en revue. Finalement, la dernière section portera sur l'utilisation des statines et la myopathie associée. Suite à cette introduction, les expériences à l'étude seront présentées sous forme d'article scientifique. Ce manuscrit en préparation élucide l'effet du traitement aux statines sur les ATP-ases calciques du réticulum sarcoplasmique. Il touche en effet les caractéristiques fonctionnelles et moléculaires de ces pompes en ce qui concerne les muscles rapides et les cellules musculaires en culture. Il contribue donc à une meilleure compréhension de la problématique multifactorielle que représente la MIS, s'insérant dans le portrait des connaissances en comblant un manque probant d'informations.

<u>Table des matières</u>	<u>Page</u>
Résumé	III
Table des matières	V
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	IX
Avant-propos	XI
<u>Chapitre 1 ; Introduction</u>	1
<u>Section 1 ; La structure et composition du muscle</u>	
1.1 Hiérarchie structurale, architecture tissulaire et contenu biologique	2
1.2 Organites et cellules résidentes	3
1.3 Protéines contractiles et cytosquelette	4
<u>Section 2 ; Le couplage excitation-contraction et la relaxation</u>	
2.1 Le potentiel d'action et l'unité motrice	6
2.2 La jonction neuromusculaire et la libération de Ca ²⁺ du réticulum sarcoplasmique	7
2.3 La contraction induite par les myofilaments	9
2.4 L'apport en calcium extracellulaire	10
2.5 La relaxation et ses acteurs	12
2.6 La structure de SERCA, ses isoformes et son cycle catalytique	13
2.7 Les performances, la régulation et les modifications de la pompe	17
2.8 Les propriétés contractiles; protocoles, possibilités et interprétations	21
<u>Section 3 ; L'atrophie et l'hypertrophie; dégradation et synthèse</u>	
3.1 Un survol des stimuli	26
3.2 La synthèse protéique	27
3.3 La dégradation	28
3.4 La machinerie du système ubiquitine-protéasome	29
3.5 La protéolyse dépendante du calcium; les calpaines	30
3.6 Le système autophagie lysosomale	31
3.7 La voie apoptotique de mort cellulaire programmée	32
<u>Section 4 ; Les types de fibres et plasticité phénotypique</u>	
4.1 Le rôle et la répartition	33
4.2 Le continuum phénotypique	34
4.3 Les caractéristiques distinctives	35
4.4 La plasticité phénotypique	35
<u>Section 5 ; La myopathie associée aux statines</u>	
5.1 Prévalence et bénéfices du traitement	36
5.2 Effets indésirables variés	37
5.3 Les symptômes musculaires	37
5.4 Les mécanismes potentiels	39

<u>Section 6 ; Pertinence et objectifs du mémoire</u>	
6.1 L'hypothèse du calcium	42
<u>Chapitre 2 ; <i>Effects of lovastatin treatment on fast-twitch skeletal muscle function.</i></u>	45
<u>Chapitre 3 ; Discussion et conclusion générale</u>	69
<u>Bibliographie</u>	75

<u>Liste des figures</u>	<u>Page</u>
<u>Chapitre 1 ; Introduction</u>	
Figure 1 ; Hiérarchie structurale; du muscle aux myofilaments.	5
Figure 2 ; Microscopie électronique de la jonction neuromusculaire.	7
Figure 3 ; Microscopie électronique et représentation structurale des triades.	8
Figure 4 ; Représentation schématique des ponts croisés.	10
Figure 5 ; Les mouvements calciques de la cellule musculaire.	13
Figure 6 ; Cycle catalytique et structure des domaines des pompes SERCA.	16
Figure 7 ; Représentation graphique; de la secousse au tetanus.	23
Figure 8 ; Caractéristiques contractiles et métaboliques selon le type de myosine.	35
Figure 9 ; Sentiers signalétiques affectés par les statines et effets en aval.	43
<u>Chapitre 2 ; <i>Effects of lovastatin treatment on fast-twitch skeletal muscle function.</i></u>	
Figure 1 ; Propriétés contractiles d'EDL de souris suite à l'administration de lovastatine ou du placebo pendant 28 jours. Force maximale absolue (1A), courbe de force-fréquence (1B), temps requis pour l'atteinte de la force maximale (1C) et taux de développement maximal de la force (1D).	65
Figure 2 ; La relaxation de l'EDL de souris en contexte de contraction de secousse (2A-B) et de contraction tétanique maximale (2C-D) suite à l'administration de lovastatine ou du placebo pendant 28 jours.	66
Figure 3 ; Abondance des pompes SERCA1-2 mesurée par immunobuvardage chez l'EDL de souris suite à l'administration de lovastatine ou du placebo pendant 28 jours (3A) Activité enzymatique des calpaines mesurée dans le TA de souris suite à l'administration de lovastatine ou du placebo pendant 28 jours (3B).	67
Figure 4 ; Abondance des pompes SERCA1-2 mesurée par immunobuvardage chez les myotubes (4A) C2C12 et leur diamètre (4B) suite à l'administration de lovastatine ou du placebo pendant 24 heures.	68

Liste des abréviations

½ RT	<i>Half relaxation time</i>
4EBP1	<i>eIF4E-binding protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébrale
CamKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CPA	<i>Cyclopiazonic acid</i>
CT	<i>Contraction time</i>
DHPR	Dihydropyridines
EDL	Long extenseur des orteils
eIF2	Facteur d'initiation eukaryotique 2B
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase-3b</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Lf	Longueur des fibres
MCT4	<i>Monocarboxylate transporter 4</i>
MCU	<i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
MIS	Myopathie induite par les statines
mTor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MuRF-1	<i>Muscle ring-finger protein-1</i>
Myf-5	<i>Myogenic factor 5</i>
MyoD	<i>Myoblast determination protein</i>
NCX	<i>Sodium-calcium exchangers</i>
P70S6K	<i>P70-ribosomal S6 kinase</i>
Pax-7	<i>Paired box 7</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
Pi	Phosphate inorganique
PIP2	<i>Phosphatidyl-inositol-diphosphate</i>
PKA	Protéine kinase A
PLB	<i>Phospholamban</i>
PMCA	<i>Plasma membrane Ca²⁺ ATP-ase</i>
P0	Force maximale
ROC	<i>Receptor-operated channel</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RYR	<i>Ryanodine receptor</i>
SAC	<i>Stretch-activated channels</i>
SERCA	<i>Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
Ser	<i>Serine</i>

SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SLN	<i>Sarcophilin</i>
SOC/SOCE	<i>Store-operated calcium entry channel</i>
SR	<i>Sarcoplasmic reticulum</i>
STIM1	<i>Stromal interaction protein 1</i>
Thr	<i>Threonine</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
UM	Unité motrice
UP	Ubiquitine-protéasome

Avant Propos

Le présent mémoire vise à étoffer les connaissances au sujet de la myopathie induite par les statines en ce qui a trait à notre champ de recherche qu'est la physiologie musculaire. Il comporte un manuscrit en préparation en vue d'une soumission en cours d'année 2015 dans *Journal of Pharmaceutical Sciences*, revue scientifique révisée par les pairs. En ce qui concerne cet article, j'ai été responsable de la grande majorité de la création des devis expérimentaux, des procédures expérimentales, de l'analyse des données et de la rédaction, le tout habilement appuyé par Dr Jérôme Frenette, auteur de correspondance et directeur de recherche attitré. Ma contribution est donc celle d'auteur principal. Mes collègues Sébastien Dufresne, Patrice Bouchard et Éliane Lavergne ont généreusement partagé leurs connaissances techniques ainsi que leurs expertises afin de rendre possible ces expériences et je les en remercie grandement. Également, j'ai pu profiter du partage de connaissances inestimables de la part d'étudiants maintenant gradués tels que Nicolas Dumont, Élise Duchesne et Mélissa De La Durantaye, entre autres. À l'heure actuelle, quelques expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'atteindre un stade de compréhension nous permettant d'effectuer la soumission de l'intégralité de nos résultats. Outre ce projet, j'ai eu la chance de pouvoir participer à plusieurs projets variés en cours au laboratoire, tant de type exploratoire que contributoire aux travaux établis de notre programme de recherche. J'ai également pu entreprendre des projets qui seront poursuivis lors de mes études de 3^e cycle débutant au moment d'écrire ces lignes, et qui, j'en suis certain, sauront me faire cheminer à plusieurs égards avec le privilège d'être sous la tutelle de mon directeur actuel.

Chapitre 1 ; Introduction

Le tissu musculaire squelettique est doté d'une polyvalence étendue ainsi que d'une ambivalente plasticité. Le muscle squelettique, flexible et dynamique, est par ailleurs un organe hautement spécialisé arborant des caractéristiques de base dont l'excitabilité, la contractilité, l'extensibilité et l'élasticité. Constituant environ 36 à 45% de la masse corporelle humaine via plus de 600 muscles, il accomplit des fonctions essentielles à plusieurs égards [16]. Ces rôles vitaux comprennent notamment la respiration, la locomotion, le support postural, la thermogenèse et l'homéostasie énergétique [17]. Apprécié au passage son statut de réservoir d'acides aminés salubre dans divers contextes physiologiques et pathologiques [18]. Ses capacités d'adaptation élevées permettent le remodelage de sa machinerie structurale, contractile et métabolique afin de mettre au diapason ses propriétés aux stimuli externes appliqués. Ces signaux modulent étroitement la réponse adaptative du muscle squelettique et peuvent prendre les formes suivantes; le stress mécanique, le stress métabolique, l'innervation motrice, la disponibilité en nutriments, le bilan endocrinien, le profil pharmacologique, etc. [19-22]. Le muscle est situé au carrefour des interactions systémiques, d'une part à l'écoute des signaux en aval mais également en amont, participant majeur de la physiologie intégrative par la libération endocrine ou paracrine de son sécrétôme composé de divers cytokines et peptides, nommés myokines [23-26]. Cette malléabilité peut donc entraîner des changements significatifs au profit ou au détriment des tissus impliqués dans la diaphonie. Pensons d'emblée aux effets de l'exercice qui dirigent intrinsèquement les adaptations en fonction du type d'effort effectué; hypertrophie, adaptations métaboliques, angiogenèse, biogenèse mitochondriale, etc., [27]. Il a également été démontré que suite à des séances d'exercice, le muscle pouvait entre autres libérer la célèbre *interleukin-6* (IL-6) ayant des effets variés sur le profil métabolique et immunitaire de tissus distants [28]. Il peut, d'autre part, survenir des situations délétères telles que l'alitement prolongé, l'immobilisation, la dénervation progressive ou traumatique, divers cancers, le vieillissement, la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'hypogravité et l'insuffisance cardiaque [29, 30]. Ces conditions affectent négativement le muscle squelettique et mènent à une dégradation plus ou moins progressive de la fonction, allant de l'altération biochimique mineure à l'atrophie. Mis à

part ces conditions, on retrouve plusieurs pathologies d'origine génétique ou en lien avec l'administration d'un composé pharmacologique.

Section 1 ; La structure du muscle et sa composition

1.1 Hiérarchie structurale, architecture tissulaire et contenu biologique

L'architecture musculaire est organisée de façon précise, permettant une structure dense composée d'un nombre élevé de fibres musculaires encadrées par un espace interstitiel interactif. Cet espace héberge diverses cellules résidentes leucocytaires et contient un réseau de matrice extracellulaire, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des afférences et efférences nerveuses. À titre indicatif, un gastrocnémien humain peut contenir environ un million de fibres. Ces fibres sont regroupées en sous-divisions dont la principale est le muscle entier, divisé en quelques centaines à milliers de faisceaux, à leur tour composés de dizaines à centaines de fibres musculaires [31]. Ces niveaux organisationnels sont séquestrés par des enveloppes de tissu conjonctif principalement faites de collagène I, III, IV et V. Elles se retrouvent dans l'ordre respectif suivant; l'épymysium, le périmysium et enfin, l'endomysium. Ces fascias permettent un maintien de l'organisation structurale, une isolation électrique, l'élasticité face à l'étirement et une protection au frottement ainsi qu'au stress mécanique [32]. C'est d'ailleurs au sein même de ces structures collagénieuses que la jonction myotendineuse prend naissance. Son prolongement constitue le tendon qui permet l'attache à un os et habituellement, le mouvement autour de l'articulation donnée. Le degré d'enveloppe ultime propre à la fibre musculaire est le sarcolemme, situé sous l'endomysium, il est constitué de deux couches distinctes. La première, membrane basale, est formée de collagène, fibronectine, laminine et glycoprotéines. La deuxième, membrane plasmique, est constituée d'une double couche de phospholipides et est directement en contact avec le milieu sarcoplasmique [17]. C'est au sein de ces membranes que siègent et parcourent différents récepteurs et canaux raccordant les milieux extracellulaires, cytosoliques et nucléaires. Mentionnons notamment des récepteurs sensibles aux signaux hormonaux, au stress mécanique, aux nutriments, aux neurotransmetteurs, etc. [33]. Au chapitre des canaux, prévalent les canaux sodiques, potassiques, chloriques et calciques. Ces canaux peuvent être passifs ou actifs, transportant avec ou contre le gradient de

concentration des ions selon une activation dépendante du voltage ou par liaison avec un ligand spécifique [34, 35].

1.2 Organites et cellules résidentes

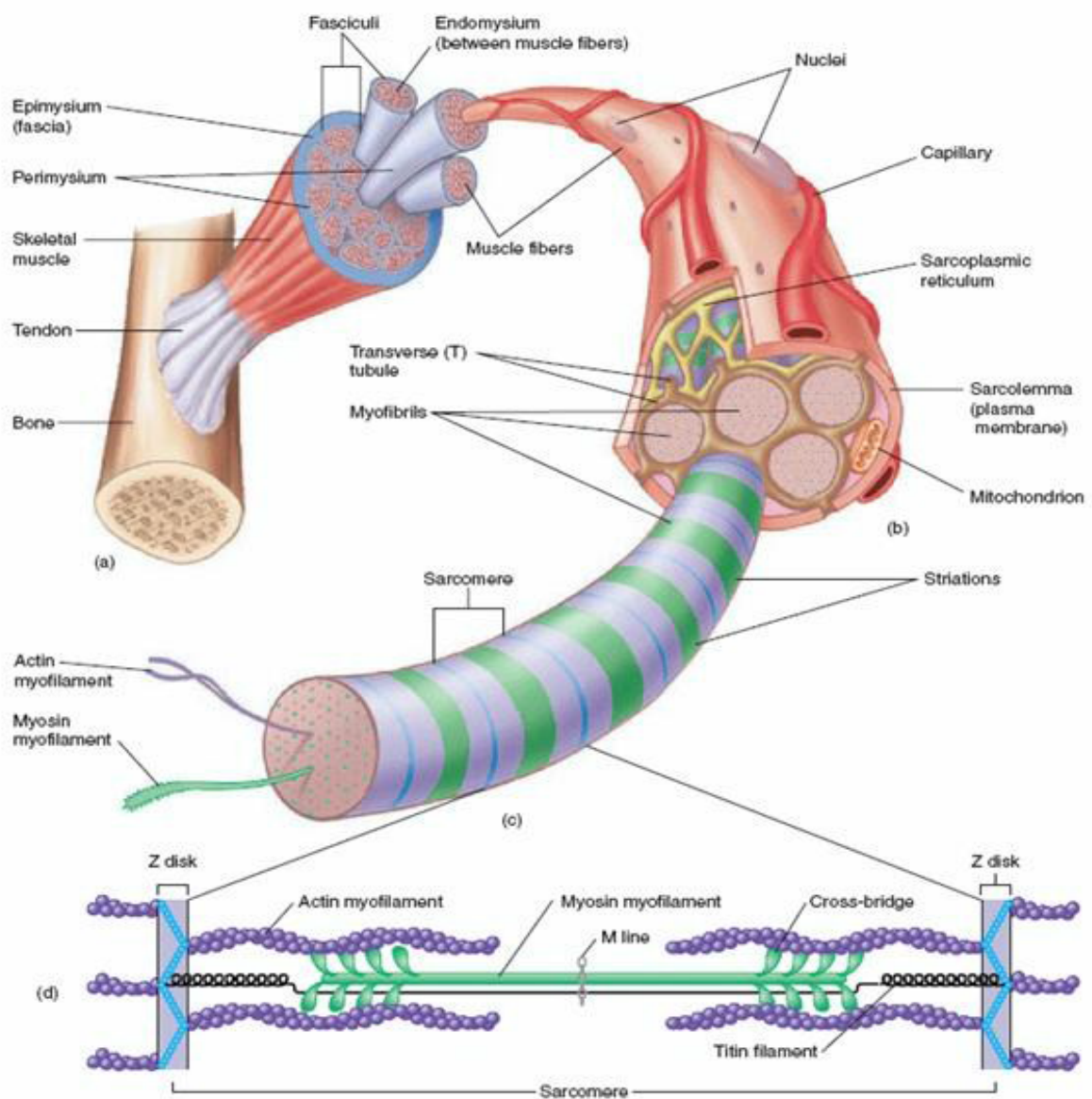
Les cellules contractiles, cylindriques et allongées, sont usuellement disposées en parallèle par rapport à l'axe longitudinale. Elles peuvent également être orientées selon un angle de pennation unique, un double angle de pennation, de façon convergente, fusiforme ou circulaire. Ces dispositions angulaires accuseront des propriétés variables en ce qui concerne la vitesse, l'amplitude de mouvement et la force déployée lors d'une contraction. C'est en périphérie de ces fibres, directement adossés sous la membrane plasmique, que l'on retrouve les nombreux noyaux à l'origine de leur caractère multinucléé. Cette centaine de noyaux par fibre est répartie de façon relativement uniforme et palliera à une demande en synthèse protéique élevée, que ce soit à des fins d'homéostasie, d'hypertrophie ou de réparation. De manière similaire, on retrouve entre le sarcolemme et la membrane basale des cellules satellites quiescentes démontrant une dispersion assez homogène [36]. Une fois recrutées par un stimulus propice à leur activation de nature intrinsèque et/ou micro environnementale, leur destinée sera de contribuer à la réserve de cellules satellites ou encore d'être commises à la différenciation en myoblastes. Ces myoblastes fusionneront afin de former des myotubes et contribuer aux myofibres matures déjà en place [37, 38]. Étant donné la nature post-mitotique des cellules musculaires, les cellules satellites sont importantes à la croissance et régénération, mais pourraient ne pas être biologiquement nécessaires dans certaines circonstances [39]. La migration et l'alignement de ces cellules lors de la différenciation repose fortement sur l'intégrité et la qualité du cytosquelette [40]. Un autre élément essentiel est la présence du lit capillaire au pourtour des fibres performant la perfusion de ces dernières et donc réalisant les apports et échanges métaboliques et interactions moléculaires multiples [41]. Également, on observe dans l'espace interstitiel la présence d'une population leucocytaire résidente, majorée de la fraction infiltrante lors d'injures physiques et/ou d'appels par messagers chimiques. Mastocytes, neutrophiles, macrophages, sont au nombre des cellules présentes et arborent une attraction et une chronologie d'activation définie par les messagers produits [42]. Ces acteurs vont être

modulés par la présence de facteurs pro et anti-inflammatoires, contribuant à l'exacerbation ou à la résolution de ce profil selon leurs phénotypes et médiateurs sécrétés [17].

1.3 Protéines contractiles et cytosquelette

À l'intérieur des fibres se retrouvent les myofibrilles composées d'un alignement de myofilaments agencés en série dont les segments sont appelés sarcomères, l'essence même de l'activité contractile. Chacune des myofibrilles est entourée d'un réseau de tubules et citernes que constitue le réticulum sarcoplasmique (SR). Ce réservoir est essentiel aux mouvements calciques entre autres requis lors de la contraction. Le calcium entreposé et disponible à la libération est situé dans la partie terminale de ces citernes tandis que la partie centrale est vouée à la recapture du calcium permettant la relaxation musculaire. À proximité, on retrouve des organites et autres éléments comme des mitochondries, des gouttelettes de substrat lipidique ou glycogénique, des lysosomes, l'appareil de golgi, des ribosomes, etc. Le sarcomère, quant à lui, est un segment d'une myofibrille représentant l'unité fonctionnelle de base du muscle squelettique. Ce sont essentiellement la myosine, myofilament épais, et l'actine, myofilament mince, qui forment les sarcomères. L'actine est entourée de la tropomyosine et précisément parsemée de troponine qui possède les sites de liaison I, T et C, lui conférant des propriétés nécessaires au couplage excitation-contraction. Le filament épais, regroupant environ 200 molécules de myosine, est disposé parallèlement à l'actine afin de permettre les interactions et la formation des éventuels ponts croisés. La myosine elle-même est composée de 2 chaînes lourdes de liaison et 2 chaînes légères par tête qui régulent son activité ATP-ase. Un segment est la région théorique comprise entre deux disques Z, constituée d'alpha-actinine et de desmine. C'est ce disque Z qui sert d'attache aux filaments minces et qui fait le lien entre les sarcomères, les filaments épais sont quant à eux ancrés à la ligne M. Les filaments minces et épais se chevauchent mais ce n'est que lors d'un changement de conformation exposant les sites de liaison de l'actine que l'interaction aura lieu. La protéine géante titine est aussi intimement impliquée dans le maintien de la structure du sarcomère et du disque Z. Le cytosquelette est omniprésent et confère une stabilité à l'ensemble des éléments, en plus de contribuer au transfert d'énergie mécanique produite par les protéines contractiles en mouvement grâce aux costamères

reliant les sarcomères à la membrane basale [17]. Mis à part la titine, on retrouve des protéines primordiales dans plusieurs domaines comme la dystrophine, la vinculine, la nébuline, les intégrines, les laminines, etc [43-45]. Ce réseau structural se doit d'être intact et opérationnel afin de permettre une contraction efficace, de promouvoir la myogenèse, de relier les organites, d'effectuer du stockage, d'assurer le développement et la réparation mais aussi de préserver l'intégrité à tous les niveaux [46-48]. Certaines maladies héréditaires touchent de tels acteurs comme l'absence de la dystrophine dans la fameuse dystrophie musculaire de Duchenne [49].



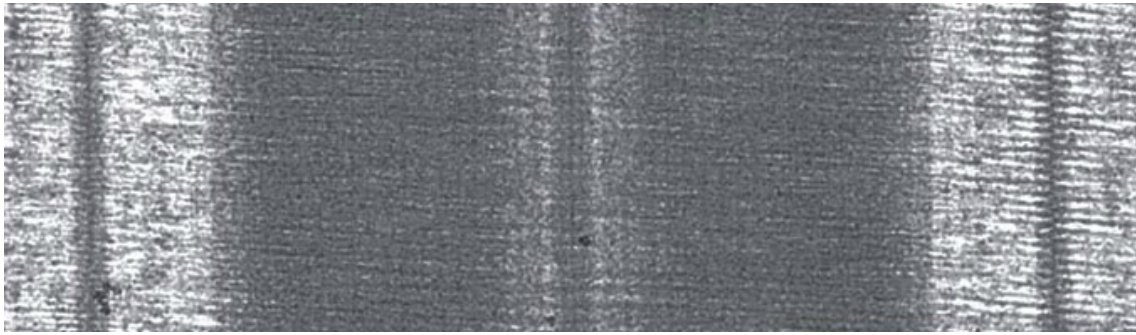


Figure 1 : Hierarchie structurale; du muscle aux myofilaments. Tirée de [17, 45] et de [50]

Section 2 ; Le couplage excitation-contraction et la relaxation

2.1 Le potentiel d'action et l'unité motrice

La fonction première du couplage excitation-contraction est de convertir un signal électrique en un signal chimique dont résultera une action mécanique. Le cortex moteur primaire, situé à l'arrière du lobe frontal, est à l'origine de la création du signal électrique comprenant l'intégration des informations provenant des différents lobes succédant la prise de décision d'engendrer une contraction volontaire. Ce sont les axones du cortex moteur qui chemineront jusqu'à la substance grise de la corne ventrale de la moelle épinière, véritable relais de l'information et point de départ des motoneurones. Ces neurones se rendront jusqu'aux muscles effecteurs et leurs terminaisons formeront avec ces derniers les régions hautement spécialisées que sont les jonctions neuromusculaires. Il est important de mentionner qu'un motoneurone innerve une quantité définie de fibres et que ces dernières sont à leur tour innervées par un unique motoneurone alpha. C'est la notion fondamentale d'unité motrice (UM), entité fonctionnelle regroupant un motoneurone et les fibres qu'il innerve. À titre indicatif, un *Gastrocnemius* humain comporterait 579 UM avec un ratio moyen de 1934 fibres/UM. Un potentiel d'action suffisant déclencherait donc l'activité de l'ensemble des fibres associées à une UM, réparties sur un territoire relativement homogène et dispersé. Basé sur les propriétés contractiles physiologiques, on dénote une mosaïque d'UM variées en ce qui concerne la vitesse de contraction et résistance à la fatigue. Malgré cette hétérogénéité dans les propriétés des UM, le recrutement est ordonné et progressif en fonction du seuil d'excitabilité respectif des motoneurones. De façon générale, le recrutement débutera par les petites UM lentes, résistantes à la fatigue et oxydatives. En

second lieu seront graduellement utilisées les UM moyennes et grandes, caractérisées par une contraction rapide et puissante ainsi qu'une fatigabilité croissante, couplée à un métabolisme allant de mixte à totalement glycolytique. Exceptionnellement, cet ordre de recrutement peut être dépassé dans le cas d'un mouvement réflexe. Une fois un nombre d'UM recrutées approximativement égal à 70-80% des disponibilités totales, la puissance supplémentaire déployée sera dosée par l'entremise de la fréquence de stimulation appliquée. En conditions physiologiques, il est suggéré qu'une contraction volontaire n'atteindrait jamais le maximum réel du potentiel contractile [17, 45].

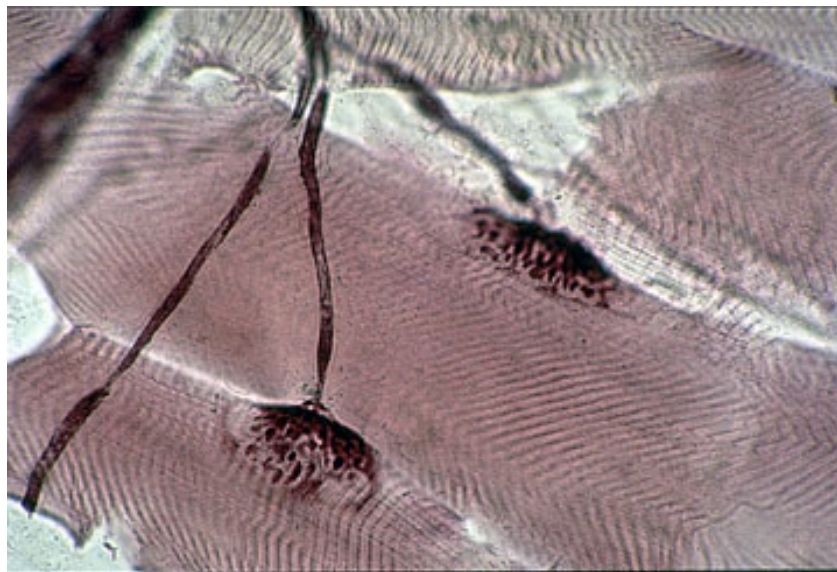


Figure 2 : Microscopie électronique de la jonction neuromusculaire. Tirée de [51]

2.2 La jonction neuromusculaire et la libération calcique du réticulum sarcoplasmique

Le potentiel d'action arrivant à la terminaison pré-synaptique de l'axone moteur engendrera une ouverture des canaux calciques dépendant du voltage de la membrane du bouton terminal et une entrée massive d'ions. Cela stimulera les vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur acétylcholine à fusionner avec la membrane et à relâcher leur contenu dans la fente synaptique par exocytose. Ce faisant, les récepteurs nicotiniques de la plaque motrice de la jonction neuromusculaire seront chimiquement activés et les canaux sodiques intimement liés à ces derniers opéreront une entrée sodique dans le cytosol de la fibre. Cette dépolarisation progressive encouragera d'autres canaux sodiques dépendants du voltage à proximité à laisser entrer d'autres ions sodium contribuant à la dépolarisation, faisant

momentanément passer le potentiel membranaire de -90mV à $+30\text{mV}$ chez l'amphibien et environ $+50\text{mV}$ chez l'homme [34]. Le potentiel membranaire basal est rendu possible grâce à une plus grande concentration de Na^+ et Cl^- à l'extérieur tandis que le K^+ est présent en plus grande quantité à l'intérieur de la cellule. À l'atteinte du seuil électrophysiologique, le potentiel d'action créé va migrer et parcourir la membrane plasmique jusqu'à l'atteinte des tubules transverses, véritables invaginations permettant de rejoindre les citernes du SR qui lui sont physiquement attachées [52]. Les tubules T arborent donc un rôle physiologique classique qui est celui d'augmenter la surface de contact membranaire, permettant surtout dans ce cas-ci l'atteinte de structures adjacentes. Le processus de la transmission de l'influx jusqu'à la dépolarisation du sarcolemme s'effectue en moins de 1 ms et représente donc un court temps proportionnellement aux étapes contractiles subséquentes. Cet assemblage se nomme triade et comprend deux citernes terminales du SR pour un tubule T adjacent disposé perpendiculairement.

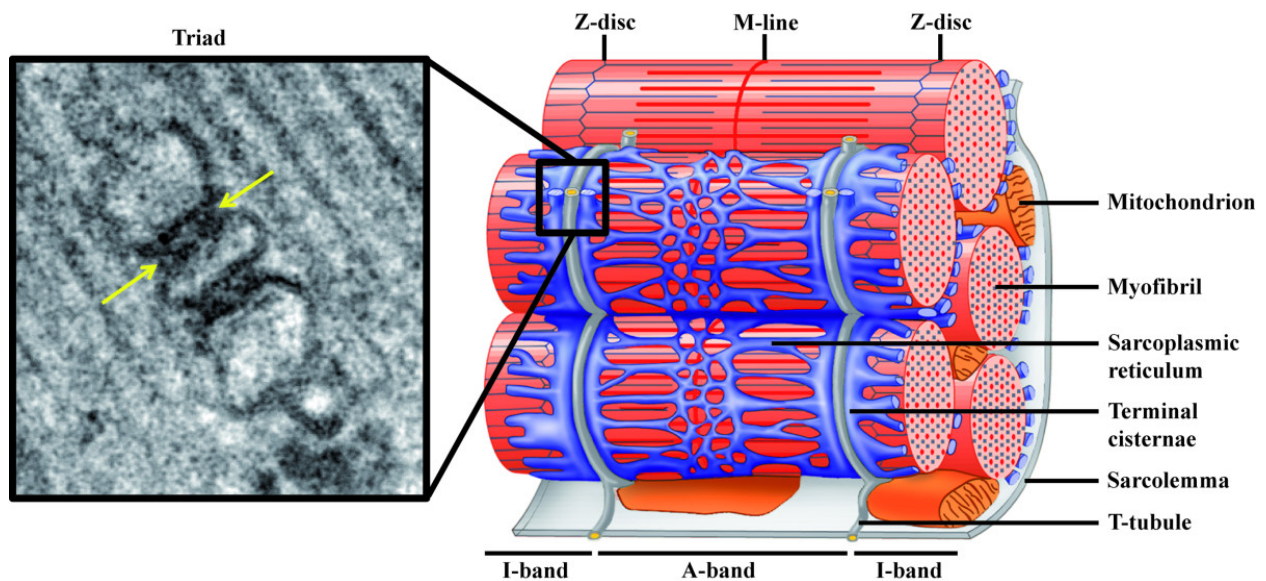


Figure 3 : Microscopie électronique et représentation structurale des triades. Tirée de [53]

Le récepteur dihydropyridine (DHPR) tapissant les tubules T agit comme détecteur du voltage et accuse un changement de conformation permettant, via ses sous-unités *alpha 1s* et *beta 1a*, l'ouverture du récepteur ryanodine (RYR) du SR via une interaction physique [54]. De plus, RYR encourage le flux calcique en exerçant une action rétrograde sur DHPR,

indépendante de ce dit flux [55]. Les protéines junctine, triadine et calsequestrine sont de puissants régulateurs de RYR et forment un complexe quaternaire qui contribue à la stabilité de l'état d'ouverture ou de fermeture du canal selon l'état des niveaux calciques du réservoir [56-60]. La protéine calstabile, qui lie les sections du tétramère RYR, a aussi été démontrée comme étant un régulateur important de la fonction d'ouverture mais surtout de fermeture de RYR [61]. Ces étapes déclenchent la libération massive de calcium des citernes terminales du SR vers le sarcoplasme et donc la cascade d'évènements liés l'exposition au calcium aux filaments minces et la contraction proprement dite [62].

2.3 La contraction induite par les myofilaments

À l'état de repos, la formation de ponts croisés est impossible car le site de liaison de la myosine sur l'actine est masqué par le complexe tridimensionnel troponine-tropomyosine. À ce moment, la tête de myosine est dite armée. La présence du flux de calcium libéré par RYR, qui se liera en partie sur la troponine C, engendre un changement conformationnel du complexe troponine-tropomyosine. Ce faisant, le site de liaison de la myosine sur l'actine est dévoilé et la liaison est rendue possible. L'activité ATP-ase de la myosine est alors stimulée et l'hydrolyse de l'adénosine tri-phosphate (ATP) en adénosine diphosphate + phosphate inorganique (ADP+Pi) précédemment liée sur la tête globulaire de la myosine abaisse son état énergétique. Cela permet l'inclinaison de 90° à 45° de cette dernière, il en résulte le glissement de l'actine. Cette étape constitue le mouvement et suite à sa complétion, de l'ATP est de nouveau liée à la tête de myosine ce qui dissocie le pont croisé par baisse d'affinité et rend possible de nombreux cycles de mouvement additionnels [63]. Ceux-ci atteindront de prochains sites de liaison sur l'actine, chaque cycle de déplacement permet de parcourir environ 10 nm. Cet enchainement d'évènements devrait se poursuivre tant et aussi longtemps que le calcium et les substrats énergétiques seront disponibles, dans les limites de l'amplitude des sarcomères et de la nature de la stimulation. Notons qu'une force peut être produite sans nécessairement produire de mouvement, c'est la contraction dite isométrique. De plus, il faut être conscient qu'avant d'observer un mouvement vectoriel produit par la contraction, la force produite doit se transmettre à toutes les structures musculaires. On entend ici les lignes Z entre les sarcomères, le cytosquelette

inter-sarcomérique et inter-fibres, la matrice extracellulaire et le tendon. Ces composantes absorbent en quelque sorte une partie de la force appliquée jusqu'à l'atteinte de leur propre limite de compliance, la transférant au prochain niveau structural qui fera de même jusqu'au raccourcissement musculaire global. Les acteurs de ce délais sont nommés composantes élastiques en série et en parallèle [17].

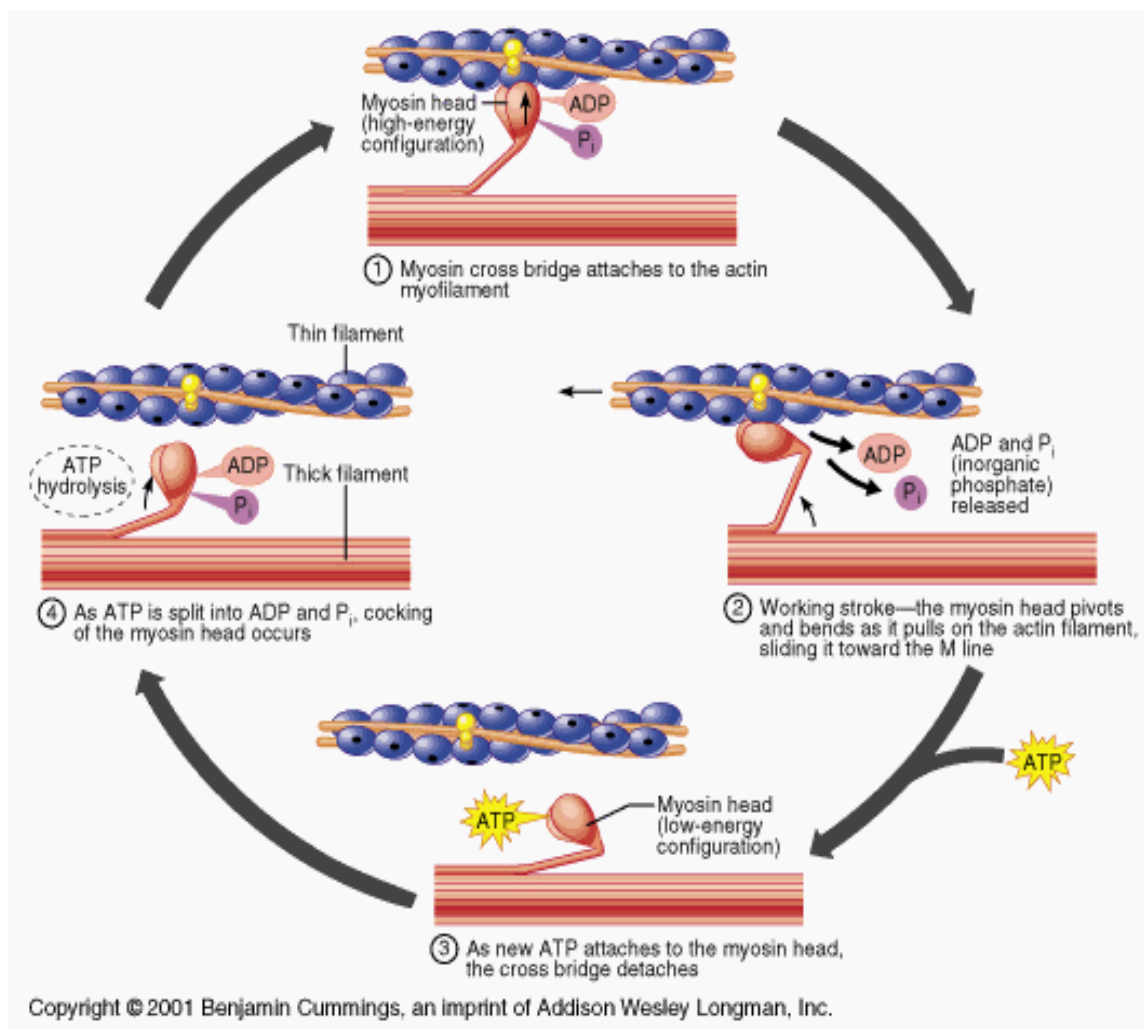


Figure 4 : Représentation schématique des ponts croisés. Tirée de [53]

2.4 L'apport en calcium extracellulaire

En plus du rôle pivot attribué au SR, les échanges avec le milieu extracellulaire représentent des capacités contributives réelles aux mouvements calciques permettant de mener à bien les cycles de contraction. Ces mouvements non-négligeables s'ajoutent donc à ceux du SR et peuvent réduire la susceptibilité à la fatigue de la fibre musculaire, tel que

démontré grâce à un modèle de souris transgénique et à des expériences de contractilité *ex-vivo* ainsi qu'*in vivo* [64]. Ce transport est effectué par la famille de récepteurs membranaires perméables au calcium nommée "*transient receptor potential*" (TRP). Ces canaux peuvent être activés soit par un ligand, par du stress mécanique ou par la vidange du SR. Ces catégories seraient impliquées dans la physiologie du muscle squelettique et sont respectivement appelés "*receptor operated channel*" (ROC), "*stretch activated channel*" (SAC) et "*store operated channel*" (SOC). Des approches biophysiques ont révélées que l'inhibition du "*store operated Ca²⁺ entry*" (SOC/SOCE), particulièrement dans un contexte de stimulation à haute fréquence, diminuait la force tétanique atteinte par de jeunes souris. En contrepartie, des souris âgées n'accusaient pas cette baisse, suggérant que SOCE serait intrinsèquement relié à la perte de force liée au vieillissement [65]. SOCE est donc un mécanisme qui relie de façon élégante l'entrée de calcium cellulaire aux niveaux de stockage et de mouvement ioniques du SR [66]. La régulation de SOCE passe par le "*stromal interacting molecule 1*" (STIM1) qui agit à titre de senseur du calcium cellulaire et est fortement exprimé dans les muscles squelettiques. STIM1 est composé d'un domaine du coté du lumen du SR qui pourrait monitorer les niveaux calciques de ce dernier. D'autre part, son domaine situé en façade cytosolique joindrait la protéine tétramérique ORAI1 qui est en fait un canal traversant la membrane cellulaire. La liaison du calcium au domaine du SR de STIM1 engendrerait un changement conformationnel considérable de la protéine et relayerait le signal à ORAI1 via ses segments en hélice. Ce processus passerait en effet par la liaison d'ions calciques aux deux sites de STIM1 mais semble impliquer d'autres acteurs qui restent encore à déterminer [67, 68]. Au delà de leurs fonctions contractiles, STIM1 et ORAI1 seraient en partie responsables de veiller au remplissage adéquat du SR tout en contribuant à l'homéostasie calcique de la cellule [69]. Le bon fonctionnement de ce duo est donc essentiel et des dysfonctions les touchant, comme dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne où le transport est augmenté via l'excès de canaux, peuvent engendrer des effets sévères menant au bouleversement du niveau calcique cytosolique [70, 71].

Le couplage excitation-contraction se solde notamment lorsque la stimulation du potentiel d'action cesse et que la fibre se repolarise au potentiel membranaire de repos. Les paramètres de ce couplage peuvent être grandement altérés sans vraiment atteindre la relaxation proprement dite; c'est la fatigue centrale et/ou périphérique. Cela peut être fondé, entre autres, par les phénomènes variés suivants : soit une déplétion d'un métabolite essentiel comme l'ATP, l'accumulation d'un sous-produit métabolique, une baisse de génération de potentiel d'action par le système nerveux centrale, un déséquilibre ionique, des bouleversements du pH, des dommages cellulaires, une baisse de sensibilité au Ca^{2+} , une désensibilisation des jonction neuromusculaires, etc. [72, 73]. C'est ultimement le retrait d'ions calciques du milieu sarcoplasmique par les ATP-ases du SR qui rétablira le gradient calcique de repos et qui, en quelques millisecondes, mènera à la relaxation suite à la dissociation du calcium des sites de la troponine C. Ces pompes seront cependant assistées par un autre acteur contributoire ; la protéine parvalbumine, agent chélateur de calcium retrouvé principalement dans les fibres musculaires rapides de rongeurs [74, 75]. La parvalbumine peut tamponner deux ions calciques et son rôle serait celui de faciliter la transition du calcium entre les myofibrilles et le SR. Ce faisant, le temps de relaxation serait diminué, et ce, sans affecter l'atteinte de forces maximales. [76, 77]

2.5 La relaxation et ses acteurs

Les principales pompes qui sont véritablement responsables du remplissage du réticulum sarcoplasmique et qui permettent un gradient calcique 10000 fois supérieur par rapport au milieu cytosolique sont connues sous le nom de "*Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase*" (SERCA). Elles sont en partie responsables de maintenir la cellule à une concentration calcique de 10^{-7}M tandis que le SR et le milieu extracellulaire se trouveront à environ 10^{-3}M [78, 79]. La fine régulation de ce gradient ionique est capitale pour la survie et la fonction de la cellule. Elles sont toutefois assistées dans une moindre mesure par des pompes complémentaires qui comprennent la recapture mitochondriale (MCU), les échangeurs sodium-calcium (NCX) et les ATP-ases de la membrane plasmique (PMCA) [80, 81]. Un autre facteur important qui contribuera à abaisser les efforts déployés par SERCA est la présence d'agents tampons dans le lumen du SR. On compte la

calsequestrine, sarcalumenine, calreticuline, CLP-150, CLP-170 et CLP-220 parmi ceux-ci. En plus de son intime régulation auprès de l'état d'activation de RYR, calsequestrine permet de stocker la grande majorité du calcium présent dans le SR sous forme liée, ayant pour effet de diminuer le gradient contre lequel les ATP-ases doivent lutter et donc d'abaisser les besoins énergétiques associés à l'hydrolyse d'ATP. Contenant environ 50 sites de liaison au calcium, ce tampon rassemblerait 95% des ions du réservoir tandis que 5% seraient sous forme libre [59, 82-85]. D'un côté fonctionnel, la présence de ces tampons couplée à des performances facilitées des ATP-ases permet l'obtention d'un réservoir de plus grande capacité absolue et donc d'une libération potentielle accrue par l'accumulation majorée des réserves calciques [86, 87]. Les fibres rapides seraient particulièrement sujettes à profiter de l'avantage conféré par cette protéine, atteignant des capacités de séquestration supérieures à celles des fibres lentes [84, 87].

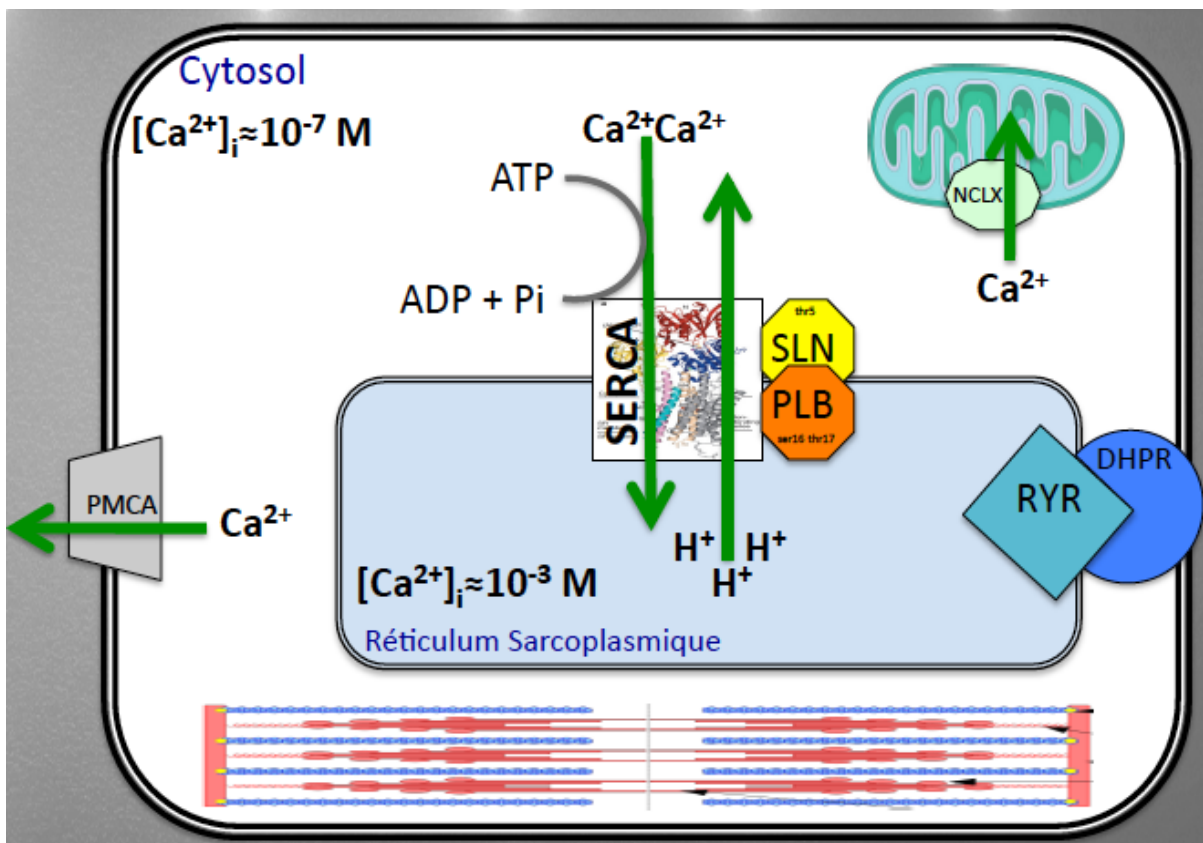


Figure 5 : Les mouvements calciques de la cellule musculaire. Réalisée par Antoine Boulanger Piette

2.6 La structure de SERCA, ses isoformes et son cycle catalytique

La famille de SERCA est traduite à partir de 3 gènes et en ajoutant les résultats de l'épissage alternatif, on retrouve de nombreux isoformes de SERCA1 à SERCA3, très conservés dans le vivant, de la levure aux mammifères. Ils comprennent notamment SERCA1a, SERCA1b, SERCA2a, SERCA2b, SERCA3a, SERCA3b et SERCA3c. Ces transporteurs sont quasi-ubiquitaires dans le vivant eucaryote lors de différentes phases développementales et dans différents tissus car elles sont impliquées dans la gestion du calcium des réticulums endoplasmiques (ER). Ces organites ont des rôles essentiels très variés, influençant le métabolisme, le repliement de protéines, l'apoptose, le stockage, etc. [88]. En plus des cellules musculaires, le calcium est aussi un puissant second messager pour plusieurs cellules non-contractiles[89]. L'importance de SERCA au sein de processus biologiques est soulignée de par son implication dans des maladies ou conditions comme; la maladie de Brody, la maladie de Darier, l'insuffisance cardiaque et plusieurs types de dystrophies musculaires [90-93].

Au niveau du SR des muscles squelettiques de mammifères, il existe deux isoformes; SERCA1 et SERCA2 [92]. SERCA1 est majoritairement retrouvée dans les muscles rapides tandis que SERCA2 est exclusivement équipée dans les fibres lentes [93, 94]. Les deux isoformes diffèrent quant à leurs performances au niveau de la cinétique du transport et malgré des régulateurs différents, exhibent une fonction identique et le même cycle catalytique [95, 96]. Les pompes SERCA appartiennent à la grande famille des ATP-ases de type P et exhibent des changements conformationnels réversibles compris dans un cycle catalytique qui est caractérisé par l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie et par le transport vectoriel de Ca^{2+} contre son gradient de concentration. Il est établi que dans des situations optimales, c'est-à-dire en incluant le fait que la concentration calcique à l'intérieur de vésicules phospholipidiques reconstituées demeure artificiellement basse, ce transport affichera un ratio stochiométrique de 2 ions par molécule d'ATP en échange de 2 à 3 protons H^+ dans la direction opposée [97]. Ce processus est donc électrogénique et possiblement imputable de variations du pH physiologique. En plus d'être coûteuse au point de vue métabolique, l'activité reliée à SERCA représenterait de 30 à 40% du coût

énergétique de la contraction musculaire [98]. Dans le même ordre d'idée, mentionnons que des mesures calorimétriques avancent que pour un *soleus* de souris au repos, de 25 à 45% de la chaleur produite est attribuable aux pompes calciques du SR [99]. Des études ayant une visée similaire ont par ailleurs statué que la consommation d'ATP par SERCA dans des muscles de souris lents et rapides était responsable de 40 à 50% du taux métabolique de repos de ces muscles [100]. Ces valeurs soulignent le caractère névralgique des pompes SERCA en ce qui concerne la dépense énergétique liée au tissu musculaire.

Au cours des dernières années, plusieurs groupes des recherches ont été en mesure de générer, à l'aide de rayons X, le crystal de la pompe dans différentes conformations [101-104]. Ils ont été à même de reconstituer relativement fidèlement ce qui est suggéré comme étant la structure et les différentes étapes du cycle de l'enzyme. À cela s'ajoute des études de Förster Resonance Energy Transfer (FRET) et d'enzymologie, entre autres, qui ont permis de démystifier le déplacement de certains résidus, les états d'encombrement stérique, l'implication de certaines molécules et autres spécifications sur la chronologie du transport [105-107]. De façon générale, SERCA1 est décrite comme une protéine membranaire de 994 acides aminés possédant 10 hélices transmembranaires (M1 à M10) et une tête globulaire en saillie cytoplasmique qui détient les domaines A, P et N. Le domaine A est l'actionneur à proprement dit, responsable de la régulation transmembranaire de liaison et libération calcique. Le domaine P quant à lui est constitué de plusieurs résidus dont Asp351, d'une haute importance lors de l'autophosphorylation permettant une conformation de haute énergie qui rend possible l'occlusion ionique. Enfin, le domaine N détient la fonction de liaison au nucléotide adénosine sur un de ses résidus, rôle critique à la liaison de l'ATP et à ses interactions. Le dernier segment doté d'une responsabilité centrale est le domaine transmembranaire M, il contient deux sites de liaison au Ca^{2+} formé par M4, M5 et M6 qui seront accessibles grâce à la fixation de l'ATP au domaine N. Les différents domaines de la pompe seront appelés à se déplacer afin d'interagir, de modifier l'état énergétique et de gérer la translocation menant aux échanges ioniques [108-110].

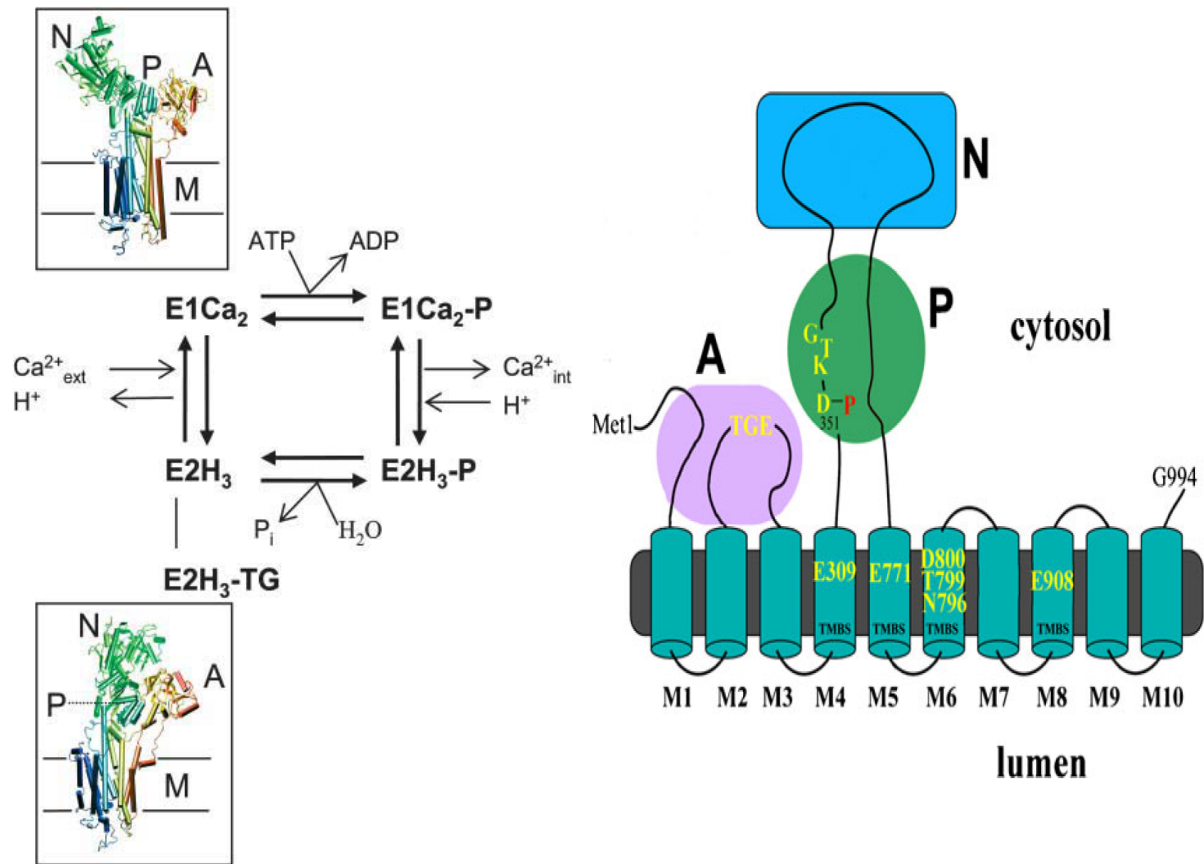


Figure 6 : Le cycle catalytique et la représentation structurale des domaines des pompes SERCA. Tirée de [109] et de [111].

Le cycle catalytique est généralement décrit en 6 étapes distinctes, parfois chevauchantes ou quasi simultanées, où l'on retrouve SERCA dans une alternance de conformations enzymatiques dite E1 et E2. Lors de ces étapes, l'affinité de SERCA pour le calcium sera variable; E1 possède une haute affinité pour le calcium tandis que E2 est un état de basse affinité. Cette liaison calcique est reconnue comme coopérative et séquentielle et s'accompagne de la libération de 2-3 H^+ dans le cytosol ainsi que d'un changement de conformation. Il y aura également l'implication de l'hydrolyse de l'ATP et de la liaison d'ions afin de procéder aux changements conformationnels via la phosphorylation à des sites spécifiques. Pour mieux comprendre les subtilités de l'orchestration du transport de cette pompe, le cycle est disponible en détail dans les références suivantes; [108-110, 112, 113].

2.7 Les performances, la régulation et les modifications de la pompe

Ce cycle catalytique exhibe un ratio stœchiométrique variable qui peut être plus ou moins optimal moyennant certaines conditions. On retrouve en effet un continuum de performances stœchiométriques possibles en fonction des conditions physiologiques retrouvées et cela fait partie intégrante de la fonction adaptative de la pompe. Étant donné son caractère dépendant de l'hydrolyse de l'ATP, l'activité de la pompe se doit d'être malléable afin de fournir à l'organisme hôte une efficacité énergétique tangible, par exemple en conditions d'anoxie chez la tortue en hibernation où SERCA fonctionne à bas régime [114]. À l'inverse, certaines subtilités régulatrices permettent un transport couteux en énergie qui sera contributoire à la thermogenèse, processus essentiel aux organismes en réponse à un apport énergétique élevé ou à des basses températures. On fait référence ici au découplage de la pompe, notion récente en thermogenèse dite non frissonnante, lorsque la pompe découple le transport vectoriel de l'hydrolyse de l'ATP, engendrant une dépense énergétique dissipée en chaleur [115]. Des agents découplants peuvent être de nature signalétique mais également exogène comme certains agonistes cannabinoïdes par exemple. Un autre aspect de nature tout aussi évolutive est la capacité de l'organisme à augmenter l'activité de SERCA en situation d'urgence lorsqu'une performance supra physiologique est requise. La voie β -adrénergique engendrera une cascade biochimique qui rejoindra SERCA et permettra l'augmentation transitoire de son activité au sein du muscle squelettique [116]. Le rendement de la pompe est donc régulé à une échelle temporelle très courte comme celle du couplage excitation-contraction mais également à une échelle plus grande comme l'état d'économie d'énergie ou de thermorégulation. De plus, la cellule peut gérer l'abondance relative de SERCA à plusieurs niveaux, l'ajustant aux circonstances contextuelles. Ceci se fait en modulant l'expression des gènes et le contenu protéique de SERCA au niveau transcriptionnel et traductionnel et grâce à de nombreuses modifications post-traductionnelles possibles de cette enzyme. Cependant, une fois la protéine en place, elle peut voir la machinerie ubiquitine-protéasome (UP) activée qui procédera à la polyubiquitination spécifique qui mènera à son éventuelle dégradation. Il est à noter que le processus UP a également lieu dans un contexte de recyclage et remodelage homéostatique régulier, on fait ici allusion à un phénomène rapide et anormal de plus ou moins grande

amplitude engendré par un élément perturbateur. À l'opposé, la sumoylation pourrait préférer une certaine protection à la protéine [117].

Afin d'avoir une idée hypothétique de la performance du transport de façon plus précise, il faut réunir plusieurs facteurs susceptibles de l'affecter qui comprennent des acteurs signalétiques et des paramètres physiologiques physicochimiques. Au chapitre des paramètres indépendants de la quantité de la pompe elle-même, on peut retrouver la concentration de calcium de part et d'autre de la membrane du SR, le pH, la température et la disponibilité d'ATP/ADP/Pi [108, 118, 119]. De la même manière, certains processus cellulaires engendrent des composés chimiques susceptibles de créer des modifications post traductionnelles réversibles ou irréversibles sur SERCA. Ces altérations, contributives ou délétères, peuvent faire partie intégrante d'un processus cellulaire normal mais peuvent aussi découler de conditions d'atteintes à la cellule. Enfin, la cellule peut aussi compter sur des régulateurs connus comme phospholamban (PLB) et sarcolipine (SLN), protéines associées à SERCA affectant grandement son niveau opérationnel selon leur présence et leur degré d'influence directement relié à leur état de phosphorylation [120].

En premier lieu, il est incontournable de mentionner l'implication des polypeptides accessoires phospholamban et sarcolipine qui limitent l'activité de SERCA [121, 122]. Ces deux acteurs ont été démontrés comme ayant une action synergique matérialisant une super inhibition lorsque retrouvés de concert [123, 124]. Principalement au niveau cardiaque et dans les muscles de phénotypes lents comprenant SERCA2, phospholamban est un régulateur de SERCA constitué de 52 acides aminés et son association résulte en une baisse d'affinité de la pompe pour le calcium au niveau des sites de liaison. Il ralentit donc par le fait même le passage transitionnel entre l'état E1 et $\text{Ca}^{2+}\text{E1}$ tout en réquisitionnant une plus grande concentration calcique pour activer la pompe. Cet effet de ralentissement de la relaxation de PLB serait dû à des interactions entre son domaine cytosolique et la tête globulaire de SERCA. Le frein que constitue PLB peut être renversé selon deux éventualités. Dans un premier temps, cela sera causé par une élévation du Ca^{2+} cytosolique et autrement, ce sera via des sentiers de signalisation où PLB sera phosphorylé aux sites

Ser16 et Thr17 de son domaine N-terminal cytosolique. En ce qui concerne le site Ser16, cela surviendra par la voie protéine kinase K (PKA), ce qui le place au cœur de la réponse β -adrénergique des muscles cardiaques et squelettiques. PLB est également phosphorylable au site Thr17 par la voie Ca^{2+} /calmodulin dépendant kinase (CamKII) [106, 110, 125-128]. En somme, sous la lumière de la physiologie, il est important de réaliser que PLB maintient SERCA dans un état sous maximale lorsque le Ca^{2+} cytosolique n'est pas élevé et que la cellule n'est pas en contexte contractile nécessitant une dépense d'énergie immédiate pour la recapture du calcium. Cela représente donc une économie d'énergie par l'entremise d'une fine régulation. Malgré le rôle partiellement homéostatique de SERCA, d'autres acteurs peuvent être mis à profit afin de conserver la cellule en conditions ioniques favorables. Deuxième acolyte inhibiteur, SLN est un protéolipide de 31 acides aminés et est retrouvé dans les muscles de phénotypes rapides qui sont majoritairement constitués de SERCA1 [129]. SLN possède un double effet sur l'activité de SERCA, tout comme PLB, il diminue l'affinité de SERCA pour la Ca^{2+} lors de basses concentrations mais il agit également comme découplant sans affecter l'activité ATP-ase. SLN découple en effet l'activité d'hydrolyse de l'ATP du transport vectoriel de Ca^{2+} , entraînant une plus grande libération de chaleur par mole d'ATP hydrolysée. Cela s'explique par une augmentation du glissement qui est la libération de calcium du côté cytoplasmique, et donc une accumulation dans le SR compromise par transport nul. Pour libérer SERCA de l'effet de SLN, une phosphorylation sur le site Ser5 de SLN est possible via la voie CamKII [126].

De par le rôle des pompes SERCA dans l'homéostasie calcique, dans la relaxation post-contraction et de par les éléments soulevés précédemment, il est intuitif d'attribuer d'emblée au calcium son rôle de modulateur d'activité de SERCA. En effet, les conditions physiologiques normales tendent à dicter que le calcium doit se trouver dans le SR et que SERCA cherche inlassablement à rétablir le gradient normal. En plus d'influencer les régulateurs, une haute concentration cytosolique nourrira les sites de grande affinité et stimulera la pompe tandis qu'une concentration à l'intérieur du SR qui dépasserait la constante de dissociation des sites de transport engendrerait un ralentissement de la pompe en rendant la libération du côté du lumen du SR impossible [108].

De façon similaire à la majorité des enzymes, SERCA possède une activité dépendante de la température, cela dit, en ce qui concerne les mammifères endothermes et homéotherme, les pompes sont préservées dans un environnement physiologique relativement stable, accusant cependant des variations de températures intramusculaires à l'effort pouvant affecter la pompe et la situer hors de sa zone d'activité optimale contextuelle. Grâce à des études en physiologie comparative, des groupes de recherche ont décelé des différences dans l'activation à différentes températures permettant l'adaptation et la fonction de certains organismes à des climats extrêmes. Ces adaptations moléculaires de la cinétique enzymatique semblent être le résultat de modifications uniques issues de mutations génétiques concernant des résidus d'acides aminés.

L'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ est une caractéristique intrinsèque du fonctionnement de SERCA. Comme vu précédemment, il est nécessaire à l'équilibre électrostatique et fait partie intégrante du cycle de transport. Il a été démontré que lorsque la quantité de H^+ présente était limitante dans le SR, l'activité de la pompe était diminuée. En effet, lorsque le pH se situe au dessus de la valeur physiologique de 6.8, l'accumulation de calcium par SERCA est diminuée car la dissociation de Ca^{2+} nécessite des protons H^+ pour s'opérer à l'intérieur du SR. Dans ce contexte, l'activité enzymatique augmente mais le transport net diminue. À titre d'exemple, le passage d'un pH de 7 à un pH de 8 engendrerait une accumulation 2.8 fois moins importante de quoi tandis que l'activité de quoi est augmentée 2.5 fois [110, 111]. Évidemment, un autre facteur limitant dans l'activité de la pompe est en lien à sa nature ATP-ase. Le substrat énergétique clé du transport, l'ATP, doit être disponible afin que le cycle catalytique soit mené à bien. Un manque d'ATP ou une trop grande prévalence de ses sous-produits d'hydrolyse pourrait court-circuiter ou minimiser l'accumulation calcique. Dans un cadre plus métabolique, les substrats énergétiques dont la synthèse de l'ATP est issue doivent être des précurseurs non limitants. On sous-entend ici les composés de proximité comme la phosphocréatine mais également tous les intermédiaires des sentiers glycolytiques et oxydatifs qui mèneront à la biosynthèse de l'ATP.

Des modifications de résidus cystéines par oxydation liée aux espèces oxygénées réactives ont été associées à une activité de SERCA compromise dans diverses pathologies qui incluent des niveaux d'oxydant élevés [130, 131]. Plus précisément, ces altérations irréversibles issues du stress oxydatif prennent la forme de sulfonylation à la cystéine 674 ainsi que de nitration aux tyrosines 294/295 [132, 133]. Une autre modification possible est la glutathiolation de la cystéine 674. Cet événement est réversible et contrairement à ceux issus du stress oxydatif, a pour effet d'augmenter l'activité de SERCA [134]. D'autre part, le stress oxydatif pourrait compromettre l'intégrité du SR et lors d'atteintes à la structure phospholipidique de ce dernier, la fonction de SERCA pourrait en être considérablement amoindrie.

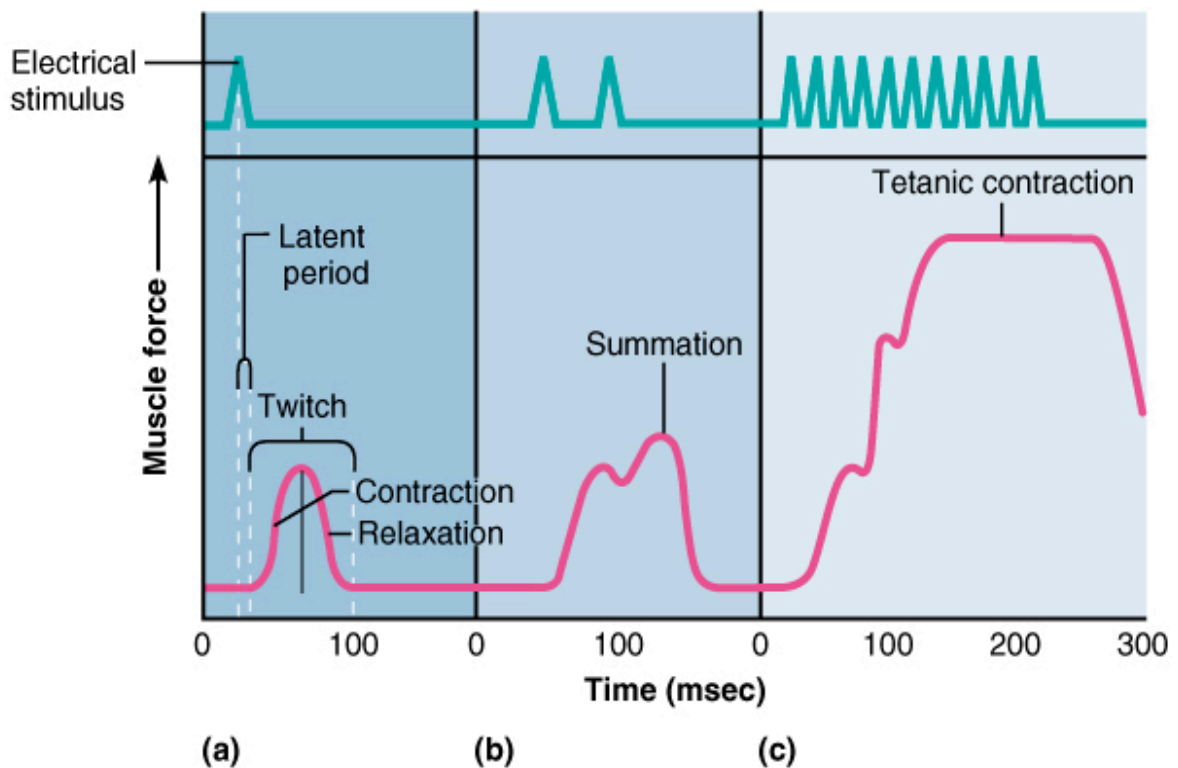
2.8 Les propriétés contractiles: protocoles, possibilités et interprétations

Le domaine de la physiologie musculaire appliquée s'intéresse à des principes biochimiques, interactions moléculaires, mobilisations ioniques et autres notions qui seront étudiées dans un but de transposer les connaissances fondamentales à des effets fonctionnels tangibles. Les tests comportementaux visant à déterminer la fonction musculaire de l'animal abondent, mais ultimement, du au manque de finesse et à la reproductibilité fastidieuse de ce type d'expérimentation, cette fonction sera appréciée à partir de la collecte de paramètres issus des propriétés contractiles. Néanmoins, les réponses apportées par des expériences fonctionnelles comme le *rotarod*, le tapis roulant, la roue, la cage métabolique, le test de suspension et autres tests sont pertinentes et ont leur place dans la validation d'hypothèses expérimentales. Les expériences de contractilité isométrique peuvent prendre plusieurs formes et constituent généralement la mesure étalon, standard de référence dans le domaine. En ordre de finesse technique relative, la première technique est la mesure de contractilité *in situ*. Brièvement, cette méthode utilise l'insertion tendineuse d'un muscle squelettique comme point d'attache à une jauge de force tandis que l'origine de ce dit muscle est préservée en place et l'articulation est immobilisée avec précaution. Habituellement, l'utilisation d'électrodes en contact avec le muscle est l'intermédiaire pour transmettre le voltage. Les propriétés *in situ* ont l'avantage de conserver un environnement fidèle à la physiologie, moyennant quelques considérations concernant le maintien de la

température et de l'hydratation des tissus exposés. Malgré les risques de mortalité liés à l'anesthésie et la lourdeur expérimentale requise pour obtenir des données précises à grande échelle, des résultats de qualité peuvent être récoltés à l'aide de cette méthode. Une autre méthode de contractilité qui est reconnue comme véritable standard consiste en l'isolation *ex vivo* de muscles squelettiques sous anesthésie et analgésie. C'est la technique utilisée dans le cadre de nos expériences et fera l'objet de la section suivante. Enfin, une expérience à la fine pointe de la précision et de la technologie moderne est la mesure de contractilité *ex vivo* sur fibre musculaire isolée. L'étape supplémentaire consiste à isoler une fibre unique à partir d'un muscle entier en préservant toutes les qualités de cette dernière. De plus, l'appareillage est d'une sensibilité considérablement supérieure à celui utilisé pour le muscle entier et se doit d'être substitué en conséquence. En contexte de modèle animal murin, peu d'équipes maîtrisent cette démarche expérimentale de par la complexité et la finesse des manipulations.

En ce qui concerne la procédure *ex vivo* utilisée aux fins de l'étude actuelle, en voici la description. Le muscle d'intérêt est délicatement prélevé par ses tendons en veillant à ne pas faire injure à son intégrité. Généralement, l'*EDL* et le *Soleus* sont les muscles préférentiels, de par leurs phénotypes typiques, caractéristiques physiques les rendant aptes à l'incubation et emplacements relativement accessibles en chirurgie. À titre informatif, le *biceps* et le diaphragme sont également couramment utilisés. Une fois disséqué, le tissu musculaire est immédiatement incubé dans un tampon physiologique (pH = 7,4) à température contrôlée (25°C) contenant le nécessaire aux fonctions normales du tissu. De plus, le milieu est perfusé en carbogène afin d'assurer l'apport en oxygène (95% O², 5% CO²) aux cellules musculaires. Considération importante; l'équilibre ionique précis de la solution permet à la fois de conduire le courant et de respecter les propriétés cellulaires. Une extrémité du muscle est attachée à une électrode fixe tandis que l'autre est nouée à la jauge de force. L'électrode est reliée à un équipement de contrôle électrique commandé tandis que la jauge à un équipement d'acquisition de données. Cette électrode fera office de stimulation nerveuse artificielle, à l'instar du potentiel d'action, délivrant les voltages et fréquences de stimulation désirées. Cette particularité permet d'obtenir le plein potentiel du

tissu musculaire, outrepassant les altérations possibles liées à une condition touchant les afférences nerveuses. Un autre avantage, selon les signes vitaux de l'animal, est la possibilité de prélever plusieurs muscles du même individu et donc de réduire le nombre d'animaux requis pour des expériences couteuses et accaparantes. Une limite liée à cette technique est reliée au fait que le muscle est hors de l'animal et la perfusion doit être artificielle via le milieu. Considérant des constantes de perfusion en fonction de la distance à parcourir intra-tissulaire, utiliser des muscles de fins diamètres est primordial et restreint les muscles candidats à ce genre de technique. De plus, la dextérité nécessaire afin de mener à bien la chirurgie peut engendrer des erreurs techniques qui seront dévoilées lors de la prise de données. Règle générale, les protocoles *ex-vivo* vont calquer les étapes correspondantes à cette description mais néanmoins, certains paramètres peuvent varier comme par exemple la température d'incubation. Lors de la comparaison de valeurs contractiles, il est essentiel d'avoir en main les informations relatives à ces conditions, en plus de porter une attention particulière aux unités de grandeur utilisées.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figure 7 : Représentation graphique de la force en fonction du temps; de la secousse au tetanus. Tirée de [53]

Un protocole classique débute par la détermination de la longueur optimale du muscle en contexte de stimulation de secousse [17]. Cette secousse maximale est la réponse musculaire à une impulsion nerveuse unique, dans ce cas-ci électrique, et sera utilisée afin d'acquérir des valeurs liées à la cinétique contractile. Les informations comprennent le temps requis pour atteindre la tension maximale, le demi temps de relaxation et l'amplitude. Ces données fonctionnelles représentent de précieux indices dans la compréhension des mécanismes moléculaires caractérisant l'animal à l'étude. En effet, le temps requis afin de développer la secousse maximale, temps de contraction (CT) fournira des renseignements liés au type de myosine présente et aux acteurs impliqués dans la libération du calcium. La valeur dP/dT , taux de génération de la tension musculaire, peut aussi être calculée. Elle dépend de la compliance et du type de myosine en place, une grande rigidité et une myosine rapide sont les conditions nécessaires pour obtenir un taux abrupte. De l'autre côté, le temps de demi-relaxation ($\frac{1}{2}RT$) guidera les conclusions en rapport avec la recapture calcique du muscle, dont les ATP-ase du SR assurent un rôle majeur. Le $\frac{1}{2} RT$ donnera aussi des informations par rapport à la compliance et aux éléments élastiques en série du muscle. Il est à noter que le temps de demi-relaxation peut être acquis une deuxième fois, ici dans le cadre d'une contraction tétonique et non dans une situation sous-maximale de type secousse. Dans un contexte de contraction isotonique, le déplacement en fonction du temps peut être mesuré et suite à la collecte de données à plusieurs charges, on peut les réunir dans une courbe de force en fonction de la vitesse et extrapoler la V_{max} . La V_{max} représente la vitesse de raccourcissement lorsque le muscle est stimulé de façon maximale et que la charge appliquée sur celui-ci est nulle. Suite à la stimulation isolée, un continuum croissant de stimulations sera appliqué, entrecoupé de périodes de repos standardisées permettant la récupération optimale. Ces stimulations à des fréquences croissances de 10 à 150 hertz d'une durée de 500 ms à 25V donneront lieu à la sommation de la force de secousse et permettront de déterminer la force maximale pouvant être produite par le muscle. Habituellement, un muscle de phénotype rapide atteindra sa force maximale aux environs de 120 hertz alors qu'un muscle dit plutôt lent aura tendance à plafonner en amont de cette valeur. Lors de ces sommations, les ponts croisés demeurent actifs et il n'y a pas de relaxation entre les impulsions électriques. Afin de raffiner cette mesure, l'utilisation du calcul suivant permet de normaliser la force maximale en fonction de la masse du muscle et

de la longueur des fibres, obtenant ainsi une idée plus réaliste des forces obtenues par rapport à la qualité et à la dimension du muscle. Cette équation inclut donc une constante de densité musculaire, déterminée dans de précédentes études, qui est unique pour tous les muscles et qui représente 1,062 mg/mm³. La constante appliquée sur la longueur du muscle afin d'obtenir la longueur des fibres (Lf) est variable selon le type de muscle étudié. Le long extenseur des doigts (*EDL*) par exemple, exhibe une constante de 0,44 tandis que pour le *soleus*, la valeur 0,62 est utilisée [45, 135].

$$sP_0 (N/cm^2) = P_0 (g) \times Lf (mm) \times \text{densité du muscle (mg/mm}^3) / \text{masse du muscle (mg)}$$

Mis à part le test de production de la force maximale, une batterie d'autres protocoles peut être effectuée comme le test de puissance, véritable mesure de vitesse d'exécution de la force. Le test de fatigue est un protocole personnalisable qui enchaîne des contractions à des intervalles rapprochés donnés. Le résultat d'intérêt peut être le temps requis pour atteindre une baisse de force établie ou la baisse relative de force après une épreuve chronométrée. D'autre part, le protocole de contractions excentriques est possible et peut apporter des indices sur l'intégrité structurale et la capacité du muscle à tolérer ce type d'effort selon sa condition. D'autres tests ayant des objectifs communs qui représentent une réelle épreuve de tolérance à l'étirement en contexte passif ou contractiles sont les tests de claquage, d'étirement et de rupture. Ces tests joueront auprès des limites de capacités plastiques du muscle et pourront apporter des réponses quant à la capacité des structures structurales à tolérer l'étirement et la tension. Au final, l'équipement de stimulation peut produire le stimulus contractile selon la volonté de l'utilisateur et selon les réponses désirées [135].

Le protocole de propriétés contractiles est donc un outil d'une puissance significative qui, lorsque combiné à des méthodes biochimiques et moléculaires, peut dresser un portrait représentatif de la fenêtre physiologique testée. Il permet de cerner plus efficacement les effets fonctionnels liés à une pathologie ou une myopathie induite afin de mieux cibler les traitements potentiels et d'orienter les efforts qui seront reconduits à la recherche dite

clinique. Additionné à cette variété de tests, les propriétés contractiles en incubation permettent un répertoire substantiel de variantes. En effet, le milieu physiologique utilisé constitue une réelle opportunité de mettre en contact avec les cellulaires musculaires des molécules ou drogues d'intérêts. Selon leur caractère physicochimique et leur taille, certains de ces composés sont solubles dans les conditions expérimentales du bain et peuvent diffuser et rejoindre de façon uniforme les fibres du muscle. Ce faisant, il est alors possible d'étudier avec précision l'effet de l'exposition de ces molécules et des conséquences fonctionnelles. Dans un répertoire plus connu, l'utilisation de caféine ouvre RYR et vide le SR de son calcium tandis que le CPA bloque la recapture calcique en inhibant les ATPase du SR [136, 137]. En utilisant des combinaisons de drogues similaires à ces deux dernières, il est possible d'étudier des phases particulières de la contraction en jouant sur des acteurs précis. En plus de ce volet pharmaceutique, les conditions du milieu et du bain lui-même peuvent être manipulées afin de tester l'effet de la température, de la teneur en O_2 ou de différentes concentrations ioniques comme le calcium, entre autres.

Section 3 ; L'atrophie et l'hypertrophie; dégradation et synthèse

3.1 Un survol des stimuli

Le thème de la plasticité musculaire est récurrent au fil des sections et cela est d'autant plus pertinent dans la présente dissertation sur l'atrophie et l'hypertrophie. En conditions évolutives naturelles que l'on pourrait qualifier de normales, le corps humain est un chef d'œuvre évolutif et la régulation de la masse musculaire n'en fait pas exception. Faisant autrefois face à des apports énergétiques temporellement hétérogènes mais simultanément confronté à des efforts de subsistances considérables, la masse musculaire squelettique ajustable et son phénotype malléable ont rapidement été favorisés par les pressions de la sélection naturelle. Une masse musculaire optimalement accordée aux besoins et dépenses énergétiques quotidiennes a fixé l'évolution des populations. Le phénotype du tissu musculaire squelettique et la quantité de ce dernier sont dictés par les stimuli de l'environnement, entre autres [19-22]. C'est selon ce principe qu'il peut réguler sa masse et l'ampleur de sa machinerie contractile pour pallier aux besoins de sédentarité ou au grandes activités physiques. Ultiment, le muscle intégrera les différents signaux via les sentiers

de signalisation, selon ses capacités à les percevoir, et il en résultera possiblement un niveau d'équilibre entre la synthèse protéique et la dégradation. Certains agents ou stimuli joueront sur des acteurs anaboliques, cataboliques, répresseurs d'anabolisme ou anti-cataboliques. Ces différents angles influenceront donc à leur manière, singulière ou combinée, le bilan protéique de la cellule. Les secteurs touchés par ce remodelage peuvent être spécifiques et toucher un ou des paramètres comme la morphologie, le métabolisme, la physiologie contractile, etc. [138].

3.2 La synthèse protéique

La cellule utilisera la synthèse protéique comme outils de croissance, de remodelage et de régénération. Cette synthèse sera conduite par l'information génétique contenue dans les noyaux, couplée à l'activité myogénique des cellules satellites [37]. De façon générale, plusieurs situations peuvent mener à l'hypertrophie dont la plus reconnue est l'induction par l'entraînement en résistance [139, 140]. En fait, plusieurs facteurs semblent contribuer à un état favorable à la synthèse protéique. Le muscle s'adaptera en effet selon certains contextes dont l'ampleur du stress mécanique, la durée du temps sous tension, et le volume ainsi que la surcharge progressive du travail. D'un autre côté, il réagira au stress métabolique comprenant des signaux provenant de l'accumulation du lactate, de l'hypoxie, des mouvements calciques, de l'état d'hydratation, de la disponibilité des nutriments, de la présence d'espèces oxygénées réactives, de pressions cellulaires, etc. D'autre part, la sensibilité aux différents composés endocriniens et à différentes molécules pharmacologiques est un régulateur puissant dont est doté le muscle. Il est cependant capital de mentionner que ces signaux doivent être interprétés et intégrés dans un contexte spatio-temporel défini, une exposition à court terme ou à long terme pourrait ne pas engendrer le même type adaptation. Dans le cadre du présent mémoire, survolons brièvement la principale voie reconnue comme étant associées à la synthèse protéique; la voie Pi3K/Akt/mTOR via l'activation de IGF-1. Le facteur de croissance de l'insuline (IGF-1) se liera à son récepteur et activera la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) qui phosphorylera la *phosphatidyl-inositol-diphosphate* (PIP2), conduisant à la phosphorylation d'Akt. Par la suite, l'activation de la *mammalian target of rapamycin* (mTor) par Akt va

promouvoir la traduction et l'élongation protéique via la phosphorylation de la *p70-ribosomal S6 kinase* (P70S6K). Akt agit également en inhibant les *eIF4E-binding proteins* (4EBP1) et la *glycogen synthase kinase-3b* (GSK3B), respectivement répresseurs de la transcription et de la traduction protéique. Cette voie possède également des effets importants d'inhibition de l'activité de protéines impliquées dans la dégradation et l'apoptose [141]. De l'autre côté, la contribution des cellules satellites prendra la forme générale suivante. Comme énoncé précédemment, on en retrouve deux populations et suite à la sortie de l'état de quiescence, leur destinée sera de contribuer à la réserve de cellules satellites, par division dite asymétrique, ou encore d'être commises à la différenciation en myoblastes, par division dite symétrique, qui fusionneront afin de former des myotubes et contribuer aux myofibres matures. Ces processus sont finement régulés par les facteurs de régulation myogéniques *paired box 7* (Pax7), *myogenic factor 5* (Myf-5) et *myoblast determination protein* (MyoD), impliqués dans les cycles de prolifération, dans la destinée des cellules satellites et dans l'initiation de la différenciation. [140, 142-148]

3.3 La dégradation

Outre la panoplie existante d'atteintes traumatiques et génétiques qui regroupent entre autres les claquages, dystrophies, myopathies et myasthénies, les atteintes atrophiques peuvent apparaître en comorbidité ou prévaloir seules. En ce qui concerne cette dernière catégorie, les principes de stimuli précédemment énoncés pour l'hypertrophie sont transposables advenant un profil qui se détériore ou lors de périodes d'exposition qui dépassent la barrière physiologique favorable. À titre d'exemple, une hypoxie aiguë peut être un signal de biosynthèse de machinerie oxydative et d'angiogenèse mais l'hypoxie chronique peut entraîner l'atrophie et la mort cellulaire. Ajoutons donc à cela des conditions connues qui dirigent des effets cataboliques ou qui compromettent la synthèse protéique, car il faut rappeler que le ratio synthèse/dégradation peut être touché à plusieurs niveaux. On peut classer les causes de l'atrophie en trois grandes appellations comprenant la sous-utilisation, la cachexie et la sarcopénie. L'atrophie causée par la sous-utilisation peut prendre plusieurs formes et provient de la nature plastique du muscle à s'adapter à la demande reçue. On répertorie des contextes d'immobilisation par plâtre, de sédentarité

extrême, d'hypogravité, d'alitement prolongée, ou même d'incapacité de recrutement par dénervation. D'autre part, la cachexie est une condition multifactorielle associée à des maladies systémiques chroniques affectant à la baisse la masse maigre et sa fonction. Bien qu'il n'y ait pas de consensus clair sur la définition et les limites d'inclusion de cette condition, le cancer, la maladie pulmonaire obstructive chronique et le SIDA sont au nombre des différentes atteintes évoquées. La sarcopénie quant à elle, est une dégénération de la masse et de la qualité musculaire associée à des perturbations hormonales et neuromusculaires occasionnées par le vieillissement. Cette condition est intimement reliée à la perte de la qualité métabolique du tissu musculaire, principalement par une perte graduelle de la sensibilité à l'insuline, occasionnant plusieurs autres effets néfastes menant à une spirale dégénérative [20, 29, 149, 150].

La présente section s'attardera donc sur les principales voies de signalisation associées à l'atrophie et à la dégradation. Bien que les différentes causes d'atrophie puissent partager des sentiers communs, ils peuvent différer grandement quant à l'orchestration et à l'implication d'acteurs précis. On retrouve principalement la machinerie du système ubiquitine-protéasome, les mécanismes de protéolyse et les enzymes lysosomales pour l'autophagie. La cellule possède également la programmation apoptotique qui ne constitue pas une voie de dégradation en soit, mais qui influence le remodelage tissulaire via la mort cellulaire programmée [143, 144, 151].

3.4 La machinerie du système ubiquitine-protéasome

La machinerie du système ubiquitine-protéasome constitue généralement l'acteur majoritairement responsable de la dégradation protéique. Les ubiquitines ligases clés retrouvées dans plusieurs conditions atrophiques sont Murf-1 et Atrogin-1/MAFbx. Elles ne représentent en fait que deux acteurs sur une multitudes de ligases retrouvées dans le muscle, dont TRAF6, ligase E3 en amont, médiateur de polyubiquitination de type Lys63 impliqué dans la pleine activation d'acteurs comprenant JNK, FOXO3, NFkB et AMPK. Les caractéristiques fondamentales des ces deux ubiquitines ligases sont les suivantes.

Premièrement, les deux gènes sont spécifiquement exprimés dans les muscles striés. Deuxièmement, ils sont tous deux exprimés à des niveaux relativement bas dans des circonstances de repos. Troisièmement, l'expression des deux gènes augmente rapidement précédant l'éventualité d'une grande variété de conditions menant à la perte de masse musculaire. Toutes deux sont régulées par des médiateurs transcriptionnels incluant FOXO1/FOXO3a, NF-kB, C/EBP B, KLF15, Smad 3 et myogenin. Ces derniers sont activés par des signaux énoncés précédemment comme le stress oxydatif, l'inflammation, des cytokines, la carence nutritionnelle, inactivité neurale, l'hypogravité, etc. L'ubiquitination de protéines et de substrats comme l'ADN fait partie intrégré de plusieurs processus cellulaires. En effet, selon le caractère de mono, bi, ou polyubiquitination, les destinées et fonctions des substrats seront affectées de différentes manières. Ces effets peuvent être une relocalisation, une interaction inter-protéines, une régulation transcriptionnelle, un signal transmembranaire, etc. Parmi les nombreuses fonctions soupçonnées de ces deux ubiquitines ligases E3, celle d'intérêt est la polyubiquitination spécifique de substrats à partir de l'ubiquitine activé par les E1 (*Ub activating enzyme*), transférée aux E2 (*Ub conjugating enzyme*) puis finalement acquises par les E3 (*Ub protein ligase*) qui marqueront la protéine cible. Ce marquage aura habituellement lieu sur une lysine, mais peut également survenir sur un groupement NH₂ terminale ou une autre molécule d'ubiquitine déjà présente. La pensée actuelle dicte que les protéines marquées selon des chaînes possédant des liens de lysines K11, K48 et K29 seront mobilisées au protéasome 26S de façon subséquente, ce qui mènera à la dégradation et à la perte de masse musculaire. Le protéasome 26S est composé de complexes régulateurs 19S qui identifient les protéines polyubiquitinées ainsi que du complexe centrale 20S, siège de l'activité catalytique. À l'heure actuelle, il est difficile d'établir avec certitude et exactitude les substrats spécifiques qui différencient l'action de Murf1 de celle de Atrogin-1/MAFbx. Néanmoins, la littérature mentionne que le protéasome est ultimement responsable de 80 à 90% du renouvellement protéique. [30, 144, 150, 152-156].

3.5 La protéolyse dépendante du calcium: les calpaines

Un autre mode d'atteinte aux protéines musculaires est la protéolyse via les calpaines. Les

calpaines sont des cystéines protéases non-lysosomales dépendantes du calcium. Le tissu musculaire squelettique contient de façon ubiquitaire trois isoformes de calpaines; mu-calpaine, m-calpaine et calpaine-3. Grâce à leur activité de clivage, les deux premières formes seraient des médiateurs de différents événements cellulaires comme la myogenèse, la différenciation, ainsi que l'homéostasie et la mort cellulaire. Calpaine-3, quant à elle, serait plus particulièrement occupée au remodelage sarcomérique, son substrat préférentiel étant les protéines du cytosquelette comme la titine. Quoique sujet à d'autres études, les calpaines ne seraient pas aptes à dégrader les protéines en acides aminés ou même en segments peptidiques. Leur rôle en serait plutôt un de dépliement, rendant ces chaînes peptidiques accessibles à la "chambre " du protéasome pour la dégradation. Un système de dégradation en aval serait donc nécessaire afin de guider les protéines suite au désassemblage par les calpaines. En conditions natives ou dites de repos, les calpaines arborent une pleine longueur et une fois en contact avec le calcium, on retrouve leur forme autolysée témoignant de leur activation. Sans entrer dans les détails, l'ampleur des concentrations calciques ainsi que la durée transitoire de ces courants ioniques vont déterminer la spécificité et la durée d'activation des formes de calpaines [145, 150, 157-168].

3.6 Le système autophagie lysosomale

L'autophagie lysosomale est, quant à elle, un mécanisme de phagocytose dégradative où un phagosome se forme partir d'une double membrane. Ce phagosome englobera la protéine cible préalablement mono/bi-ubiquitinée ainsi que dirigée par la protéine d'échafaudage p62 et la dégradation aura lieu lors de la fusion à un lysosome, la mettant en contact son contenu enzymatique. C'est donc un couplage de la machinerie ubiquitine à l'artillerie de l'autophagie qui mènera à terme cette orchestration destructive. Ce mécanisme joue un rôle crucial de recyclage dans des conditions constitutives mais également un rôle important en réponse à la privation nutritionnelle, au stress oxydatif, à la carence en acides aminés et à certaines cytokines. La cellule doit donc être munie d'un équilibre finement régulé car un excès d'autophagie porterait atteinte à l'homéostasie par la destruction excessive de composantes essentielles aux activités normales et mènerait éventuellement à l'atrophie.

Par ailleurs, une insuffisance de ce phénomène perturberait à son tour l'homéostasie, menant à l'accumulation de composantes endommagées ou défectueuses, menant à des dysfonctions structurales et fonctionnelles causant des faiblesses musculaires. Le processus autophagique au sein du muscle squelettique est de type macroautophagie. À l'origine considérée comme un processus non-spécifique, plusieurs évidences suggèrent que l'autophagie serait compétente à la destitution de certains organites en particulier, comme par exemple les mitochondries en contexte de mitophagie, véritable point de départ d'une boucle amplificatrice du processus de programmation de l'atrophie. Comme nous venons de le voir, le processus nécessite une organisation rigoureuse et accuse certains défauts comme dans le cas de la maladie de Pompe, de la maladie de Danon et de la myopathie *X-linked*. [145, 169, 170].

3.7 La voie apoptotique de mort cellulaire programmée

La solution ultime à bien des injures ou défauts cellulaires est l'enclenchement de la signalisation de mort cellulaire préprogrammée; l'apoptose. Il a été démontré que les cellules musculaires étaient capables d'entrer en apoptose, notamment via l'action de certaines myopathies. La machinerie apoptotique est un outil central dans le remodelage, rendant possible le recyclage de cellules en fin de vie ou développant des anomalies délétères. D'ailleurs, hautement conservée au sein du vivant, l'apoptose est intimement reliée aux phases du cycle cellulaire car elle représente une des avenues tout indiquées lors de l'échec à un point de contrôle. C'est donc un rôle de pivot que revêt l'apoptose de par son implication dans la prolifération et la différenciation. Les premiers acteurs impliqués dans la chronologie apoptotique seront les caspases dites initiatrices 8, 9 et 12. Les caspases sont des protéases qui acquièrent leur activité suite à leur clivage protéolytique, entraînant une cascade de clivage d'autres caspases de manière amplificatrice. De façon générale, l'apoptose est déclenchée par deux types de facteurs. Premièrement, les facteurs externes se liant à des récepteurs associés à la mort cellulaire et deuxièmement, les événements cellulaires internes menant à la libération de molécules apoptotiques dans le cytoplasme par les mitochondries. Pour la catégorie interne, des paramètres comme le stress oxydatif démesuré ou une concentration calcique chronique dépassant les seuils physiologiques

entraîneront la mise en marche de la voie apoptotique. D'autre part, les caspases peuvent être sélectivement activées selon des stimuli apoptogéniques. À titre d'exemple, l'activation de la caspase 12 serait initiée par du stress au niveau du réticulum endoplasmique tandis que l'activation de la caspase 8 serait déclenchée par des signaux circulants comme le "*TNF-related apoptosisinducing ligand*" (TRAIL) et le ligand Fas (FasL). Quant à elle, la caspase 9 serait activée en réponse à l'apoptose médiée par des facteurs provenant des mitochondries comme le cytochrome C. Suite à ces activations spécifiques, on dénote une convergence vers les caspases dites effectrices 3, 6 et 7. Elles ont la fonction d'exécuter les processus destructifs menant à la mort cellulaire comprenant le démantèlement membranaire, la destruction des noyaux, la dégradation protéique, la fragmentation de l'ADN et l'insertion du contenu cellulaire dans des vésicules vouées à la phagocytose. Mentionnons que les cellules sont équipées de plusieurs éléments inhibiteurs d'apoptose et la régulation du mécanisme s'opère donc à plusieurs niveaux. En ce qui concerne le muscle squelettique, l'apoptose a été démontrée comme faisant partie des effets liés à des maladies neuromusculaires, à la dénervation, à la sous-utilisation, à l'ischémie, à l'exercice et à la sarcopénie. Autrement, l'apoptose semble aussi un joueur important dans les processus adaptatifs reliés à la plasticité et à l'homéostasie tissulaire. [145, 171-173]

Section 4 ; Les types de fibres et plasticité phénotypique

4.1 Le rôle et la répartition

Que ce soit le muscle squelettique, lisse ou cardiaque, tous et chacun accomplissent des fonctions définies nécessitant des capacités qui leur sont propres. De façon générale, les muscles squelettiques qui assurent des rôles posturaux sont majoritairement composés de fibres lentes (I) tandis que les muscles impliqués dans le mouvement sont constitués en grande partie par des fibres rapides (II). Malgré l'existence de muscles spécialisés, l'hétérogénéité morphologique, physiologique et métabolique au sein d'un muscle permet une flexibilité rendant possible l'accomplissement de tâches variées. Les muscles étudiés dans les études courantes du laboratoire illustrent bien ce principe et sont choisis pour leurs phénotypes distinctifs. D'un côté, le *soleus* est composé majoritairement de fibres lentes

chez l'homme tandis que de l'autre, la plupart des fibres de l'*EDL* sont décrites comme étant rapides [174, 175]. Il est à noter que ces proportions sont sujettes à des variations importantes selon l'espèce de mammifère mais également au sein même des individus selon différents paramètres comme l'âge et la présence de polymorphismes particuliers. [50, 174].

4.2 Le continuum phénotypique

Le tissu musculaire squelettique arbore un continuum phénotypique. Cet échelonnement peut être observé lors de la comparaison de muscles ou de fibres distinctes, mais on peut également discriminer des caractères phénotypiques variant au fil d'une même fibre comme par exemple l'isoforme de myosine exprimée. Bien sur, une classification nette existe mais il faut garder en tête la présence d'un gradient phénotypique propre à certaines fibres et à certains muscles. Les types de fibres de rongeurs sont dénotés I, IIa, IIx et IIb et peuvent être classées selon des critères reliés à la durée de la secousse, à la vitesse de raccourcissement, à la fréquence de stimulation, au métabolisme, à l'endurance à l'effort et à l'efficacité énergétique. On peut aussi asseoir notre caractérisation sur des données fonctionnelles contractiles incluant le *time to peak tension* et le *half relaxation time*. Concrètement, on utilise des outils moléculaires comme l'électrophorèse, l'histochimie ou l'immunohistochimie pour discriminer le type de la chaîne lourde de myosine exprimée ou la quantification de l'abondance de substrats propres à une machinerie métabolique correspondant à un type de fibre. Les fibres de type I, stimulées à basse fréquence, performant des contractions lentes et endurantes pouvant être maintenues sur une longue période grâce à leur métabolisme oxydatif et à leur contenu riche en myoglobine. Les fibres de type IIa constituent en fait un phénotype intermédiaire possédant une contraction rapide, une endurance moyenne et un métabolisme partagé entre l'oxydatif et le glycolytique. Chez le rongeur, les fibres de type IIA ont un potentiel aérobie plus élevé que les fibres de type I. Quant à elles, les fibres IIx et IIb sont spécialisées et ont une contraction rapide issue d'une stimulation à haute fréquence. De par leur métabolisme glycolytique, elles ont une faible endurance. [50, 176, 177]







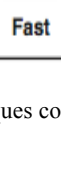
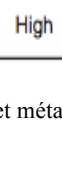
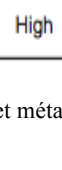
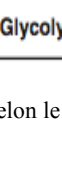


MyHC type	Twitch duration	Shortening velocity	Stimulation frequency	Metabolism	Endurance	Energy efficiency						
I	Slow 	Slow 	Low 	Oxidative 	High 	High 						
Ila												
Ilx												
Ilb							Fast 	Fast 	High 	Glycolytic 	Low 	Low 

Figure 8 : Tableau des caractéristiques contractiles et métaboliques selon le type de MyHC. Tirée de N. Dumont

4.3 Les caractéristiques distinctives

Au delà de l'essence de l'unité motrice et des qualités macroscopiques comme les caractéristiques structurales, l'aire des fibres, la capillarité, la densité mitochondriale et la surface de la plaque motrice, plusieurs autres caractéristiques distinguent les types de fibres et définissent leurs identités de façon profonde. Dans le cadre du présent mémoire, effleurons des notions pertinentes à la compréhension de cette diversité. Ces différences sont nombreuses et peuvent se situer au niveau de la perméabilité ionique, hydrique et métabolique, façonnant l'électrophysiologie en ce qui a trait à la capacitance et à la résistance membranaire. D'autre part, les mécanismes d'action myofibrillaires et les déterminants moléculaires de la sensibilité au calcium varient. Aussi, la cinétique de largage et de recapture du calcium est sujette à des changements, notamment au niveau du volume du SR et de la densité de l'isoforme de SERCA présente [95, 178]. Également, les niveaux de calcium de repos, les entrées calciques et la présence d'agents tampons altèrent la contraction. Les niveaux de réserves énergétiques et leurs natures; glycolytiques ou lipidiques, sont également au nombre des facteurs variant, en plus des habiletés de transports et d'utilisation de ces substrats. [97, 179-182]

4.4 La plasticité phénotypique

Initialement déterminé lors de l'expression du programme génétique lié au développement embryonnaire par des facteurs myogéniques intrinsèques, le phénotype sera éventuellement modulé par des paramètres neuraux, mécaniques, hormonaux et métaboliques [19-22]. Ces

paramètres peuvent être regroupés et être qualifiés d'environnement et entraîneront l'activation d'acteurs de signalisation dont découleront des cascades biochimiques qui demeurent mal comprises à ce jour. Bien sur, une myriade de myopathies et conditions influencera le typage. Par exemple, le vieillissement, la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'hypogravité, le jeun et la dénervation ont été soulevés comme étant au nombre des causes donnant lieu à des conversions phénotypiques. Le muscle peut également accuser une telle conversion dictée par la tâche appliquée plus ou moins volontairement. Ainsi, dans une certaine mesure, un effort d'intensité faible de longue durée favorisera le phénotype oxidatif lent tandis qu'à l'opposé, un effort en résistance d'intensité moyenne à élevée produira des changements associés au phénotype glycolytique rapide et à l'hypertrophie[183-185].

Section 5 ; la myopathie associée aux statines.

La dernière section de l'introduction portera sur les statines, inhibiteurs de l'enzyme *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-Coa)* réductase et donc de la mévalonate qui est un produit au carrefour d'une étape limitante dans la biosynthèse du cholestérol [1]. Lors d'une prise orale, les statines administrées sont principalement distribuées dans le foie et inhibent la synthèse du mévalonate à la manière d'un analogue antagoniste du HMG-CoA. Ce faisant, l'expression du récepteur LDL augmente dans le foie, augmentant l'endocytose associée à ce récepteur et réduisant par le fait même les niveaux de cholestérol dans la circulation, permettant l'atteinte d'une valeur thérapeutique cible établie par le clinicien [186].

5.1 Prévalence et bénéfices du traitement

Les statines sont parmi les médicaments les plus communément prescrits au monde et d'ailleurs, environ 10% des Nord-Américains en consommeraient quotidiennement [187]. Au chapitre de la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires, les rôles revêtus par les statines sont nombreux et reconnus. Par exemple, une méta-analyse

basée sur 5 études cliniques a révélé que trois statines différentes (lovastatine, simvastatine, pravastatine) réduisaient les principales maladies coronariennes et la mortalité de 31% et 21% respectivement [2]. D'autres travaux de cohortes à grand déploiement confirment également ces dires [3]. De plus, un grand nombre d'effets pléiotropiques ont été répertoriés [5]. Ces effets comprennent l'amélioration de la fonction endothéliale, l'inhibition de l'inflammation vasculaire, de la thrombogénèse et de l'oxydation des lipoprotéines de cholestérol de faible densité. Également, elles jouent un rôle dans la stabilisation des plaques athérosclérotiques, des actions immunomodulatrices et ont des effets antiprolifératifs des cellules musculaires lisses [4, 6, 7].

5.2 Effets indésirables variés

Règle générale, l'utilisation de statines est bien tolérée et possède un profil clinique sécuritaire [188]. Mais de l'autre côté, des effets qui exacerbent ou qui causent une variété d'indésirables ont été catalogués ; hépatotoxicité, AVC hémorragique, déclin cognitif, neuropathie périphérique, diabète, insomnie, tendinites, arthralgie, arthrite, cataractes, résistance à l'insuline, etc. [189-191]. Certains patients développent une myopathie dite autoimmune nécrotique qui perdure malgré l'arrêt du traitement. Les anticorps anti-HMGCR produits nécessitent même une thérapie immunosuppressive dans certains cas reliés à des prédispositions immunogénétiques [14, 192, 193]. Mentionnons simplement au passage que le traitement aux statines et l'exercice semblent incompatibles chez plusieurs sujets, de par les symptômes engendrés ou aggravés, éloignant ainsi ces patients de l'atteinte d'un profil cardiovasculaire sain et entraînant une spirale de dépendance potentielle envers la médication [194-197]. Pourtant, l'exercice est un moyen connu d'améliorer des paramètres de santé cardio-vasculaire et un groupe de recherche a décelé une protection au niveau des mitochondries chez les rongeurs ayant complété 10 jours entraînements précédant la prise de statines [134, 198-200].

5.3 Les symptômes musculaires

Néanmoins, en ce qui concerne le muscle squelettique, de nombreuses complications ont

été rapportées et étudiées. Selon les sources et le devis expérimental de ces études cliniques, de 0,1 à 25% des patients éprouveraient des complications musculaires, ces chiffres extrêmement étendus sont à considérer en sachant le fait que bien souvent, la présence de symptômes musculaires indépendants du traitement ainsi que l'exclusion de patients à hauts risques font varier les statistiques [8-10]. Ces statistiques sont également sujettes à la subjectivité par rapport aux signes cliniques considérés, au choix des critères biologiques d'inclusion et au statut de monothérapie ou de multithérapie du patient [8, 11, 12]. Ces symptômes varient grandement selon l'individu, allant de la simple myalgie, aux crampes, faiblesses et même jusqu'à la rhabdomyolyse fatale [13-15]. Ces symptômes seraient intimement liés à la dose administrée, aux facteurs de risques intrinsèques, à la présence de comédication et au caractère lipophile ou hydrophile de la molécule utilisée [201, 202]. La classe lipophile serait plus sujette aux symptômes, probablement dus à des systèmes de transport différents et à des concentrations intramusculaires supérieures attribuables entre autres à la diffusion [202-205].

Chez l'humain, un manque de cohésion et de convergence persiste en ce qui a trait à la définition clinique de la MIS. Toutefois, pour nous situer, selon la *US National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force*, une méta-analyse de 21 études cliniques ont stipulé que 5 patients/100 000 par année accusaient des niveaux de créatine kinase plasmatiques supérieurs à 10 fois la limite normale, atteignant le stade de myopathie, tandis que 1,6 patients dépassaient de plus de 100 fois cette limite combinée à une élévation de créatinine, atteignant la définition de rhabdomyolyse [204, 206, 207]. L'utilisation de l'activité de la créatine kinase plasmatique comme témoin de la MIS semble controversée et selon plusieurs, manquerait de précision spatio-temporelle et s'associerait mal aux symptômes cliniques [208-210]. Le défi est de bien cerner un ensemble de biomarqueurs qui seraient à même de dresser un portrait clinique de manière non-invasive [211].

À l'heure actuelle, afin de maximiser la tolérance et la compliance au traitement, plusieurs polymorphismes génétiques impliqués dans la pharmacodynamique des statines sont

étudiés et certains semblent corrélés avec des symptômes myopathiques chez des patients. Toutefois, les connaissances au sujet de ces biomarqueurs doivent continuer de s'accumuler car actuellement, les notions ne sont pas suffisantes pour effectuer une pré-sélection visant à identifier des patients susceptibles de développer des complications [212]. Prendre en considération les interactions de nature poly pharmacologique sont également primordiales afin de répertorier les risques de MIS [213, 214].

5.4 Les mécanismes potentiels

Dans le cas présent, l'intérêt sera porté sur des pistes explicatives de la MIS qui seraient sujettes à causer ou à contribuer au portrait myopathique. La littérature abonde de pistes intéressantes et de travaux crédibles issus de différentes écoles de pensées et expertises. Les sujets abordés dans le cadre de ce mémoire ne couvriront donc pas l'intégralité des hypothèses émises.

Le maintien des fonctions physiologiques musculaires passe par un fin équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique, des perturbations au sein de ces phénomènes ont d'ailleurs été reliées à la MIS. En effet, il a été démontré que les statines induisaient l'expression d'Atrogin-1, un gène clé dans l'atrophie via les ubiquitines ligases E3, accompagné par d'autres travaux soulignant une protéolyse de 5 à 10% supérieure par rapport au contrôle [215-217]. Dans le même ordre d'idées, la simvastatine réprimait la synthèse protéique chez les cellules musculaires C2C12 via la réduction de l'expression du facteur d'initiation eukaryotique 2B (eIF2) et par la régulation négative de la voie IGF-1/PI3K/Akt [215, 218-220]

La mitochondrie est au cœur de plusieurs processus dynamiques touchant la chaîne d'électrons de la phosphorylation oxydative, la gestion homéostasique du calcium et les signaux de mort cellulaire. Le volet mitochondrial de la MIS est très représenté dans la littérature, mettant de l'avant des niveaux d'ADN mitochondriaux abaissés, des altérations

du potentiel membranaire favorisant les cascades apoptotiques et des dysfonctions mitochondriales à l'exercice [219, 221-226]. Fait intéressant, certains effets des statines semblent être spécifiques aux tissus. Une étude a en effet démontré des répercussions différentielles sur le muscle cardiaque vs le muscle squelettique [227]. Dans les cellules de l'atrium, les statines ont déclenché l'activation de la transcription de la biogenèse mitochondriale tandis que dans le muscle squelettique, elles ont induit un haut stress oxydatif responsable de l'effet contraire via une grande production d'espèces réactives oxygénées dépassant sans doute les seuils physiologiques [221, 228]. Des observations décrivant des modifications ultrastructurales des mitochondries suivent la même tangente, affectant le muscle squelettique mais laissant le cœur sain [229]. Une explication de ces divergences pourrait être au niveau de la biodisponibilité moléculaire via le transporteur *monocarboxylate transporter 4* (MCT4), absent chez les cardiomyocytes et dont l'inhibition abolirait les altérations dans l'homéostasie du calcium retrouvé chez les fibres musculaires squelettiques [221]. La mitochondrie serait donc au cœur de la dégénération de la MIS, à la fois victime et activatrice de cascades délétères pour la cellule. Cette spécificité tissulaire semble se préciser suite à l'émergence d'évidences plaçant les fibres musculaires rapides au premier rang de susceptibilité à la MIS par rapport à leur contrepartie phénotypiquement lente [230, 231]. Cette sensibilité accrue a été consolidée par des études histopathologiques et observationnelles, démontrant la dominance de nécrose chez les fibres de type IIb. Également, des analyses de spectroscopie infrarouge ont décelé des altérations macromoléculaires en lien avec le traitement. Ces changements concernaient des réductions de contenus protéiques, glycogéniques, lipidiques, d'acides nucléiques ainsi qu'une augmentation concomitante dans la fluidité membranaire. De plus, le repliement optimal des protéines, principalement réalisé au niveau du réticulum endoplasmique, était affecté à plusieurs niveaux. Ces perturbations biochimiques étaient plus évidentes chez les muscles rapides comme l'*EDL* par rapport au *soleus* [231]. Ces données portent à croire que la fonction du ER soit menacée, possiblement par un stress attribuable à un niveau de *reactive oxygen species* (ROS) ou de Ca^{2+} ayant tendance à dépasser les limites physiologiques, ou encore par une déstabilisation physico-chimique membranaire quelconque.

Dans un domaine connexe, la mévalonate est un précurseur pour la production d'isoprénoides comme le farnésylpyrophosphate et le géranylgeranylpyrophosphate. Ces isoprénoides sont spécialement importantes dans l'ancrage de petites GTP-ases à la membrane avant leur activation. Les Ras GTP-ases modulent la prolifération et l'apoptose, les Rho GTP-ases contrôlent la formation du cytosquelette et les Rab GTP-ases altèrent des composantes cellulaires essentielles pour le trafic vésiculaire. Ces GTP-ases sont donc d'une importance capitale pour la fonction cellulaire et l'hypothèse que compromettre leur synthèse soit au cœur de la MIS chez des myotubes est fortement considérée dans la littérature. En effet, certains groupes suggèrent que la MIS soit causée directement par l'inhibition de HMG-CoA réductase et des sous-produits du sentier comme l'ubiquinone et autres isoprénoides, et non par la réduction du cholestérol lui-même située en aval [202]. L'ubiquinone, connue sous le nom de coenzyme Q10, protège du stress oxydatif produit par les radicaux libres, participe au transport d'électrons au sein de la phosphorylation oxydative, régule la perméabilité des pores mitochondriaux et régule les propriétés physicochimiques des membranes [225, 226, 232]. Plusieurs études ont démontré que le traitement aux statines diminuait les niveaux sanguins et tissulaires d'ubiquinone chez l'animal ainsi que chez l'humain et certaines démontrent que l'administration de coenzyme Q10 renverserait certaines dysfonctions mitochondriales [232-234]. Ces altérations seraient liées aux niveaux de mévalonate [235].

Au niveau de la structure et de la fonction des membranes cellulaires, le cholestérol est un élément clé modulé par les statines et le muscle squelettique ne fait pas exception à cette action [236]. Cela prendrait la forme d'une réduction du cholestérol membranaire et pourrait rendre les membranes musculaires instables, pouvant affecter la fluidité membranaire qui à son tour affecterait des canaux ioniques comme les canaux potassiques et chloriques, modifiant l'excitabilité membranaire [230]. Par exemple, une étude démontre une baisse de conductance chlorique dépendante de la dose de simvastatine chez les fibres musculaires de rat [203]. Ces changements de conductance pourraient avoir un effet tangible sur l'électrophysiologie fonctionnelle du muscle et perturber la cinétique contractile [203, 237, 238]. Au niveau morphologique structural, toujours chez le rat, les

statines induiraient la vacuolation dans le cytoplasmes des fibres due à la dilatation du SR et des mitochondries, signes évidents de dommages musculaires [230]. Cette vacuolation aurait un effet prononcé retrouvé sur les tubules T provenant de biopsies humaines [239, 240]. En plus des observations précédentes, des équipes ont observé des baisses d'épaisseur et d'abondance ainsi que des lésions chez les myotubes C2C12 et les cellules murines primaires [241-243]. Des évidences de dommages peuvent aussi prendre la forme d'indices biochimiques comme la fuite d'enzymes intracellulaires telles que la créatine kinase, la lactate déshydrogénase ou l'aspartate amino transférase mesurés spectrophotométriquement à partir de milieux de différents modèles *in vitro* d'exposition à la cérostatine, atorvastatine, fluvastatine, pravastatine, lovastatine et simvastatine [222, 242, 243]. Des évidences morphologiques d'apoptose comme la fragmentation et condensation nucléaire ont pour leur part été visualisées chez des myoblastes de cellules de rat L6 traitées à l'aide de différentes statines [244]. Dans le même créneau, plusieurs tests sur différents modèles et différentes statines ont démontré la présence d'apoptose ou de cytotoxicité en réponse au traitement, particulièrement associé aux molécules lipophiles, que ce soit par la mesure de cytochrome C par les mitochondries, par des essais enzymatiques, techniques d'observation, colorations ou imageries par fluorescence diverses [245-248] [243, 249-253]. D'un point de vue plus signalétique, de nombreuses études *in vitro* ont détecté l'activation de la voie des caspases 3/7/9 suite au traitement de certaines statines en fonction de la concentration et de la durée d'exposition [249, 252, 254]. Cette activation serait précédée de l'induction des calpaines, succédant des niveaux calciques élevés pour une période prolongée, qui jouerait un important rôle initiateur concernant la voie des caspases [162].

Section 6 ; Pertinence et objectifs du mémoire

6.1 L'hypothèse du calcium

D'une haute pertinence dans le cadre de ce mémoire, des perturbations dans l'homéostasie calcique sont au nombre des idées accusant une certaine convergence dans la littérature abordant la SIM. Des travaux ont pu démontrer que le traitement aux statines affectait l'expression de gènes foncièrement impliqués dans cette homéostasie calcique [255]. Cette homéostasie perturbée sous la forme d'une élévation des concentrations de calcium

cytosolique au repos pourrait par le fait même être la source de dysfonctions, dérégulations et même de dommages [159, 237, 249, 256-258]. Selon certains groupes, cette dérégulation débiterait par le flux de calcium libéré précocement par les mitochondries qui entrainerait une élévation retardée du niveau de calcium cytosolique, attribuée à la libération ultérieure par le SR via RYR [221, 232, 234, 235, 256, 257, 259]. D'autres évidences démontrent aussi la perte d'homéostasie au niveau cytosolique par le largage de quantités importantes de calcium par le SR via une fuite des RYRs, additionné d'un flux de calcium à travers le pore de perméabilité ainsi qu'en provenance de l'échangeur sodium-calcium mitochondriaux suite à une dépolarisation inappropriée de sa membrane. Ces déplacements ioniques seraient d'ailleurs responsables de l'activation de la voie des caspases 3 et 9, discutés précédemment [260]. Ces mêmes perturbations calciques interféreraient avec le stockage ionique optimal par les mitochondries et le SR, occasionnant la perte de l'état physiologique [79]. Avec l'avancement des recherches touchant l'homéostasie calcique et toutes les connaissances concernant les défauts de pompes calciques, il est ardu de préciser les mécanismes exacts menant à ces altérations et de les relier de façon directe à des signes cliniques mais certains groupent avancent qu'il est possible d'établir une causalité entre la perte de l'homéostasie et la myotoxicité [159, 257, 261-263].

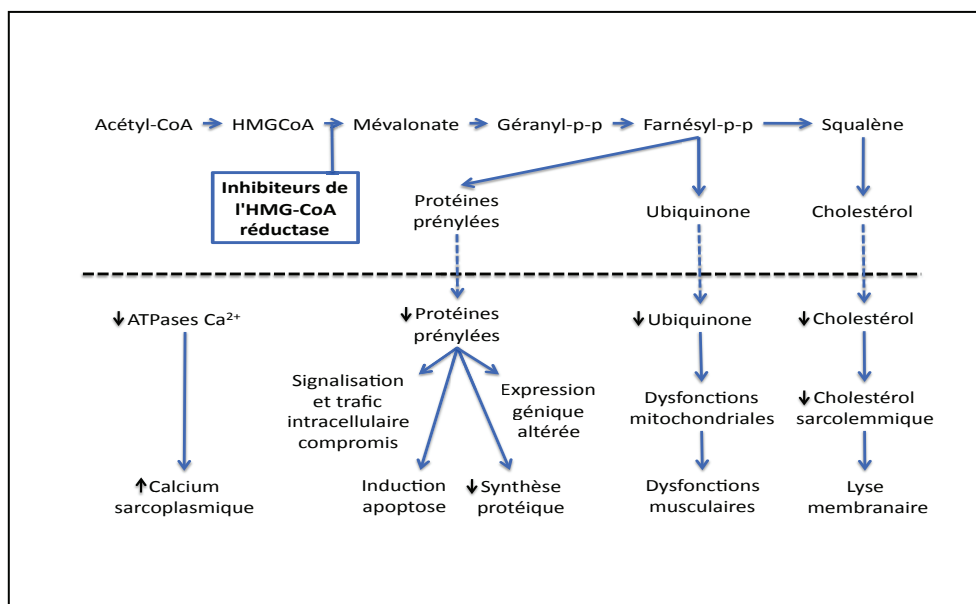


Figure 9 : Sentiers signalétiques possiblement affectés par les statines et leurs effets en aval. Adapté de [159, 257, 261-263]

À la lumière des ouvrages réalisés par des équipes de recherches dans des spécialités qui leur sont propres, il est aisé de réaliser la profondeur multifactorielle attachée à la MIS. Il est difficile d'exclure les effets des statines sur la fonction du SR et sur les détériorations au niveau du cyclage du calcium de ce dernier qui pourrait résulter d'un effet direct subi par les mitochondries. La perte de l'homéostasie calcique du SR et des mitochondries pourraient toutes deux être solvables du processus apoptotique, du stress oxydatif encouru, du remodelage musculaire et de la dégénération structurale. C'est donc avec la volonté d'élucider un volet de cette problématique que nous avons orienté nos recherches vers les ATP-ases du SR. Les informations recherchées s'imbriquaient de façon convaincante dans l'objectif d'élucider l'établissement de la MIS. Modelés en connaissances des informations précédentes, **les objectifs de l'étude se situent donc au niveau de la caractérisation des propriétés contractiles fonctionnelles post-traitement, ainsi qu'à l'étude de l'abondance protéique des pompes et à la prévalence des isoformes retrouvés. Les objectifs ont donc comme but commun de dresser un portrait de l'état des pompes SERCA afin de les situer dans la MIS.**

Chapitre 2 ; Le manuscript

Titre

Les effets du traitement à la lovastatine sur la fonction du muscle squelettique rapide.

Résumé

Les muscles squelettiques, particulièrement les fibres musculaires rapides, ont été largement rapportés comme étant sujets à la myopathie induite par les statines menant à la myalgie, aux crampes, aux faiblesses et même à de rare cas de rhabdomyolyses. Les pompes SERCA (*sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ATPase*) effectuent la recapture du Ca²⁺ vers le *lumen* du réticulum sarcoplasmique, permettant ainsi la relaxation et l'homéostasie du Ca²⁺ cytosolique. Dans la présente étude, nous utilisons des modèles *in vivo* et *in vitro* pour investiguer les effets secondaires du traitement à la lovastatine sur les propriétés contractiles ainsi que sur le contenu et l'activité des protéines de recapture du Ca²⁺. Nous démontrons que le traitement à la lovastatine prolonge le demi-temps de relaxation de la contraction tétanique de 48,7% et tend à augmenter l'abondance de l'isoforme lent SERCA2a (29%). Parallèlement, l'isoforme rapide SERCA1a est significativement réduit de 21% dans les myotubes C2C12 traités à la lovastatine. À noter que ces changements chez les muscles squelettiques ont lieu en l'absence de perte significative de masse ou d'intégrité, ainsi que sans l'activation de la voie protéolytique dépendante du Ca²⁺ des calpaines. Collectivement, nos données démontrent qu'il est possible d'induire des changements dans le profil contractile d'un muscle de phénotype rapide à un stade très précoce du traitement aux statines, conclusion contribuant à notre compréhension du mécanisme d'initiation de la myopathie.

Effects of lovastatin treatment on fast-twitch skeletal muscle function

Manuscript en préparation pour soumission dans *Journal of Pharmaceutical Sciences*

Antoine Boulanger Piette¹ and Jérôme Frenette^{1,2}

Affiliations

¹ Centre de Recherche du CHU de Québec-CHUL, Axe Neurosciences, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

² Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 0A6

Corresponding author:

Jérôme Frenette

CHUQ-CRCHUL

2705 boulevard Laurier

Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

Telephone: 418-656-4141, ext. 47779

Fax: 418-654-2145

Email: jerome.frenette@crchul.ulaval.ca

Abstract

Skeletal muscles, especially fast-twitch muscle fibers, have been widely reported to be prone to statin-induced myopathy, leading to myalgia, cramps, weakness, and even rhabdomyolysis in rare cases. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) pumps Ca^{2+} back into the sarcoplasmic reticulum allowing relaxation and cytosolic Ca^{2+} homeostasis. In the present study, we use *in vivo* and *in vitro* models to investigate the aftereffects of lovastatin treatment on contractile properties and calcium protein content and activity. Here we show that lovastatin treatment prolongs the tetanic half relaxation time by 48,7% and tends to increase (29%) the abundance of the slow-twitch SERCA2a isoform while reducing significantly the fast-twitch SERCA1a isoform by 21% in the C2C12 myotubes. Of note, these changes in fully differentiated skeletal muscles occur without any significant loss of muscle mass or integrity or activation of the calpain Ca^{2+} -dependant proteolytic pathway. Together, our data show that it is possible to induce changes in the contractile profile of fast-twitch muscle at a very early time post-statin treatment contributing to our understanding on how statins may initiate myopathy

Introduction

Statins are a class of drugs used to treat hypercholesterolaemia by inhibiting HMG-CoA reductase enzyme, which is a rate-limiting step in the biosynthesis of cholesterol. Statins are effective as primary and secondary preventions for cardiovascular diseases but their use is frequently associated with statin-induced myopathy (SIM). SIM encompasses myalgia, cramps, weakness, and even rhabdomyolysis [264]. The mechanisms and course of statin-induced muscle dysfunction/injury are poorly understood and appear multifactorial [211]. SIM may be the sum of multiple pathophysiological defects including; genetic predispositions [265], mitochondrial dysfunctions [224, 233, 257, 266, 267], prenylated proteins [268], inhibited protein geranylgeranylation [253], ubiquinone depletion [232, 234], loss of t-tubular region architecture [239, 240], altered membrane fluidity [11] and immune-mediated necrotizing [269]. Moreover, these events are linked to disturbance in the proper completion of the excitation-contraction coupling through compromised membrane polarization and altered sarcomere excitability thresholds [237, 238].

Impairment of the sarcoplasmic reticulum (SR)/mitochondria Ca^{2+} release system [256, 259] and concomitant loss of Ca^{2+} homeostasis has also been suggested as a crucial event for SIM [237, 256]. Myoplasmic Ca^{2+} transients are of paramount importance not only for proper muscle contraction and relaxation kinetics, but as an ubiquitous second messenger. Upon electrical stimulation, the release of Ca^{2+} from the SR triggers mechanical contraction through the excitation-contraction apparatus. Muscle relaxation occurs through the active reuptake of Ca^{2+} into the SR lumen through an ATP-dependent Ca^{2+} pumps called

sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), [92, 108, 111, 270-273]. SERCA pumps are defective in several forms of muscle and heart disease, prolonging muscle relaxation and reducing muscle force production [92, 271]. There are two SERCA isoforms in fully mature mammalian skeletal muscle, fast-twitch muscle cells are primarily equipped with the rapid SERCA1a whereas slow-twitch myofibers are exclusively fitted with SERCA2a [92, 274]. Interestingly, fast-twitch fibers are the first to disappear in numerous forms of muscle diseases and aging [275-277], and these fibers seem especially prone to SIM [238, 278, 279]. Failure to preserve physiological resting cytosolic Ca^{2+} may activate the calpain Ca^{2+} -dependant protease pathways [256], accompanied with repressed protein synthesis [215, 218], ubiquitin-proteasome arousal [197, 280], atrophy [215], myocellular damage [280] and ultimately, apoptosis [249, 253, 254].

Given the pivotal role of SERCA pumps in Ca^{2+} homeostasis and contraction kinetics, inadequate Ca^{2+} sequestration could potentially represent an exacerbating factor for the establishment of SIM. To our knowledge, there are no data available concerning the characterization of SERCA expression and muscle relaxation rate in statins treated mice. In the present research, *ex-vivo* contractile properties of EDL muscles and skeletal muscle C2C12 cell line were used to test the side-effects of lovastatin, a lipophilic statin chosen for its clinical relevance, mid-range potency and wide-spread use. Our findings showed that moderate statin treatment for 28 days [50mg/kg] does not influence maximal force production or time to peak tension of fast-twitch EDL muscles. However, the peak rate of tension development (dP/dT) is decreased and the relative force production at low frequency of stimulation [1-20 Hz] is increased suggesting a change toward slower phenotype in EDL muscles following statin treatment. Consistently with these observations,

the half relaxation time ($1/2RT$) for maximal tetanic contraction is significantly prolonged in these EDL muscles and the expression of the fast-twitch SERCA-1a isoform is decreased in statin-treated C2C12 myotubes providing new insights on how statins may interfere with muscle function.

Materials and Methods

Animals and experimental design

Male C57BL/6 mice (30–35 g) obtained from Charles River Laboratories International (St-Constant, QC, Canada) were housed one per cage, maintained in a 12 h light/dark cycle and given food and water ad libitum. The mice were orally administered with placebo gelatin gel or lovastatin in gelatin gel [50 mg/kg/day; J&K scientific (Shanghai, China)] for 28 days. The Animal Care and Use Committee of the CHUQ Research Centre approved all the experiments according to Canadian Council on Animal Care guidelines.

Isometric contractile properties

At the end of the 28 days treatment period, the mice were injected intraperitoneally with 0.1 mg/kg buprenorphine as an analgesic and were anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital sodium 15 minutes later. *Extensor digitorum longus* (EDL) and *tibialis anterior* (TA), two fast-twitch muscles, were harvested from the left hindlimb and immediately stored at -80 for further experiments. EDL muscles from the right hindlimb were carefully dissected and incubated at 25°C in buffered physiological saline solution for the entire set of experiments (Krebs-Ringer solution supplemented with 2 mg/mL glucose and oxygen). The optimal

length (L_0) was determined by measuring the tension at which the muscle produced a maximal twitch force, attached to both an electrode and a 305B-LR dual-mode lever arm sensor system controlled by dynamic muscle control and data acquisition software (Aurora Scientific Inc., Aurora, ON, Canada). Thereafter, the muscles were stimulated for 500 ms at 10, 20, 50, 80, 100 and 120 Hz in order to determine the absolute maximal force. Time-to-peak twitch tension (TPT, ms), 1/2 RT, (ms), twitch tension (P_t , g), maximum tetanic tension (P_0 , g), dP/dT and maximum specific tetanic tension (sP_0 , N/cm^2) values were also recorded. Specific muscle force was calculated as (absolute muscle force x optimal fiber length x muscle density)/muscle mass [135]. At the end of the contractile property measurements, the tendons were removed, muscle length was measured then muscles were weighed, embedded in tissue freezing medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA), frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, and stored at $-80^\circ C$ until used for immunohistochemical assays. Mice were then euthanized by cervical dislocation under anaesthesia.

Immunohistochemical experiments

Duplicate of transverse sections (10 μm thick) of proximal and distal portions of the EDL muscles were cut at $-20^\circ C$ using a cryotome (Leica Microsystems CM1850, Nussloch, Germany) and adhered to Superfrost®Plus Micro slides (VWR, Québec, Canada). Hematoxylin and eosin staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was performed to assess cross sectional area. Three images of each muscle section were randomly acquired with an inverted light microscope at x400 magnification, (Nikon, Mississauga, Canada). Approximately 100 fibers per section were analyzed. Fiber cross-sectional areas were

calculated using ImageJ software version 1.46r (NIH, Bethesda, MD).

Cell culture

C2C12 myoblasts at passages between 2 and 6 (ATCC, Manassas, VA, USA) were seeded in six-well plates in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% FBS (HyClone) and 1% antibioticantimycotic (Life Technologies) in a 5% CO² and 37°C environment. When the myoblasts reached 90% confluence, the medium was replaced by high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1% FBS for 5 days to induce differentiation into mature myotubes. The culture medium was replaced every 2 days. Myotubes were then treated with lovastatin (10 µM) or vehicle for 24h. Lovastatin concentration was based on previous pharmacodynamic and research studies [280-283].

Western blot

Myotubes or skeletal muscles were homogenized in a lysis buffer containing 1 µl/ml, protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma-Aldrich), 20 mM Tris-base pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10% glycerol, 1% Igepal (Sigma-Aldrich), 2 mM Na₃VO₄, 8.3 mM NaF and 0.2 mM PMSF and centrifuged for 10 min at 10,000 x g at 4°C. Protein contents of the homogenates were measured using BCA protein assay kits (EMD Chemical, Darmstadt, Germany). Protein homogenates were electrophoretically separated on SDS-polyacrylamide gels. The bands were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), blocked in 5% skim milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. (SERCA-1 (ab92666), SERCA-2

(ab3625), GAPDH (sc-25778). The membranes were washed and incubated with appropriate HRP conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Bands were revealed using the ECL-Plus chemiluminescent detection system (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Images of the membranes were acquired, scanned, and analyzed using Quantity One software (v4.6.6, Bio-Rad).

Calpain enzymatic activity

Skeletal muscles were homogenized in a commercial buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA-Tris (pH 7.2), 0.1% β -mercaptoethanol, 100 mg/L of trypsin inhibitor, 2.5 mM E-64, and 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor. After centrifuging the homogenate at 20,000 X g for 30 min at 4°C, the protein concentrations in the supernatant were determined using BCA protein assay kits (EMD Chemical, Darmstadt, Germany). Calpain activity was then measured using a fluorimetric commercial kit (Sensolyte®, AnaSpec). Calpain protease cleaves the FRET substrate into two separate fragments resulting in the release of 5-FAM fluorescence which can be monitored at excitation/emission= 490/520 nm. Data acquisition was performed with an infinite F200 microplate reader (TECAN, Switzerland).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). The data were analyzed by two-way ANOVA to determine whether the variations among the experimental groups were significant (InStat software, version 3). When a significant F ratio was obtained, a posteriori test was performed (Tukey's protected least-significant differences test) to determine whether there were any specific differences. The level of significance was set at

$p < 0.05$. For data expressed as percentage relative to control, paired test sampled from gaussian (t-test) distribution, two tail p-value, were performed.

Results

Lovastatin decreases the peak rate of tension development, increases the force production at low frequency of stimulation and delays the tetanic half relaxation time of EDL muscles.

To evaluate the aftereffects of lovastatin on the contraction and relaxation functions, we assessed the *ex-vivo* contractile properties of the fast-twitch EDL (Fig. 1). We found that lovastatin treatment [50 mg/kg/day] for 28 days did not induce changes in P_0 , sP_0 or TPT (Fig. 1A-C). On the other hand, dP/dT ratio significantly decreased by 22,4% ($p < 0,05$) compared to the placebo-treated mice suggesting changes in compliance of series elastic component or myosin ATPase activity (Fig. 1D). Additionally, the force-frequency curve was shifted toward a greater force production at low frequencies (1-20 Hz range). At 1 and 20 Hz stimuli, EDL muscles from statin-treated mice had the tendency to be 29,7 % ($p = 0,07$) and 38,1 % ($p = 0,06$) stronger respectively, while at 10 Hz stimulus, the force of production of EDL muscles were significantly superior by 36,7 % ($p < 0,05$) in statin-treated mice. No significant differences were observed between control and experimental muscles at higher frequencies of stimulation (50-120 Hz) (Fig. 1B). Furthermore, the twitch $1/2RT$ of EDL muscles were not different between placebo- and treated-mice (Fig. 2A-B)

but the tetanic 1/2RT of EDL muscles (100 or 120 Hz) was significantly prolonged by 48,7% ($p < 0,05$) and shifted to the right following statin treatment (Fig. 2C-D). Additionally, cross-sectional areas of EDL muscles or total muscle weights did not differ between groups following treatments.

Lovastatin treatment alters SERCA protein contents

Lovastatin treatment gave rise to a tendency for SERCA2a content to increase by 28,8% ($p < 0,10$) while the levels of SERCA1a remained unchanged (Fig. 3A). The calpain activity assays performed on *tibialis anterioris* (TA), another fast-twitch muscle, revealed no major induction of this calcium-dependant proteolytic pathway (Fig. 3B). The exposition of C2C12 muscle cells to lovastatin [10 μ M] for 24h atrophied myotubes by 40% ($p < 0,05$) (Fig. 4A-B) which was associated with a 20% ($p < 0,05$) decrement of the fast-twitch SERCA1a content (Fig. 4C) with no change in the slow-twitch SERCA2a content (Fig. 4C).

Discussion

SIM has major social and economic consequences. The lack of understanding on how statins impair muscle function at the cellular, molecular and physiological levels impedes proper management in clinical care setting. Ca^{2+} homeostasis is tightly controlled by complex homeostatic mechanism and is of the utmost importance for muscle performance. The disrupted Ca^{2+} homeostasis may be a pivotal event in the initiation and progression of SIM.

Our findings showed that the lovastatin treatment for 28 days does not affect the force production of a maximal tetanic contraction or the time to peak tension associated with a twitch contraction. However, the peak rate of tension development (dP/dT ratio) significantly declines and the force production at low frequencies of stimulation increases in statins-treated mice. The tetanic half relaxation time ($\frac{1}{2}$ RT of P_0) of EDL muscles was also increased by 48% in statin-treated mice. All of these changes in contractile properties of EDL muscles point toward changes in the rate of Ca^{2+} reuptake by SERCA and/or a change in muscle phenotype from fast- to slow- twitch fibres. Interestingly, fast-twitch fibres are essential for brief and powerful contractions (i.e., standing up, climbing stairs) and are the first to disappear in several forms of muscle diseases as well as during aging [275, 276, 284]. Our results fit perfectly with previous work showing that fast-twitch fibres are severely affected by chronic statin treatments and that prolonged relaxation and diminished force production is often directly caused by defective SERCA pumps [238, 285]. Prolonged relaxation and changes in SERCA profile support the hypothesis that impairment

of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} management system and ultimately a loss of Ca^{2+} homeostasis may represent a potential event for hypolipidemic drugs-induced myotoxicity [256]. Compromised fast-twitch phenotype and alterations in Ca^{2+} handling and signalling proteins may thus explain many of the symptoms associated with SIM in humans, including muscle fatigue, cramping, and damage.

The present results also show that statins induce a 40% myotube atrophy with specific loss of the fast-twitch SERCA1a, not the slow-twitch SERCA2a isoform. The main and common intracellular system for protein degradation and atrophy is the activation of the ubiquitin proteasome system (UPS), most notably ubiquitin protein ligase or E3, MAFbx/atrogen-1, and MuRF1. Recent work has demonstrated that statins induce a marked induction of atrogen-1 expression and that the deletion of atrogen-1 prevents statin-induced muscle degradation and suppression of the IGF-1/PI3K/AKT signalling pathway, a key pathway for cell survival and growth [241, 280]. Although UPS plays an important role in muscle proteolysis, it does not degrade intact muscle proteins [286]. The activation of calpain, a Ca^{2+} -dependent protease, appears to be essential for releasing contractile proteins for subsequent degradation by UPS [287]. We did not observe any muscle atrophy, loss of muscle fiber integrity, increase in serum creatine kinase or activation of the calcium-dependent proteolytic calpain suggesting that 28 days of treatment is possibly at the very early stage of muscle dysfunction where no functional or physical muscle damage are visible, as opposed to clinical report showing sometimes extensive muscle degeneration. We speculate that the loss of SERCA1a, a key determinant for fast-twitch phenotype and Ca^{2+} homeostasis would be the initial factor for statin-induced muscle dysfunction. Previous reports and experiments from our lab and collaborators put forward the fact that

SERCA1a is considerably more effective than SERCA-2a to pump Ca^{2+} into SR. The loss or impairment of SERCA1a may exacerbate the loss of Ca^{2+} homeostasis, leading possibly to mitochondrial dysfunction and cell death in prolonged treatment of statins [128, 197, 239, 253, 254, 256, 279, 288]. This observation is particularly interesting given that SERCA1 expression is limited to fast-twitch fibres and that these fibres are more vulnerable to dysfunction and necrosis following muscle diseases and statin treatments.

Collectively, our findings indicate that the peak rate of tension development, muscle relaxation, SERCA-2a and SERCA-1a contents are modified in muscle cells exposed to statins *in vivo* and *in vitro*. Our results give credence to the notion that statin treatments exert significant disturbances to fast-twitch skeletal muscles influencing mainly Ca^{2+} pump involved in muscle relaxation and Ca^{2+} handling. As seen in some patients treated with statins, mild and subtle changes can be visible in less than 1 month. Whether these changes in SERCA content is the cause of SIM or a consequence remain an unresolved issue. It would be important to highlight, that elderly population are subject to changes in muscle phenotype from fast- to slow- twitch myofibers with concomitant loss of muscle power. Statins are commonly prescribed for patients over 65 years may potentially enhance or accelerate these changes in muscle phenotype putting them at greater risks for dependence and falls.

Acknowledgments

The authors wish to thank Patrice Bouchard and Sebastien Dufresne for technical assistance and insightful discussions. This work was supported by grants to J. Frenette from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

Disclosure

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

References

- 1.(264) Egan, A. and E. Colman, *Weighing the benefits of high-dose simvastatin against the risk of myopathy*. N Engl J Med, 2011. **365**(4): p. 285-7.
- 2.(211) Taha, D.A., et al., *Translational insight into statin-induced muscle toxicity: from cell culture to clinical studies*. Transl Res, 2014. **164**(2): p. 85-109.
- 3.(265) Group, S.C., et al., *SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study*. N Engl J Med, 2008. **359**(8): p. 789-99.
- 4.(233) Muraki, A., et al., *Coenzyme Q10 reverses mitochondrial dysfunction in atorvastatin-treated mice and increases exercise endurance*. J Appl Physiol (1985), 2012. **113**(3): p. 479-86.
- 5.(257) Sirvent, P., et al., *Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(3): p. 1067-75.
- 6.(266) Sirvent, P., et al., *Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **259**(2): p. 263-8.
- 7.(267) Kwak, H.B., et al., *Simvastatin impairs ADP-stimulated respiration and increases mitochondrial oxidative stress in primary human skeletal myotubes*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 198-207.
- 8.(224) Stringer, H.A., et al., *Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients with statin-induced myopathy*. J Neurol Sci, 2013. **325**(1-2): p. 142-7.
- 9.(268) Siddals, K.W., et al., *Abrogation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin action by mevalonic acid depletion: synergy between protein prenylation and receptor glycosylation pathways*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38353-9.
- 10.(253) Yu, J.G., et al., *Investigation of gene expression in C(2)C(12) myotubes following simvastatin application and mechanical strain*. J Atheroscler Thromb, 2009. **16**(1): p. 21-9.

- 11.(234)Folkers, K., et al., *Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 8931-4.
- 12.(232)Willis, R.A., et al., *Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 8928-30.
- 13.(239)Mohaupt, M.G., et al., *Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage*. CMAJ, 2009. **181**(1-2): p. E11-8.
- 14.(240)Draeger, A., et al., *Statin therapy induces ultrastructural damage in skeletal muscle in patients without myalgia*. J Pathol, 2006. **210**(1): p. 94-102.
- 15.(26)Evans, M. and A. Rees, *The myotoxicity of statins*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(4): p. 415-20.
- 16.(269)Lahaye, C., et al., *Immune-mediated myopathy related to anti 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies as an emerging cause of necrotizing myopathy induced by statins*. Joint Bone Spine, 2014. **81**(1): p. 79-82.
- 17.(237)Pierno, S., et al., *Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on excitation-contraction coupling of rat skeletal muscle*. Eur J Pharmacol, 1999. **364**(1): p. 43-8.
- 18.(238)Pierno, S., et al., *Effects of chronic treatment with statins and fenofibrate on rat skeletal muscle: a biochemical, histological and electrophysiological study*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(7): p. 909-19.
- 19.(256)Liantonio, A., et al., *Fluvastatin and atorvastatin affect calcium homeostasis of rat skeletal muscle fibers in vivo and in vitro by impairing the sarcoplasmic reticulum/mitochondria Ca²⁺-release system*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 626-34.
- 20.(259)Inoue, R., et al., *Ca²⁺-releasing effect of cerivastatin on the sarcoplasmic reticulum of mouse and rat skeletal muscle fibers*. J Pharmacol Sci, 2003. **93**(3): p. 279-88.
- 21.(270)MacLennan, D.H., M. Abu-Abed, and C. Kang, *Structure-function relationships in Ca(2+) cycling proteins*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(8): p. 897-918.
- 22.(271)Pan, X., et al., *The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(12): p. 1464-72.
- 23.(108)Mueller, B., et al., *SERCA structural dynamics induced by ATP and calcium*. Biochemistry, 2004. **43**(40): p. 12846-54.
- 24.(92)Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease*. Muscle Nerve, 2007. **35**(4): p. 430-42.
- 25.(272)Inesi, G., Z. Zhang, and D. Lewis, *Cooperative setting for long-range linkage of Ca(2+) binding and ATP synthesis in the Ca(2+) ATPase*. Biophys J, 2002. **83**(5): p. 2327-32.
- 26.(111)Inesi, G. and F. Tadini-Buoninsegni, *Ca(2+)/H (+) exchange, lumenal Ca(2+) release and Ca (2+)/ATP coupling ratios in the sarcoplasmic reticulum ATPase*. J Cell Commun Signal, 2014. **8**(1): p. 5-11.
- 27.(273)Yu, X., et al., *H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes*. Biophys J, 1993. **64**(4): p. 1232-42.
- 28.(274)Brandl, C.J., et al., *Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences*. Cell, 1986. **44**(4): p. 597-607.
- 29.(275)Sugiura, T., et al., *Changes in myosin heavy chain isoform expression of overloaded rat skeletal muscles*. Int J Biochem, 1993. **25**(11): p. 1609-13.

- 30.(276)Webster, C., et al., *Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1988. **52**(4): p. 503-13.
- 31.(277)Lexell, J., C.C. Taylor, and M. Sjoström, *What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men*. J Neurol Sci, 1988. **84**(2-3): p. 275-94.
- 32.(230)Westwood, F.R., et al., *Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity*. Toxicol Pathol, 2005. **33**(2): p. 246-57.
- 33.(279)Seachrist, J.L., et al., *Roles of exercise and pharmacokinetics in cerivastatin-induced skeletal muscle toxicity*. Toxicol Sci, 2005. **88**(2): p. 551-61.
- 34.(218)Tuckow, A.P., et al., *Simvastatin represses protein synthesis in the muscle-derived C(2)C(1)(2) cell line with a concomitant reduction in eukaryotic initiation factor 2B expression*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(3): p. E564-70.
- 35.(215)Mallinson, J.E., et al., *Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 1): p. 219-30.
- 36.(280)Hanai, J., et al., *The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/MAFbx mediates statin-induced muscle toxicity*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3940-51.
- 37.(197)Urso, M.L., et al., *Changes in ubiquitin proteasome pathway gene expression in skeletal muscle with exercise and statins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2560-6.
- 38.(249)Sacher, J., et al., *Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(3): p. 1032-41.
- 39.(254)Johnson, T.E., et al., *Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **200**(3): p. 237-50.
- 40.(135)Brooks, S.V. and J.A. Faulkner, *Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice*. J Physiol, 1988. **404**: p. 71-82.
- 41.(281)Lennernas, H. and G. Fager, *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences*. Clin Pharmacokinet, 1997. **32**(5): p. 403-25.
- 42.(282)Corsini, A., et al., *New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins*. Pharmacol Ther, 1999. **84**(3): p. 413-28.
- 43.(283)Dumont, N.A. and J. Frenette, *Macrophage colony-stimulating factor-induced macrophage differentiation promotes regrowth in atrophied skeletal muscles and C2C12 myotubes*. Am J Pathol, 2013. **182**(2): p. 505-15.
- 44.(284)Faulkner, J.A., et al., *Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(11): p. 1091-6.
- 45.(285)Tupling, A.R., *The sarcoplasmic reticulum in muscle fatigue and disease: role of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*. Can J Appl Physiol, 2004. **29**(3): p. 308-29.
- 46.(241)Cao, P., et al., *Statin-induced muscle damage and atrogin-1 induction is the result of a geranylgeranylation defect*. FASEB J, 2009. **23**(9): p. 2844-54.
- 47.(286)Hobler, S.C., et al., *Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 2): p. R30-7.

- 48.(287)Smith, I.J. and S.L. Dodd, *Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle*. *Exp Physiol*, 2007. **92**(3): p. 561-73.
- 49.(288)Tanaka, S., et al., *Mechanism of statin-induced contractile dysfunction in rat cultured skeletal myofibers*. *J Pharmacol Sci*, 2010. **114**(4): p. 454-63.
- 50.(128)Hagemann, D., et al., *Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(29): p. 22532-6.

Figure legends

Figure 1 : Contractile properties of EDL muscles in placebo and statin-treated mice.

Absolute maximal force (**A**), force frequency curve (**B**), time to peak tension (**C**) and peak rate of tension development (**D**) of EDL muscles following 28 days of treatment with placebo or lovastatin [50 mg/kg/day]. Data are expressed as means \pm SEM. N = 6 for each group. *P < 0.05.

Figure 2 : Twitch and tetanic half relaxation time of EDL muscles in placebo and statin-treated mice.

Twitch half relaxation time values (**A**) and its representative graphical record (**B**), tetanic half relaxation time values (**C**) and its representative graphical record (**D**) are shown for EDL muscles in placebo- and lovastatin- treated mice treated for 28 days. Data are expressed as means \pm SEM. N = 6 for each group. *P < 0.05.

Figure 3 : SERCA1a and SERCA2a protein contents and calpain activity in fast-twitch muscles.

Mice were treated for 28 days with placebo or lovastatin [50 mg/kg/day]. Protein contents of SERCA1a and SERCA2a in EDL muscles were quantified, normalized to GAPDH expression and expressed as percentage relative to paired controls (**A**) calpain activity assays were determined in fast-twitch TA muscles (**B**). N = 6 for each group. *P < 0.05.

Figure 4 : C2C12 myotubes treated with vehicle or lovastatin. Representative pictures of C2C12 myotubes treated with vehicle or lovastatin [10 μ M] for 24h (**A**). Myotube diameters were expressed as a percentage relative to paired controls (**B**). Protein contents of SERCA1a and SERCA2a were quantified, normalized to GAPDH expression and expressed as percentage relative to paired controls (**C**). N = 4 to 8 for each group. *P< 0.05, ***P< 0.001.

Figure 1

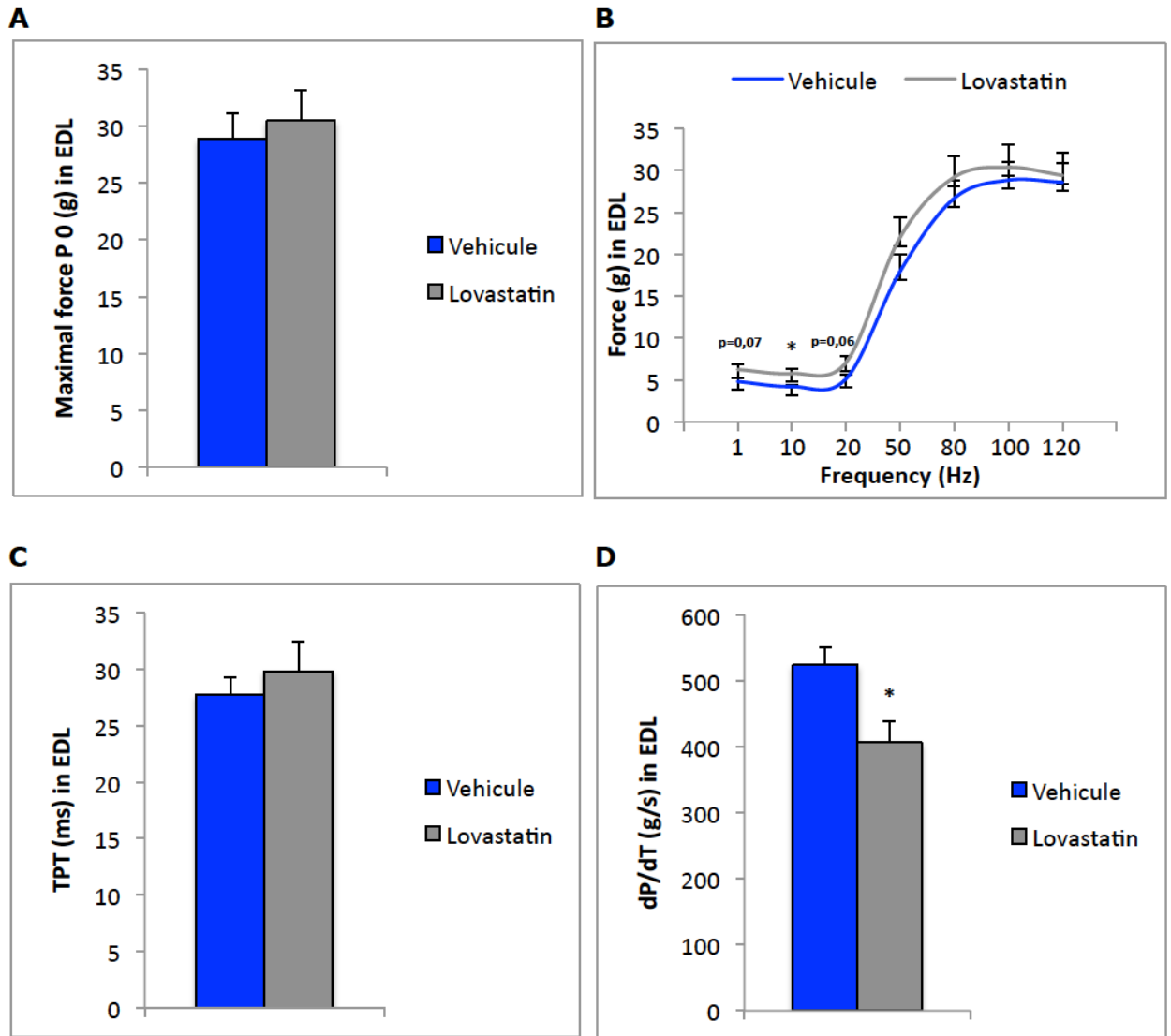


Figure 2

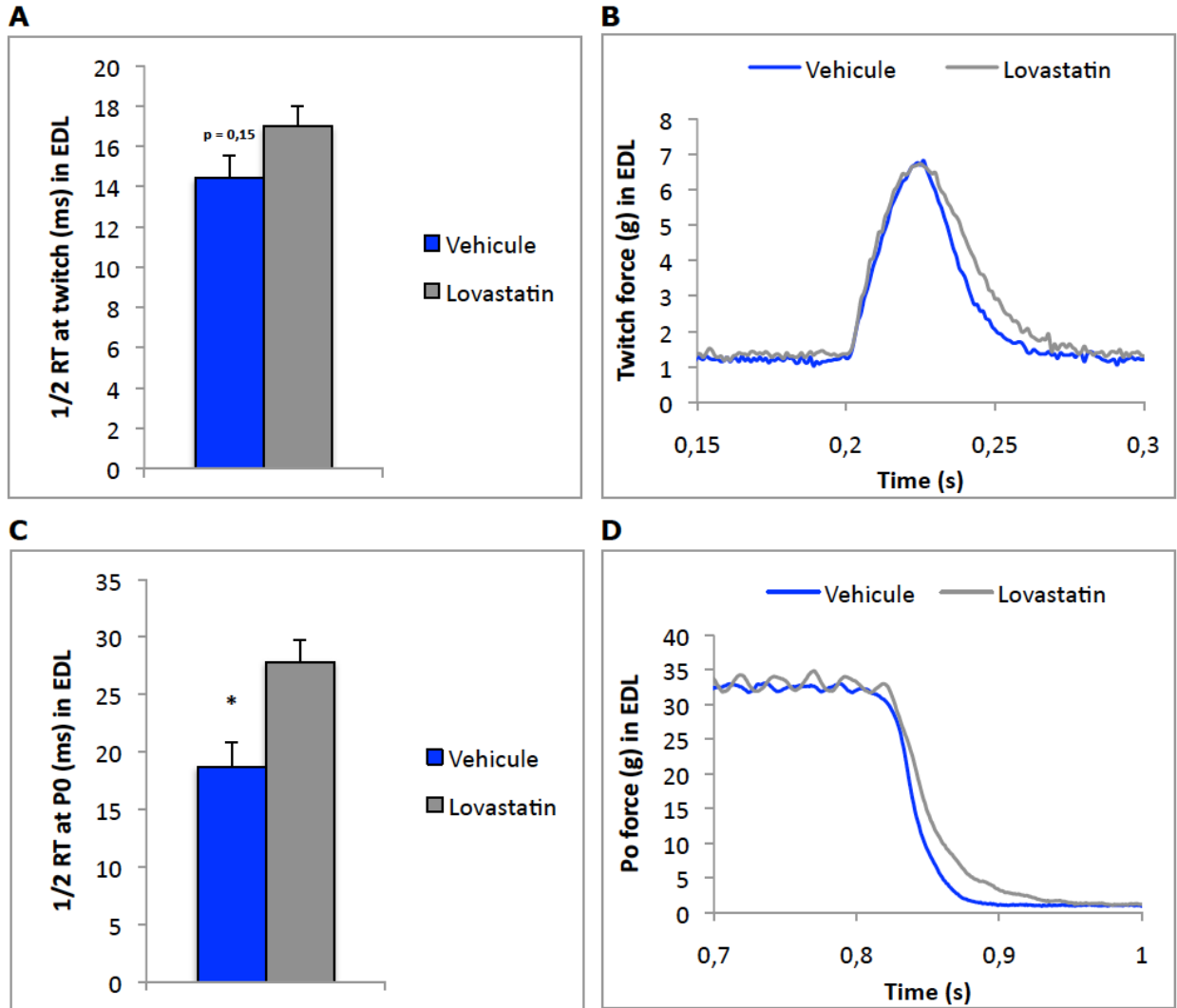


Figure 3

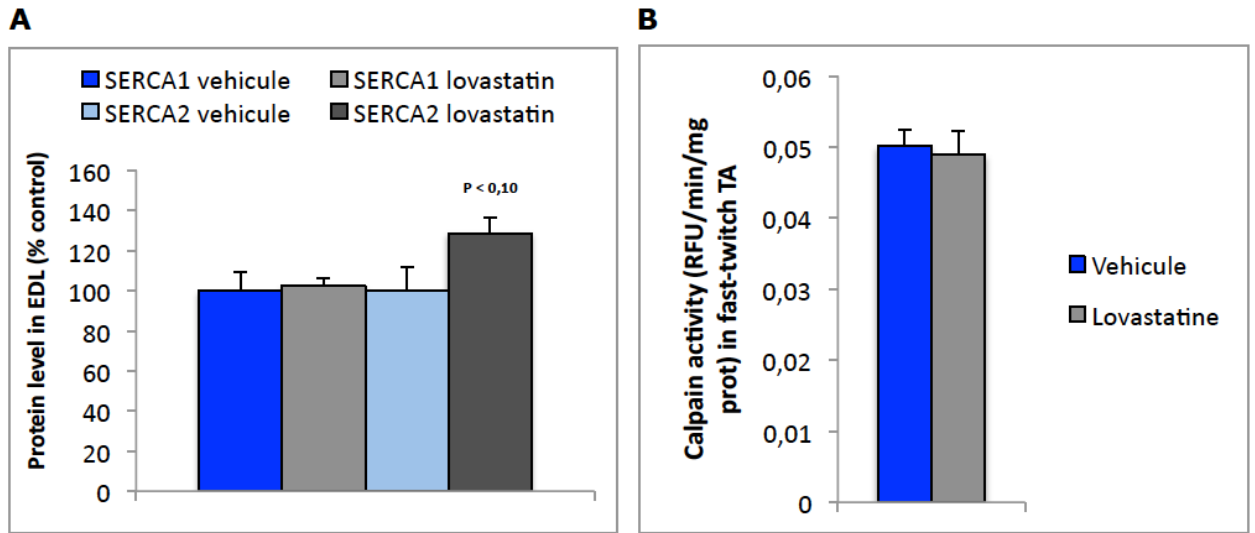
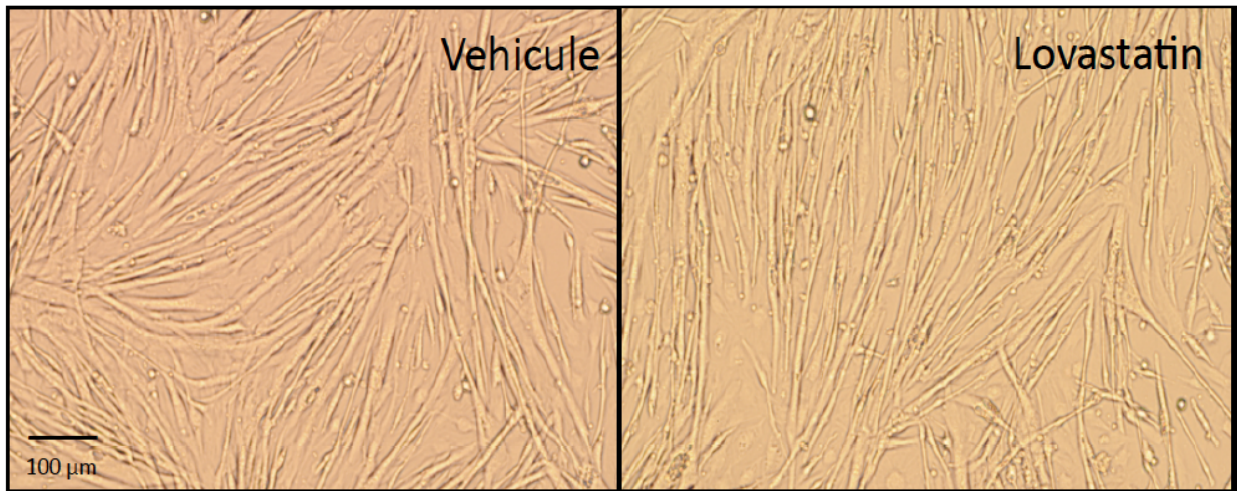
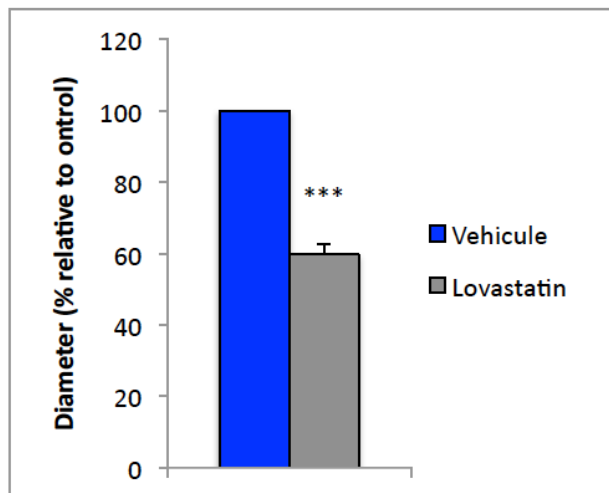


Figure 4

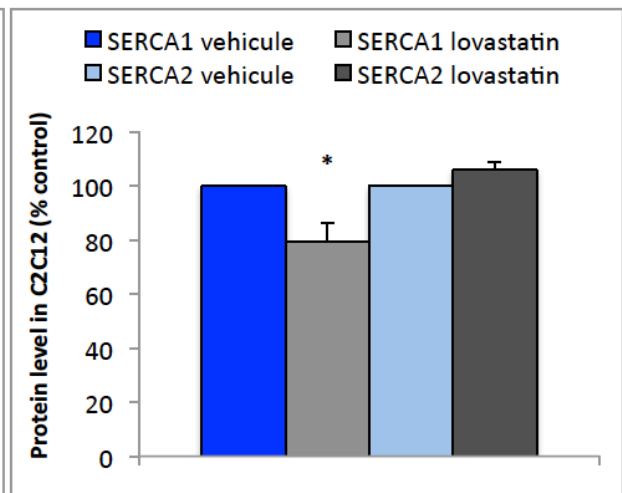
A



B



C



Chapitre 3 ; Discussion et conclusion générale

La MIS entraîne un coût sociétal et économique substantiel et des efforts importants sont déployés afin de maîtriser la myopathie. Par contre, le manque de compréhension du mécanisme par lequel les statines compromettent la fonction musculaire mène à une gestion déficiente de la condition par les professionnels du système de la santé. D'un coté mécanistique, l'homéostasie du Ca^{2+} est de la plus haute importance pour la fonction musculaire et la perte de cette dernière serait possiblement un point central dans l'établissement de la MIS [237, 256, 259]. Notre programme de recherche comportait donc des objectifs permettant de caractériser des acteurs primordiaux de cette gestion du Ca^{2+} et des possibles répercussions fonctionnelles sur la contraction et la relaxation musculaire.

Nos résultats issus du volet animal révèlent qu'un traitement de 28 jours à la lovastatine n'affecte pas la production de force d'une contraction tétanique maximale ni le temps requis à l'atteinte de la force maximale d'une contraction de secousse du muscle EDL, un muscle de phénotype rapide. Cependant, le taux de développement maximal de la force (dP/dT) diminue significativement et la production de force à des basses fréquences de stimulation augmente chez les souris traitées aux statines. Subséquemment, le demi-temps de relaxation de la contraction tétanique ($1/2 RT$ du P_0) est fortement prolongé dans ce contexte maximal chez la souris traitée. Ces modifications au sein des propriétés contractiles de l'EDL suggèrent une conversion phénotypique de fibres rapides vers des fibres lentes ainsi qu'une altération de la recapture du Ca^{2+} par les pompes SERCA. Ces résultats concernant l'EDL concordent bien avec des travaux décrivant la propension de la MIS à affecter les fibres musculaires rapides [5, 237, 279]. Ces fibres possèdent des capacités contractiles et métaboliques essentielles pour la complétion de contraction brèves et puissantes mais sont également les premières à être touchées dans plusieurs conditions pathologiques ou lors du vieillissement, compromettant la capacité du patient à accomplir certaines actions [275-277]. Nos résultats ne démontrent pas d'atteintes de la force maximale produite mais indiquent qu'à seulement 28 jours de traitement, certains effets délétères concernant le taux de développement maximal de la force et le demi-temps de

relaxation prennent place. De façon additionnelle, nos expériences de mesures semi-quantitatives concernant l'abondance des pompes SERCA chez l'EDL suggèrent que l'isoforme SERCA2 accuse une tendance à la hausse. Il est important de se rappeler que cet isoforme est associé aux fibres lentes et possède une activité enzymatique moins efficace que sa contrepartie rapide SERCA1 [92, 108]. Bien que la cinétique de la relaxation ne se résume pas uniquement à SERCA et qu'elle implique des paramètres comme la compliance des systèmes et la présence d'agents tampons, cette tendance appuie les valeurs fonctionnelles et cette donnée converge vers l'avenue d'un changement phénotypique. D'ailleurs, ces pompes sont au cœur de plusieurs formes de maladies du muscle squelettique et du muscle cardiaque, prolongeant la relaxation et réduisant éventuellement la production de force [285]. En plus de son rôle fonctionnel évident, SERCA contribue à l'homéostasie du Ca^{2+} et des altérations de celle-ci pourraient éventuellement conduire à une séquestration moins efficace puis à l'activation de voies protéolytiques, cataboliques et apoptotiques qui pourraient expliquer plusieurs des symptômes de la MIS humaines tels que la fatigue, la crampe, la perte de force et les dommages structuraux. De plus, l'essai enzymatique de l'activité des calpaines chez le muscle rapide TA nous fournit des renseignements intéressants indiquant que le groupe traité n'exhibe pas d'activation supérieure au groupe contrôle. Cela constitue donc un indice indirect que la concentration de calcium cytosolique se situerait présumément à des niveaux physiologiques qui ne permettraient pas l'activation de ces protéases après 28 jours de traitement. D'un autre côté, des expériences supplémentaires histologiques dénotent des valeurs d'aires de section inaltérées et des mesures de masse placent les muscles à des masses totales équivalentes, traduisant une masse musculaire qui ne semble pas être affectée par le traitement, tant au niveau des fibres que du muscle entier. D'autre part, des mesures d'activités enzymatiques de la créatine kinase plasmatique ne discriminent pas les deux groupes possédant tous deux des valeurs sous les seuils détectables. Ces résultats sont utiles dans la compréhension de l'orchestration de la MIS et avec l'intégration des découvertes du volet fonctionnel et protéique, nous pouvons supposer que les dysfonctions retrouvées après seulement 28 jours de traitement ne sont pas associées à la myopathie telle qu'on la retrouve dans la littérature clinique et fondamentale mais plutôt à des effets précoces de myotoxicité.

Les données obtenues suite au devis expérimental cellulaire constitué de myotubes C2C12 traités aux statines indiquent une diminution sévère de diamètre ainsi qu'une perte spécifique de l'isoforme rapide SERCA1 sans changements au niveau de SERCA2. Cette atrophie sévère concorde avec des évidences récentes incluant la répression de la synthèse protéique et l'activation de la voie de dégradation commune du système ubiquitine protéasome (UBS), plus précisément via l'induction de MAFbx/ atrogin-1 [218, 280]. Par ailleurs, en contexte de traitement aux statines, la délétion d'atrogin-1 prévient la dégradation musculaire associée aux statines et la suppression de la voie de signalisation IGF-1/PI3K/AKT, une voie essentielle à la survie et la croissance cellulaire [241, 280]. Le UBS joue un rôle important dans la protéolyse des protéines mais il ne dégrade toutefois pas des protéines, entières, en place et intactes [286]. L'activation des calpaines, protéase dépendante du Ca^{2+} serait essentielle afin de mobiliser et de déplier les protéines afin de les rendre disponibles au UBS [287]. Devant ces éléments possiblement impliqués, la perte spécifique de SERCA1 pourrait donc être un élément participant à la perte d'homéostasie du Ca^{2+} relatée dans divers travaux, menant à l'activation des voies précédemment énoncées. La disparité évidente émergeant de l'analyse des modèles *in vivo* et *in vitro* utilisés nous renseigne possiblement sur les multiples effets myopathiques des statines. En effet, du modèle animal semble émaner des dysfonctions légères qui ne s'apparentent pas à celles retrouvées dans le modèle cellulaire en culture. Néanmoins, les pompes SERCA sont perturbées dans les modèle *in vivo* et *in vitro* et la proportion de ces enzymes semble orientée vers une performance amoindrie, tant par une tendance de SERCA2 à se voir augmenter ou par une diminution de l'isoforme SERCA1 qui possède un transport vectoriel calcique plus efficace que SERCA2. Ces modifications pourraient constituer un élément initiateur ou exacerber la myopathie en entraînant des dysfonctions mitochondriales et les conséquences apoptotiques leur étant reliées [289]. Cet état des pompes est d'ailleurs une composante qui fait partie intégrante du phénotype musculaire et ces modifications se rangent aux cotés de l'hypothèse de changement phénotypique en cours.

Afin de préciser la place de SERCA dans la myopathie et de confirmer le changement phénotypique possible, des perspectives d'expériences scientifiques supplémentaires sont

nécessaires. Premièrement, des mesures d'activité enzymatiques des ATPases SERCA devront être effectuées afin de faire le pont entre les données contractiles fonctionnelles et les données d'abondance protéique. Cette activité constitue véritablement la capacité maximale des pompes SERCA retrouvées dans l'échantillon musculaire ou cellulaire, nous informant plus en profondeur sur l'état des pompes. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et d'agents protecteurs de la fonction de SERCA pourrait nous permettre d'établir son rôle dans la myopathie à titre d'acteur exacerbant la condition ou de victime de cette dernière. Un modèle de souris surexprimant SERCA au niveau du muscle squelettique traité aux statines pourrait également élucider cette question. Au niveau de l'orchestration de la myopathie, un traitement animal de durée prolongée est envisagé tandis que des temps de traitements cellulaires courts sont planifiés. L'utilisation de plusieurs statines de puissances différentes à des doses variées est envisagée afin de tester leurs actions sur les cibles de notre étude. En effet, nos travaux s'appuient sur des études pharmacodynamiques humaines ainsi que sur des études animales semblables mais il serait pertinent d'explorer des doses progressives afin de mieux correspondre aux pratiques cliniques de divers patients [280-283]. Cela permettra de visualiser les changements dans le temps et la puissance de façon plus précise. Également, vérifier nos cibles à différents points dans le temps succédant l'arrêt du traitement pourrait corroborer des observations chez l'humain décrivant l'estompement ou la persistance des symptômes dans ce contexte. En ce qui concerne le volet phénotypique, des tests contractiles de fatigue seront effectués, en plus d'histologie et d'immunobuvardage permettant de caractériser le profil de myosine retrouvé chez les groupes traités. Certains acteurs de conversion phénotypique pourront être investigués afin de déterminer le mécanisme responsable de ces changements. En conclusion, quelques pensées et perspectives cette fois dans un registre plus philosophique. Devant l'abondance d'ordonnances de statines délivrées à des patients dont le profil lipidique semble s'écarter des valeurs jugées optimales, il est normal de se questionner sur l'émergence d'autant de ces individus problématiques. Parfois perçues comme étant une solution facile et incontournable, les statines sont utilisées de façon réflexe et perdureront dans la vie du bénéficiaire sur une période de temps pouvant atteindre de nombreuses années, augmentant par le fait même les risques de développer une myopathie, même si certains patients réagissent presque instantanément à ce composé. Une approche

multidisciplinaire basée sur la prévention primordiale pourrait prendre en charge des patients par des interventions misant sur l'environnement, l'exercice, la nutrition et l'hygiène de vie, permettant de réduire les risques d'encourir un premier événement cardiovasculaire et les désagréments lui étant rattachés. En effet, la transformation d'un patient passif en un patient prenant une part active au traitement est préférable. Ces mesures seront bénéfiques pour l'ensemble du système de santé et pourront libérer les utilisateurs d'un composé pharmaceutique dont ils pourraient éviter l'utilisation et les effets secondaires indésirables.

Bibliographic

1. Shitara, Y. and Y. Sugiyama, *Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions*. *Pharmacol Ther*, 2006. **112**(1): p. 71-105.
2. LaRosa, J.C., J. He, and S. Vupputuri, *Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *JAMA*, 1999. **282**(24): p. 2340-6.
3. Shalev, V., et al., *Continuation of statin treatment and all-cause mortality: a population-based cohort study*. *Arch Intern Med*, 2009. **169**(3): p. 260-8.
4. Gazzerro, P., et al., *Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer*. *Pharmacol Rev*, 2012. **64**(1): p. 102-46.
5. Sidaway, J., et al., *Statin-induced myopathy in the rat: relationship between systemic exposure, muscle exposure and myopathy*. *Xenobiotica*, 2009. **39**(1): p. 90-8.
6. Chong, P.H., J.D. Seeger, and C. Franklin, *Clinically relevant differences between the statins: implications for therapeutic selection*. *Am J Med*, 2001. **111**(5): p. 390-400.
7. Liao, J.K. and U. Laufs, *Pleiotropic effects of statins*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. **45**: p. 89-118.
8. Christopher-Stine, L., *Statin myopathy: an update*. *Curr Opin Rheumatol*, 2006. **18**(6): p. 647-53.
9. Rallidis, L.S., K. Fountoulaki, and M. Anastasiou-Nana, *Managing the underestimated risk of statin-associated myopathy*. *Int J Cardiol*, 2012. **159**(3): p. 169-76.
10. Ahmad, Z., *Statin intolerance*. *Am J Cardiol*, 2014. **113**(10): p. 1765-71.
11. Evans, M. and A. Rees, *The myotoxicity of statins*. *Curr Opin Lipidol*, 2002. **13**(4): p. 415-20.
12. Hodel, C., *Myopathy and rhabdomyolysis with lipid-lowering drugs*. *Toxicol Lett*, 2002. **128**(1-3): p. 159-68.
13. Sakamoto, K. and J. Kimura, *Mechanism of Statin-Induced Rhabdomyolysis*. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2013. **123**(4): p. 289-294.
14. Grable-Esposito, P., et al., *Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins*. *Muscle Nerve*, 2010. **41**(2): p. 185-90.
15. Ganga, H.V., H.B. Slim, and P.D. Thompson, *A systematic review of statin-induced muscle problems in clinical trials*. *Am Heart J*, 2014. **168**(1): p. 6-15.
16. Proctor, D.N., et al., *Comparison of techniques to estimate total body skeletal muscle mass in people of different age groups*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 1): p. E489-95.
17. MacIntosh, B.R., Gardiner, P.F., and McComas, A.J., *Skeletal muscle: form and function*. 2006: Human Kinetics.
18. Wolfe, R.R., *The underappreciated role of muscle in health and disease*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(3): p. 475-82.
19. Fluck, M., *Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli*. *J Exp Biol*, 2006. **209**(Pt 12): p. 2239-48.

20. Fluck, M. and H. Hoppeler, *Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **146**: p. 159-216.
21. Matsakas, A. and K. Patel, *Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli*. Histol Histopathol, 2009. **24**(5): p. 611-29.
22. Hood, D.A., et al., *Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 12): p. 2265-75.
23. Pedersen, B.K., et al., *Role of myokines in exercise and metabolism*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(3): p. 1093-8.
24. Pedersen, B.K., *Muscles and their myokines*. J Exp Biol, 2011. **214**(Pt 2): p. 337-46.
25. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(8): p. 457-65.
26. Hamrick, M.W., *The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle-bone crosstalk*. Bonekey Rep, 2012. **1**: p. 60.
27. Egan, B. and J.R. Zierath, *Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation*. Cell Metab, 2013. **17**(2): p. 162-84.
28. Keller, P., et al., *Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **310**(2): p. 550-554.
29. Evans, W.J., *Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(4): p. 1123S-1127S.
30. Bonaldo, P. and M. Sandri, *Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy*. Dis Model Mech, 2013. **6**(1): p. 25-39.
31. Seeley, R.R., Stephens, T.D., and Tate, P. , *Anatomy and Physiology*. 2007: McGraw-Hill.
32. Light, N. and A.E. Champion, *Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens*. Biochem J, 1984. **219**(3): p. 1017-26.
33. Franco-Obregon, A., Jr. and J.B. Lansman, *Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice*. J Physiol, 1994. **481 (Pt 2)**: p. 299-309.
34. Goodman, B.E., *Channels active in the excitability of nerves and skeletal muscles across the neuromuscular junction: basic function and pathophysiology*. Adv Physiol Educ, 2008. **32**(2): p. 127-35.
35. Catterall, W.A., *Voltage-gated calcium channels*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(8): p. a003947.
36. Yin, H., F. Price, and M.A. Rudnicki, *Satellite cells and the muscle stem cell niche*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 23-67.
37. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 209-38.
38. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(2): p. 534-51.
39. McCarthy, J.J., et al., *Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle*. Development, 2011. **138**(17): p. 3657-66.

40. Costa, M.L., *Cytoskeleton and Adhesion in Myogenesis*. ISRN Developmental Biology, 2014. **2014**: p. 1-15.
41. Erzen, I., J. Janacek, and L. Kubinova, *Characterization of the capillary network in skeletal muscles from 3D data*. *Physiol Res*, 2011. **60**(1): p. 1-13.
42. Tidball, J.G. and S.A. Villalta, *Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010. **298**(5): p. R1173-87.
43. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 291-329.
44. Ottenheijm, C.A. and H. Granzier, *Lifting the nebula: novel insights into skeletal muscle contractility*. *Physiology (Bethesda)*, 2010. **25**(5): p. 304-10.
45. Côté, D.C., *Physiologie et pathophysiologie du muscle squelettique*, PHS-21235 2002, Université Laval.
46. Campbell, K.P. and J.T. Stull, *Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(15): p. 12599-600.
47. Capetanaki, Y., et al., *Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(10): p. 2063-76.
48. Gillies, A.R. and R.L. Lieber, *Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix*. *Muscle Nerve*, 2011. **44**(3): p. 318-31.
49. Nowak, K.J. and K.E. Davies, *Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(9): p. 872-6.
50. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber types in mammalian skeletal muscles*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(4): p. 1447-531.
51. Ghdiri, R. *Neurophysiologie; fonctionnement du muscle squelettique*. 2014; Available from: <http://svt.ghediri.com/bac-sciences/10/neurophysiologie/20/fonctionnement-muscle-squelettique.html>.
52. Block, B.A., et al., *Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle*. *J Cell Biol*, 1988. **107**(6 Pt 2): p. 2587-600.
53. Marieb, E.N., Katja Hoehn *Human anatomy & physiology*. 2007: Pearson.
54. Rebbbeck, R.T., et al., *Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners?* *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. **48**: p. 28-38.
55. Nakai, J., et al., *Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor*. *Nature*, 1996. **380**(6569): p. 72-5.
56. Novak, P. and T. Soukup, *Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones*. *Physiol Res*, 2011. **60**(3): p. 439-52.
57. Protasi, F., et al., *Lessons from calsequestrin-1 ablation in vivo: much more than a Ca(2+) buffer after all*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2011. **32**(4-5): p. 257-70.
58. Wei, L., et al., *Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(11): p. 2214-24.
59. Beard, N.A., D.R. Laver, and A.F. Dulhunty, *Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2004. **85**(1): p. 33-69.

60. Franzini-Armstrong, C. and F. Protasi, *Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(3): p. 699-729.
61. Brillantes, A.B., et al., *Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein*. *Cell*, 1994. **77**(4): p. 513-23.
62. Melzer, W., A. Herrmann-Frank, and H.C. Lüttgau, *The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1241**(1): p. 59-116.
63. Gordon, A.M., E. Homsher, and M. Regnier, *Regulation of contraction in striated muscle*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(2): p. 853-924.
64. Wei-Lapierre, L., et al., *Orai1-dependent calcium entry promotes skeletal muscle growth and limits fatigue*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2805.
65. Thornton, A.M., et al., *Store-operated Ca(2+) entry (SOCE) contributes to normal skeletal muscle contractility in young but not in aged skeletal muscle*. *Aging (Albany NY)*, 2011. **3**(6): p. 621-34.
66. Gonzalez Narvaez, A.A. and A. Castillo, *Ca²⁺ store determines gating of store operated calcium entry in mammalian skeletal muscle*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2007. **28**(2-3): p. 105-13.
67. Stiber, J., et al., *STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(6): p. 688-97.
68. Soboloff, J., et al., *STIM proteins: dynamic calcium signal transducers*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(9): p. 549-65.
69. Kiviluoto, S., et al., *STIM1 as a key regulator for Ca²⁺ homeostasis in skeletal-muscle development and function*. *Skelet Muscle*, 2011. **1**(1): p. 16.
70. Vandebrouck, C., et al., *Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers*. *J Cell Biol*, 2002. **158**(6): p. 1089-96.
71. Goonasekera, S.A., et al., *Enhanced Ca(2+)(+) influx from STIM1-Orai1 induces muscle pathology in mouse models of muscular dystrophy*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(14): p. 3706-15.
72. MacIntosh, B.R., *Role of calcium sensitivity modulation in skeletal muscle performance*. *News Physiol Sci*, 2003. **18**: p. 222-5.
73. Joannis, D.D., *Muscle et activité physique, notes de cours*. 2013, Université Laval.
74. Schwaller, B., et al., *Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(2 Pt 1): p. C395-403.
75. Raymackers, J.M., et al., *Tetanus relaxation of fast skeletal muscles of the mouse made parvalbumin deficient by gene inactivation*. *J Physiol*, 2000. **527 Pt 2**: p. 355-64.
76. Fohr, U.G., et al., *Human alpha and beta parvalbumins. Structure and tissue-specific expression*. *Eur J Biochem*, 1993. **215**(3): p. 719-27.
77. Muntener, M., et al., *Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(14): p. 6504-8.

78. Robert, V., et al., *Direct Monitoring of the Calcium Concentration in the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle Myotubes*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(46): p. 30372-30378.
79. Pozzan, T. and R. Rizzuto, *High tide of calcium in mitochondria*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. E25-7.
80. Balnave, C.D. and D.G. Allen, *Evidence for Na⁺/Ca²⁺ exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 1): p. C940-6.
81. Carafoli, E., *Calcium pump of the plasma membrane*. Physiol Rev, 1991. **71**(1): p. 129-53.
82. Lamboley, C.R., et al., *Endogenous and maximal sarcoplasmic reticulum calcium content and calsequestrin expression in type I and type II human skeletal muscle fibres*. J Physiol, 2013. **591**(Pt 23): p. 6053-68.
83. MacLennan, D.H. and P.T. Wong, *Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(6): p. 1231-5.
84. Paolini, C., et al., *Differential effect of calsequestrin ablation on structure and function of fast and slow skeletal muscle fibers*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 634075.
85. Sanchez, E.J., et al., *High-capacity Ca²⁺ binding of human skeletal calsequestrin*. J Biol Chem, 2012. **287**(14): p. 11592-601.
86. Launikonis, B.S., et al., *Depletion "skraps" and dynamic buffering inside the cellular calcium store*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2982-7.
87. Murphy, R.M., et al., *Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 2): p. 443-60.
88. Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport, *Structural organization of the endoplasmic reticulum*. EMBO Rep, 2002. **3**(10): p. 944-50.
89. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1047-58.
90. *<Corticosteroids decrease mRNA levels of SERCA pumps, whereas they increase sarcolipin mRNA in the rat diaphragm.pdf>*.
91. Goonasekera, S.A., et al., *Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle*. J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 1044-52.
92. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease*. Muscle Nerve, 2007. **35**(4): p. 430-42.
93. Regis Bobe, E.R.C., *Sarco (Endo) Plasmic Reticulum Calcium Atpases (SERCA) Isoforms in the Normal and Diseased Cardiac, Vascular and Skeletal Muscle*. Journal of Cardiovascular Diseases & Diagnosis, 2013. **01**(04).
94. Wu, K.D. and J. Lytton, *Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms in rat muscles*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 1): p. C333-41.
95. Sumbilla, C., et al., *Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. H2381-91.
96. Lytton, J., et al., *Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14483-9.

97. Lamboley, C.R., et al., *Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle*. J Physiol, 2014. **592**(Pt 6): p. 1381-95.
98. Bombardier, E., et al., *Ablation of sarcolipin decreases the energy requirements for Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases in resting skeletal muscle*. FEBS Lett, 2013. **587**(11): p. 1687-92.
99. Chinet, A., A. Decrouy, and P.C. Even, *Ca(2+)-dependent heat production under basal and near-basal conditions in the mouse soleus muscle*. J Physiol, 1992. **455**: p. 663-78.
100. Smith, I.C., et al., *ATP consumption by sarcoplasmic reticulum Ca(2+)(+) pumps accounts for 40-50% of resting metabolic rate in mouse fast and slow twitch skeletal muscle*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68924.
101. Drachmann, N.D., et al., *Comparing crystal structures of Ca(2+) -ATPase in the presence of different lipids*. FEBS J, 2014. **281**(18): p. 4249-62.
102. Sacchetto, R., et al., *Crystal structure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) from bovine muscle*. J Struct Biol, 2012. **178**(1): p. 38-44.
103. Toyoshima, C., et al., *Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg²⁺-bound E1 state*. Nature, 2013. **495**(7440): p. 260-4.
104. Winther, A.M., et al., *The sarcolipin-bound calcium pump stabilizes calcium sites exposed to the cytoplasm*. Nature, 2013. **495**(7440): p. 265-9.
105. Autry, J.M., et al., *Oligomeric interactions of sarcolipin and the Ca-ATPase*. J Biol Chem, 2011. **286**(36): p. 31697-706.
106. Cornea, R.L., et al., *High-throughput FRET assay yields allosteric SERCA activators*. J Biomol Screen, 2013. **18**(1): p. 97-107.
107. Dong, X. and D.D. Thomas, *Time-resolved FRET reveals the structural mechanism of SERCA-PLB regulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **449**(2): p. 196-201.
108. Mueller, B., et al., *SERCA structural dynamics induced by ATP and calcium*. Biochemistry, 2004. **43**(40): p. 12846-54.
109. Reuter, N., K. Hinsén, and J.J. Lacapere, *Transconformations of the SERCA1 Ca-ATPase: a normal mode study*. Biophys J, 2003. **85**(4): p. 2186-97.
110. Rossi, A.E. and R.T. Dirksen, *Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle*. Muscle Nerve, 2006. **33**(6): p. 715-31.
111. Inesi, G. and F. Tadini-Buoninsegni, *Ca(2+)/H (+) exchange, lumenal Ca(2+) release and Ca (2+)/ATP coupling ratios in the sarcoplasmic reticulum ATPase*. J Cell Commun Signal, 2014. **8**(1): p. 5-11.
112. Zhang, Z., et al., *Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca(2+) binding and catalytic activation in the Ca(2+) transport (SERCA) ATPase*. Biochemistry, 2000. **39**(30): p. 8758-67.
113. Tran, K., et al., *A thermodynamic model of the cardiac sarcoplasmic/endoplasmic Ca(2+) (SERCA) pump*. Biophys J, 2009. **96**(5): p. 2029-42.
114. Ramnanan, C.J., et al., *Regulation of sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) in turtle muscle and liver during acute exposure to anoxia*. J Exp Biol, 2010. **213**(1): p. 17-25.
115. Sahoo, S.K., et al., *Sarcolipin protein interaction with sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) is distinct from phospholamban protein, and*

- only sarcolipin can promote uncoupling of the SERCA pump.* J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 6881-9.
116. Domeier, T.L., J.T. Maxwell, and L.A. Blatter, *beta-Adrenergic stimulation increases the intra-sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ threshold for Ca²⁺ wave generation.* J Physiol, 2012. **590**(Pt 23): p. 6093-108.
 117. Kho, C., et al., *SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure.* Nature, 2011. **477**(7366): p. 601-5.
 118. Dode, L., et al., *Low temperature molecular adaptation of the skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1 (SERCA 1) in the wood frog (Rana sylvatica).* J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3911-9.
 119. McMullen, D.C., C.J. Ramnanan, and K.B. Storey, *In cold-hardy insects, seasonal, temperature, and reversible phosphorylation controls regulate sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA).* Physiol Biochem Zool, 2010. **83**(4): p. 677-86.
 120. Asahi, M., et al., *Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5040-5.
 121. Babu, G.J., et al., *Ablation of sarcolipin enhances sarcoplasmic reticulum calcium transport and atrial contractility.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(45): p. 17867-72.
 122. Babu, G.J., et al., *Overexpression of sarcolipin decreases myocyte contractility and calcium transient.* Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 177-86.
 123. Fajardo, V.A., et al., *Co-expression of SERCA isoforms, phospholamban and sarcolipin in human skeletal muscle fibers.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84304.
 124. Vangheluwe, P., et al., *Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species.* Biochem J, 2005. **389**(Pt 1): p. 151-9.
 125. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 566-77.
 126. Traaseth, N.J., et al., *Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca(2+)-ATPase.* Biochemistry, 2008. **47**(1): p. 3-13.
 127. Ha, K.N., et al., *Controlling the inhibition of the sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase by tuning phospholamban structural dynamics.* J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37205-14.
 128. Hagemann, D., et al., *Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes.* J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22532-6.
 129. Odermatt, A., et al., *Sarcolipin Regulates the Activity of SERCA1, the Fast-twitch Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(20): p. 12360-12369.
 130. Qin, F., et al., *Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart.* J Am Heart Assoc, 2013. **2**(4): p. e000184.
 131. Tong, X., et al., *High glucose oxidizes SERCA cysteine-674 and prevents inhibition by nitric oxide of smooth muscle cell migration.* J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(2): p. 361-9.

132. Lancel, S., et al., *Oxidative posttranslational modifications mediate decreased SERCA activity and myocyte dysfunction in Galphaq-overexpressing mice*. *Circ Res*, 2010. **107**(2): p. 228-32.
133. Fugere, N.A., D.A. Ferrington, and L.V. Thompson, *Protein nitration with aging in the rat semimembranosus and soleus muscles*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006. **61**(8): p. 806-12.
134. Adachi, T., et al., *S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide*. *Nat Med*, 2004. **10**(11): p. 1200-7.
135. Brooks, S.V. and J.A. Faulkner, *Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice*. *J Physiol*, 1988. **404**: p. 71-82.
136. Kong, H., et al., *Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor*. *Biochem J*, 2008. **414**(3): p. 441-52.
137. Zhang, Q., et al., *SERCA inhibition limits the functional effects of cyclic GMP in both control and hypertrophic cardiac myocytes*. *Pharmacology*, 2009. **83**(4): p. 223-30.
138. Bassel-Duby, R. and E.N. Olson, *Signaling pathways in skeletal muscle remodeling*. *Annu Rev Biochem*, 2006. **75**: p. 19-37.
139. Marcotte, G.R., D.W. West, and K. Baar, *The Molecular Basis for Load-Induced Skeletal Muscle Hypertrophy*. *Calcif Tissue Int*, 2014.
140. Nader, G.A., et al., *Resistance exercise training modulates acute gene expression during human skeletal muscle hypertrophy*. *J Appl Physiol (1985)*, 2014. **116**(6): p. 693-702.
141. Stitt, T.N., et al., *The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors*. *Mol Cell*, 2004. **14**(3): p. 395-403.
142. Bentzinger, C.F., et al., *Differential response of skeletal muscles to mTORC1 signaling during atrophy and hypertrophy*. *Skelet Muscle*, 2013. **3**(1): p. 6.
143. Egerman, M.A. and D.J. Glass, *Signaling pathways controlling skeletal muscle mass*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014. **49**(1): p. 59-68.
144. Glass, D.J., *Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(2): p. 87-90.
145. Schiaffino, S., et al., *Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy*. *FEBS J*, 2013. **280**(17): p. 4294-314.
146. Blaauw, B. and C. Reggiani, *The role of satellite cells in muscle hypertrophy*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2014. **35**(1): p. 3-10.
147. Kuang, S., et al., *Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle*. *Cell*, 2007. **129**(5): p. 999-1010.
148. Schiaffino, S. and C. Mammucari, *Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models*. *Skelet Muscle*, 2011. **1**(1): p. 4.
149. Fitts, R.H., D.R. Riley, and J.J. Widrick, *Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle*. *J Appl Physiol (1985)*, 2000. **89**(2): p. 823-39.
150. Jackman, R.W. and S.C. Kandarian, *The molecular basis of skeletal muscle atrophy*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(4): p. C834-43.

151. Glass, D.J., *Signaling pathways perturbing muscle mass*. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2010. **13**(3): p. 225-229.
152. Attaix, D., et al., *The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting*. Essays Biochem, 2005. **41**: p. 173-86.
153. Bodine, S.C. and L.M. Baehr, *Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **307**(6): p. E469-84.
154. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
155. Ciechanover, A. and A.L. Schwartz, *The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2727-30.
156. Glass, D.J., *Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(10): p. 1974-84.
157. <Calpains, skeletal muscle function and exercise.pdf>.
158. Bartoli, M. and I. Richard, *Calpains in muscle wasting*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(10): p. 2115-33.
159. Berchtold, M.W., H. Brinkmeier, and M. Muntener, *Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease*. Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 1215-65.
160. Duguez, S., M. Bartoli, and I. Richard, *Calpain 3: a key regulator of the sarcomere?* FEBS J, 2006. **273**(15): p. 3427-36.
161. Goll, D.E., et al., *Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains*. J Anim Sci, 2008. **86**(14 Suppl): p. E19-35.
162. Goll, D.E., et al., *The calpain system*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 731-801.
163. Huang, J. and N.E. Forsberg, *Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12100-5.
164. Murphy, R.M., *Calpains, skeletal muscle function and exercise*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(3): p. 385-91.
165. Ojima, K., et al., *Non-proteolytic functions of calpain-3 in sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles*. J Mol Biol, 2011. **407**(3): p. 439-49.
166. Sultan, K.R., B.T. Dittrich, and D. Pette, *Calpain activity in fast, slow, transforming, and regenerating skeletal muscles of rat*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(3): p. C639-47.
167. Talbert, E.E., et al., *Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-induced limb muscle atrophy*. J Appl Physiol (1985), 2013. **114**(10): p. 1482-9.
168. Taveau, M., et al., *Calpain 3 Is Activated through Autolysis within the Active Site and Lyses Sarcomeric and Sarcolemmal Components*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(24): p. 9127-9135.
169. Bechet, D., et al., *Lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(10): p. 2098-114.
170. Sandri, M., *New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(3): p. 223-9.
171. Green, et al., *Mitochondria and Apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-1312.

172. Primeau, A.J., P.J. Adhihetty, and D.A. Hood, *Apoptosis in heart and skeletal muscle*. Can J Appl Physiol, 2002. **27**(4): p. 349-95.
173. Schwartz, L.M., *Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle*. Cell Death Differ, 2008. **15**(7): p. 1163-9.
174. Soukup, T., G. Zacharova, and V. Smerdu, *Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats*. Acta Histochem, 2002. **104**(4): p. 399-405.
175. Sieck, G.C., *Physiological effects of diaphragm muscle denervation and disuse*. Clin Chest Med, 1994. **15**(4): p. 641-59.
176. Scott, W., J. Stevens, and S.A. Binder-Macleod, *Human skeletal muscle fiber type classifications*. Phys Ther, 2001. **81**(11): p. 1810-6.
177. Hennig, R. and T. Lomo, *Firing patterns of motor units in normal rats*. Nature, 1985. **314**(6007): p. 164-6.
178. Maier, A., E. Leberer, and D. Pette, *Distribution of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and of calsequestrin in rabbit and rat skeletal muscle fibers*. Histochemistry, 1986. **86**(1): p. 63-9.
179. Gorski, P.A., et al., *Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibition by sarcolipin is encoded in its luminal tail*. J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8456-67.
180. Leberer, E. and D. Pette, *Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, of calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition*. Eur J Biochem, 1986. **156**(3): p. 489-96.
181. Damiani, E. and A. Margreth, *Characterization study of the ryanodine receptor and of calsequestrin isoforms of mammalian skeletal muscles in relation to fibre types*. J Muscle Res Cell Motil, 1994. **15**(2): p. 86-101.
182. Ruff, R.L., *Calcium sensitivity of fast- and slow-twitch human muscle fibers*. Muscle Nerve, 1989. **12**(1): p. 32-7.
183. D'Antona, G., et al., *Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders*. J Physiol, 2006. **570**(Pt 3): p. 611-27.
184. Pette, D. and R.S. Staron, *Transitions of muscle fiber phenotypic profiles*. Histochem Cell Biol, 2001. **115**(5): p. 359-72.
185. Demirel, H.A., et al., *Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship*. J Appl Physiol (1985), 1999. **86**(3): p. 1002-8.
186. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(4): p. 431-8.
187. Genest, J., et al., *2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations*. Can J Cardiol, 2009. **25**(10): p. 567-79.
188. Bays, H., *Statin safety: an overview and assessment of the data--2005*. Am J Cardiol, 2006. **97**(8A): p. 6C-26C.
189. <Professional athletes suffering from familial hypercholesterolaemia rarely tolerate statin treatment because of muscular problems.pdf>.

190. Larsen, S., et al., *Simvastatin effects on skeletal muscle: relation to decreased mitochondrial function and glucose intolerance*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(1): p. 44-53.
191. Mancini, G.B., et al., *Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: proceedings of a Canadian Working Group Consensus Conference*. Can J Cardiol, 2011. **27**(5): p. 635-62.
192. Mohassel, P. and A.L. Mammen, *The spectrum of statin myopathy*. Curr Opin Rheumatol, 2013. **25**(6): p. 747-52.
193. Werner, J.L., et al., *Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(12): p. 4087-93.
194. Meador, B.M. and K.A. Huey, *Statin-associated myopathy and its exacerbation with exercise*. Muscle Nerve, 2010. **42**(4): p. 469-79.
195. Murlasits, Z. and Z. Radak, *The effects of statin medications on aerobic exercise capacity and training adaptations*. Sports Med, 2014. **44**(11): p. 1519-30.
196. Parker, B.A. and P.D. Thompson, *Effect of statins on skeletal muscle: exercise, myopathy, and muscle outcomes*. Exerc Sport Sci Rev, 2012. **40**(4): p. 188-94.
197. Urso, M.L., et al., *Changes in ubiquitin proteasome pathway gene expression in skeletal muscle with exercise and statins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2560-6.
198. Oguma, Y. and T. Shinoda-Tagawa, *Physical activity decreases cardiovascular disease risk in women: review and meta-analysis*. Am J Prev Med, 2004. **26**(5): p. 407-18.
199. Shiroma, E.J. and I.M. Lee, *Physical activity and cardiovascular health: lessons learned from epidemiological studies across age, gender, and race/ethnicity*. Circulation, 2010. **122**(7): p. 743-52.
200. Bouitbir, J., et al., *Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins*. Muscle Nerve, 2012. **46**(3): p. 367-73.
201. Ballantyne, C.M., et al., *Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients*. Arch Intern Med, 2003. **163**(5): p. 553-64.
202. Bitzur, R., et al., *Intolerance to statins: mechanisms and management*. Diabetes Care, 2013. **36 Suppl 2**: p. S325-30.
203. Pierno, S., et al., *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*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **275**(3): p. 1490-6.
204. Tomaszewski, M., et al., *Statin-induced myopathies*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(4): p. 859-66.
205. Hamelin, B.A. and J. Turgeon, *Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors*. Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**(1): p. 26-37.
206. McKenney, J.M., et al., *Final conclusions and recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force*. Am J Cardiol, 2006. **97**(8A): p. 89C-94C.
207. Klopstock, T., *Drug-induced myopathies*. Curr Opin Neurol, 2008. **21**(5): p. 590-5.

208. Teichholz, L.E., *Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels*. *Ann Intern Med*, 2003. **138**(12): p. 1008; author reply 1008-9.
209. Sinzinger, H., F. Chehne, and G. Lupattelli, *Oxidation injury in patients receiving HMG-CoA reductase inhibitors: occurrence in patients without enzyme elevation or myopathy*. *Drug Saf*, 2002. **25**(12): p. 877-83.
210. Di Stasi, S.L., et al., *Effects of statins on skeletal muscle: a perspective for physical therapists*. *Phys Ther*, 2010. **90**(10): p. 1530-42.
211. Taha, D.A., et al., *Translational insight into statin-induced muscle toxicity: from cell culture to clinical studies*. *Transl Res*, 2014. **164**(2): p. 85-109.
212. Needham, M. and F.L. Mastaglia, *Statin myotoxicity: a review of genetic susceptibility factors*. *Neuromuscul Disord*, 2014. **24**(1): p. 4-15.
213. Evans, M. and A. Rees, *Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same?* *Drug Saf*, 2002. **25**(9): p. 649-63.
214. Tobert, J.A., *Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin*. *Am J Cardiol*, 1988. **62**(15): p. 28J-34J.
215. Mallinson, J.E., et al., *Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 1): p. 219-30.
216. Sandri, M., et al., *Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy*. *Cell*, 2004. **117**(3): p. 399-412.
217. Allen, D.L., et al., *Myostatin expression is increased by food deprivation in a muscle-specific manner and contributes to muscle atrophy during prolonged food deprivation in mice*. *J Appl Physiol* (1985), 2010. **109**(3): p. 692-701.
218. Tuckow, A.P., et al., *Simvastatin represses protein synthesis in the muscle-derived C(2)C(1)(2) cell line with a concomitant reduction in eukaryotic initiation factor 2B expression*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **300**(3): p. E564-70.
219. *SIMVASTATIN REDUCES INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 SIGNALING IN DIFFERENTIATING C2C12 MOUSE MYOBLAST CELLS IN AN HMG-CoA REDUCTASE INHIBITION-INDEPENDENT MANNER*
220. Ogura, T., et al., *Simvastatin reduces insulin-like growth factor-1 signaling in differentiating C2C12 mouse myoblast cells in an HMG-CoA reductase inhibition-independent manner*. *J Toxicol Sci*, 2007. **32**(1): p. 57-67.
221. Sirvent, P., et al., *Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(3): p. 1426-34.
222. Kaufmann, P., et al., *Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(19-20): p. 2415-25.
223. Mullen, P.J., et al., *Susceptibility to simvastatin-induced toxicity is partly determined by mitochondrial respiration and phosphorylation state of Akt*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(12): p. 2079-87.
224. Stringer, H.A., et al., *Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients with statin-induced myopathy*. *J Neurol Sci*, 2013. **325**(1-2): p. 142-7.
225. Marcoff, L. and P.D. Thompson, *The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(23): p. 2231-7.

226. Miles, L., et al., *Muscle coenzyme Q: a potential test for mitochondrial activity and redox status*. *Pediatr Neurol*, 2005. **32**(5): p. 318-24.
227. Yamazaki, H., et al., *Influence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on ubiquinone levels in rat skeletal muscle and heart: relationship to cytotoxicity and inhibitory activity for cholesterol synthesis in human skeletal muscle cells*. *J Atheroscler Thromb*, 2006. **13**(6): p. 295-307.
228. Bouitbir, J., et al., *Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(11): p. 1397-407.
229. Bergman, M., et al., *Ultrastructure of mouse striated muscle fibers following pravastatin administration*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2003. **24**(7): p. 417-20.
230. Westwood, F., et al., *Statin-Induced Muscle Necrosis in the Rat: Distribution, Development, and Fibre Selectivity*. *Toxicologic Pathology*, 2005. **33**(2): p. 246-257.
231. Simsek Ozek, N., et al., *Structural and functional characterization of simvastatin-induced myotoxicity in different skeletal muscles*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(1): p. 406-15.
232. Willis, R.A., et al., *Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(22): p. 8928-30.
233. Muraki, A., et al., *Coenzyme Q10 reverses mitochondrial dysfunction in atorvastatin-treated mice and increases exercise endurance*. *J Appl Physiol* (1985), 2012. **113**(3): p. 479-86.
234. Folkers, K., et al., *Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(22): p. 8931-4.
235. von Keutz, E. and G. Schluter, *Preclinical safety evaluation of cerivastatin, a novel HMG-CoA reductase inhibitor*. *Am J Cardiol*, 1998. **82**(4B): p. 11J-17J.
236. Nishimoto, T., et al., *Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes*. *Biochemical Pharmacology*, 2003. **66**(11): p. 2133-2139.
237. Pierno, S., et al., *Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on excitation-contraction coupling of rat skeletal muscle*. *Eur J Pharmacol*, 1999. **364**(1): p. 43-8.
238. Pierno, S., et al., *Effects of chronic treatment with statins and fenofibrate on rat skeletal muscle: a biochemical, histological and electrophysiological study*. *Br J Pharmacol*, 2006. **149**(7): p. 909-19.
239. Mohaupt, M.G., et al., *Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage*. *CMAJ*, 2009. **181**(1-2): p. E11-8.
240. Draeger, A., et al., *Statin therapy induces ultrastructural damage in skeletal muscle in patients without myalgia*. *J Pathol*, 2006. **210**(1): p. 94-102.
241. Cao, P., et al., *Statin-induced muscle damage and atrogen-1 induction is the result of a geranylgeranylation defect*. *FASEB J*, 2009. **23**(9): p. 2844-54.
242. Dirks, A.J. and K.M. Jones, *Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **291**(6): p. C1208-12.
243. Masters, B.A., et al., *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, 1995. **131**(1): p. 163-74.
244. Itagaki, M., et al., *Possible mechanisms underlying statin-induced skeletal muscle toxicity in L6 fibroblasts and in rats*. J Pharmacol Sci, 2009. **109**(1): p. 94-101.
 245. Darzynkiewicz, Z., et al., *Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)*. Cytometry, 1997. **27**(1): p. 1-20.
 246. Sakamoto, K., et al., *Rab-small GTPases are involved in fluvastatin and pravastatin-induced vacuolation in rat skeletal myofibers*. FASEB J, 2007. **21**(14): p. 4087-94.
 247. Sakamoto, K., H. Mikami, and J. Kimura, *Involvement of organic anion transporting polypeptides in the toxicity of hydrophilic pravastatin and lipophilic fluvastatin in rat skeletal myofibres*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(7): p. 1482-90.
 248. Sakamoto, K., I. Wada, and J. Kimura, *Inhibition of Rab1 GTPase and endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking underlies statin's toxicity in rat skeletal myofibers*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **338**(1): p. 62-9.
 249. Sacher, J., et al., *Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(3): p. 1032-41.
 250. Skotheim, I.B., et al., *Statin induced myotoxicity: the lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro*. Eur J Pharm Sci, 2008. **33**(4-5): p. 317-25.
 251. Kobayashi, M., et al., *Preventive effects of bicarbonate on cerivastatin-induced apoptosis*. Int J Pharm, 2007. **341**(1-2): p. 181-8.
 252. Kobayashi, M., et al., *Association between risk of myopathy and cholesterol-lowering effect: a comparison of all statins*. Life Sci, 2008. **82**(17-18): p. 969-75.
 253. Yu, J.G., et al., *Investigation of gene expression in C(2)C(12) myotubes following simvastatin application and mechanical strain*. J Atheroscler Thromb, 2009. **16**(1): p. 21-9.
 254. Johnson, T.E., et al., *Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **200**(3): p. 237-50.
 255. Draeger, A., et al., *Statin therapy and the expression of genes that regulate calcium homeostasis and membrane repair in skeletal muscle*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 291-9.
 256. Liantonio, A., et al., *Fluvastatin and atorvastatin affect calcium homeostasis of rat skeletal muscle fibers in vivo and in vitro by impairing the sarcoplasmic reticulum/mitochondria Ca²⁺-release system*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 626-34.
 257. Sirvent, P., et al., *Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(3): p. 1067-75.
 258. Nakahara, K., et al., *Cytosolic Ca²⁺ increase and cell damage in L6 rat myoblasts by HMG-CoA reductase inhibitors*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **202**(3): p. 1579-85.

259. Inoue, R., et al., *Ca²⁺-releasing effect of cerivastatin on the sarcoplasmic reticulum of mouse and rat skeletal muscle fibers*. J Pharmacol Sci, 2003. **93**(3): p. 279-88.
260. Sirvent, P., J. Mercier, and A. Lacampagne, *New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity*. Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(3): p. 333-8.
261. Guis, S., et al., *In vivo and in vitro characterization of skeletal muscle metabolism in patients with statin-induced adverse effects*. Arthritis Rheum, 2006. **55**(4): p. 551-7.
262. Galtier, F., et al., *Effect of a high dose of simvastatin on muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling in healthy volunteers*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **263**(3): p. 281-6.
263. Brini, M. and E. Carafoli, *Calcium pumps in health and disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(4): p. 1341-78.
264. Egan, A. and E. Colman, *Weighing the benefits of high-dose simvastatin against the risk of myopathy*. N Engl J Med, 2011. **365**(4): p. 285-7.
265. Group, S.C., et al., *SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study*. N Engl J Med, 2008. **359**(8): p. 789-99.
266. Sirvent, P., et al., *Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **259**(2): p. 263-8.
267. Kwak, H.B., et al., *Simvastatin impairs ADP-stimulated respiration and increases mitochondrial oxidative stress in primary human skeletal myotubes*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 198-207.
268. Siddals, K.W., et al., *Abrogation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin action by mevalonic acid depletion: synergy between protein prenylation and receptor glycosylation pathways*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38353-9.
269. Lahaye, C., et al., *Immune-mediated myopathy related to anti 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies as an emerging cause of necrotizing myopathy induced by statins*. Joint Bone Spine, 2014. **81**(1): p. 79-82.
270. MacLennan, D.H., M. Abu-Abed, and C. Kang, *Structure-function relationships in Ca(2+) cycling proteins*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(8): p. 897-918.
271. Pan, X., et al., *The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(12): p. 1464-72.
272. Inesi, G., Z. Zhang, and D. Lewis, *Cooperative setting for long-range linkage of Ca(2+) binding and ATP synthesis in the Ca(2+) ATPase*. Biophys J, 2002. **83**(5): p. 2327-32.
273. Yu, X., et al., *H+ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes*. Biophys J, 1993. **64**(4): p. 1232-42.
274. Brandl, C.J., et al., *Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences*. Cell, 1986. **44**(4): p. 597-607.
275. Sugiura, T., et al., *Changes in myosin heavy chain isoform expression of overloaded rat skeletal muscles*. Int J Biochem, 1993. **25**(11): p. 1609-13.

276. Webster, C., et al., *Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1988. **52**(4): p. 503-13.
277. Lexell, J., C.C. Taylor, and M. Sjostrom, *What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men*. J Neurol Sci, 1988. **84**(2-3): p. 275-94.
278. Westwood, F.R., et al., *Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity*. Toxicol Pathol, 2005. **33**(2): p. 246-57.
279. Seachrist, J.L., et al., *Roles of exercise and pharmacokinetics in cerivastatin-induced skeletal muscle toxicity*. Toxicol Sci, 2005. **88**(2): p. 551-61.
280. Hanai, J., et al., *The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/MAFbx mediates statin-induced muscle toxicity*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3940-51.
281. Lennernas, H. and G. Fager, *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences*. Clin Pharmacokinet, 1997. **32**(5): p. 403-25.
282. Corsini, A., et al., *New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins*. Pharmacol Ther, 1999. **84**(3): p. 413-28.
283. Dumont, N.A. and J. Frenette, *Macrophage colony-stimulating factor-induced macrophage differentiation promotes regrowth in atrophied skeletal muscles and C2C12 myotubes*. Am J Pathol, 2013. **182**(2): p. 505-15.
284. Faulkner, J.A., et al., *Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(11): p. 1091-6.
285. Tupling, A.R., *The sarcoplasmic reticulum in muscle fatigue and disease: role of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*. Can J Appl Physiol, 2004. **29**(3): p. 308-29.
286. Hobler, S.C., et al., *Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 2): p. R30-7.
287. Smith, I.J. and S.L. Dodd, *Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle*. Exp Physiol, 2007. **92**(3): p. 561-73.
288. Tanaka, S., et al., *Mechanism of statin-induced contractile dysfunction in rat cultured skeletal myofibers*. J Pharmacol Sci, 2010. **114**(4): p. 454-63.
289. Zhu, L.P., et al., *Mitochondrial Ca(2+) homeostasis in the regulation of apoptotic and necrotic cell deaths*. Cell Calcium, 2000. **28**(2): p. 107-17.