

Université de Montréal

**Effet de la mutation du gène *lrpprc* sur l'activité de l'AMPK dans
les fibroblastes des patients atteints du syndrome de Leigh, type
canadien français**

**Par
Yvette Mukaneza**

Département de nutrition
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maîtrise ès science
en nutrition

Août, 2013

© Yvette Mukaneza, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet de la mutation du gène *lrpprc* sur l'activité de l'AMPK dans les fibroblastes des patients atteints du syndrome de Leigh, type canadien français

Présenté par :
Yvette Mukaneza

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Claude Lavoie, président-rapporteur
Dr Lise Coderre, directrice de recherche
Dr Christine Des Rosiers, codirectrice de recherche
Dr Guylaine Ferland, membre du jury

Résumé

Le syndrome de Leigh, type canadien français (LSFC) est une maladie infantile orpheline causée par une mutation du gène *lrpprc*. Elle se caractérise par une déficience tissu-spécifique de cytochrome c oxydase (COX), une dysfonction mitochondriale et la survenue de crises d'acidose lactique fatales dans plus de 80% de cas. Selon les familles des patients, ces crises apparaissent lors d'une demande excessive d'énergie. Malheureusement, les mécanismes sous-jacents à l'apparition des crises et notamment la physiopathologie du LSFC demeurent inconnus. Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique chez les patients LSFC, nous avons examiné la régulation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), une enzyme clé de l'homéostasie énergétique, de même que certaines de ses voies cibles (SIRT1/PGC1 α et Akt/mTOR) dans les fibroblastes de patients LSFC et de témoins en *conditions basales* et *conditions de stress*.

En conditions basales, l'activité de l'AMPK était similaire dans les cellules LSFC et les témoins. Par contre, les cellules LSFC montraient une surexpression significative des voies Akt/mTOR et SIRT1/PGC1 α comparativement aux cellules témoins. Nous avons aussi examiné ces voies de signalisation suite à une incubation de 4h avec 10 mM de lactate et 1 mM de palmitate (LP), nous permettant de mimer les conditions de « crise ». Nos résultats ont démontré que le LP augmentait les niveaux de phosphorylation de l'AMPK de 90% ($p < 0,01$) dans les cellules témoins mais pas dans les cellules LSFC. Pourtant, l'AMPK est activée dans les cellules LSFC en réponse à une hypoxie chimique induite par le 2,4 dinitrophénol. Dans les cellules témoins, le LP augmentait aussi les niveaux d'expression de SIRT1 (57%, $p < 0,05$), de LRPPRC (23%, $p = 0,045$) et de COXIV (19%, $p < 0,05$). Un prétraitement de 48h au ZMP, un activateur pharmacologique de l'AMPK, a eu un effet additif avec le LP et des augmentations de SIRT1 phosphorylée (120%, $p < 0,05$), de SIRT1 total (75%, $p < 0,01$), de LRPPRC (63%, $p < 0,001$) et de COXIV (38%, $p < 0,001$) ont été observés. Tous ces effets étaient aussi abolis dans les cellules LSFC. En conclusion, nos résultats ont démontré des altérations importantes de la régulation du métabolisme énergétique dans les fibroblastes de patients LSFC.

Mots clés : LSFC, LRPPRC, AMPK, fibroblastes, dysfonction mitochondriale, métabolisme énergétique, palmitate, ZMP

Abstract

Leigh syndrome French Canadian type (LSFC) is an orphan infantile disease caused by mutations in the *LRPPRC* gene. It is characterized by a tissue-specific cytochrome c oxidase deficiency (COX), mitochondrial dysfunction and fatal lactic acidosis crises which occur in more than 80% of cases. According to parents, these crises occur during stressful situations. The pathophysiology underlying this disease and the factors that precipitate these crises remain unknown. To better understand the regulation of energy metabolism in LSFC patients, we examined the activity of AMP activated protein kinase (AMPK), a key regulator of energy balance, and its downstream targets (SIRT1/PGC1 α and Akt/mTOR) in LSFC and control fibroblasts under basal and stress conditions.

Our results showed that AMPK activity was similar in LSFC and control cells under basal conditions. On the other hand, Akt/mTOR and SIRT1/PGC1 α pathways were up regulated in LSFC cells compared to controls. We next examined AMPK activity in cells treated with 10 mM lactate and 1mM palmitate (LP) for 4h, thus mimicking the conditions of “crisis”. Following this treatment, AMPK phosphorylation levels increased significantly (90%, $p<0.01$) in control cells but not in LSFC cells. Nevertheless, AMPK seems functional in LSFC cells because the enzyme was activated in response to chemical hypoxia induced by 2,4 dinitrophenol. LP also increased the expression of SIRT1 (57%, $p<0.05$), *LRPPRC* (23%, $p=0.045$) and COXIV (19%, $p<0.05$), in controls cells. Furthermore, pretreatment with ZMP, a pharmacological activator of AMPK, had an additive effect with LP leading to a further increase in the activity of SIRT1 (120%, $p<0.05$), as well as the expression levels of SIRT1 (75%, $p<0.01$), *LRPPRC* (63%, $p<0.001$) and COXIV (38%, $p<0.001$). All these effects were abolished in LSFC cells and thus, our data highlight alterations in the regulation of key enzymes of energy metabolism, including the activation of AMPK, in LFSC fibroblasts.

Key words: LSFC, *LRPPRC*, AMPK, fibroblasts, mitochondrial dysfunction, energy metabolism, palmitate, ZMP.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
DÉDICACE.....	xvi
REMERCIEMENTS.....	xvii
L'AVANT-PROPOS.....	xviii
INTRODUCTION.....	1
I- Les maladies mitochondriales.....	2
I.1- La mitochondrie et le métabolisme énergétique.....	2
I.1.1- Le métabolisme intermédiaire.....	3
I.1.1.1- Catabolisme du glucose.....	5
I.1.1.2- Catabolisme des acides gras libres.....	6
I.1.1.3- Catabolisme des acides aminés.....	8
I.1.1.4- Cycle de Krebs.....	8
I.1.2- La phosphorylation oxydative.....	10
I.1.2.1- Les réactions d'oxydoréduction.....	11
I.1.2.2- La phosphorylation oxydative.....	12
I.2- Dysfonction mitochondriale : Cause des maladies mitochondriales.....	13
I.2.1- Mutations génétiques.....	13
I.2.1.1- Déficience en complexe I.....	13
I.2.1.2- Déficience en complexe II.....	14
I.2.1.3- Déficience en complexe III.....	14
I.2.1.4- Déficience en complexe IV.....	14
I.2.1.5- Déficience en complexe V.....	15
I.2.2- Altérations métaboliques.....	16
I.2.2.1- Production d'ATP.....	16

I.2.2.2- Stress oxydatif.....	17
I.2.2.3- Apoptose.....	18
II- Le syndrome de Leigh, de type canadien français (LSFC).....	19
II.1- Caractéristiques : syndrome de Leigh classique vs LSFC.....	19
II.1.1- Syndrome de Leigh classique.....	19
II.1.2- Syndrome de Leigh de type canadien français	20
II.2- Pathogénie du LSFC.....	23
II.2.1- Mutations du gène <i>lrpprc</i>.....	23
II.2.1.1- La protéine LRPPRC.....	23
II.2.1.2- Mutations à l'origine du LSFC.....	25
II.2.2- La déficience en COX.....	26
II.3- Récapitulatif et mécanismes potentiels de compensation.....	27
III- La protéine kinase activée par AMP.....	28
III.1- Généralités.....	28
III.2- Structure et régulation de l'AMPK	28
III.2.1- Structure de l'AMPK.....	28
III.2.2- Régulation de l'activité de l'AMPK.....	30
III.2.2.1- La phosphorylation	31
III.2.2.2- L'inhibition de la déphosphorylation.....	33
III.2.2.3- L'activation allostérique.....	33
III.3- Activation de l'AMPK.....	34
III.3.2- L'activation par le stress énergétique.....	34
III.3.3- L'activation par les hormones et les cytokines.....	34
III.3.4- L'activation par les nutriments.....	35
III.3.4- L'activation pharmacologique.....	35
III.4- Rôles de l'AMPK.....	36
III.4.1- Régulation du métabolisme des glucides.....	36
III.4.1.1- Le transport du glucose et la glycolyse.....	36
III.4.1.2- La néoglucogenèse.....	37
III.4.2- Régulation du métabolisme lipidique.....	38
III.4.3- Régulation du métabolisme des protéines.....	39

III.4.4- Régulation de la biogenèse mitochondriale.....	40
III.4.5- Régulation de la croissance cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose.....	41
III.4.6- Régulation de l'autophagie.....	42
HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	45
I- Mise en contexte.....	46
II- Hypothèses.....	47
III- Objectifs.....	49
IV- Approche expérimentale.....	49
IV.1- Métabolisme de base.....	49
IV.2- Conditions de stress.....	50
IV.2.1- Incubation avec le DNP.....	50
IV.2.2- Incubation avec un excès de nutriments.....	51
IV.2.3- Incubation chronique avec le ZMP.....	51
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	53
I- Modèle cellulaire.....	54
II- Culture cellulaire.....	54
III- Immunobuvardage.....	55
IV- Analyse statistique.....	57
RÉSULTATS.....	58
I- Choix du modèle cellulaire.....	59
II- Caractérisation des voies métaboliques dans les cellules LSFC en conditions basales.....	61
II.1- Expression protéique de LRRPRC et de COXIV.....	61
II.2- Activité de l'AMPK.....	62
II.3- Activité de la protéine PFK2.....	63
II.4- Activité de la p38MAPK.....	64
II.5- Activité des protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale.....	65

II.6- Activité des protéines impliquées dans la survie et la croissance cellulaire..	67
III- Caractérisation des voies métaboliques en réponse à un stress.....	69
III.1- Traitement avec le DNP.....	69
III.2- Traitement avec le LP et le ZMP.....	70
II.2.1- Activité de l'AMPK.....	70
II.2.2- Activité de la p38MAPK.....	72
II.2.3- Activité des protéines impliquées dans la survie et la croissance cellulaire.....	73
II.2.4- Activité des protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale.....	75
 DISCUSSION.....	 78
 CONCLUSION.....	 95
 BIBLIOGRAPHIE.....	 99

Liste des tableaux

Tableau I. Les niveaux de lactate en fonction du type de déficience.....	17
Tableau II. Paramètres biochimiques des patients LSFC : état basal vs état de crise métabolique.....	22
Tableau III. Comparaison entre le syndrome de Leigh classique et le syndrome de Leigh de type canadien français.....	23
Tableau IV. Caractéristiques des deux lignées cellulaires utilisées.....	54

Liste des Figures

Figure 1. Structure de la mitochondrie	3
Figure 2. Réactions du métabolisme intermédiaire dans la mitochondrie	4
Figure 3. Étapes de la glycolyse.....	5
Figure 4. Le système carnitine.....	6
Figure 5. L'oxydation des acides gras dans la mitochondrie.....	7
Figure 6. Le devenir du squelette carboné des acides aminés.....	8
Figure 7. Étapes du cycle de Krebs.....	9
Figure 8. La chaîne respiratoire mitochondriale.....	10
Figure 9. Structure de l'AMPK.....	30
Figure 10. Régulation de l'activité de l'AMPK par les nucléotides.....	31
Figure 11. Régulation du métabolisme des lipides par l'AMPK.....	38
Figure 12. Inhibition de la voie de mTOR par l'AMPK.....	40
Figure 13. Régulation de la biogenèse mitochondriale par l'AMPK.....	41
Figure 14. Régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose par l'AMPK.....	42
Figure 15. Induction de l'autophagie par ULK1.....	43
Figure 16. Schéma illustrant la première hypothèse du projet de recherche.....	47
Figure 17. Schéma illustrant la deuxième hypothèse du projet de recherche.....	48
Figure 18. Protéines impliquées dans le métabolisme énergétique évaluées dans l'étude.....	50
Figure 19. Différents types de stress utilisés dans notre étude.....	52
Figure 20. Protocole expérimental suivi pour la réalisation des westerns blots.....	57
Figure 21. Comparaison des niveaux d'expression et de phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC dans les cellules primaires et les cellules immortalisées.....	60
Figure 22. Expression protéique de LRPPRC et de COXIV dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.....	61
Figure 23. Activité de l'AMPK dans les cellules LSFC et les cellules témoins.....	62
Figure 24. Taux de phosphorylation de la PFK2 dans les cellules LSFC et les cellules témoins.....	63
Figure 25. Taux de phosphorylation de la p38MAPK dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.....	64

Figure 26. Taux de phosphorylation et d'expression de SIRT1 et PGC-1 α dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.....	66
Figure 27. Taux de phosphorylation et d'expression d'Akt et de mTOR dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.....	68
Figure 28. Effet du dinitrophénol sur l'activité de l'AMPK.....	69
Figure 29. Effet du LP et du ZMP sur l'activité de l'AMPK.....	71
Figure 30. Effet du LP et du ZMP sur la phosphorylation de P38MAPK.....	72
Figure 31. Effet du LP et du ZMP sur la voie Akt/mTOR.....	74
Figure 32. Effet du LP et du ZMP sur la voie SIRT1/PGC-1 α	76
Figure 33. Effet du LP et du ZMP sur l'expression protéique de LRPPRC et de COXIV.....	77
Figure 34. Expression protéique de HIF1- α en conditions basales.....	81
Figure 35. Régulation du métabolisme des cellules en prolifération.....	82
Figure 36. Mécanismes potentiels de régulation de la voie de SIRT1/PGC-1 α	85
Figure 37. Récapitulatif : Métabolisme de base des cellules LSFC.....	87
Figure 38. Mécanisme potentiel de régulation de la biogenèse mitochondriale par la voie AMPK/SIRT1/PGC-1 α	94

Liste des abréviations

ACC : acétyl-CoA carboxylase
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
ADNn : ADN nucléaire
ADP : adénosine diphosphate
AICAR : 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide
Akt : protéine kinase B
AMPK : protéine kinase activée par l'AMP
ANT : adénine nucléotide translocateur
Apaf1 : facteur activateur des protéases apoptotiques 1
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphate
ATP6 : ATP synthétase 6
ATP8 : ATP synthétase 8
BCS1 : «Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Synthesis»
BSA : albumine de sérum bovin
CACT : carnitine-acyl-carnitine translocase
CaMKK β : «Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase Kinase»
CBM : domaine de liaison aux glucides
CBS : cystathionine- β - synthase
CPT : carnitine-palmitoyl-transférase
CoQ : coenzyme Q
CoASH/HSCoA : coenzyme A
COX : cytochrome c oxydase
COXIV: sous-unité IV de COX
CRTC2: «CREB-Regulated Transcription Coactivator 2»
Cyt : cytochrome
DHAP : dihydroxyacétone phosphate

DIC : transporteur dicarboxylate
DMEM : «Dulbecco's Modified Eagle's Medium»
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNP : 2,4-dinitrophénol
4EBP1 : protéine de liaison au facteur d'initiation 4E
eEF-2-kinase : protéine kinase du facteur d'élongation
eIF4E : facteur d'initiation de la traduction
ENTH : «Epsin N-Terminal Homology»
ETF : flavoprotéine de transfert d'électron
ETF-DH : déshydrogénase de transfert d'électron
FAD : flavine adénine dinucléotide
FADH₂ : flavine adénine dinucléotide réduit
FAS : acides gras synthase»
FBS : sérum foetal bovin
FMN : flavine mononucléotide
FOX01 : «Forkhead Box Transcriptional Factor 01»
G-6-P : glucose-6-phosphate
GAP : glycéraldéhyde 3 phosphate
GLUT1 : transporteur du glucose 1
GLUT4 : transporteur du glucose 4
GPAT : glycérol-3-phosphate acyl-transférase
GTP : guanosine triphosphate
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HDAC : histone désacétylase 5
HMG-CoR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase
HNF4 α : facteur nucléaire hépatocytaire 4 α
HO \cdot : hydroxyl
HSL : lipase hormono-sensible
LHON : neuropathie optique héréditaire de Leber
LKB1 : protéine suppresseur de tumeurs

LRPPRC ou LRP130 : «Leucine-Rich PPR-motif Containing Protein»

LSFC : syndrome de Leigh, de type canadien français

MELAS : syndrome d'encéphalopathie mitochondriale avec acidose lactique et des pseudo-accidents vasculaires cérébraux

MKK3 : MAPK kinase 3

MO25 : «Mouse protein 25- α »

MOMP : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale

mRNP : complexe ribonucléoprotéique nucléaire

mTOR : «Mammalian Target Of Rapamycin»

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH,H⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NAMPT : nicotinamide phosphoribosyletransférase

NARP : syndrome de neuropathie, d'ataxie, et de rétinite pigmentaire

ND : NADH déshydrogénase

ND4 : NADH déshydrogénase 4

NDUFAF1 : «NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 alpha Subcomplex, Assembly Factor 1»

NO : monoxyde d'azote

O₂⁻ : anion superoxyde

ONOO⁻ : anion peroxinitrite

p38MAPK : protéine kinase p38 activée par mitogène

PBS : tampon phosphate salin

pCO₂ : pression partielle du gaz carbonique

PDHC : complexe de la pyruvate déshydrogénase

PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase

PFK2 : 6-phosphofructo-2-kinase

PGC1- α : co-activateur transcriptionnel 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes

PK : pyruvate kinase

PP : phosphatases

PPR : motif répété de pentatricopeptide

PTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale

RabGAP : «Rab GTPase-Activating Protein»

Rheb : «Ras Homolog Enriched in Brain»

ROS : espèces réactives oxygénées

SCO : «Cytochrome C Oxidase Assembly Protein»

SDH : succinate déshydrogénase

SDS : sodium dodécyl sulfate

SEC1 : «SECretory 1»

SERBP1c : «Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c»

SIRT1 : sirtuine 1

siRNA : «Small Interfering RNA»

SLIRP : «Stem- Loop Interacting RNA Binding Protein»

Ste20 : «Sterile 20 Group Kinases»

STRAD : «Ste20-Related Adaptor Protein»

SURF1 : «Surfeit gene 1»

TAB1 : «Transforming Growth Factor- β -Activated Protein Kinase 1– Binding Protein 1»

TAK1: «Transforming Growth Factor- β - Activated Kinase 1»

TCA : cycle acide tricarboxylique

TSC2 : «Tuberous Sclerosis Complex»

ULK1 : «Unc-51-Like Kinase 1»

UQCRB : gène codant pour la protéine ubiquinol-cytochrome c réductase qui lie l'ubiquinone

ZMP : 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate

Dédicace

Je dédie ce mémoire à toute ma famille, et plus particulièrement à mes parents. Auprès de vous, j'ai appris la persévérance, la patience et l'implication dans tout ce que j'entreprends. Sans quoi je n'aurais pas pu accomplir le plus gros de ce travail, merci pour votre soutien moral et financier durant toutes mes études.

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Dr Lise Coderre, ainsi que ma codirectrice Dr Christine Des Rosiers. Votre soutien, vos encouragements et conseils tout au long de ma maîtrise furent d'une aide précieuse.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur accueil. Merci à tous les membres du consortium de l'acidose lactique, avec qui les discussions furent une source d'inspiration. Je tiens à remercier également l'Association de l'acidose lactique dont le courage et l'espoir sont d'une grande source de motivation pour nous tous. Merci à tous les organismes subventionnaires qui ont contribué à la réalisation de mon projet de recherche.

J'aimerais finir en remerciant particulièrement le Dr Geneviève Renier, ainsi que mon frère Yves Mugabo qui ont su me transmettre leur passion pour la recherche.

Merci

Avant-propos

Le syndrome de Leigh type canadien français (LSFC), appelé aussi acidose lactique, est une maladie mitochondriale rare mais avec une prévalence et une mortalité élevées au Québec. Il y a un peu plus de 20 ans cette maladie était peu connue du grand public. C'est à partir de 1999, avec le lancement du premier défi Pierre Lavoie, qu'elle a été découverte par le public. Avec la participation des parents d'enfants atteints, ce défi a permis d'amasser des fonds pour la recherche. Le gène muté responsable de la maladie fût ainsi découvert en 2003. Depuis, avec l'appui des familles de l'Association de l'acidose lactique, un consortium de chercheurs multidisciplinaires a été créé en 2007. Le but principal de ce consortium est de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le LSFC et éventuellement de développer des thérapies. Ce projet de maîtrise rentre dans le cadre des recherches menées par le consortium.

Le LSFC est une maladie mitochondriale caractérisée par une déficience du complexe IV de la chaîne respiratoire entraînant une dysfonction de la mitochondrie. Dans d'autres maladies mitochondriales, cette déficience est associée à plusieurs altérations métaboliques incluant la diminution de la production énergétique par la mitochondrie. En ce qui concerne le LSFC, les conséquences de cette dysfonction demeurent inconnues. Mon projet était d'identifier les voies de signalisation, notamment énergétiques, qui sont altérées chez les patients LSFC avec une emphase sur la voie de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), voie régulatrice par excellence du métabolisme énergétique.

La première partie de ce mémoire constitue une revue de la littérature. Le premier chapitre est consacré aux maladies mitochondriales en général. Ce chapitre a été choisi pour mieux cerner les caractéristiques du LSFC en tant que maladie mitochondriale. Il inclut une partie sur le rôle de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique, les dysfonctions mitochondriales associées aux maladies mitochondriales, de même que leurs conséquences. Le deuxième chapitre décrit les caractéristiques du LSFC, ainsi que les dernières avancées sur la compréhension de sa pathogénie. Enfin, le troisième est consacré à la protéine AMPK. Il expose les caractéristiques de l'AMPK, la régulation de son activité et ses multiples rôles

dans le rétablissement de l'homéostasie énergétique. La deuxième partie du mémoire consiste en la présentation du projet de recherche. Elle inclut les hypothèses, les objectifs, l'approche expérimentale ainsi que les résultats. Une dernière partie porte sur la discussion des résultats dans le contexte de la littérature.

Introduction

I- Les maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales, comme leur nom l'indique, sont des maladies héréditaires associées à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elles sont transmises de façon autosomique dominante ou récessive. Elles peuvent avoir une transmission maternelle ou liée au chromosome X. Ce groupe de maladies fait partie des maladies métaboliques héréditaires les plus fréquentes avec une prévalence de 1/5000 naissances. Elles affectent les personnes de tous âges mais plus particulièrement les enfants. Ce sont des maladies complexes, de causes multiples, avec des manifestations cliniques très variées (1).

I.1- La mitochondrie et le métabolisme énergétique

La mitochondrie est un organe d'origine bactérienne présente en nombre variable dans presque toutes les cellules du corps humain. Elle dérive d'une endosymbiose entre les cellules procaryotes et eucaryotes, ce qui lui confère une anatomie distincte des autres organelles de l'organisme (2). Elle est composée d'une matrice et d'un espace intermembranaire délimités par deux membranes : une membrane externe uniforme et continue, et une membrane interne qui forme des crêtes (Figure 1, p. 3). Elle possède son propre génome, l'acide désoxyribonucléique mitochondrial (ADNmt). Cependant, celui-ci synthétise seulement une partie des acides ribonucléiques (ARN) et des protéines dont la mitochondrie a besoin. L'ADNmt est constitué de 37 gènes dont deux codent pour des ARN ribosomiaux, 22 codent pour des ARN de transfert, et 13 qui codent pour les ARN messagers (ARNm) des protéines de la chaîne respiratoire. Le reste des protéines provient de l'ADN nucléaire (ADNn) qui code pour environ 900 protéines mitochondriales (3).

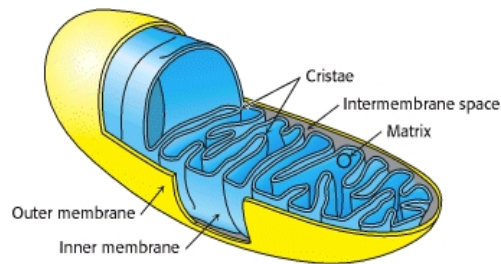


Figure 1. Structure de la mitochondrie. Figure tirée de *Biochemistry 5th edition*, section 18.1, 2002.

La mitochondrie est un organe dynamique, en continuel remodelage au travers des processus de fusion et de fission, de la biogenèse et de l'autophagie. Par ces mécanismes, elle participe à plusieurs fonctions cellulaires telles que la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire, le stress oxydatif, la thermogenèse, l'homéostasie calcique et l'apoptose (4). Cependant, le rôle principal de la mitochondrie demeure la production de l'énergie cellulaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Elle est le siège de certaines réactions du métabolisme intermédiaire et de la phosphorylation oxydative (5).

I.1.1- Le métabolisme intermédiaire

Le métabolisme intermédiaire constitue l'ensemble des réactions cataboliques et anaboliques des macronutriments à savoir les glucides, les lipides et les protéines lesquels sont digérés respectivement en glucose, en acides gras libres et en acides aminés (5). La Figure 2 (p. 4) présente l'ensemble des réactions impliquées dans le catabolisme du glucose et des acides gras. Les réactions cataboliques de ces derniers et des acides aminés seront discutées dans les sous-sections suivantes.

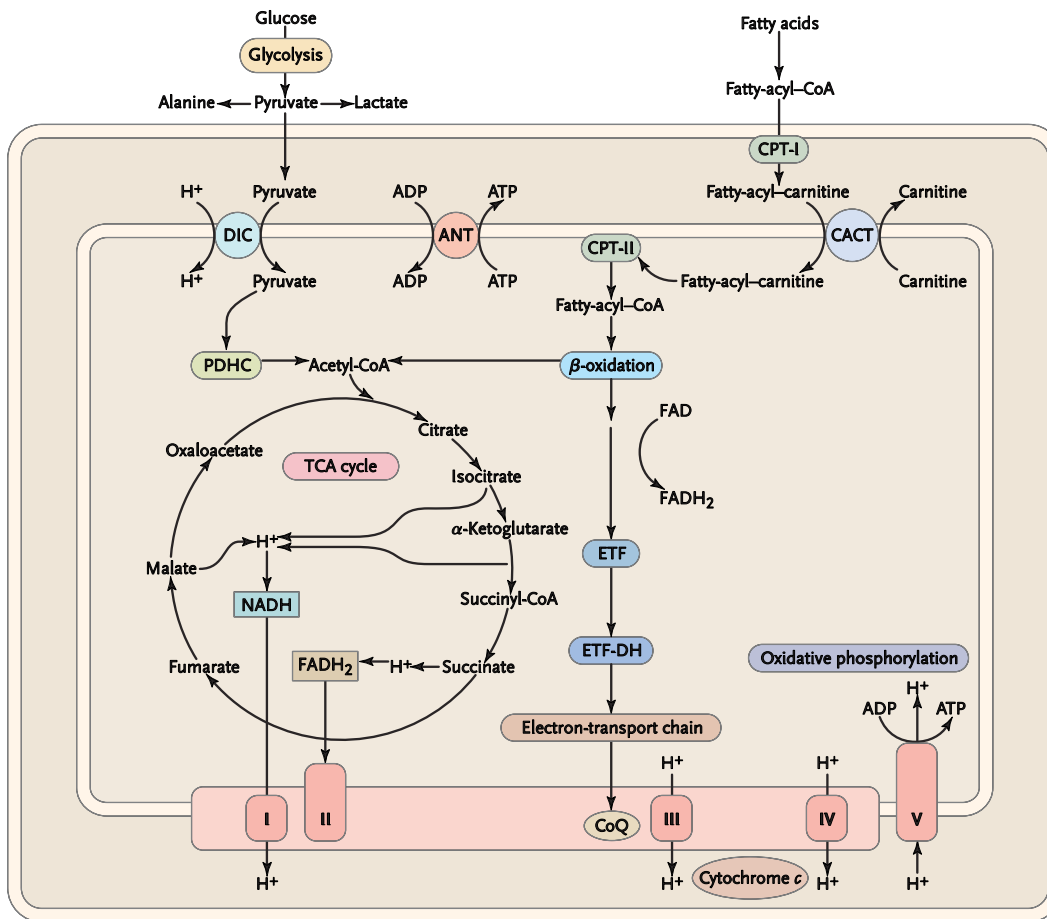


Figure 2. Réactions du métabolisme intermédiaire dans la mitochondrie. Figure adaptée de DiMauro S. et Schon E.A. *N Engl J Med*, 348, 2656-2668, 2003.

ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, ANT : adénine nucléotide translocateur, CACT : carnitine-acyl-carnitine translocase, CoQ : coenzyme Q, CPT : carnitine-palmitoyl-transférase, DIC : transporteur dicarboxylate, ETF : flavoprotéine de transfert d'électron, ETF-DH : déshydrogénase de transfert d'électron, FAD : flavine adénine dinucléotide, FADH₂ : FAD réduit, NADH, H⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide réduit, PDHC : complexe de la pyruvate déshydrogénase, TCA : cycle acide tricarboxylique, I : complexe I, II : complexe II, III : complexe III, IV : complexe IV, et V : complexe V.

I.1.1.1- Catabolisme du glucose

La glycolyse est la voie de dégradation du glucose en pyruvate. Ce dernier peut ensuite être converti en acétyl-CoA ou en lactate. La glycolyse permet la synthèse de deux molécules d'ATP et deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH,H⁺). Dans le cytosol, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate (G-6-P) par une hexokinase. Suite à une série de réactions enzymatiques, le G-6-P est transformé en fructose 1,6 biphosphate puis clivé pour former du dihydroxyacétone phosphate et du glycéraldéhyde 3 phosphate (GAP). Une série de réactions enzymatiques transforme le GAP en pyruvate. En présence d'oxygène, le pyruvate entre dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. Dans d'autres conditions, notamment anaérobiques, le pyruvate est transformé en lactate sous l'action de la lactate déshydrogénase (Figure 3, p. 5) (5).

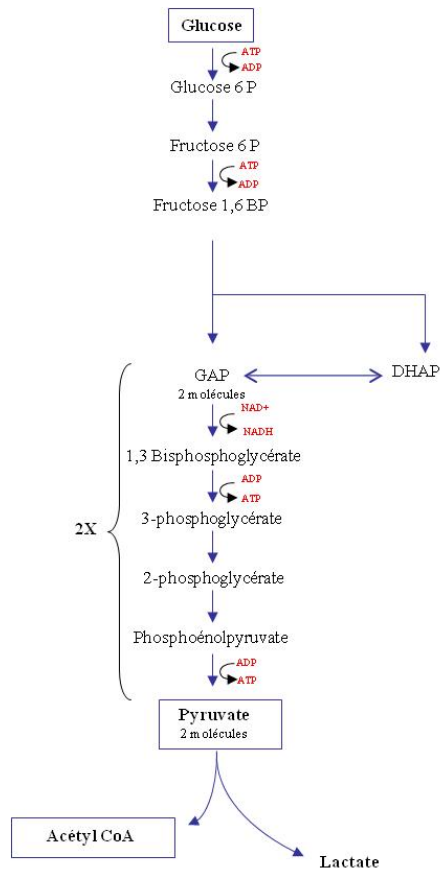


Figure 3. Étapes de la glycolyse. Figure adaptée de *Biochemistry 5th edition*, section 16.1, 2002. NAD: nicotinamide adénine dinucléotide, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide réduit, ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, GAP : glycéraldéhyde 3 phosphate, DHAP : dihydroxyacétone phosphate.

I.1.1.2- Catabolisme des acides gras libres

Les acides gras libres doivent préalablement être activés en acyl-CoA pour ensuite être oxydés au niveau de la matrice mitochondriale. Cette étape d'activation, catalysée par l'enzyme acyl-CoA synthétase, lie un coenzyme A à un acide gras libre. L'activation des acides gras à chaîne longue (nombre de carbone supérieur ou égal à 14) a lieu soit dans le cytosol, soit au niveau de la membrane externe dépendamment des isoformes de l'acyl-CoA synthétase (5,6). Comme, l'acyl-CoA formé ne peut pas traverser la membrane interne, il est transporté dans la matrice par le système de carnitine. Au niveau de la membrane externe, la carnitine se lie à l'acyl-CoA pour former l'acyl-carnitine, une réaction catalysée par la carnitine-palmitoyl-transférase 1 (CPT1). L'acyl-carnitine libéré dans l'espace inter membranaire est pris en charge par l'acyl-carnitine translocase pour traverser la membrane interne. Dans la matrice, l'acyl-carnitine est retransformé en acyl-CoA via une réaction catalysée par la carnitine-palmitoyl-transférase 2 (Figure 4, p. 6). En ce qui concerne les acides gras à chaîne moyenne et courte (nombre de carbones inférieurs à 14), ces derniers traversent librement les membranes interne et externe et leur activation a lieu directement dans la matrice par une acyl-CoA synthétase matricielle. L'acyl-CoA est le substrat lipidique de la β -oxydation (5,6).

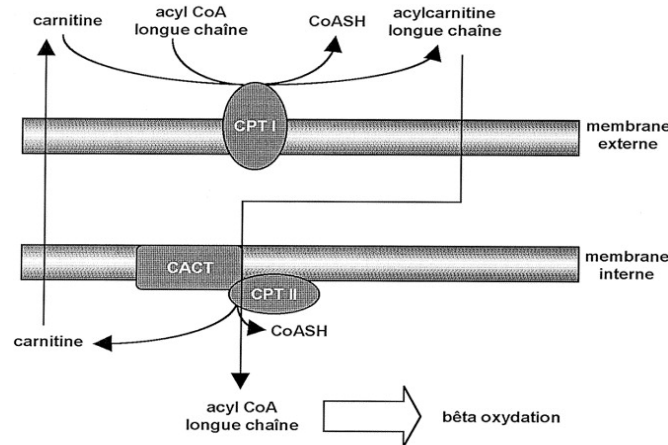


Figure 4. Le système carnitine. Figure tirée de Le Borgne F. et Demarquoy J. *Science & Sports*, 18, 125-133, 2003. CPT I : carnitine palmitoyl transférase I, CPT II : carnitine palmitoyl transférase II, CACT : carnitine acylcarnitine translocase, CoASH : coenzyme A.

La β -oxydation comporte 4 étapes de dégradation de l'acyl-CoA en acétyl-CoA à savoir une déshydrogénation, une hydratation, une deuxième déshydrogénation et enfin un clivage de l'acide gras. La dernière étape libère un acyl-CoA privé de deux carbones qui servira de substrat pour le tour suivant, de même qu'un acétyl-CoA. À chaque tour de cycle, une molécule de flavine adénine dinucléotide réduit (FADH_2) et une molécule de NADH,H^+ sont libérées dans la matrice (Figure 5, p. 7). Pour un acide gras à $2n$ carbones, $(n-1)$ tours d'oxydation sont nécessaires pour la formation de n acétyl-CoA. Par exemple, le palmitoyl-CoA, un acyl-CoA à 16 carbones, sera dégradé en 8 acétyl-CoA au cours de 7 tours de β -oxydation et produira 7 molécules de FADH_2 et 7 molécules de NADH,H^+ . Dans le cas d'un acide gras avec un nombre impair $(2n+1)$ de carbones, le clivage libère $(n-1)$ acétyl-CoA et un propionyl-CoA (5,6).

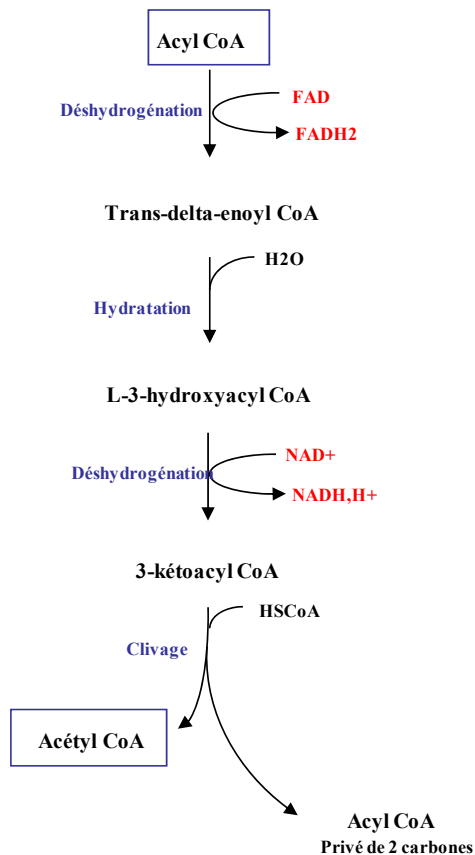


Figure 5. L'oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Figure adaptée de *Biochemistry 5th edition*, section 22.2, 2002. NAD: nicotinamide adénine dinucléotide, FAD: flavine adénine dinucléotide, HSCoA : coenzyme A.

1.1.1.3- Catabolisme des acides aminés

La dégradation d'un acide aminé est composée de deux étapes : la transamination puis la désamination pour former l'acide α -cétonique correspondant. Selon l'acide aminé de départ, le squelette carboné peut-être transformé en sept composés différents soit : l' α -cétooglutarate, l'oxaloacétate, le fumarate, l'acétoacétyl-CoA, le succinyl-CoA, le pyruvate et l'acétyl-CoA. Selon les organes, ces derniers entrent dans le métabolisme intermédiaire pour la production d'énergie ou participent à la synthèse des glucides ou des lipides (Figure 6, p. 8) (5,6).

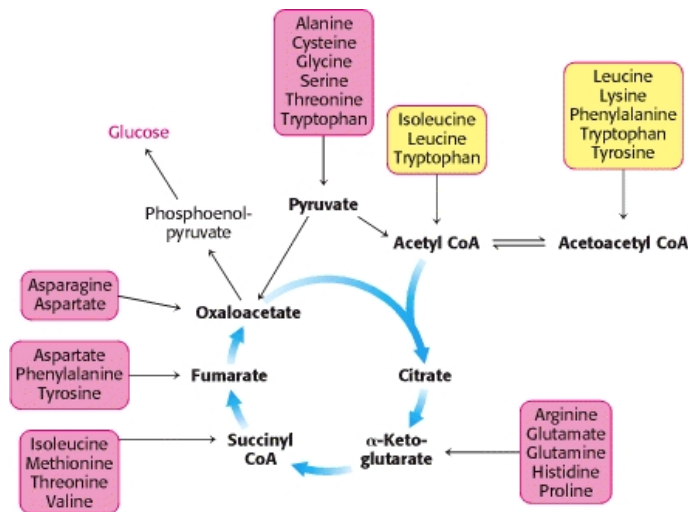


Figure 6. Le devenir du squelette carboné des acides aminés. Figure tirée de *Biochemistry* 5th edition, section 23.5, 2002.

1.1.1.4- Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, appelé aussi le cycle de l'acide citrique, constitue l'étape finale du catabolisme oxydatif des glucides, des acides gras et des acides aminés. Il a lieu dans la matrice mitochondriale. Le cycle comprend huit réactions enzymatiques qui se résument en trois grandes étapes. À chaque tour d'oxydation, une molécule d'acétyl-CoA réagit avec une molécule d'oxaloacétate pour former du citrate. La première étape du cycle consiste à transformer le citrate en isocitrate par deux réactions enzymatiques de déshydratation et de réhydratation. La deuxième étape est une série de trois réactions de décarboxylation

permettant de convertir l'isocitrate en succinate. Enfin, la troisième étape permet la régénération de l'oxaloacétate par une suite de trois réactions de déshydrogénation, d'hydratation et de déshydrogénation. Globalement, le cycle de Krebs permet l'oxydation du groupement acétyle de l'acétyl-CoA en deux molécules de CO₂. À chaque tour, le cycle libère de l'énergie sous forme d'une molécule de guanosine triphosphate (GTP) et génère des coenzymes réduits, soit une molécule de FADH₂ et 3 molécules de NADH,H⁺, qui seront oxydés en présence d'oxygène par la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 7, p. 9) (5,6).

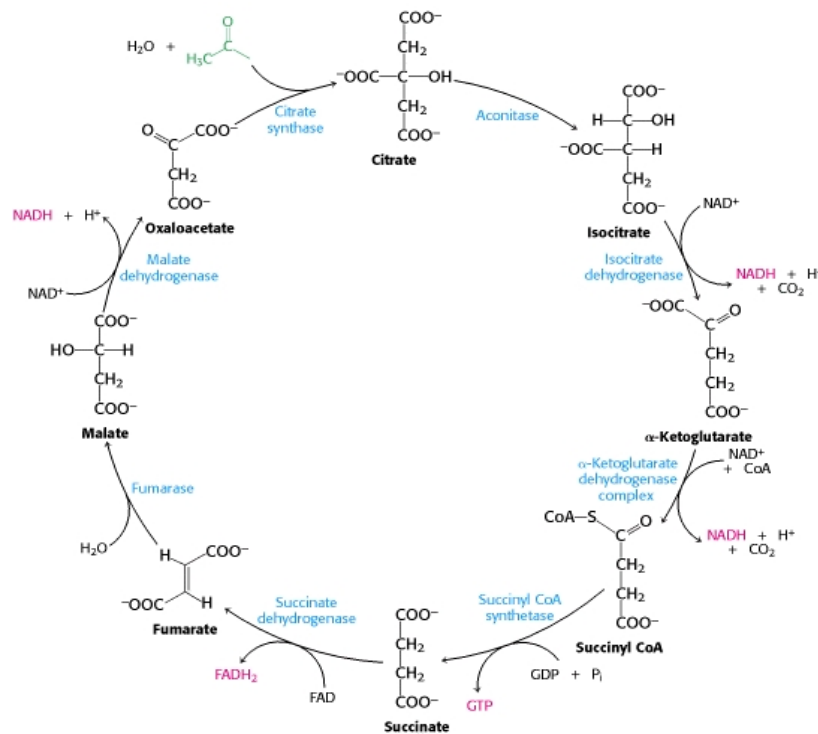


Figure 7. Étapes du cycle de Krebs. Figure tirée de *Biochemistry 5th edition*, section 17.1, 2002. NADH,H⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide réduit, FADH₂: flavine adénine dinucléotide réduit, GTP : guanosine triphosphate.

I.1.2- La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. C'est une série de réactions d'oxydoréduction des coenzymes réduits (NADH, H^+ et FADH_2) couplée à la phosphorylation d'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de cinq complexes protéiques (I, II, III, IV et V) situés dans la membrane interne. Les quatre premiers complexes forment la chaîne d'oxydoréduction et le cinquième complexe est une ATP synthétase et qui comme son nom l'indique, est responsable de la synthèse d'ATP. Deux petites protéines mobiles : le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome c se situent dans la membrane interne et participent au transport des électrons. Le CoQ permet le transport des électrons des complexes I et II vers le complexe III alors que le cytochrome c transfère les électrons du complexe III vers le complexe IV (Figure 8, p. 10). La chaîne respiratoire joue un rôle primordial dans la respiration cellulaire et permet la production de plus de 90% de l'énergie cellulaire (5).

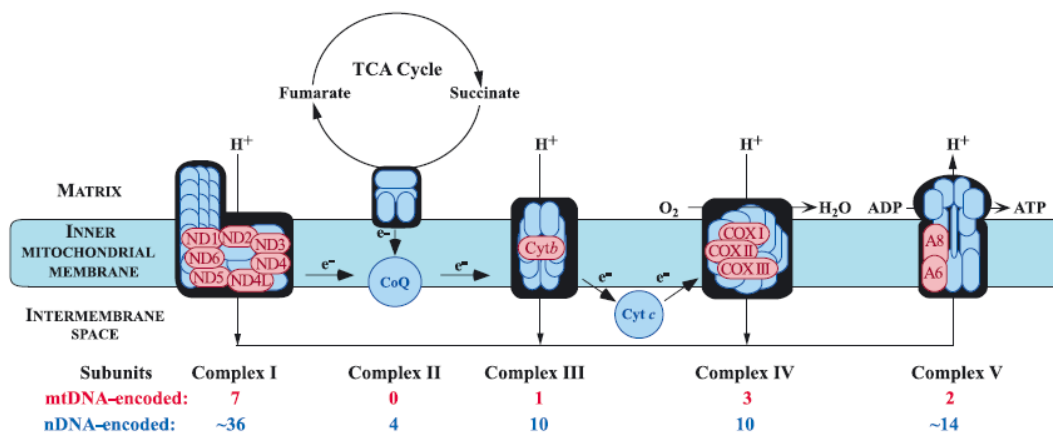
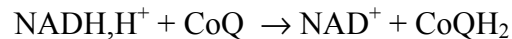


Figure 8. La chaîne respiratoire mitochondriale. Figure tirée de DiMauro S., *Biochim Biophys Acta*, 1658, 80-88, 2004. e⁻ : électrons, H⁺ : protons, CoQ : Coenzyme Q, Cyt c : cytochrome c, TCA cycle : cycle acide tricarboxylique, O₂ : dioxygène, H₂O : eau, ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate.

I.1.2.1- Les réactions d'oxydoréduction

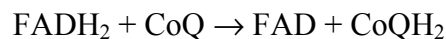
Les complexes I, II, III, et IV de la chaîne respiratoire comportent des systèmes d'oxydoréduction qui vont transférer les électrons des coenzymes réduits, NADH,H^+ et FADH_2 , vers l'oxygène. Ces réactions sont couplées à un déplacement des protons H^+ de la matrice vers l'espace inter membranaire pour former un gradient électrochimique.

Le complexe I ou NADH-coenzyme Q-oxydoréductase est une enzyme constituée d'une flavine mononucléotide (FMN) et de 6 centres fer-soufre. Le complexe I catalyse l'oxydation du NADH,H^+ en NAD^+ via la FMN. Il transfère les électrons du NADH,H^+ sous forme d'ions hydrures H^- au CoQ, le réduisant en CoQH_2 .



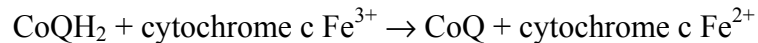
Cette réaction d'oxydoréduction libère de l'énergie qui sert à déplacer les protons H^+ libérés de la matrice vers l'espace inter membranaire (5).

Le complexe II ou succinate-coenzyme Q-oxydoréductase est constitué d'une FAD et de 3 centres fer-soufre. Il contient l'enzyme succinate déshydrogénase du cycle de Krebs qui catalyse, en présence de FADH_2 , l'oxydation du succinate en fumarate. Le complexe II fait donc partie à la fois du cycle de Krebs et de la chaîne mitochondriale. Les électrons libérés sont transférés par les centres fer-soufre, au CoQ de la membrane interne entraînant sa réduction en CoQH_2 .



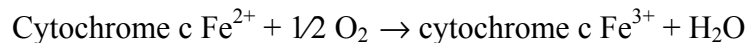
Cette réaction d'oxydoréduction ne libère pas suffisamment d'énergie pour le pompage de protons. Cependant, le complexe II reste indispensable à la chaîne respiratoire puisqu'il est le seul accepteur d'électrons du FADH_2 issu du cycle de Krebs (5).

Le complexe III ou coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase contient les cytochromes b et c1 ainsi qu'un centre fer-soufre. L'enzyme ubiquinol-cytochrome c-oxydoréductase du complexe catalyse l'oxydation du CoQH₂ et transfère les électrons, un par un, au cytochrome c ferrique Fe³⁺ le réduisant en cytochrome c ferreux Fe²⁺ selon la réaction suivante :



Cette réaction libère suffisamment d'énergie pour permettre le transfert de protons H⁺ de la matrice vers l'espace inter membranaire (5).

Le complexe IV ou cytochrome c oxydase (COX) est constitué, entre autres, de deux atomes de cuivre et deux atomes de fer. La COX catalyse l'oxydation du cytochrome c ferreux Fe²⁺ et les électrons libérés serviront à réduire une molécule d'oxygène pour former, dans la matrice, une molécule d'eau. La réaction d'oxydoréduction libère suffisamment d'énergie pour le pompage de protons H⁺ vers l'espace inter membranaire (5).



I.1.2.2- La phosphorylation oxydative

La synthèse d'ATP est catalysée par le complexe V ou ATP synthétase. C'est une enzyme transmembranaire constituée de deux sous-unités : la sous-unité F₀ qui permet le retour des ions H⁺ dans la matrice et la sous-unité F₁ qui contient le site catalytique. Le pompage de protons de la matrice vers l'espace inter membranaire crée un gradient électrochimique de protons enfermant l'énergie issue de l'oxydation des coenzymes : c'est la force proton-motrice. Lors du retour des ions H⁺ dans la matrice mitochondriale, le flux des protons libère une énergie chimique que l'ATP synthétase utilise pour la phosphorylation de l'ADP en ATP (5).

I.2- Dysfonction mitochondriale : Cause des maladies mitochondriales

I.2.1- Mutations génétiques

Les maladies mitochondriales peuvent être causées par des mutations au niveau de l'ADNmt ou au niveau de l'ADNn. Toutefois, la majorité de ces maladies sont dues à des mutations du génome nucléaire, ce dernier codant pour la plupart des protéines mitochondriales. Les mutations affectent en majorité les gènes qui codent pour les composantes structurales ou pour les facteurs d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. Les autres mutations vont notamment affecter les protéines impliquées dans le maintien de l'ADNmt et la synthèse ou l'importation des protéines mitochondriales. Toutes ces mutations conduisent à des défauts de la chaîne respiratoire, principalement des déficiences en un ou plusieurs des complexes de la chaîne (7,8).

I.2.1.1- Déficience en complexe I

Le complexe I est constitué de 45 sous-unités codées à la fois par l'ADNmt et l'ADNn (9). Les maladies mitochondriales les plus fréquentes sont associées à une déficience isolée du complexe I et elles affectent aussi bien les enfants que les adultes. D'origine mitochondriale ou nucléaire, les mutations responsables de la déficience en complexe I affectent les gènes codant pour les composants structurels ou les facteurs d'assemblage des sous-unités du complexe. Les anomalies génétiques touchent soit l'assemblage du complexe en empêchant l'insertion des sous-unités dans le complexe, soit l'assemblage se fait correctement mais l'activité enzymatique est déficiente (10). Les phénotypes cliniques associés à ces maladies sont variés. Classiquement, on retrouve le syndrome de Leigh (encéphalomyopathie) et la neuropathie optique héréditaire de Leber associés entre autres aux mutations dans le gène d'assemblage *NDUFAF1* (NADH Dehydrogenase (ubiquinone) 1 Alpha Subcomplex, Assembly Factor 1) et le gène de structure *ND4* (NADH déshydrogénase 4), respectivement (11,12).

1.2.1.2- Déficience en complexe II

Le complexe II est constitué de 4 sous-unités protéiques, appelées succinate déshydrogénase (SDH) A à D, qui sont entièrement codées par le génome nucléaire. Les anomalies à l'origine d'un déficit du complexe II sont donc d'origine nucléaire uniquement. Les mutations dans le gène codant pour la sous-unité *SDH-A* causent le syndrome de Leigh alors que les mutations qui affectent les sous-unités *SDH-B*, *SDH-C* et *SDH-D* prédisposent aux cancers (13, 14, 15, 16). Le complexe II appartient à la fois à la chaîne respiratoire et au cycle de Krebs. Par conséquent une anomalie au niveau de celui-ci entraîne des altérations dans les deux voies.

1.2.1.3- Déficience en complexe III

Le complexe III est constitué de 11 sous-unités mais une seule est codée par l'ADNmt (17). Les maladies caractérisées par une déficience en complexe III sont rares. Les mutations responsables peuvent être d'origine mitochondriale ou nucléaire. Elles ont été identifiées dans deux gènes de structure soit le *CYTB* (cytochrome b) et l'*UQCRB* (Ubiquinol-Cytochrome c Reductase Binding Protein) et un gène d'assemblage, le *BCSIL* (Ubiquinol-Cytochrome c Reductase Synthesis-Like). Les mutations dans les gènes structuraux ont été associées à l'encéphalopathie mitochondriale, l'encéphalomyopathie mitochondriale, la cardiomyopathie, la dysplasie septo-optique, et le trouble multisystémique. Les mutations dans le facteur d'assemblage *BCSIL* sont associées à une plus grande variété phénotypique soit : un retard de croissance, une aminoacidurie, une cholestase, une surcharge en fer, une acidose lactique et une mort précoce, une perte auditive neurosensorielle et une perte de cheveux (18).

1.2.1.4- Déficience en complexe IV

Le complexe IV ou COX est composé de 13 sous-unités. Trois de ces sous-unités (COX1, COX2 et COX3) forment la partie catalytique du complexe et sont codées par l'ADNmt alors que les 10 autres sous-unités (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C et COX8) sont codées par l'ADNn. Ces dernières participent à la stabilité ainsi qu'à la régulation du complexe (8).

Les maladies mitochondriales associées à la déficience en COX sont parmi les plus fréquentes. Les mutations génétiques qui en sont responsables sont très hétérogènes et sont associées à des manifestations cliniques variées. Quelques mutations ont été identifiées dans les gènes mitochondriaux (*COX1*, *COX2* et *COX3*). Les autres mutations ont été décrites dans 5 gènes nucléaires (*SURF1*-Surfeit Gene 1-, *SCO*-Cytochrome c Oxidase Assembly Protein-1 et 2, *COX10*, et *COX15*) codant pour des facteurs d'assemblage du complexe IV. Les mutations dans les gènes *COX1-3* ont été associées à la myopathie et au syndrome d'encéphalopathie mitochondriale avec acidose lactique et des pseudo-accidents vasculaires cérébraux (MELAS). Plus de 40 mutations dans le gène *SURF1* ont été associées au syndrome de Leigh. Les mutations dans *SCO1* et *SCO2* causent respectivement une hépatopathie néonatale et un coma acidocétosique et une cardiomyopathie infantile. Les mutations dans *COX10* et *COX15* peuvent entraîner le syndrome de Leigh et une cardiomyopathie hypertrophique infantile mortelle (8). D'autres mutations dans le gène *LRPPRC* (Leucine-Rich PPR-motif Containing Protein) ont été associées à la déficience en COX et entraîne le syndrome de Leigh de type canadien français, sujet principal de cette étude. Ce gène sera discuté en détail dans la section II.

1.2.1.5- Déficience en complexe V

Le complexe V est constitué de 16 sous-unités. Deux des sous-unités du module F_0 sont codées par les gènes mitochondriaux *ATP6* et *ATP8* (ATP synthétase 6 et 8) alors que les autres sous-unités sont codées par l'ADNn. Les mutations au niveau du gène *ATP6* sont les plus fréquentes. Elles causent des défauts d'assemblage du complexe et de plus, elles diminueraient l'activité catalytique. Elles ont été observées dans le syndrome de Leigh et le syndrome de neuropathie, d'ataxie, et de rétinite pigmentaire (NARP). Une mutation au niveau du gène *ATP8* a été associée à une diminution de l'activité et de l'assemblage du complexe (19). La formation du module F_1 nécessite deux facteurs d'assemblage (*ATP11* et *ATP12*) qui sont codés par le génome nucléaire. Une mutation au niveau du gène *ATP12* cause une diminution drastique de la formation du complexe V, entraînant une acidose lactique sévère, une cardiomyopathie hypertrophique et une acidurie méthylglutaconique (20,21).

I.2.2- Altérations métaboliques

La mitochondrie est un organite multifonctionnel jouant un rôle primordial dans la cellule. La dysfonction de celle-ci engendre plusieurs anomalies métaboliques liées, en particulier, à la production énergétique, à l'apoptose ainsi qu'à la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) (7). Les dysfonctions mitochondriales sont d'ailleurs souvent associées à des maladies métaboliques telles que le cancer, l'insuffisance cardiaque, le diabète, l'obésité, l'athérosclérose et les maladies du foie (22, 23).

I.2.2.1- Production d'ATP

Une déficience en un ou plusieurs des complexes de la chaîne respiratoire entraîne une perte d'activité de cette dernière et par conséquent une diminution de la production d'énergie sous forme d'ATP (7). L'ATP est une source énergétique majeure pour l'organisme grâce à ses liaisons phosphodiester riches en énergie (5). Il participe aussi à la régulation de l'activité de certaines protéines par phosphorylation ou en tant qu'effecteur allostérique. Il intervient ainsi dans plusieurs processus physiologiques tels que la contraction musculaire, le transport des molécules et des ions; la biosynthèse des protéines, des ARN et des nucléosides triphosphates, et dans les réactions métaboliques comme l'oxydation des acides gras (5). Une déficience dans la production d'ATP entraîne un ralentissement, voire un dysfonctionnement, de tous ces processus biologiques. Toutefois, il existe des mécanismes compensatoires physiologiques permettant plusieurs réajustements métaboliques afin de rétablir l'homéostasie énergétique comme l'augmentation de la production d'énergie par la glycolyse (24). D'autres mécanismes existent, par exemple, dans certaines maladies liées à un déficit du complexe I où une augmentation compensatoire de l'activité du complexe IV est observée (25).

Une des conséquences des maladies mitochondriales est l'accumulation de lactate (Tableau I, p. 17). Une déficience sévère de la chaîne respiratoire entraîne des changements de l'état d'oxydoréduction notamment en diminuant l'oxydation du pyruvate ce qui entraîne une augmentation de sa conversion en lactate et une accumulation de ce dernier dans le sang. Le lactate est recyclé principalement dans le foie où il sert de substrat à la néoglucogénèse. Dans les maladies mitochondriales, ces mécanismes sont souvent défectueux. De plus, les

cellules deviennent trop dépendantes de la glycolyse ce qui favorise une synthèse plus importante du pyruvate et sa conversion en lactate. Ces situations peuvent provoquer une acidose lactique toxique pour les cellules (26).

Tableau I. Les niveaux de lactate en fonction du type de déficience et des gènes mutés

Déficience	Complexe I	Complexe II	Complexe III	Complexe IV	Complexe V
[lactate] normale <2, mM	Mutations nucléaires et mitochondriales	<i>SDHC</i> <i>SDHD</i>	<i>Cytb</i>	<i>LRPPRC</i>	<i>ATP6</i>
[lactate] modérée 2-5 mM	<i>ND5</i> <i>ND6</i>	<i>SDHA</i>	<i>MTCYTB</i> <i>UQCRB</i>	<i>LRPPRC</i> <i>COX10</i> <i>COX15</i> <i>COXI</i> <i>COXII</i> <i>SURF1</i>	<i>ATP6</i> <i>ATP12</i>
[lactate] sévère > 5 mM	<i>ND3</i> <i>ND5</i>		<i>BCSI</i>		

Tableau adapté de Robinson B.H., *Mol Genet Metab*, 89, 3-13, 2006. *ND* : NADH déshydrogénase, *SDH* : succinate déshydrogénase, *Cyt b* : cytochrome b, *MTCYTB* : cytochrome b mitochondrial, *UQCRB* : gène codant pour la protéine ubiquinol-cytochrome c réductase qui lie l'ubiquinone, *BCSI* : gène codant une protéine indispensable à la synthèse du complexe ubiquinol-cytochrome c réductase, *LRPPRC* : leucine-rich PPR-motif containing protein, *COX* : cytochrome c oxydase, *SURF1* : surfeit gene 1, *ATP* : ATP synthétase.

1.2.2.2- Stress oxydatif

La mitochondrie est une source importante de ROS. Les électrons des complexes I et III principalement interagissent avec le dioxygène (O₂) pour générer l'anion superoxyde (O₂⁻) (27). Lors du transport d'électrons, seul 2% des électrons libérés participent à la production physiologique d'O₂⁻. Dans un état d'homéostasie énergétique, ces derniers jouent un rôle dans la signalisation cellulaire. Il a été démontré qu'en général, un blocage de la chaîne respiratoire, notamment au niveau de COX, provoque une accumulation d'électrons libres et

de molécules d'O₂, favorisant la formation d'O₂^{•-} (27). L'O₂^{•-} n'est pas un radical très nocif, mais il est très réactif. Deux molécules d'O₂^{•-} engendrent spontanément le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) capable de générer un radical très toxique l'hydroxyle (HO[•]). En présence du monoxyde d'azote (NO), l'O₂^{•-} peut aussi former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻) qui lui aussi est très toxique (27, 28, 29). Ces radicaux libres attaquent et détruisent les macromolécules de la cellule comme l'ADN, les lipides et les protéines. Ils causent des dommages à la chaîne respiratoire, induisent l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP), et activent la voie des caspases. Ces dommages peuvent conduire, in fine, à la mort cellulaire (27, 28, 29, 30, 31).

I.2.2.3- Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire physiologique programmée sous contrôle génétique. C'est un mécanisme d'autodestruction cellulaire en équilibre avec la prolifération cellulaire. L'apoptose joue un rôle primordial dans la croissance, le développement, la différenciation et l'élimination des cellules anormales. Elle se caractérise par la condensation nucléaire et cytoplasmique, le bourgeonnement et la fragmentation de la membrane et enfin la formation de corps apoptotiques. Ces derniers sont reconnus, ingérés et dégradés par les phagocytes. Un déficit de l'apoptose est associé au cancer alors qu'un excès d'apoptose peut causer des maladies neurodégénératives ou auto-immunes. Un dérèglement de l'apoptose est néfaste pour l'organisme (32).

La mitochondrie joue un rôle important dans le processus d'apoptose (33). Et pour cause, l'espace inter membranaire mitochondriale dispose de plusieurs molécules qui jouent un rôle clé dans ce processus. En réponse à des niveaux faibles d'ATP, les protéines pro-apoptotiques membres de la famille Bcl2 favorisent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), ce qui libère les molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c dans le cytosol. Ce dernier forme un complexe macromoléculaire avec le facteur activateur des protéases apoptotiques 1 (Apaf1) qui active la cascade des caspases pro-apoptotiques. Le relargage du contenu de l'espace inter membranaire fait varier le potentiel de

la membrane et ouvre le PTP. L'ouverture de ce dernier entraîne le gonflement de la mitochondrie qui éclate libérant tous les composants pro-apoptotiques et conduisant à la mort cellulaire (33,34).

II- Le syndrome de Leigh, de type canadien français (LSFC)

II.1- Caractéristiques : syndrome de Leigh classique vs LSFC

II.1.1- Syndrome de Leigh classique

Le syndrome de Leigh classique, aussi connu sous le nom d'encéphalomyopathie nécrosante subaigüe, est une maladie mitochondriale neurodégénérative à caractère récessif qui touche particulièrement les enfants de moins d'un an, et plus rarement les adolescents et les jeunes adultes. Sa prévalence est de 1 naissance sur 40000. Il est communément caractérisé par des lésions cérébrales d'une grande hétérogénéité clinique et génétique (35, 36, 37, 38).

Les mutations à l'origine de ce syndrome affectent les gènes codant pour les facteurs d'assemblage ou les composantes des sous-unités des complexes I, II, IV et V et conduisent à une diminution de l'activité de un ou plusieurs complexes de la chaîne respiratoire (38). Dans certains cas, les mutations au niveau du CoQ et du complexe de la pyruvate déshydrogénase résultent en une déficience de ces derniers (38). La maladie est aussi caractérisée par une acidose lactique pouvant entraîner chez les patients une congestion vasculaire responsable d'une hypoxémie et d'une nécrose (39). Les régions sous corticales (ganglions de bases, tronc cérébral, thalamus) sont les plus touchées car celles-ci sont les plus sensibles à l'acidose lactique (39).

Les symptômes cliniques apparaissent principalement à partir de un mois après la naissance et sont très hétérogènes. La majorité des patients présentent des anomalies du système nerveux, principalement le système nerveux central. Il s'agit, entre autres, d'un retard psychomoteur, d'une ophtalmoparésie, d'une atrophie optique, d'une ataxie, une dysphagie

entraînant des difficultés d'alimentation, une paralysie des nerfs crâniens, une faiblesse générale, une hypotonie, une dystonie, ou encore une insuffisance respiratoire. Certains patients présentent aussi des anomalies non neurologiques comme une dysmorphie, des anomalies endocriniennes (petite taille), des anomalies cardiaques (cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée), ou des problèmes gastro-entérologiques (diarrhée) (39).

À ce jour, il n'existe aucun traitement pour le syndrome de Leigh. Les patients meurent majoritairement avant l'âge de 5 ans à cause d'une insuffisance respiratoire aigüe. Néanmoins, quelques agents thérapeutiques comme la thiamine, la L-carnitine et le CoQ semblent avoir un effet bénéfique sur les symptômes pour certains patients (40, 41, 42).

II.1.2- Syndrome de Leigh de type canadien français

La variante canadienne française du syndrome de Leigh a été observée pour la première fois en 1980 par le pédiatre Jean Laroche à Chicoutimi auprès d'enfants qui présentaient une hypotonie accompagnée de crises d'acidose métabolique sévères. Alors que le syndrome de Leigh classique est observé dans le monde entier, cette variante est principalement localisée au Québec avec une fréquence plus élevée au Saguenay-Lac-Saint-Jean et à Charlevoix. Dans ces régions, une personne sur 23 est porteuse de la mutation responsable de la maladie et l'on dénombre une naissance sur 2063 atteinte du LSFC. Contrairement à ce que l'on peut penser, la fréquence élevée de cette maladie n'est pas due à une forte consanguinité. Il s'agirait plutôt d'un «effet fondateur» où quelques individus porteurs de la mutation ont contribué de façon importante à l'établissement de celui-ci, en raison des familles nombreuses et de l'isolation relative de la région (43).

La principale caractéristique du LSFC consiste en une déficience *tissu-spécifique* de COX, alors que dans le syndrome de Leigh classique la déficience touche tous les tissus. Cependant, comme dans le syndrome de Leigh classique, les manifestations cliniques sont très hétérogènes et leurs sévérités varient d'un patient à un autre (43).

Les premiers signes cliniques de la maladie se manifestent au cours de la période néonatale. À la naissance, la majorité des enfants atteints présentent une hypotonie. Cette

dernière s'accompagne, dans certains cas, de problèmes de succion, d'une tachypnée transitoire et de trémulations. En outre, certains enfants présentent une hypoglycémie ou encore des taux sanguins d'acide lactique élevés. Vers l'âge d'un an, de nombreux enfants manifestent un retard de développement. En l'occurrence, ils s'assoient, marchent et parlent plus tard. Ils présentent aussi des caractéristiques cranio-faciales distinctes comme un front proéminent, une hypoplasie médio-faciale, une ligne médiane large, un léger hirsutisme, une forme caractéristique en arc des sourcils, et enfin une faiblesse et un manque d'expression faciale. Certains patients plus âgés ont une ataxie tronculaire et présentent ainsi des problèmes de marche (43, 44).

Il a été observé, chez les patients LSFC, la survenue de crises aiguës de décompensation. Il s'agit soit de crises d'acidose métabolique sévère aiguë, soit des crises neurologiques sans acidose sévère, soit des pseudo-épisodes vasculaires cérébraux. D'après une enquête faite auprès des parents, ces crises apparaissent le plus souvent suite à une maladie infectieuse incluant des infections respiratoires et des infections gastro-intestinales. D'autres surviennent lors d'un effort physique, d'un jeûne prolongé ou d'un stress psychologique intense. Les mécanismes impliqués dans le déclenchement de ces crises restent encore inconnus. Elles se produisent en général avant l'âge de 4 ans et sont fatales dans 82% des cas (43, 44).

Les crises métaboliques sont caractérisées par une respiration de Kussmaul, une perfusion insuffisante de la peau, une déshydratation, et enfin une acidose lactique associée à une hyperglycémie. Au cours de ces crises, le pH et le bicarbonate sanguins sont bas et la pression partielle du gaz carbonique ($p\text{CO}_2$) est élevée (Tableau II, p. 22). Ces crises métaboliques débutent par une acidose et progressent rapidement vers le coma puis la mort qui peut survenir en moins d'une journée. Au cours de cette période, le patient entre dans une phase de défaillance multiviscérale. À ce jour, il n'existe aucun traitement ou intervention médicale pouvant améliorer l'état du patient. Très rarement, certains patients survivent à la crise et affichent une amélioration de leur état métabolique avec des taux de lactate plasmatique proche de la normale. En général, ces patients développent, dans les jours suivants, une crise secondaire mixte i.e. métabolique/neurologique souvent mortelle (43, 44).

**Tableau II. Paramètres biochimiques des patients LSFC :
état basal vs état de crise métabolique**

	État basal	État de crise
Lactate	0.8-2.2 mM	12-26 mM
Bicarbonate	22.0-26.0 mM	3.5-11.8 mM
Glucose	4.5-6.5 mM	>10 mM
pH	7.4	7.0

Informations tirées de Morin C. et al, *Am J Hum Genet*, 53, 488-496, 1993; et de Debray et al, *J Med Genet*, 48, 183-189, 2011.

Les crises neurologiques sont caractérisées par une détérioration neurologique aigüe ou subaigüe sans acidose sévère. Les patients présentent des convulsions, puis entrent dans une phase de détérioration neurologique, passent sous assistance respiratoire et décèdent dans un état végétatif. Ces crises mènent à la mort dans un délai de 34 jours en moyenne (6-66 jours). Lors des pseudo-épisodes vasculaires cérébraux, les patients présentent plusieurs signes d'atteinte neurologique comme des convulsions, une hémiparésie, une ophtalmoplégie, des myoclonies, une faiblesse, et une léthargie. La majorité des patients survivent à ces épisodes et se rétablissent en quelques semaines (44).

Les crises métaboliques aigües sont la principale cause de mortalité du LSFC. Les patients qui n'ont jamais eu de crise survivent à la maladie. Sur les 56 patients dénombrés à ce jour, 45 ont déjà développé une ou plusieurs crises et près de 50% sont décédés dès la première. La majorité des survivants sont morts lors de crises subséquentes. Seulement 5 patients ont survécu aux crises et un seul patient a survécu à plus de 4 crises. Les crises métaboliques aigües sont les plus fréquentes et elles n'ont jamais été observées après l'âge de 7 ans (44).

Tableau III. Comparaison entre le syndrome de Leigh classique et le syndrome de Leigh de type canadien français

Syndrome de Leigh classique attribué à la déficience en COX	Syndrome de Leigh, version Canadienne Française
<i>Mutation/gène</i> COX15 SURF1	<i>Mutation/ gène</i> LRPPRC
<i>Activité de COX</i> -<25% dans tous les tissus	<i>Activité de COX</i> -normale dans le cœur et les reins -50% muscles et fibroblastes -10-20 % foie et cerveau
<i>Phénotype</i> Retard psychomoteur, ophtalmoparésie, atrophie optique, ataxie, une dysphagie entraînant des difficultés d'alimentation, paralysie des nerfs crâniens, faiblesse générale, une hypotonie, dystonie, insuffisance respiratoire.	<i>Phénotype</i> Retard de développement, une hypotonie, une dysmorphie faciale et une acidose métabolique chronique compensée
<i>Pronostic</i> Décès en bas âge souvent avant 5 ans suite à une insuffisance respiratoire aigue	<i>Pronostic</i> Décès en bas âge souvent avant 5 ans suite à des crises d'acidose lactique sévères

II.2- Pathogénie du LSFC

Il existe très peu d'informations sur la pathogénie de cette maladie. En 2003, on a découvert le gène associé à la maladie et son mode de transmission. Le LSFC est une maladie autosomique récessive résultant de mutations dans le gène *lrpprc* (45, 46). Ces mutations provoquent une diminution générale de l'expression de la protéine LRPPRC et une déficience tissu-spécifique du complexe IV. Cependant, les mécanismes sous-jacents à la physiopathologie restent encore largement inconnus.

II.2.1- Mutations du gène *lrpprc*

II.2.1.1- La protéine LRPPRC

Le gène *lrpprc* est localisé sur le chromosome 2 et est transcrit en deux ARNm mineurs et un ARNm majeur qui code pour la protéine LRPPRC. La protéine LRPPRC ou LRP130 a un poids moléculaire de 130 Kilo daltons et comporte une séquence de ciblage mitochondriale (47). Elle est localisée majoritairement dans les mitochondries, mais on la retrouve aussi dans le noyau et le cytoplasme. C'est une protéine riche en leucine qui fait partie de la famille protéique des pentatricopeptides. Cette famille est caractérisée par la

présence d'un motif répété de pentatricopeptide (PPR) de 35 acides aminés, répété en tandem et formant une structure hélicoïdale. La protéine LRPPRC est constituée de 11 motifs PPR (48).

LRPPRC est une protéine complexe, multifonctionnelle et dont les mécanismes d'action restent encore incompris. La présence de motifs PPR suggère qu'elle serait impliquée dans le processus de transcription, d'épissage, d'excision et d'édition des ARNm mitochondriaux (48). Selon l'étude de Xu *et coll.*, LRPPRC a la capacité de fixer les ARNm nucléaires (49). Cette protéine jouerait aussi un rôle dans la stabilité et la maturation des ARNm mitochondriaux. Elle est aussi impliquée dans la traduction des protéines autant mitochondriales que nucléaires. Plusieurs études ont démontré que LRPPRC prend part à plusieurs complexes protéiques lui conférant différents rôles dans l'organisation du cytosquelette, le transport vésiculaire, le métabolisme mitochondrial, le remodelage des chromosomes et l'apoptose (48, 49, 50, 51, 52). Dans le noyau, LRPPRC participe au métabolisme des ARNm en s'associant au complexe ribonucléoprotéique nucléaire (mRNP) qui lie et transporte les ARNm du noyau vers le cytosol (53). LRPPRC peut aussi se lier au facteur d'initiation de la traduction, eIF4E, qui contrôle l'exportation d'ARNm spécifiques du noyau vers le cytoplasme (54). LRPPRC forme aussi un complexe avec le co-activateur transcriptionnel 1α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes (PGC- 1α). La formation du complexe LRPPRC/PGC- 1α est indispensable pour la conversion du lactate en glucose dans le foie via la néoglucogenèse (55). Dans la mitochondrie, LRPPRC est impliqué dans la régulation de l'expression de l'ADNmt en interagissant avec la protéine SLIRP (Stem-Loop Interacting RNA Binding Protein) qui joue un rôle dans l'homéostasie des ARNm mitochondriaux (56, 57).

Chaque fonction de LRPPRC fait intervenir de manière spécifique un des domaines de la protéine. Une étude sur la structure de cette dernière révèle que la partie N-terminal de LRPPRC contient des séquences répétées riches en leucine LXXLXL qui sont importantes pour le transport nucléaire et la fonction des facteurs de transcription comme PGC- 1α (48). Le domaine C-terminal de LRPPRC contient des motifs de liaison des ARNm nucléaires et mitochondriaux et joue un rôle dans l'expression des gènes (53). LRPPRC contient aussi deux domaines d'homologie : le domaine ENTH (Epsin N-Terminal Homology) qui joue un rôle

dans l'endocytose et l'organisation du cytosquelette et le domaine SEC1 (Secretary 1) qui joue un rôle dans le transport vésiculaire tel que la transmission synaptique, l'exocytose et la sécrétion (48).

II.2.1.2- Mutations à l'origine du LSFC

À ce jour, deux mutations causales ont été identifiées dans le gène *lrpprc*. La première est une mutation faux-sens due au remplacement d'un nucléotide (C119→T) dans l'exon 9 du gène. Cela entraîne la substitution d'une alanine par une valine en position 354 de la protéine codée (A354V). Quatre-vingts quinze pour cent des patients sont homozygotes pour cette mutation. La deuxième mutation consiste en une délétion de 8 nucléotides au niveau de l'exon 35 entraînant la formation d'un codon stop à la position 1277 (C1277STOP). Cette deuxième mutation n'a été observée que chez un seul patient, un hétérozygote composé, qui possède les deux mutations A354V et C1277STOP (46).

La mutation A354V résulte en une déficience de la protéine LRPPRC. Dans les fibroblastes et le foie des patients, les niveaux de la protéine représentent moins de 30 % des niveaux normaux. Le mécanisme par lequel la mutation entraîne ce déficit reste encore inconnu et plusieurs hypothèses ont été émises, notamment la possibilité que la mutation rende la protéine instable favorisant sa dégradation rapide (57, 49). La diminution de la quantité de LRPPRC s'accompagne d'une diminution des ARNm mitochondriaux, et de certaines protéines mitochondriales et nucléaires. Cependant, l'effet de la mutation semble être plus sévère et sélective pour les sous-unités de COX (57). De plus, la diminution des niveaux de LRPPRC avec des siRNA (Small Interfering RNA), *in vitro*, suggère que la sévérité de l'atteinte de la chaîne respiratoire varie en fonction des niveaux de LRPPRC. Donc une diminution plus importante des niveaux de LRPPRC entraîne une diminution des autres complexes de la chaîne respiratoire en plus de COX (57). Le fait d'observer tous ces changements simplement en réponse à la diminution des niveaux de LRPPRC, suggère que la protéine dispose d'une fonction résiduelle. Par contre, de manière intéressante, la mutation n'a pas les mêmes effets sur tous les tissus et notamment le cœur ne semble pas être affecté suite à la mutation.

II.2.2- La déficience en COX

La déficience en COX est la principale caractéristique du LSFC. Elle est la conséquence du défaut d'assemblage de ce complexe en raison de la diminution des ARNm et des protéines des sous-unités COXI, COXII, COXIII, de même que celle de la sous-unité COXIV dans certains cas. Ces sous-unités sont indispensables à l'activité catalytique (COXI-III) et à la stabilité (COXIV) de COX (57). Il en résulte que l'activité de COX est fortement perturbée chez les patients LSFC. Elle est seulement à 50% de l'activité normale dans les muscles squelettiques et les fibroblastes, et à moins de 20% dans le cerveau et le foie. Par contre, l'activité de COX est presque normale dans le cœur et les reins (58). La raison de cette atteinte tissu-spécifique n'a pas encore été élucidée. Il est peu probable que la diminution de l'activité soit reliée à la demande énergétique puisqu'un organe comme le cœur n'est quasiment pas touché. Un mécanisme compensatoire est probablement, en partie, à l'origine de cette différence.

Les défauts dans la chaîne respiratoire mitochondriale tel que la déficience en COX conduisent à de nombreuses altérations métaboliques. De manière intéressante, les fibroblastes de patients LSFC démontrent un ratio lactate/pyruvate à peine augmenté voire normal (58) et des niveaux d'ATP comparables voire supérieurs aux niveaux retrouvés dans les cellules des témoins (59). Cela vient supporter l'idée de l'existence d'un mécanisme compensatoire chez les patients LSFC. Cependant, on observe une importante dysfonction mitochondriale caractérisée par une diminution de la capacité de rétention calcique, du potentiel de membrane et de la respiration (60). De plus, les cellules de patients témoignent d'une plus grande susceptibilité à un stress nutritionnel par rapport aux cellules témoins. On considère comme stress toute situation susceptible de modifier l'homéostasie. Il peut s'agir d'un stimulus externe (température, excès de nutriments, hypoxie, etc.) ou d'un stimulus interne (diminution de la glycémie et du pH, etc.) qui conduit à un déséquilibre de l'environnement intérieur. Lorsque les cellules de patients LSFC sont soumises à un stress chronique de type nutritionnel, incluant des concentrations élevées de palmitate et de lactate, les niveaux d'ATP diminuent et le ratio lactate/pyruvate augmente conduisant à une mort cellulaire importante prématurément par rapport aux cellules témoins (59).

II.3- Récapitulatif et mécanismes potentiels de compensation

Le LSFC est dû à des mutations dans le gène *lrpprc* ce qui conduit à une déficience de COX et une dysfonction mitochondriale incluant probablement une diminution de la capacité de production d'ATP par phosphorylation oxydative. Cela entraîne des adaptations du métabolisme énergétique dans le but de maintenir la production d'ATP. L'organisme dispose de nombreux mécanismes de régulation pour le maintien de l'homéostasie énergétique. Parmi ceux-ci l'AMPK, est considéré comme une enzyme clé de la régulation du métabolisme énergétique. L'activation de cette enzyme a été observée dans plusieurs modèles de dysfonction mitochondriale. Ainsi, l'équipe de Fisher a récemment rapporté une hyperactivité de l'AMPK dans un modèle *dictyostelium* (61). Germain et coll. ont démontré que l'augmentation de la glycolyse et de la biogenèse mitochondriale en réponse à une dysfonction mitochondriale dans un modèle neurodégénératif est dépendante de LKB1, le principal activateur de l'AMPK (62). En accord avec ces deux études, Hsu et coll. ont démontré que la dysfonction mitochondriale active l'AMPK dans les cellules d'hépatomes (63). En outre, l'activation de la voie AMPK/ PGC-1 α a été récemment associée à une correction de la déficience en COX dans certaines maladies mitochondriales (64). Considérant le rôle important que joue cette enzyme dans la régulation du métabolisme énergétique, il nous semblait pertinent de caractériser cette voie dans les cellules de patients LSFC pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie. La régulation de l'activité et les rôles de cette protéine dans l'organisme sont discutés dans la section ci-après.

III- La protéine kinase activée par AMP : AMP kinase ou AMPK

III.1- Généralités

L'AMPK est une sérine/thréonine protéine kinase ubiquitaire, hautement conservée chez les eucaryotes. Elle est membre d'une famille constituée de 13 kinases dites kinases apparentées à l'AMPK (AMPK-related kinases). Elle a été caractérisée pour la première fois en 1973 comme une protéine kinase dépendante de l'AMP capable d'inhiber la synthèse du cholestérol en phosphorylant et en inhibant la protéine 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoR). À cette époque, la protéine était simplement appelée HMG-CoR kinase (65). En 1980, on découvre une autre cible de l'AMPK, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), une enzyme impliquée dans l'oxydation des acides gras (66). En 1989, Carling et coll. découvrent que la phosphorylation de la HMG-CoR et de l'ACC est contrôlée par la même protéine. Elle est ainsi appelée « *protéine kinase dépendante de l'AMP* », ou *AMPK* (67). À partir de 1994, plusieurs études sur ses différents rôles vont permettre de définir l'AMPK comme un senseur métabolique incontournable pour l'organisme. Comme son nom l'indique, l'AMPK est une protéine extrêmement sensible aux variations de la concentration intracellulaire de nucléotides, notamment de l'AMP. Cette enzyme est activée en réponse à une diminution, même faible, de la production d'ATP ce qui conduit à une augmentation des niveaux d'AMP ou d'ADP. L'activation de l'AMPK permet de rétablir l'homéostasie énergétique en jouant sur la croissance, la différenciation et le métabolisme (68, 69, 70).

III.2- Structure et régulation de l'AMPK

III.2.1- Structure de l'AMPK

L'AMPK est un hétéromère composé de trois sous-unités (α , β , γ) présentes en plusieurs isoformes codées par des gènes différents. Plus de 12 combinaisons hétérotrimériques $\alpha\beta\gamma$ de l'AMPK existent dans l'organisme humain. L'expression des différentes sous-unités et la formation des hétérotrimères sont tissus spécifiques et permettent

à l'AMPK de jouer des rôles différents dépendamment des isoformes présents dans l'hétérotrimère (71).

La sous-unité α constitue la sous-unité catalytique de la protéine. Elle comporte un domaine kinase N-terminal qui est activé lorsque la thréonine 172 (Thr172) est phosphorylée, un domaine d'auto-inhibition actif uniquement en absence d'AMP, ainsi qu'un domaine C-terminal d'interaction avec les sous-unités β et γ . La sous-unité α existe sous 2 isoformes α_1 et α_2 codées par les gènes *PRKAA1* et *PRKAA2*, respectivement. Les hétérotrimères contenant l'isoforme α_1 sont exclusivement cytoplasmiques alors que ceux contenant l'isoforme α_2 ont une localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire. La localisation nucléaire de l'AMPK α_2 permet la régulation de l'expression de certains gènes, en particulier ceux associés à la biogenèse mitochondriale (69, 70, 71, 72).

Les sous-unités β et γ forment les sous-unités régulatrices de l'AMPK. La sous-unité β est représentée par deux isoformes β_1 et β_2 codées par les gènes *PRKAB1* et *PRKAB2*, respectivement. Elle contient deux domaines : un domaine central appelé CBM (Carbohydrate-Binding Module) capable de lier les glucides tel que le glycogène et dont le rôle reste encore inconnu, et un domaine C-terminal responsable de l'interaction avec les sous-unités α et γ . La sous-unité γ existe en 3 isoformes (γ_1 , γ_2 , et γ_3) codées, de manière respective, par les gènes *PRKAG1*, *PRKAG2*, et *PRKAG3*. Elle contient un domaine constitué de 4 motifs CBS (Cystathionine- β -Synthase) répétés en tandem par paires (S1, S2, S3 et S4). Une paire de séquence CBS forme ce qu'on appelle le domaine Bateman. Il existe, au niveau de chaque motif CBS, un site de liaison hydrophobe capable de lier l'adénosine de l'AMP, de l'ADP ou de l'ATP. Sur ces quatre sites de liaison potentiels, seuls trois sites CBS (S1, S3 et S4) sont occupés par les nucléotides. Les sites S1 et S3 lient l'AMP, l'ADP et l'ATP de façon compétitive, alors que le site S4 semble lier l'AMP très étroitement en l'absence de toute compétition avec l'ADP ou l'ATP (Figure 9, p. 30) (69, 70, 71, 72, 73).

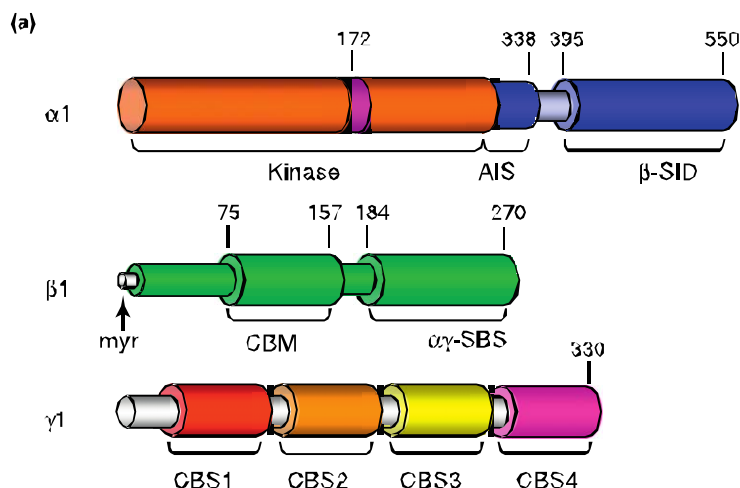
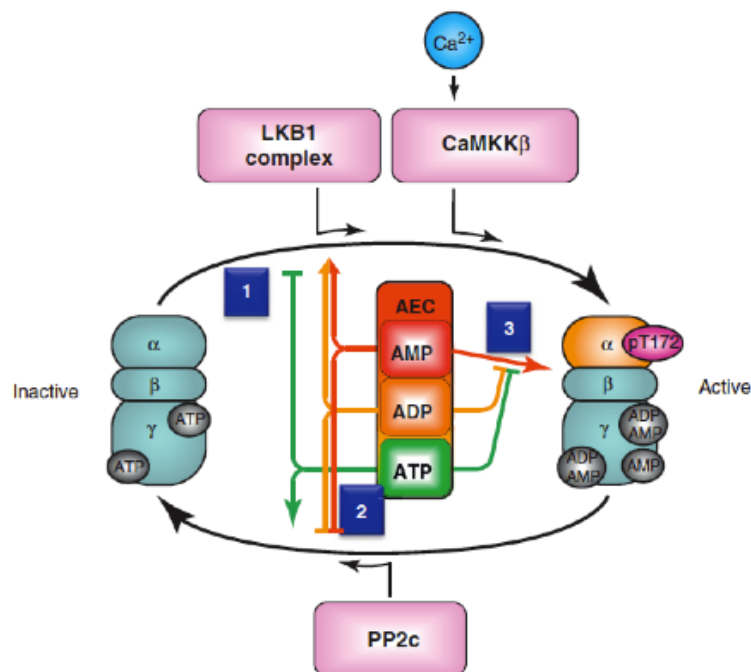


Figure 9. Structure de l'AMPK. Figure tirée d'Oakhill J.S. et al, *Trends Endocrinol Metab*, 23, 125-32, 2013. La figure représente l'organisation des domaines des sous-unités de l'AMPK. « Kinase » représente le domaine N-terminal kinase, AIS : la séquence d'autoinhibition, β -Sid : le domaine de liaison de la sous-unité β , myr : la myristoylation de la sous-unité β , CBM : domaine de liaison aux glucides, $\alpha\gamma$ -SBS : domaine de liaison des sous-unités α et γ , CBS : cystathionine- β -Synthase.

III.2.2- Régulation de l'activité de l'AMPK

La régulation de l'activité de l'AMPK est complexe et implique 3 mécanismes indépendants : la phosphorylation, l'inhibition de la déphosphorylation et l'activation allostérique. La liaison de l'AMP et de l'ADP favorise la phosphorylation de l'AMPK. Parallèlement, ces deux nucléotides inhibent la déphosphorylation et l'inactivation de l'AMPK par les phosphatases. Une fois phosphorylée, l'AMPK subit une activation allostérique par l'AMP qui multiplie par 2 à 5 fois son activité. En présence de niveaux d'ATP élevés, ces 3 mécanismes sont inhibés (Figure 10, p. 31) (72).



- 1 Phosphorylation
- 2 Inhibition de la déphosphorylation
- 3 Activation allostérique

Figure 10. Régulation de l'activité de l'AMPK par les nucléotides. Figure adaptée d'Oakhill J.S. et al, *Trends Endocrinol Metab*, 23, 125-32, 2013. AMP : Adénosine monophosphate, ADP : Adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, LKB1 : protéine suppresseur de tumeurs, CaMKKβ : calcium/calmodulin-dependent kinase kinase, PP2c : phosphatases, αβγ : sous-unités de l'AMPK.

III.2.2.1- La phosphorylation

La phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité α est un mécanisme indispensable à l'activation de l'AMPK. La séquence qui comprend la Thr172 est d'ailleurs très conservée dans tous les analogues de l'AMPK et sa phosphorylation demeure importante pour l'activité de l'enzyme dans toutes les espèces. Deux protéines kinases phosphorylent l'AMPK. Il s'agit de la protéine suppresseur de tumeurs (LKB1) et de la protéine kinase « calcium/calmodulin-dependent kinase kinase » (CaMKK). Il a aussi été proposé que la protéine kinase TAK1

(Transforming Growth Factor- β - Activated Kinase 1) puisse phosphoryler la Thr172 mais l'enjeu de cette activation reste encore inconnu (69, 70, 71, 72, 73).

La LKB1 est la principale kinase phosphorylant l'AMPK. Son nom de suppresseur de tumeurs est lié à sa découverte dans le syndrome de Peutz-Jeghers où les malades déficients en LKB1 développent plusieurs tumeurs bénignes (74). La LKB1 régule l'activité de 12 autres protéines membres de la famille des kinases apparentées à l'AMPK (75). Cette kinase existe sous forme d'un complexe comprenant LKB1/STRAD/MO25 (76). STRAD (Ste20-Related Adaptor Protein) et MO25 (Mouse Protein 25- α) existent chacun sous deux isoformes (α et β) dans l'organisme humain. STRAD est une pseudokinase apparentée à la famille des kinases Ste20 (Sterile 20 Group Kinases). Le domaine pseudokinase de STRAD α se lie au niveau du domaine catalytique de LKB1 (77). MO25 α se lie au domaine C-terminal de STRAD α et joue le rôle d'échafaudage stabilisant le complexe LKB1/STRAD (78). Cette liaison favorise la localisation cytoplasmique de LKB1 et augmente son activité catalytique. Le complexe LKB1 est constitutivement actif (77, 78). La liaison de l'AMP et de l'ADP sur la sous-unité γ de l'AMPK induit des changements conformationnels permettant la phosphorylation de l'AMPK par la LKB1. Selon certaines études, la myristoylation de la sous-unité β serait aussi indispensable à la phosphorylation de l'AMPK par la LKB1. Cependant, le mécanisme par lequel la myristoylation participe à la phosphorylation de la sous-unité α n'est pas encore bien défini. Il est important de noter que l'action de la LKB1 est essentielle à toute activation de l'AMPK médiée par l'augmentation de l'AMP intracellulaire (79, 80).

Les CaMKKs (CaMKK α et CaMKK β) sont des protéines kinases activatrices des protéines de liaison à la calmoduline (CaM), les CaM kinases. En réponse à des niveaux élevés de Ca²⁺ intracellulaire, la CaMKK β est capable de phosphoryler l'AMPK dans les cellules déficientes en LKB1 (81). En présence du Ca²⁺, le complexe Ca²⁺/CaM se lie à la CaMKK β induisant un changement conformationnel ce qui permet la liaison de la CaMKK β et de l'AMPK via leurs domaines kinases pour former le complexe actif Ca²⁺/CaM/CaMKK β /AMPK. Comme la CaMKK β a une distribution tissulaire restreinte, ce mécanisme est observé particulièrement dans les neurones, les muscles, les cellules endothéliales et les lymphocytes T. La régulation de l'activité de l'AMPK par la CaMKK β

peut se produire en l'absence de variation détectable en AMP, ADP ou ATP. De plus, ce mécanisme est indépendant de la myristoylation de la sous-unité β . Par contre, en raison de l'action de l'AMP et ADP sur la déphosphorylation de l'AMPK, il a été suggéré que CaMKK β agirait en synergie avec ces derniers (81, 82).

III.2.2.2- L'inhibition de la déphosphorylation

L'activité de l'AMPK résulte d'un rapport entre la phosphorylation par des kinases et la déphosphorylation par les phosphatases. Des études *in vitro* suggèrent que la déphosphorylation de l'AMPK est régulée par plusieurs phosphatases de la famille PPM (PP2C) et de la famille PPP (PP1 et PP2A) (83). La déphosphorylation constitue le moyen le plus efficace d'inactivation de l'AMPK. Ainsi pour que l'AMPK demeure active, l'inhibition de la déphosphorylation est indispensable. La déphosphorylation de l'AMPK est stimulée par l'ATP et inhibée par l'AMP et l'ADP. En concentrations élevées, l'AMP et l'ADP se fixent sur le site S1 de l'AMPK. Cette liaison favorise la liaison de l'ADP/AMP sur le site S3 de la sous-unité γ . Cela entraîne un changement de conformation qui protège le résidu Thr172 des protéines phosphatases, et maintient l'AMPK dans un état de phosphorylation. En concentration élevée, l'ATP peut se lier au site S3 et déstabiliser la liaison entre les sous-unités α et γ , ce qui rend le résidu Thr172 accessible aux phosphatases (84).

III.2.2.3- L'activation allostérique

L'activation allostérique de l'AMPK est promue par la liaison de l'AMP au niveau du site S1 de la sous-unité γ ce qui augmente l'activité de l'AMPK de 2 à 5 fois. Cependant, comme décrit plus haut, il existe une coopération positive entre les sites de liaison S1, S3 et S4. La liaison de l'AMP sur un site favorise sa liaison sur un autre site. Ainsi, les trois sites sont tous impliqués dans l'activation allostérique. *In vivo*, l'ADP a plus d'affinité pour le site S1 et est présent en concentrations beaucoup plus élevées que l'AMP. Il est donc probable que le site a toujours un ADP de lié. Par conséquent, il a été suggéré que l'activation allostérique serait moins importante *in vivo* que celle mesurée *in vitro* (84, 85).

III.3- Activation de l'AMPK

III.3.2- L'activation par le stress énergétique

L'organisme puise son énergie par l'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate, et de façon moins fréquente en AMP. Il existe dans les cellules eucaryotes une enzyme très active, l'adenylate kinase qui catalyse la réaction suivante $2ADP \Leftrightarrow ATP + AMP$. Ainsi, le statut énergétique de l'organisme est fonction des ratios ADP/ATP et AMP/ATP (5). On considère comme stress énergétique toute situation conduisant à un déséquilibre entre la synthèse et la consommation d'énergie. Lorsque l'ATP est consommé plus rapidement qu'il n'est synthétisé la balance énergétique devient négative. Cela conduit à une augmentation des niveaux d'ADP et sa conversion en AMP par l'adenylate kinase cytosolique. L'augmentation des ratios AMP/ATP et ADP/ATP conduit à l'activation de l'AMPK. Concrètement, l'activation de l'AMPK peut donc survenir en réponse à des stress qui, soit interfèrent avec la production d'ATP comme l'hypoxie (86), l'ischémie (87), la privation de glucose (88) ou les défauts de la chaîne respiratoire mitochondriale (89), soit qui augmentent la consommation d'ATP comme l'exercice physique (90, 91). L'AMPK est aussi activée par des inhibiteurs de la glycolyse (2-déoxyglucose), du cycle de Krebs (arsénite) ou de la phosphorylation oxydative (oligomycine, antimycine A, roténone) (92, 93). En outre, des découplants de la chaîne respiratoire mitochondriale comme le 2,4-dinitrophénol (DNP) activent l'AMPK (94). Ce dernier rend la membrane interne de la mitochondrie perméable aux protons et diminue le gradient de protons transmembranaire (95). Cela résulte en une diminution de l'ATP et une augmentation du ratio AMP/ATP et une activation de l'AMPK.

III.3.3- L'activation par les hormones et les cytokines

Il existe un certain nombre d'hormones et de cytokines qui régulent le métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme par l'intermédiaire de l'AMPK. Il s'agit, entre autres, de la leptine, de l'adiponectine, de la ghréline, et de l'interleukine 6 (IL6) (71). Dans les muscles squelettiques, la leptine, l'adiponectine et l'IL6 activent l'AMPK et augmentent l'oxydation des acides gras et la captation du glucose (96, 97, 98). Dans le foie,

l'adiponectine active l'AMPK stimulant l'oxydation des acides gras et inhibant la néoglucogenèse (98, 99). L'effet de la ghréline sur l'activité de l'AMPK est tissu-spécifique. Elle active l'AMPK au niveau de l'hypothalamus où elle joue un rôle dans la prise alimentaire alors qu'elle n'a aucun effet sur cette dernière dans le muscle (100, 101). Les mécanismes par lesquels ces adipokines régulent l'activité de l'AMPK restent encore inconnus. Toutefois certaines études démontrent que la leptine et l'adiponectine agiraient sur l'AMPK en augmentant les niveaux d'AMP (96, 98).

III.3.4- L'activation par les nutriments

Des études récentes ont démontré que l'AMPK était sensible au statut lipidique de la cellule. Une exposition aigüe aux acides gras libres active l'AMPK dans le cœur et le muscle par une voie AMP-indépendante (102, 103). C'est une activation allostérique rendant l'AMPK accessible pour sa phosphorylation par LKB1. Cette découverte a permis de faire un lien entre l'augmentation des acides gras libres et la stimulation de la β -oxydation observé dans les muscles squelettiques (104). D'autres nutriments activent aussi l'AMPK, notamment, l'apolipoprotéine ApoAI du HDL cholestérol. Ce dernier active l'AMPK dans les cellules endothéliales et stimule la phosphorylation et l'activation des NO synthétases endothéliales (105, 106). Les mécanismes par lesquels l'ApoAI agit sur AMPK n'ont pas encore été élucidés.

III.3.4- L'activation pharmacologique

L'AMPK peut être activée par plusieurs médicaments et xénobiotiques. De nombreuses études ont démontré que l'AMPK constitue une cible privilégiée de deux grandes classes de médicaments antidiabétiques soit les biguanides (metformine et phenformine) et les thiazolidinediones (rosiglitazone, troglitazone et pioglitazone) (107, 108, 109, 110, 111, 112). Selon ces études, une bonne partie des effets bénéfiques de ces médicaments comme la diminution de la néoglucogenèse, et l'augmentation de l'oxydation des acides gras passeraient par la voie LKB1/AMPK (107, 108, 109). D'autres composants naturels comme le résvératrol ou l'épigallocatechine gallate que l'on retrouve dans le vin rouge et le thé vert respectivement,

activent aussi l'AMPK (110, 111, 112). Une étude récente de Hawley et *coll.* suggère que la plupart de ces composants stimuleraient l'activité de l'AMPK en augmentant les niveaux cellulaires de l'AMP et/ou de l'ADP (113). L'AMPK peut être aussi stimulée par un activateur pharmacologique utilisé en recherche : le 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR). L'AICAR est un analogue de l'adénosine. Dans la cellule, il est phosphorylé en position 5' pour donner le 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate (ZMP). Le ZMP mime les effets de l'AMP sur l'AMPK *in vitro* (114, 115).

III.4- Rôles de l'AMPK

Jusqu'à présent, toutes les études sur l'AMPK s'accordent pour dire que cette enzyme est un senseur du métabolisme énergétique et que son activation vise à rétablir l'homéostasie énergétique. En général, l'AMPK stimule les voies cataboliques productrices d'ATP (par exemple la glycolyse ou la β-oxydation) et inhibent les voies anaboliques consommatrices d'ATP (par exemple la néoglucogenèse hépatique ou la synthèse des protéines). Elle agit à court terme en contrôlant l'activité de certaines enzymes par phosphorylation et à long terme, en contrôlant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (69, 70).

III.4.1- Régulation du métabolisme des glucides

III.4.1.1- Le transport du glucose et la glycolyse

L'AMPK est surtout connu pour son rôle dans l'exercice physique. Au cours d'un exercice physique, la contraction musculaire s'accompagne d'une augmentation de la captation du glucose. Cet effet est contrôlé par l'AMPK de manière indépendante de l'insuline. L'AMPK augmente le transport du glucose par deux mécanismes soit l'augmentation de l'expression génique des transporteurs GLUT1 et GLUT4 et leur translocation au niveau de la membrane plasmique (116, 117, 118). GLUT4 est retrouvé principalement dans le tissu adipeux, le cœur et les muscles squelettiques. Les effets de l'AMPK sur sa translocation ont donc été observés dans ces tissus (119, 120, 121). Par

contre, GLUT1 est un transporteur ubiquitaire (122) et les effets de l'AMPK sur celui-ci se retrouvent donc dans la plupart des tissus.

Plusieurs protéines cibles de l'AMPK ont été identifiées. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine kinase p38 activée par les mitogènes (p38MAPK). La p38MAPK joue un rôle dans l'inflammation, la croissance, la différenciation, le cycle et la mort cellulaire (123, 124). Des études ont montré que la p38MAPK régule le transport du glucose lors de la contraction musculaire (125, 126) et que son inhibition supprime le transport du glucose (121, 127). La p38MAPK est une cible indirecte de l'AMPK. L'AMPK active la MAPK kinase 3 (MKK3) qui active à son tour la p38MAPK (127). De plus, l'AMPK favoriserait l'autophosphorylation de la p38MAPK en stimulant son recrutement par TAB1 (Transforming Growth Factor- β -activated Protein Kinase 1– Binding Protein 1) (128). Plusieurs études proposent que les deux protéines fonctionnent en synergie pour le transport du glucose. Ainsi, l'AMPK induirait la translocation des transporteurs alors que la protéine p38MAPK activerait ces derniers après leur translocation à la surface de la cellule (128, 129).

Par ailleurs, l'AMPK favorise l'utilisation du glucose en inhibant la synthèse de glycogène et en stimulant la glycolyse via l'inhibition de la glycogène synthétase (130) et l'activation de la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK2) respectivement (131, 132).

III.4.1.2- La néoglucogenèse

L'AMPK inhibe la production hépatique du glucose en réprimant l'expression des gènes codant pour les principales enzymes de la néoglucogenèse tels que la pyruvate kinase (PK), la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la G-6-Pase (133, 134, 135, 136, 137, 138). Des études subséquentes ont démontré que l'AMPK joue un rôle prépondérant dans ce processus et les souris déficientes pour la sous-unité AMPK α 2 développent une hyperglycémie et une intolérance au glucose associées à une augmentation de la production hépatique du glucose (139, 140).

III.4.2- Régulation du métabolisme lipidique

L'AMPK régule le métabolisme des acides gras en inhibant la synthèse des lipides dans le foie et le tissu adipeux, alors qu'elle stimule la β -oxydation dans les muscles squelettiques et le cœur. L'AMPK favorise l'entrée des acides gras dans la cellule en stimulant la translocation du transporteur CD36 vers la membrane plasmatique (141, 142, 143, 144). À l'intérieur de la cellule, l'AMPK agit principalement en phosphorylant et en inactivant l'ACC (145). Cette enzyme catalyse la première réaction de synthèse des lipides, soit la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est aussi un inhibiteur allostérique de la CPT1 (146, 147). Ainsi, l'inhibition de l'ACC par l'AMPK induit d'une part l'inhibition de la synthèse des acides gras et augmente parallèlement l'entrée de ces derniers dans la mitochondrie pour leur oxydation. Dans les tissus lipogéniques comme le foie et le tissu adipeux, l'AMPK inhibe également l'activité du facteur de transcription SREBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) qui régule la transcription de plusieurs gènes lipogéniques tels que l'ACC, FAS (Fatty Acid Synthase), GPAT (Glycérol-3-phosphate acyl-transférase) et HSL (lipase hormonosensible) (Figure 11, p. 38) (148, 149).

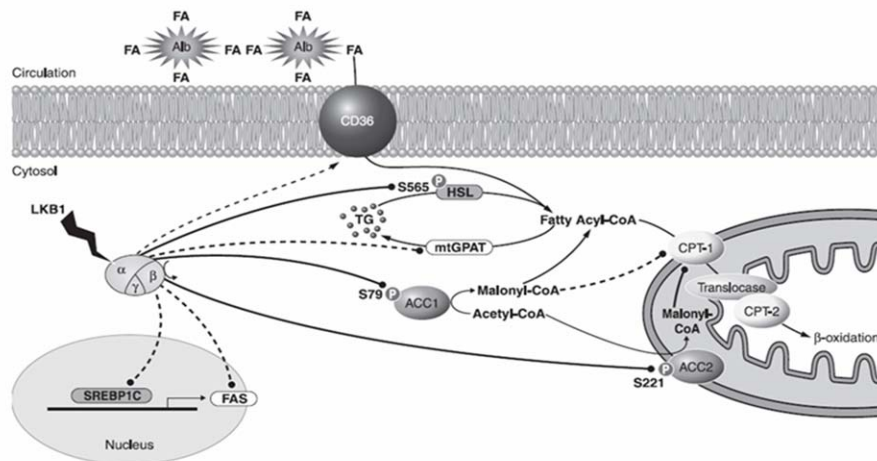


Figure 11. Régulation du métabolisme des lipides par l'AMPK. Figure tirée de Steinberg G.R. et Kemp B.E. *Physiol Rev*, 89, 1025-1078, 2009. ► : stimulation, ● : inhibition, ligne pleine : phosphorylation directe, ligne pointillée : action indirecte.

Dans les hépatocytes, l'AMPK diminue aussi la synthèse du cholestérol via la phosphorylation et l'inhibition de la HMGCoR, l'enzyme limitante de la synthèse de ce dernier (150, 151).

III.4.3- Régulation du métabolisme des protéines

L'AMPK inhibe la synthèse des protéines, un processus très coûteux en énergie, par l'inhibition de la voie Akt/mTOR. mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) est un complexe multiprotéique qui joue un rôle primordial notamment dans la régulation de la traduction et de la synthèse des protéines. C'est une protéine serine/thréonine kinase qui existe sous deux formes mTORC1 et mTORC2 (152, 153). Seul mTORC1 est régulé par le statut nutritionnel et énergétique de la cellule et son activité est donc régulée par plusieurs kinases dépendantes de facteurs de croissance tels que la protéine kinase B (Akt) (152, 153). Akt est une protéine kinase impliquée dans plusieurs processus physiologiques incluant la survie, la prolifération, et le métabolisme de la cellule. Akt contrôle aussi la croissance cellulaire via son action sur la protéine mTOR. Elle phosphoryle et inactive la protéine TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex). Ceci inhibe l'activité GAP de cette dernière, permettant l'activation de la protéine Rheb GTPase et la stimulation de mTORC1 (153, 154). mTORC1 phosphoryle la protéine de liaison au facteur d'initiation 4E (4EBP1), ce qui libère le facteur d'initiation à la traduction 4E et donc promouvoit la synthèse des protéines (154, 155). L'AMPK inhibe la voie Akt/mTOR par plusieurs mécanismes (156). Contrairement à l'Akt, elle phosphoryle et active la protéine TSC2. Cette dernière convertit la protéine Rheb GTPase en une forme inactive incapable de stimuler l'activité de mTORC1 (157, 158, 159). L'AMPK phosphoryle aussi directement un des composants de mTORC1, raptor. La phosphorylation de ce dernier favorise son recrutement par les protéines 14-3-3, rendant mTORC1 inactif (Figure 12, p. 39) (160, 161).

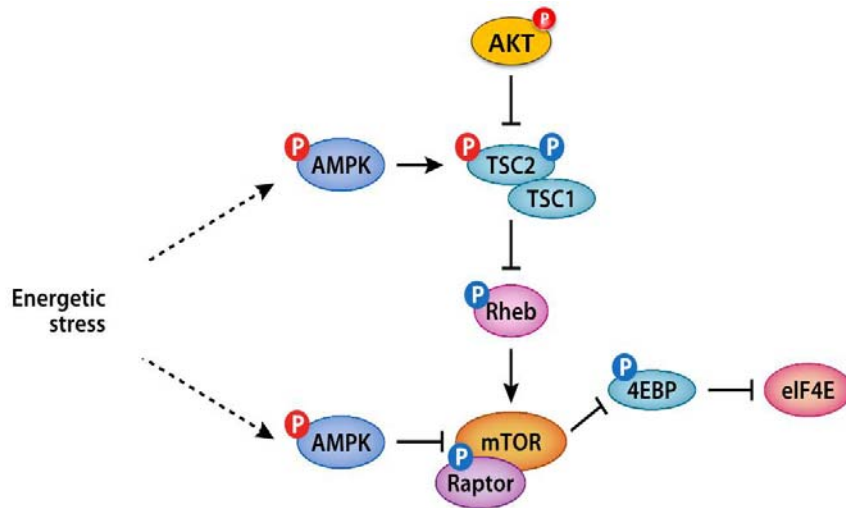


Figure 12. Inhibition de la voie de mTOR par l'AMPK. Figure adaptée d'Inoki et al. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 381-400, 2012. → : Stimulation. ⊥ : Inhibition.

Ⓟ : Phosphorylation activatrice, Ⓟ : phosphorylation inhibitrice. Akt : protéine kinase B, AMPK : protéine kinase dépendante de l'AMP, TSC : complexe sclérose tubéreuse, Rheb : protéine GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain), mTOR/raptor : complexe de la protéine cible de la rapamycine, 4EBP : protéine de liaison au facteur d'initiation 4E, eIF4E : facteur d'initiation de la traduction.

III.4.4- Régulation de la biogenèse mitochondriale

L'AMPK rétablit l'homéostasie énergétique, en partie, en favorisant la biogenèse mitochondriale (162, 163, 164). L'AMPK est capable d'activer PGC-1 α , un régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale par deux mécanismes. Premièrement, l'AMPK phosphoryle PGC-1 α sur la Thr-177 et la Ser-538. Cette phosphorylation favorise le recrutement de PGC-1 α à son promoteur et donc sa transcription (165). Deuxièmement, l'AMPK favorise la déacétylation de PGC-1 α par la sirtuine 1 (SIRT1). Ces deux mécanismes sont complémentaires et sont tous deux nécessaires à l'activité de PGC-1 α . La SIRT1 est une déacétylase dont l'activité est régulée par les niveaux de NAD⁺. Le mécanisme par lequel

AMPK active SIRT1 n'est pas encore clair. Cependant, il a été démontré que l'activation de l'AMPK augmente le ratio $NAD^+/NADH$ ce qui favorise l'activité de SIRT1 (Figure 13, p.41) (166).

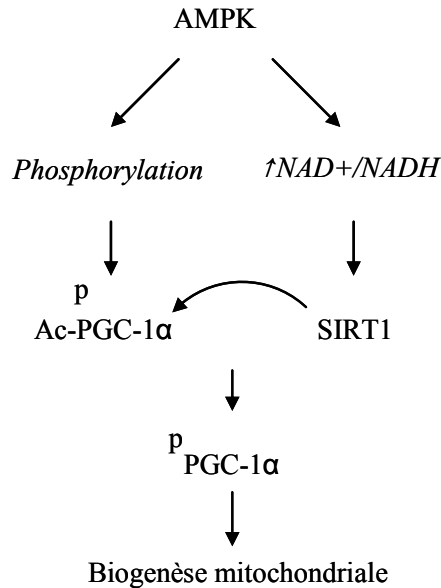


Figure 13. Régulation de la biogenèse mitochondriale par l'AMPK. AMPK : protéine kinase activée par l'AMP, PGC-1 α : co-activateur transcriptionnel 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes, ^pAc-PGC-1 α : PGC-1 α phosphorylé et acétylé, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit, SIRT1 : sirtuine 1.

III.4.5- Régulation de la croissance cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose

L'équilibre entre la croissance cellulaire, la prolifération et l'apoptose est indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme et un déséquilibre conduit notamment au cancer. Le rôle de l'AMPK dans la régulation de ces trois processus n'est pas surprenant puisque ce dernier est principalement activé par la protéine suppresseur de tumeurs LKB1.

La croissance cellulaire et la prolifération sont des processus qui impliquent la synthèse des protéines et celle des lipides (167). Ainsi, en inhibant la synthèse des protéines

(via mTORC1) et des lipides (via ACC), entre autres, l'AMPK inhibe aussi la croissance cellulaire et la prolifération (168).

Par ailleurs, lors d'un stress énergétique, l'AMPK phosphoryle le suppresseur de tumeurs p53 entraînant son accumulation et son activation. L'activation de p53 augmente la synthèse des inhibiteurs p21 et p27 du cycle cellulaire et provoque l'arrêt du cycle au niveau de la phase G1/S (169, 170, 171, 172). En outre, p53 agit aussi comme un facteur de transcription qui stimule les gènes pro-apoptotiques comme Bax et inhibe les gènes anti-apoptotiques comme Bcl2 (173). Par conséquent, l'AMPK en activant p53 peut dans certaines conditions favoriser aussi l'apoptose (Figure 14, p. 42).

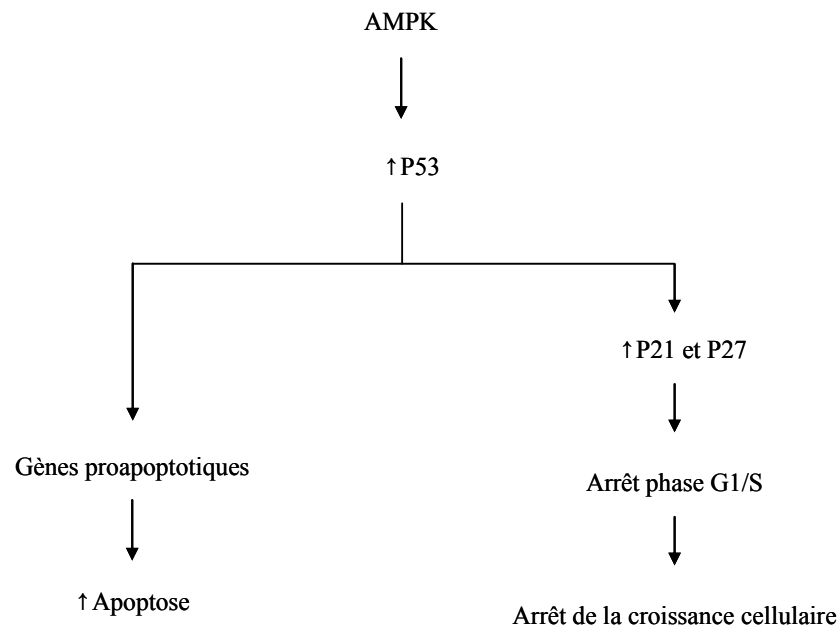


Figure 14. Régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose par l'AMPK. AMPK : protéine kinase activée par l'AMP, P53 : suppresseur de tumeurs, P21 et P27 : inhibiteurs des kinases dépendantes de la cycline.

III.4.6- Régulation de l'autophagie

L'autophagie consiste en un englobement de composants cellulaires par des autophagosomes qui fusionnent avec des lysosomes pour la digestion. C'est un processus de recyclage des composants cytoplasmiques dysfonctionnels ou en surplus dans le but de fournir des nutriments essentiels à la survie cellulaire durant un stress énergétique. Elle permet notamment de recycler les acides aminés ou les mitochondries, dans ce dernier cas, on parle alors de mitophagie (174, 175, 176). L'AMPK favorise l'autophagie via l'inhibition de mTOR (177, 178). L'AMPK régule également de manière directe l'autophagie en phosphorylant ULK1 (Unc-51-Like Kinase 1), une protéine kinase impliquée dans l'initiation de l'autophagie (179, 180, 181). L'ULK1 stimule la libération du complexe phosphatidylinositol 3 kinase de classe 3, contenant AMBRA1, VPS34 et Beclin-1, qui est transloqué vers le réticulum endoplasmique où il induit la formation de l'autophagosome (Figure 15, p. 43) (182, 183, 184).

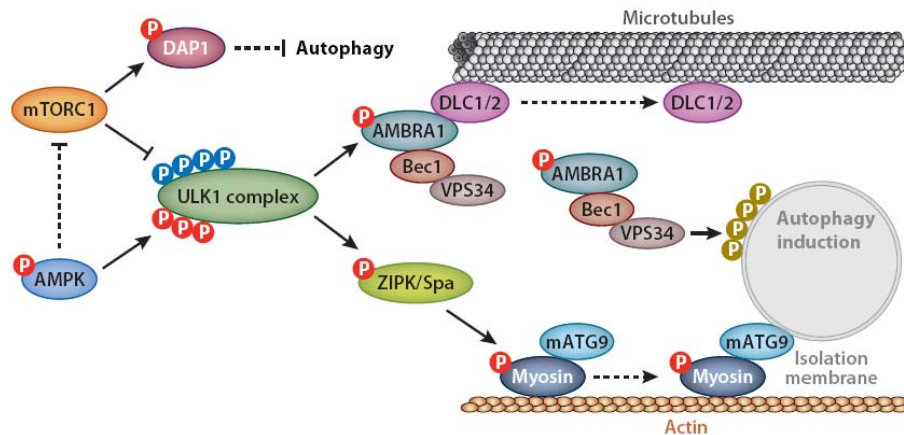


Figure 15. Induction de l'autophagie par ULK1. Figure tirée d'Inoki et al. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 381-400, 2012.

En résumé, l'AMPK est une enzyme activée principalement par l'augmentation du ratio AMP/ATP. La régulation de son activité implique plusieurs mécanismes tels que la phosphorylation/déphosphorylation ainsi qu'un contrôle allostérique notamment par des nutriments comme les acides gras. L'AMPK maintient l'équilibre énergétique en régulant différentes voies métaboliques impliquées dans la synthèse de l'ATP notamment en stimulant le transport du glucose, la glycolyse, la β -oxydation et la biogenèse mitochondriale et en inhibant les voies coûteuses en énergie telles que la synthèse des lipides et la synthèse des protéines. Son rôle de régulateur du métabolisme énergétique fait de l'AMPK une cible intéressante pour l'étude de la physiopathologie des maladies mitochondriales.

Hypothèses, objectifs et approche expérimentale

I- Mise en contexte

Le LSFC est caractérisé par une déficience en COX. Les cellules de patients démontrent une importante dysfonction mitochondriale (60) suggérant une diminution de la capacité de production de l'ATP par la mitochondrie. Cependant, en conditions basales ces cellules exhibent des niveaux d'ATP similaires aux cellules témoins (59) soutenant l'existence de mécanismes compensatoires. Des études ont montré que les cellules de patients atteints de maladies mitochondriales font face au déficit énergétique en augmentant la biogenèse mitochondriale et la glycolyse (62, 185, 186). Tel que mentionné précédemment, l'hyperactivité de l'AMPK a été observée dans plusieurs modèles de dysfonction mitochondriale (62, 63, 64, 187). En effet, il convient de rappeler que l'AMPK est une enzyme importante de la régulation du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale. Cette dernière fonction est médiée, en partie, par la régulation de l'activité de PGC-1 α par l'AMPK. La voie AMPK/PGC-1 α a donc souvent été une cible thérapeutique dans les maladies mitochondriales. Il a été rapporté que l'activation de l'AMPK dans les fibroblastes de patients atteints du syndrome de MERRF augmente la glycolyse favorisant la survie cellulaire (187), alors que l'activation de la voie PGC-1 α augmente la biogenèse mitochondriale dans un modèle murin de myopathie mitochondriale (188). Fait plus intéressant, l'activation de la voie AMPK/PGC-1 α par AICAR a été associée à une correction de la déficience en COX dans certaines maladies mitochondriales (64). Nous avons donc choisi d'étudier la régulation de cette voie dans les fibroblastes de peau de patients atteints de LSFC. Il est important de noter que ce modèle d'étude est le seul qui existait au moment de débiter l'étude du LSFC. À partir de là et en tenant compte des données de la littérature discutées ci haut, nous avons émis les hypothèses énumérées dans la section ci-après.

II- Hypothèses

1) La phosphorylation et, par conséquent, l'activité de l'AMPK seront augmentées dans les fibroblastes de patients atteints de LSFC en conditions de base.

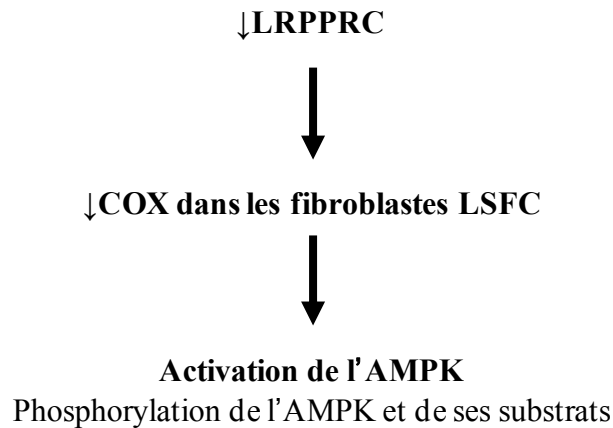


Figure 16. Schéma illustrant la première hypothèse du projet de recherche.

La mutation du gène *lrpprc* induit une déficience de COX (57) ce qui devrait diminuer la capacité des mitochondries à produire de l'ATP dans les fibroblastes LSFC (7) et entraîner la phosphorylation de l'AMPK et donc son activation pour pallier le déficit énergétique (62).

LRPPRC : leucine-rich PPR-motif containing protein, COX : cytochrome c oxydase, LSFC : syndrome de Leigh, type canadien français, AMPK : protéine kinase activée par l'AMP.

2) La stimulation chronique de l'AMPK augmentera la phosphorylation et/ou l'expression des marqueurs de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme énergétique dans les cellules de patients atteints de LSFC (64, 188).

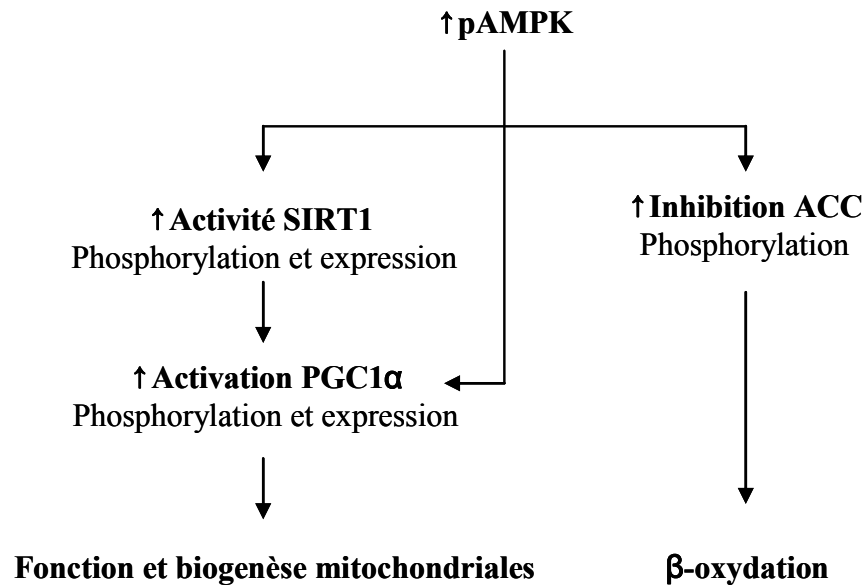


Figure 17. Schéma illustrant la deuxième hypothèse du projet de recherche.

L'activation chronique de l'AMPK stimulera les réactions cataboliques telles que la β -oxydation via l'inhibition de l'ACC (145). En outre, elle favorisera l'activité de SIRT1 (165). SIRT1 déacétyle et active PGC-1 α lorsqu'il est phosphorylé par AMPK. L'accumulation et l'activation de PGC-1 α favoriseront le métabolisme énergétique ainsi que la biogenèse mitochondriale (164, 165). pAMPK : protéine kinase activée par l'AMP phosphorylée, SIRT1 : sirtuine 1, PGC-1 α : co-activateur transcriptionnel 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes, ACC : acétyl CoA carboxylase.

III- Objectifs

1) Comparer le profil de phosphorylation de l'AMPK et de ses cibles dans les fibroblastes de patients atteints de LSFC à celui des témoins dans les *conditions basales* et les *conditions de stress* nutritionnel et énergétique.

2) Déterminer si l'activation chronique de l'AMPK augmente les marqueurs de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme énergétique en *conditions basales* et de *stress* nutritionnel et énergétique.

IV- Approche expérimentale

IV.1- Métabolisme de base

Nous avons caractérisé la voie de l'AMPK dans les fibroblastes primaires de patients LSFC en conditions basales. Ainsi, nous avons examiné la phosphorylation de l'AMPK, de même que celle de certaines de ses cibles impliquées dans l'utilisation de substrats énergétiques. Nous avons évalué les niveaux de phosphorylation et d'expression de certaines protéines clés pouvant refléter l'activité des voies métaboliques reliées aux principaux nutriments, soit les glucides, les lipides et les protéines. L'AMPK inhibe les voies anaboliques consommatrices d'ATP telles que la synthèse des protéines et la croissance cellulaire (168). Ces voies ont été évaluées via la phosphorylation et l'expression des protéines Akt et mTOR (157, 158, 159, 160, 161). Parallèlement, l'AMPK stimule les voies cataboliques productrices d'ATP ainsi que la biogenèse mitochondriale. La glycolyse a été évaluée via la phosphorylation de PFK2 (131,132). La β -oxydation a été évaluée via l'inhibition par phosphorylation de l'ACC (145), et la biogenèse mitochondriale via l'activité (phosphorylation et expression) de SIRT1 et l'expression protéique de PGC-1 α (164, 165). Enfin, la phosphorylation de p38MAPK, une des cibles indirectes de l'AMPK possédant plusieurs fonctions incluant un rôle dans le transport du glucose, a été aussi évaluée dans l'étude (128, 129). Toutes ces protéines sont présentées dans la Figure 18 p. 50 qui suit.

↓ Voies anaboliques consommatrices d'ATP		↑ Voies cataboliques productrices d'ATP		↑ Fonction et Biogenèse mitochondriale	Autres cibles
Σ des protéines	Croissance cellulaire	Glycolyse	β oxydation		Fonctions multiples (Transport du glucose)
Akt		PFK2	ACC	SIRT1	p38MAPK
mTOR				PGC-1α	

Figure 18. Protéines impliquées dans le métabolisme énergétique évaluées dans l'étude.

Σ : Synthèse, ATP : adénosine triphosphate, Akt : protéine kinase B, mTOR : mammalian target of rapamycin, PFK2 : phosphofruktokinase 2, p38MAPK : protéine kinase p38 activée par les mitogènes, ACC : acétyl-CoA-carboxylase, SIRT1 : sirtuine 1, PGC-1α : co-activateur transcriptionnel 1α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes.

IV.2- Conditions de stress

Nous avons démontré précédemment que les cellules LSFC sont plus susceptibles à un stress nutritionnel que celles de témoins (59). Nous avons donc évalué la phosphorylation de l'AMPK et de ses cibles en conditions de stress nutritionnel mais aussi en conditions de stress énergétique. Dans notre étude, les cellules ont été soumises à 3 conditions différentes détaillées dans les sous-sections ci-après.

IV.2.1- Incubation avec le DNP

Le DNP est un découplant classique de la chaîne respiratoire entraînant une diminution de la synthèse d'ATP (95). Il est souvent utilisé en recherche pour mimer une hypoxie chimique et activer l'AMPK (94). Cependant, utilisé de manière chronique ou à des concentrations élevées, ce dernier induit la mort cellulaire (95). Par conséquent, une courbe dose-réponse a été réalisée afin de déterminer la concentration optimale permettant l'activation de l'AMPK en l'absence de mort cellulaire. Suite aux expériences préliminaires

nous avons choisi une concentration de 0,1 mM de DNP avec un temps de stimulation de 10 min.

IV.2.2- Incubation avec un excès de nutriments

Une diète riche en lipides a souvent été associée à l'apparition de crises chez les patients LSFC et celles-ci sont caractérisées par des taux élevés de lactate (43, 44). D'après l'étude de Rivard et *coll.*, une exposition chronique (20h et plus) à une combinaison de 10 mM de lactate et 1 mM de palmitate (LP) induit la mort cellulaire précocement dans les cellules de patients LSFC (59). Ces concentrations de palmitate et de lactate avoisinent celles retrouvées notamment lors d'un exercice physique (1000 μ M palmitate) (189) et lors de crises chez les patients LSFC (12 à 26 mM lactate) (43, 44). À 4h de traitement, il n'y pas d'évidence de mort cellulaire dans les cellules LSFC et celles de témoins. Au contraire, on observe une augmentation des niveaux d'ATP en réponse au traitement LP aussi bien dans les cellules témoins que les cellules LSFC (59). Dans la présente étude, les fibroblastes de témoins et de patients LSFC ont ainsi été incubés avec une combinaison de 1 mM de palmitate et de 10 mM de lactate pendant 4h pour induire un stress nutritionnel mimant les effets qui pourraient précéder un état de crise. Cela permettant de déceler les altérations qui pourraient précéder la mort cellulaire.

IV.2.3- Incubation chronique avec le ZMP

Le ZMP est un analogue de l'AMP qui active l'AMPK. De façon intéressante, l'utilisation du ZMP mime l'augmentation des niveaux de l'AMP dans la cellule indépendamment d'une diminution des niveaux de l'ATP (114, 115). Cet aspect est important dans le cadre des maladies mitochondriales où la synthèse de l'ATP est déjà limitée. L'activation chronique de l'AMPK est connue pour induire la biogenèse mitochondriale (162, 163, 164). Et notamment, une incubation de 48h avec 0,5 mM de ZMP est suffisante pour induire la biogenèse mitochondriale dans des cellules saines (résultats non publiés). Il a été démontré que l'activation de la voie AMPK/PGC-1 α dans des souris invalidées pour COX10 dans les muscles augmentait la survie des souris (188). Nous avons donc voulu vérifier si l'activation de cette voie par le ZMP pouvait avoir des effets bénéfiques dans les cellules LSFC en réponse à un stress nutritionnel. Dans notre étude une partie des cellules a donc été

traitées pendant 48h avec 0,5 mM de ZMP, préalablement à l'incubation avec la combinaison de LP.

Tous les marqueurs métaboliques évalués en conditions basales ont également été évalués en ces conditions de stress. Les résultats de ces études nous permettront de mieux comprendre la régulation de l'AMPK dans les fibroblastes LSFC dans différentes situations.

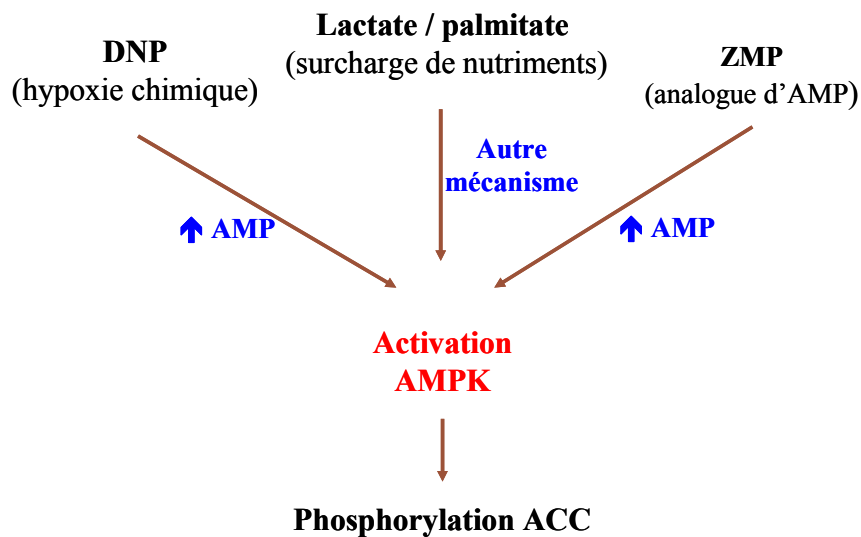


Figure 19. Différents types de stress utilisés dans notre étude. Le DNP active l'AMPK via une augmentation des niveaux de l'AMP. Le lactate/palmitate activerait l'AMPK par un mécanisme allostérique indépendamment des niveaux d'AMP. Le ZMP active l'AMPK en mimant les effets de l'AMP sur cette dernière.

DNP ; 2,4 dinitrophénol, ZMP : 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate, AMP : adénosine monophosphate, AMPK : protéine kinase activée par l'AMP, ACC : acétyl CoA carboxylase.

Matériels et méthodes

I- Modèle cellulaire

Les lignées de fibroblastes primaires provenant de biopsie de peau de patients LSFC et de témoins ont été obtenus de la Biobanque de l'acidose lactique (Laboratoire Gépromic, Université du Québec à Chicoutimi) avec l'accord du Comité d'éthique de la recherche du Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi et du Comité d'éthique du Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Certaines expériences ont été réalisées avec des lignées de fibroblastes immortalisées avec des vecteurs rétroviraux exprimant le gène HPV-16 E7 et le composant catalytique de la télomérase humaine dans le laboratoire d'Eric Shoubridge (Institut Neurologique de Montréal). Chaque lignée de patient a été appariée à une lignée témoin selon son âge et son sexe. Dans notre étude, nous avons utilisé une seule lignée cellulaire avec sa lignée témoin correspondante (Tableau IV, p. 54) pour des raisons d'économie de cellules primaires de patients. La lignée cellulaire de patient choisi pour notre étude est la lignée qui a été utilisée dans la plupart des études fondamentales effectuées au sein du consortium d'acidose lactique et particulièrement dans notre laboratoire. Elle est la plus représentative de toutes les autres lignées cellulaires de patients LSFC.

Tableau IV. Caractéristiques des deux lignées cellulaires utilisées

Nom de la lignée	Sexe	Âge au prélèvement	Origine	Caractéristiques
AL006	F	8	Québécoise	Homozygote A354V
EBS4-FA	F	5	Française	Témoin

II- Culture cellulaire

Les fibroblastes primaires ont été cultivés à 37°C et 5% de CO₂ dans un milieu de culture (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) contenant 25 mM de glucose (4,5g/L), 4 mM de L-glutamine (584 mg/L) et 1 mM de pyruvate de sodium (110 mg/L)

(Mediatech, Manassa, VA, USA). Ce milieu sera appelé milieu DMEM neutre. Il a été supplémenté avec 10% de sérum foetal de boeuf (FBS), 1% d'antibiotiques : pénicilline et streptomycine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et de 1% d'une solution de vitamines et d'acides aminés non essentiels de chez Mediatech. Ce dernier milieu sera appelé milieu DMEM supplémenté ci-après. Des expériences préliminaires ont permis de déterminer que le passage maximum pour les lignées primaires était de 18. Les fibroblastes immortalisés ont été cultivés dans un milieu DMEM neutre contenant 10% FBS, 1% pénicilline et 1% streptomycine jusqu'à un passage maximum de 30.

Incubation avec le DNP. Le jour de l'expérience, les cellules ont été incubées dans un milieu DMEM neutre pendant 4h. Elles ont ensuite été traitées avec 0,1 mM de DNP dilué dans de l'éthanol 95% (Sigma-Aldrich) ou le véhicule pendant 10 min pour une concentration final d'éthanol de 0,06%.

Incubation avec le LP. Le palmitate a été préalablement complexé avec de l'albumine de sérum bovin sans acide gras (BSA; Millipore, Billerica, MA, USA) pour une concentration final de 1,33%. Les cellules ont ensuite été incubées avec une combinaison de 10 mM de lactate et de 1 mM de palmitate (Sigma-Aldrich) ou 10 mM de mannitol et 1,33% de BSA pour maintenir l'équilibre osmotique, pendant 4 h dans un milieu DMEM neutre.

Incubation avec le ZMP. Les cellules ont été traitées avec 0,5 mM de ZMP dilué dans du DMSO (Sigma-Aldrich) ou le véhicule (concentration finale de DMSO 0,3%) pendant 48h dans un milieu DMEM supplémenté. Elles ont ensuite été incubées avec la combinaison LP ou le véhicule pendant 4 h dans un milieu DMEM neutre.

III- Immunobuvardage

Après le traitement les cellules ont été mises sur glace puis lavées deux fois avec du PBS froid pour arrêter la réaction. Elles ont ensuite été lysée avec un tampon contenant 25 mM de Tris·HCl à pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM d'orthovanadate de sodium, 20 mM fluorure de sodium, 10 mM de pyrophosphate de sodium, 2 mM d'EGTA, 2 mM d'EDTA, 1

mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle, 0,1% de sodium dodecyl sulfate (SDS), 1,5% de dodecyl-maltoside et des inhibiteurs de protéases. Les lysats ont été récoltés dans des tubes, laissés sur glace pendant 30 minutes, puis centrifugés à 20 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Chaque surnageant a été récupéré et la teneur en protéine a été déterminée avec le réactif 'Biorad Protein Assay Reagent'. Une quantité égale de protéines a été chargée (30 µg ou 40 µg) sur un gel de SDS-PAGE de 8% ou 12% puis transférées sur des membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été bloquées pendant 2 h dans une solution de 5% de lait dilué dans du TBST (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl et 0,05% Tween 20), puis incubées à 4°C toute la nuit avec les anticorps primaires suivants: AMPK, p-AMPK, ACC, p-ACC, p38MAPK, p-p38MAPK, SIRT1, p-SIRT1, PGC-1 α , mTOR, p-mTOR, Akt, p-Akt, COXIV (Cell Signalling); PFK2, p-PFK2 et β -actine (Santa Cruz); et LRPPRC (offert par le laboratoire du Dr Rioux, Institut de cardiologie de Montréal). Elles ont ensuite été incubées avec un deuxième anticorps conjugué à une peroxidase à la température de la pièce pendant 1h30. Les membranes ont été révélées par la méthode de chimioluminescence et quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. Les niveaux d'expression et les taux de phosphorylation des protéines ont été exprimés en unités arbitraires, et normalisés par rapport aux niveaux d'expression de la β actine. Les résultats ont ensuite été comparés aux conditions basales du témoin (fold increase over basal control). Dans les cas où les niveaux totaux des protéines étaient similaires, le ratio forme phosphorylée / forme totale est rapporté.

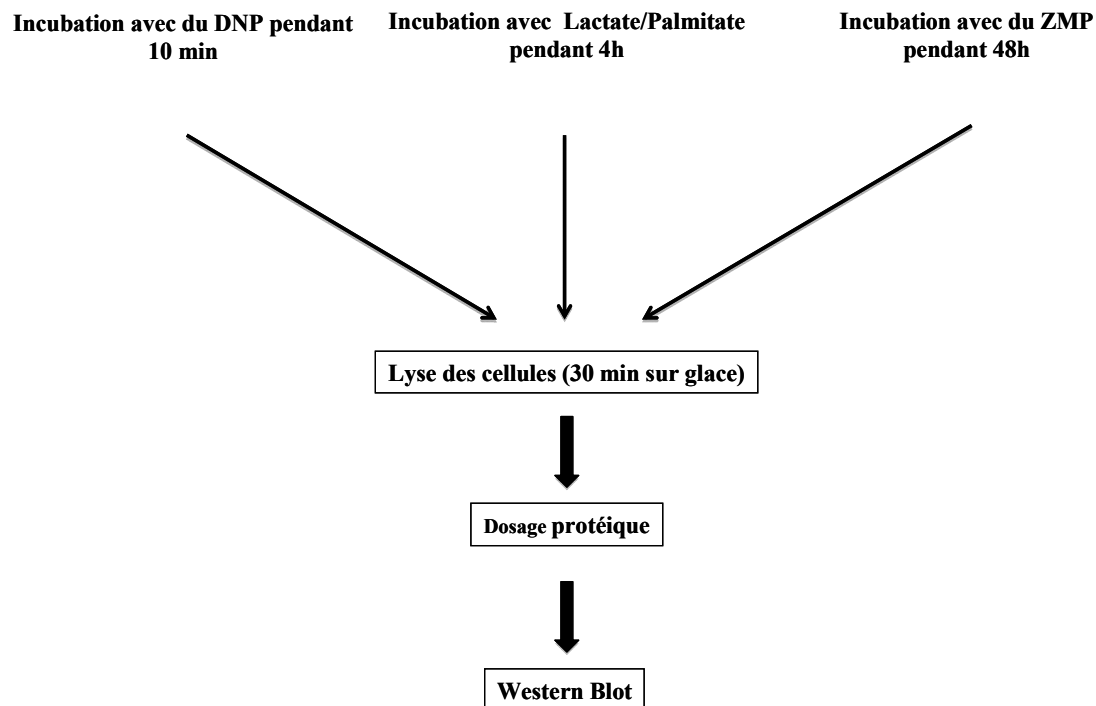


Figure 20. Protocole expérimental suivi pour la réalisation des immunobuvardage.

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ZMP : 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate, DNP : 2,4 dinitrophénol.

IV- Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graphpad prism 5. L'analyse de variance à deux voies (Two-way ANOVA) suivi du test de Bonferroni a été utilisée pour les comparaisons multiples et un test t a été utilisé pour la comparaison entre deux groupes. Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm l'erreur type (SEM) et considérés significativement différents pour un $p < 0,05$. Pour une probabilité d'erreur alpha entre $0,05$ et $0,1$, nous avons considéré la différence comme étant tendancielle, suggérant que la puissance statistique n'était pas suffisante pour observer la différence.

Résultats

I- Choix du modèle cellulaire

En raison de la disponibilité limitée des cellules primaires des patients LSFC, nous avons envisagé de travailler avec des cellules immortalisées. Une comparaison des niveaux d'AMPK et d'ACC (phosphorylés et totaux) pour les deux types cellulaires a été effectuée avant de choisir le modèle le plus approprié pour nos expériences. Comme illustré à la Figure 21 (p. 60), les cellules immortalisées de témoins et de LSFC, montrent une diminution des niveaux de phosphorylation de l'AMPK de 60% ($p < 0,01$) et de 80% ($p < 0,01$), respectivement, comparativement aux cellules primaires. Les niveaux de l'ACC phosphorylé sont également diminués de 58% dans les cellules immortalisées de témoins ($p < 0,01$) et de 69% dans les cellules LSFC ($p = 0,09$). Nos résultats démontrent des différences significatives entre les cellules immortalisées et les cellules primaires vis à vis de la régulation du métabolisme énergétique. À la lumière de ces résultats, nous avons choisi de travailler avec les cellules primaires uniquement.

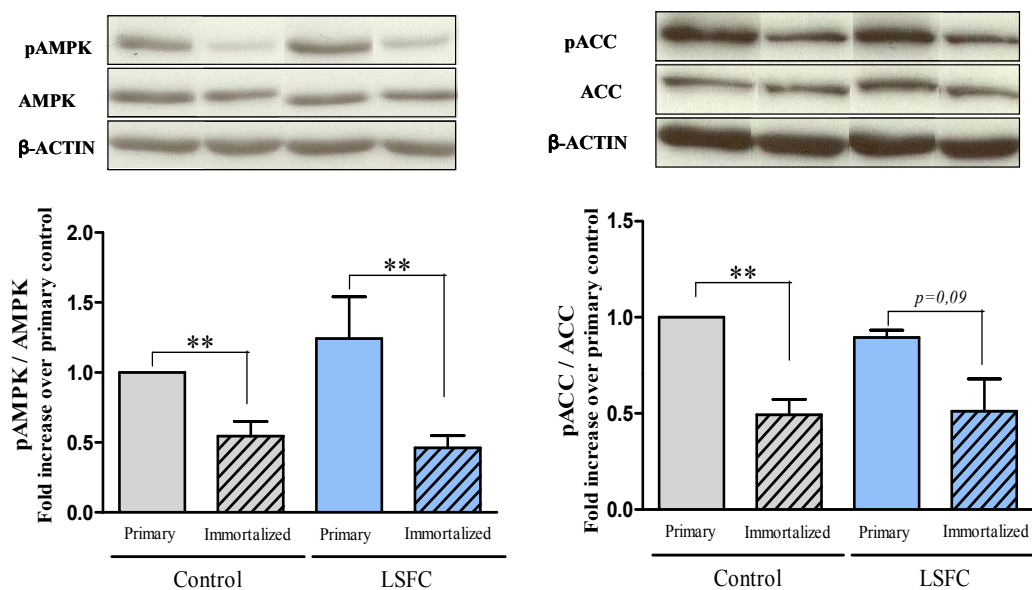


Figure 21. Comparaison des niveaux d'expression et de phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC dans les cellules primaires et les cellules immortalisées. Des fibroblastes primaires et immortalisés provenant d'un témoin et d'un patient LSFC ont été cultivés en conditions basales et les niveaux d'expression et de phosphorylation ont été déterminés par immunobuvardage. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 7 expériences indépendantes. ** $p < 0,01$.

II. Caractérisation des voies métaboliques dans les cellules LSFC en conditions basales

II.1- Expression protéique de LRPPRC et de COXIV

Le LSFC est une maladie caractérisée par une diminution des niveaux de LRPPRC associée à une diminution des niveaux de COX (43, 44). En accord avec la littérature, les cellules LSFC démontrent une diminution de 75% ($p < 0,001$) et de 58% ($p < 0,001$) de l'expression protéique de LRPPRC et de COXIV, respectivement, comparativement aux cellules témoins (Figure 22, p. 61).

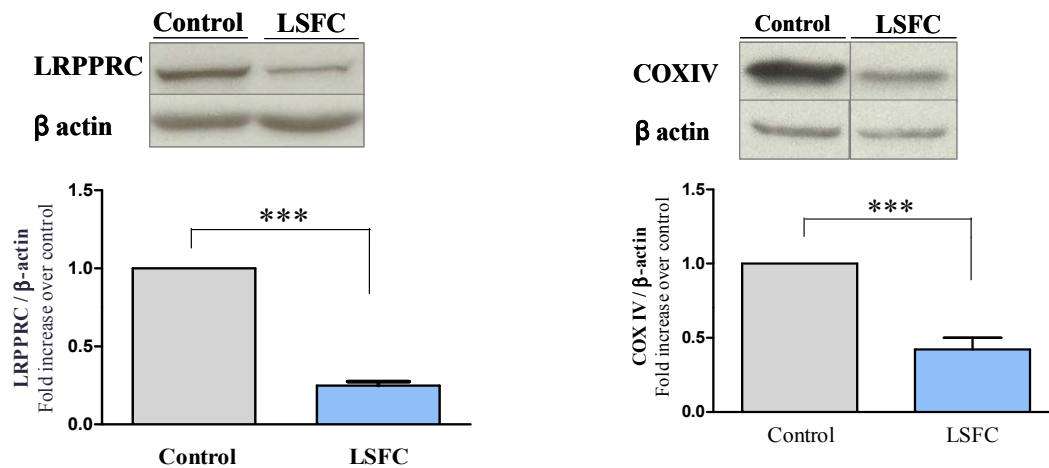


Figure 22. Expression protéique de LRPPRC et de COXIV dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins. L'expression protéique de LRPPRC et de COX a été évaluée par immunobuvardage dans des fibroblastes primaires provenant d'un témoin et d'un patient LSFC. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes. *** $p < 0,001$.

II.2- Activité de l'AMPK

L'activité de l'AMPK a été déterminée avec un anticorps qui reconnaît la forme phosphorylée et active de l'enzyme. De plus, nous avons aussi évalué la phosphorylation d'une cible de l'AMPK. Cela nous permet d'avoir un profil d'activation plus précis puisque la régulation de l'activité de l'AMPK implique, en plus de la phosphorylation, une activation allostérique qui augmente jusqu'à 5 fois son activité (84, 85). L'AMPK est la principale kinase régulatrice de l'activité de l'ACC (190). Par conséquent, l'ACC est le substrat traditionnellement choisi pour la mesure de l'activité de cette enzyme. Comme illustré à la Figure 23 (p. 62), les niveaux de phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC sont similaires dans les cellules LSFC et les cellules témoins.

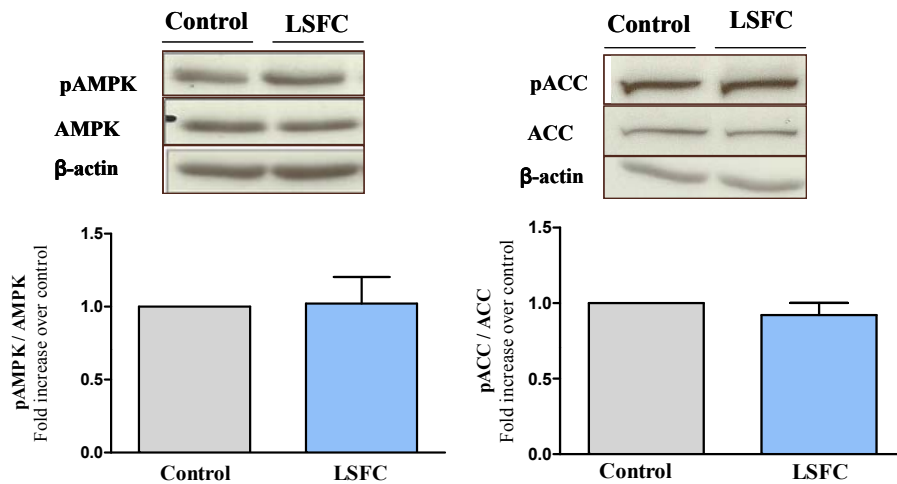


Figure 23. Activité de l'AMPK dans les cellules LSFC et les cellules témoins. Les niveaux de phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC ont été déterminés par immunobuvardage dans des fibroblastes primaires provenant d'un patient témoin et un patient LSFC. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 10 expériences indépendantes.

II.3- Activité de la protéine PFK2

Les dysfonctions mitochondriales sont souvent associées à des changements du métabolisme énergétique dont l'augmentation de la glycolyse (62, 185, 186). Nous avons examiné les niveaux d'expression et de phosphorylation de la PFK2, une enzyme clé dans la régulation de la glycolyse par l'AMPK (131, 132). Comme illustré à la Figure 24 (p. 63), et en accord avec les niveaux de phosphorylation de l'AMPK, les niveaux de phosphorylation de la PFK2 ne sont pas significativement différents entre les cellules de témoins et les cellules de patients ($p=0,27$).

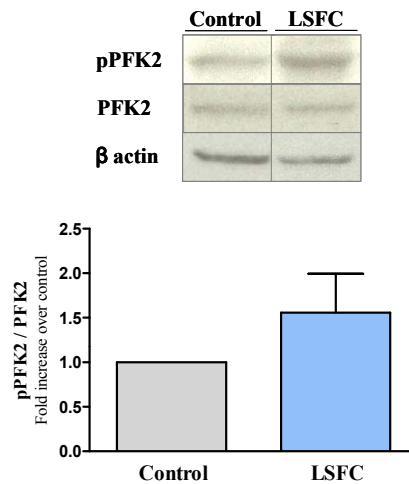


Figure 24. Taux de phosphorylation de la PFK2 dans les cellules LSFC et les cellules témoins. Les niveaux de phosphorylation de la PFK2 ont été déterminés par immunobuvardage dans des fibroblastes primaires provenant d'un témoin et d'un patient LSFC. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 10 expériences indépendantes.

II.4- Activité de la p38MAPK

La p38MAPK joue un rôle dans plusieurs processus biologiques incluant l'inflammation, la croissance, la différenciation, le cycle et la mort cellulaire (122, 123). Plusieurs études ont suggéré qu'elle jouait aussi un rôle dans le transport de glucose en coopération avec l'AMPK (128, 129). La Figure 25 (p. 64) illustre une tendance à l'augmentation de 38% des niveaux de phosphorylation de la p38MAPK ($p=0,09$) dans les cellules LSFC comparativement aux témoins. Puisqu'aucune différence d'activité de l'AMPK n'existe entre les cellules LSFC et les cellules témoins, nos résultats suggèrent que l'activation de p38MAPK se produit via une voie indépendante de l'AMPK.

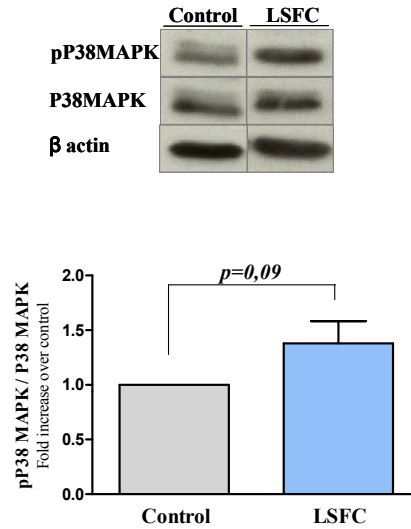


Figure 25. Taux de phosphorylation de la p38MAPK dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins. Les niveaux de phosphorylation de la p38MAPK ont été déterminés par immunobuvardage dans des fibroblastes primaires provenant d'un témoin et d'un patient LSFC. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 10 expériences indépendantes.

II.5- Activité des protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale

Dans plusieurs modèles, les mutations des protéines de la chaîne respiratoire ou des facteurs d'assemblage sont accompagnées d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale (185, 186). Pour vérifier si cela était aussi vrai dans les cellules LSFC, nous avons examiné deux protéines qui jouent un rôle important dans ce processus, soient SIRT1 et PGC-1 α .

Comme illustré à la Figure 26 (p. 65), les cellules LSFC présentent une augmentation de 223% ($p < 0,01$) de la forme phosphorylée et active de SIRT1 associée à une augmentation de 61% ($p < 0,01$) de la quantité de SIRT1. Il en résulte un ratio forme phosphorylée/forme totale significativement élevé par rapport aux cellules témoins ($\uparrow 104\%$, $p < 0,05$). Par ailleurs, on observe une tendance à l'augmentation de 39% ($p = 0,08$) de l'expression protéique de PGC-1 α dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins. Ces résultats suggèrent une surexpression et une activation de la voie de la biogenèse mitochondriale dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.

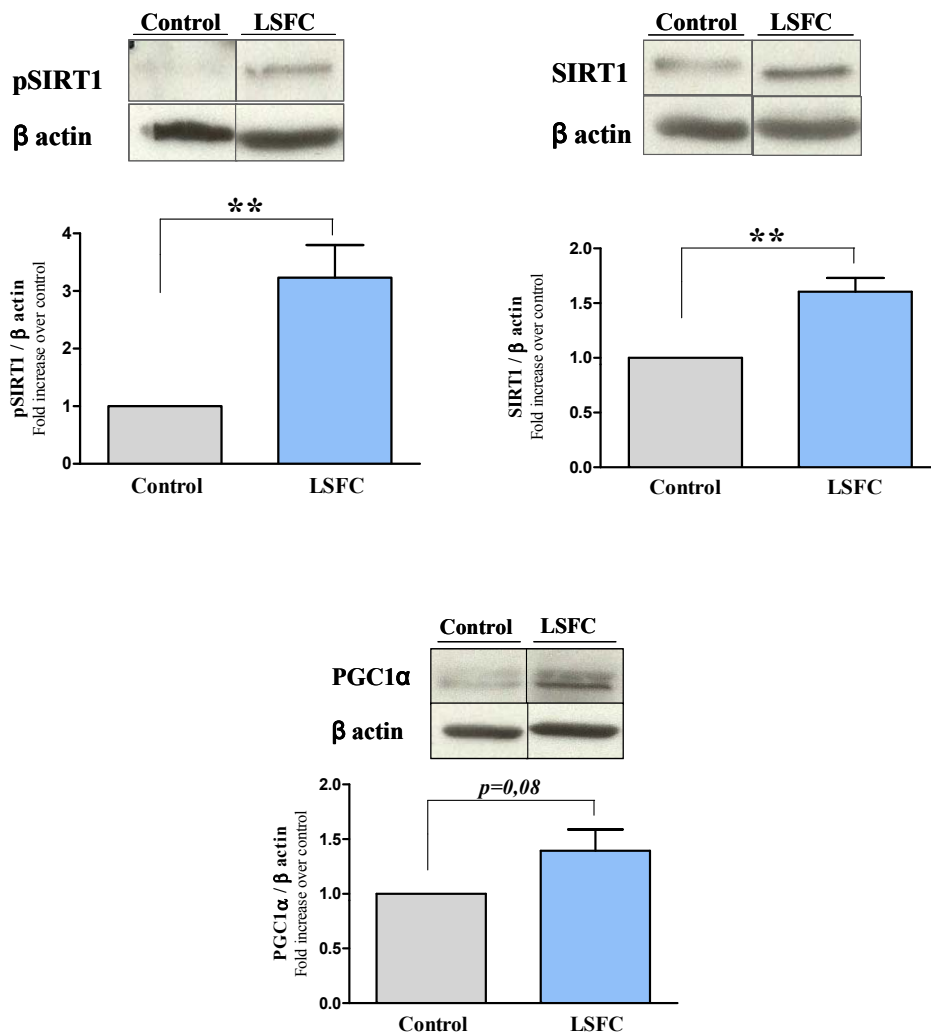


Figure 26. Taux de phosphorylation et d'expression de SIRT1 et PGC-1α dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins. Les niveaux de phosphorylation et/ou d'expression de SIRT1 et de PGC-1α ont été déterminés par immunobuvardage dans des fibroblastes primaires provenant d'un patient témoin et un patient LSFC. Les résultats représentent une moyenne ± SEM de 9 expériences indépendantes pour SIRT1 et 8 expériences pour PGC-1α. ** $p < 0,01$.

II.6- Activité des protéines impliquées dans la survie et la croissance cellulaire

L'Akt est un important régulateur de la survie cellulaire via l'inhibition de l'apoptose d'une part, et de la stimulation de la croissance cellulaire d'autre part via, en partie, l'activation de mTOR (191). Akt et mTOR sont régulées par phosphorylation. Alors que la phosphorylation d'Akt est activatrice celle de mTOR dépend du résidu phosphorylé. Ainsi la phosphorylation sur une Ser 722 ou une Ser 792 par l'AMPK au niveau du composant raptor de mTOR se traduit par une inactivation, alors que la phosphorylation de la Ser 2448 via la voie PI3K/Akt active l'enzyme (191, 192). Dans la présente étude, nous avons évalué la phosphorylation de la Ser 473 et la Ser 2448 impliquées dans l'activation de l'Akt et de mTOR respectivement.

Tel qu'illustré à la Figure 27 (p. 68), on observe une augmentation de 111 % des niveaux de phosphorylation d'Akt ($p < 0,05$) dans les cellules LSFC associée à une augmentation de 44% des niveaux d'expression de la protéine ($p < 0,001$). Les cellules de patients présentent aussi une augmentation de 51% des niveaux d'expression mTOR ($p < 0,01$) mais aucun changement dans les niveaux de phosphorylation ($p = 0,19$) pour cette protéine. Dans l'ensemble, nos résultats démontrent une surexpression de la voie d'Akt/mTOR dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.

En résumé, nos résultats démontrent qu'en conditions basales l'activité de l'AMPK est similaire dans les cellules LSFC et les cellules témoins. Ils démontrent en outre une surexpression des voies Akt/mTOR et SIRT1/PGC-1 α dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.

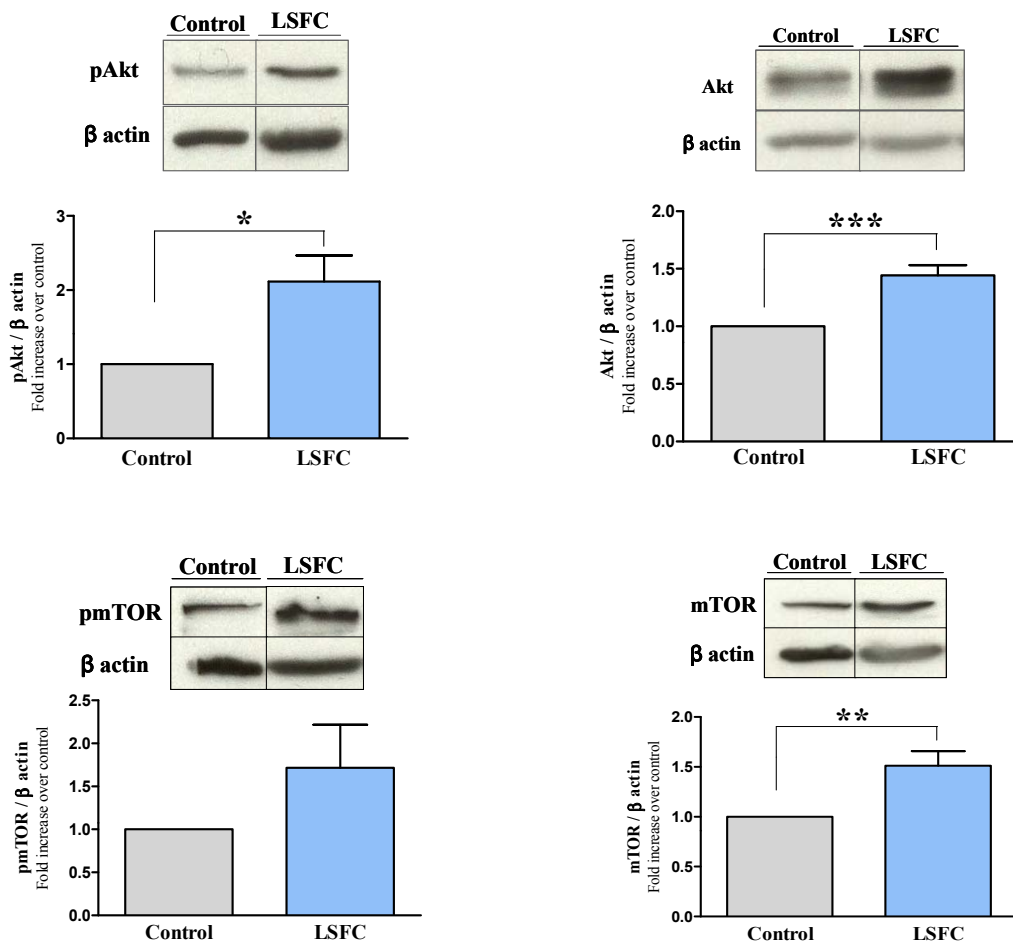


Figure 27. Taux de phosphorylation et d'expression d'Akt et de mTOR dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins.

Les niveaux de phosphorylation et d'expression d'Akt et de mTOR ont été déterminés par immunobuvardage dans des fibroblastes primaires provenant d'un patient témoin et un patient LSFC. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 10 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

III- Caractérisation des voies métaboliques en réponse à un stress

III.1- Traitement avec le DNP

L'absence d'augmentation de l'activité de l'AMPK dans les cellules LSFC nous a conduits à nous demander si la protéine était fonctionnelle dans les cellules LSFC. Les cellules ont donc été traitées avec le DNP pendant 10 min et les niveaux de phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC ont été évalués. Comme illustré à la Figure 28 (p. 69), le DNP augmente les niveaux de phosphorylation de l'AMPK de 81% et de 89% dans les cellules de témoins ($p < 0,05$) et les cellules LSFC ($p < 0,01$) respectivement. Cela s'accompagne d'une augmentation des niveaux de phosphorylation de l'ACC de 74% et de 60% dans les cellules de témoins et les cellules LSFC respectivement (traitement $p < 0,05$). Pris dans l'ensemble, nos résultats démontrent que l'activation de l'AMPK est comparable dans les cellules LSFC et les cellules témoins en réponse au DNP.

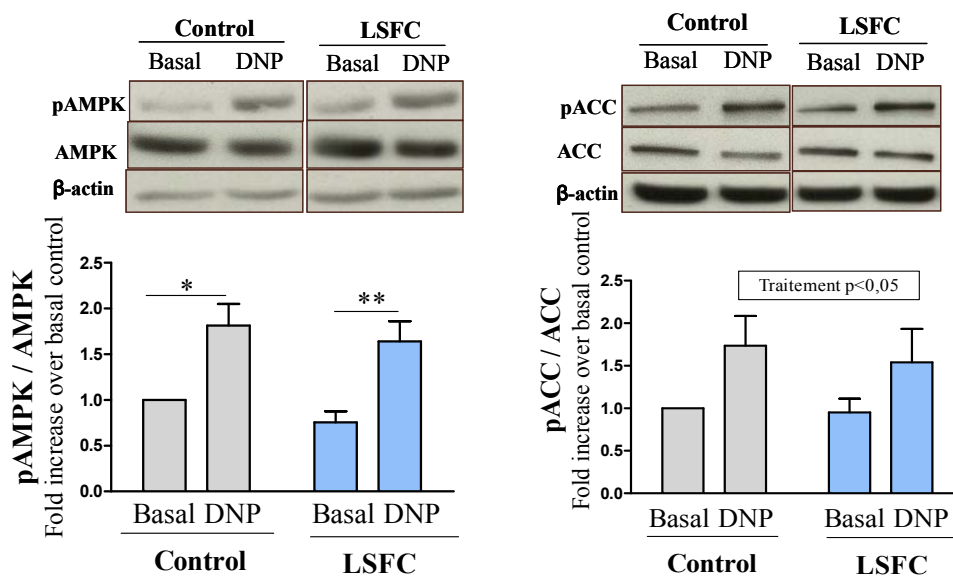


Figure 28. Effet du DNP sur l'activité de l'AMPK. Les cellules ont été stimulées avec 0,1 mM de DNP ou le véhicule pendant 10 min. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 5 expériences. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Effet traitement $p < 0,05$.

III.2- Traitement avec le LP et le ZMP

Une partie des cellules ont été prétraitées avec 0,5mM de ZMP ou son véhicule pendant 48h. Les cellules ont ensuite été traitées avec une combinaison de 10 mM lactate/ 1 mM palmitate (LP) ou son véhicule pendant 4h. Les résultats qui correspondent à une variation de moins de 20%, aussi bien dans les cellules témoins que les cellules LSFC, par rapport au traitement ne seront pas présentés. Cela concerne notamment l'expression de la PFK2.

II.2.1- Activité de l'AMPK

Dans les cellules témoins, le traitement LP augmente significativement les niveaux de phosphorylation de l'AMPK de 90% ($p<0,01$) et tend à augmenter les niveaux de phosphorylation de l'ACC de 154% ($p=0,06$). Nous avons aussi examiné l'effet du prétraitement au ZMP sur la réponse des cellules au LP. Comme illustré à la Figure 29 (p.71), les niveaux de phosphorylation de l'AMPK en réponse au LP ne sont pas affectés par le prétraitement au ZMP. Par contre, ce prétraitement augmente de 364% ($p<0,001$) les niveaux de phosphorylation de l'ACC en réponse au LP. Contrairement aux cellules témoins, le traitement avec le LP ou ZMP+LP ne change pas les niveaux de phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC dans les cellules LSFC. Pris dans l'ensemble, nos résultats démontrent que le LP stimule la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC dans les cellules témoins. De plus, un prétraitement au ZMP potentialise l'effet du LP sur la phosphorylation de l'ACC dans les cellules témoins. Ces effets sont complètement abolis dans les cellules LSFC.

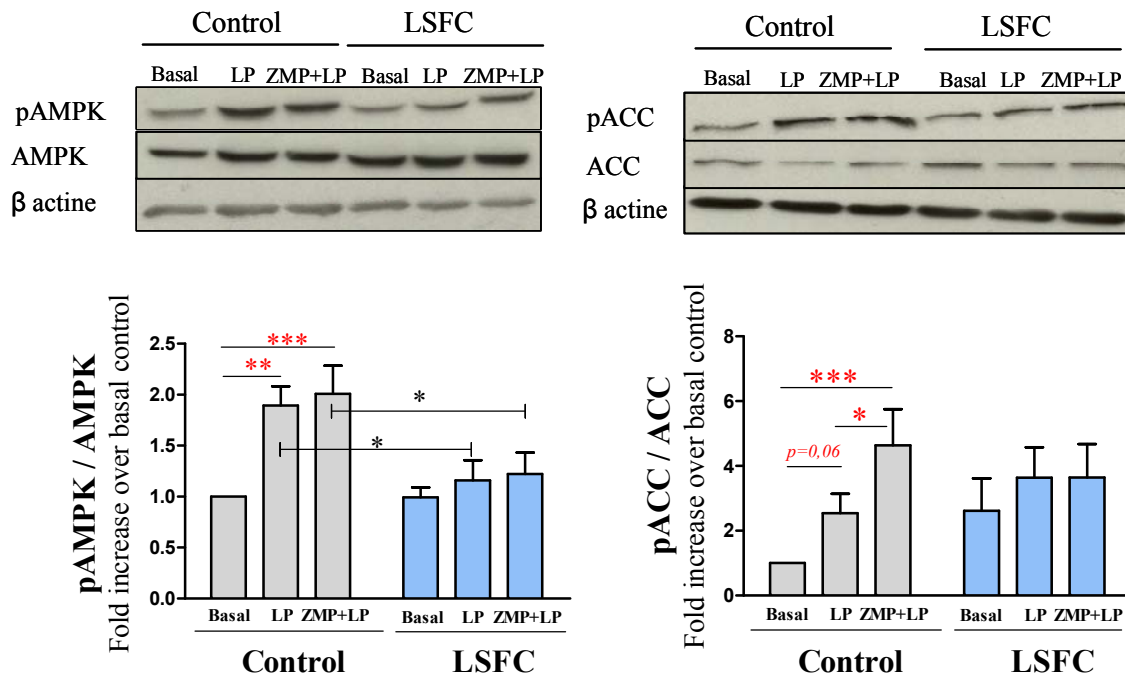


Figure 29. Effet du LP et du ZMP sur l'activité de l'AMPK. Les cellules ont été incubées avec 0,5 mM de ZMP ou le véhicule pendant 48h. Les cellules ont ensuite été incubées avec une combinaison de 1mM de palmitate complexé à 1,33% d'albumine et 10mM de lactate ou un milieu contenant le véhicule pendant 4h. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

II.2.2- Activité de la p38MAPK

Comme illustré à la Figure 30 (p. 72), il n'y a pas de changement significatif de la phosphorylation de la p38MAPK en réponse au LP ou au LP+ZMP. Dans les cellules LSFC, ni le LP ni le ZMP n'a d'effet sur les niveaux de p38MAPK phosphorylé mais il est important de noter que les niveaux de phosphorylation de p38MAPK étaient déjà élevés en conditions basales ($\uparrow 40\%$, $p=0,045$).

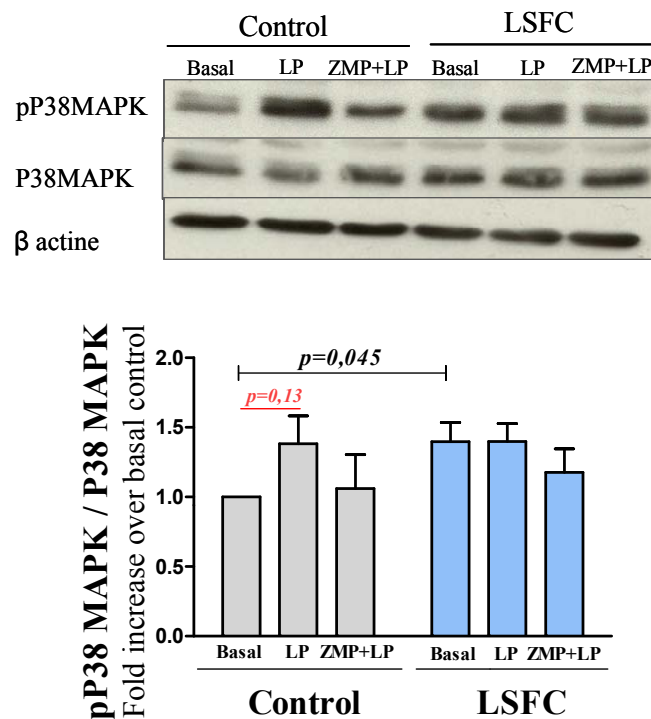


Figure 30. Effet du LP et du ZMP sur la phosphorylation de P38MAPK. Les cellules ont été incubées avec 0,5 mM de ZMP ou le véhicule pendant 48h. Les cellules ont ensuite été incubées avec une combinaison de 1mM de palmitate complexé à 1,33% d'albumine et 10mM de lactate ou dans milieu contenant le véhicule pendant 4h. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$.

II.2.3 Activité des protéines impliquées dans la survie et de la croissance cellulaire

Dans les cellules témoins, le LP n'a aucun effet significatif sur les niveaux d'expression ($p=0,3$) et de phosphorylation ($p=0,2$) d'Akt. Par contre, la combinaison ZMP+LP augmente les niveaux d'expression d'Akt de 46% ($p<0,05$) et tend à diminuer la phosphorylation d'Akt de 42% ($p=0,099$) comparativement au traitement avec le LP seul (Figure 31, p. 73).

Comme décrit précédemment, dans les cellules LSFC les niveaux de base de phosphorylation et d'expression d'Akt sont élevés ($\uparrow 175\%$ pAkt, $p<0,05$ et $\uparrow 34\%$ Akt, $p=0,056$) par rapport aux niveaux de base des cellules témoins. Le LP n'affecte pas les niveaux d'expression ($p=0,7$) et de phosphorylation de cette enzyme ($p=0,8$). La combinaison ZMP+LP n'a pas d'effet sur l'expression d'Akt mais comme observé dans les cellules témoins, ZMP+LP diminue de 69% ($p<0,05$) la phosphorylation d'Akt par rapport au traitement LP (Figure 31, p. 73).

Aucun changement significatif n'a été observé au niveau de l'expression et de la phosphorylation de mTOR en réponse au traitement LP ou ZMP+LP (Figure 31, p. 73).

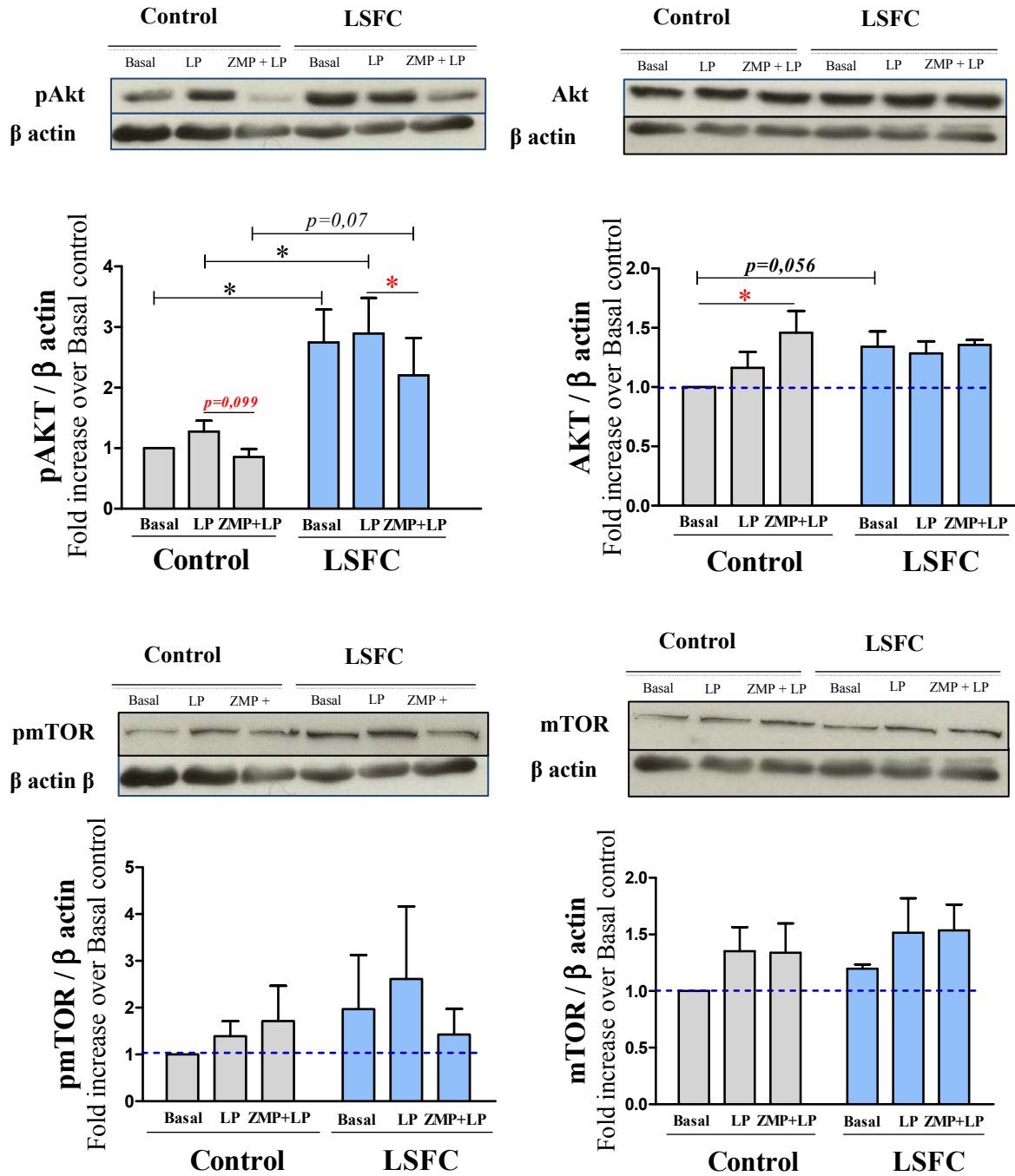


Figure 31. Effet du LP et du ZMP sur la voie Akt/mTOR. Les cellules ont été incubées avec 0,5 mM de ZMP ou le véhicule pendant 48h. Les cellules ont ensuite été incubées avec une combinaison de 1mM de palmitate complexé à 1,33% d'albumine et 10mM de lactate ou dans un milieu contenant le véhicule pendant 4h. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$.

II.2.4- Activité des protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale

Dans les cellules témoins, le LP tend à augmenter les niveaux de phosphorylation de SIRT1 ($\uparrow 79\%$, $p=0,07$) alors que le traitement ZMP+LP augmente significativement de 120% ($p<0,05$) les niveaux de phosphorylation de SIRT1. Les niveaux d'expression de SIRT1 sont significativement augmentés de 57 % ($p<0,05$) en réponse au LP et de 75% ($p<0,01$) en réponse au traitement ZMP+LP. Ces effets sont abolis dans les cellules LSFC (Figure 32, p.75). Par contre, comme décrit précédemment, les cellules LSFC présentent une augmentation des niveaux de base de SIRT1 phosphorylée ($\uparrow 166\%$, $p<0,05$) et une tendance pour les niveaux d'expression de SIRT1 ($\uparrow 60\%$, $p=0,07$).

Dans les cellules témoins, le LP tend à augmenter les niveaux d'expression de PGC-1 α de 19%, comparativement aux conditions de base. Ils sont augmentés de 44% en réponse au traitement ZMP+LP. Dans les cellules LSFC, le LP n'a pas d'effet sur l'expression de PGC-1 α et ce dernier ne varie pas non plus en fonction d'un prétraitement au ZMP (Figure 32, p.75). Par contre, il est à noter que le nombre d'expérience est limité pour cette mesure.

Nos résultats appuient une augmentation à tendance significative de l'expression de la voie de la biogenèse mitochondriale dans les cellules de témoins en réponse au LP, cette augmentation devient significative dans les cellules prétraitées au ZMP. Cet effet est aboli dans les cellules LSFC.

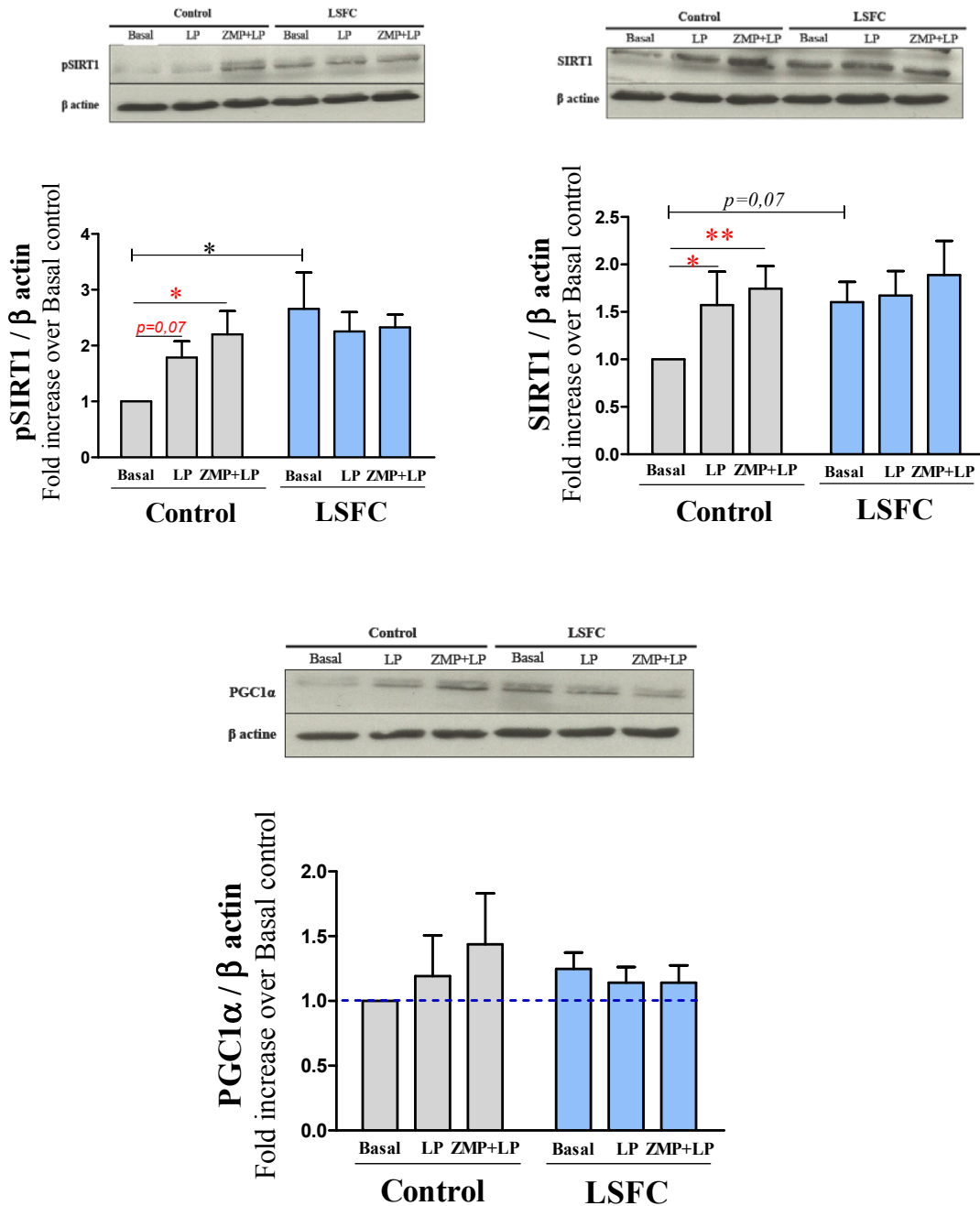


Figure 32. Effet du LP et du ZMP sur la voie SIRT1/PGC-1 α . Les cellules ont été incubées avec 0,5 mM de ZMP ou le véhicule pendant 48h. Les cellules ont ensuite été incubées avec une combinaison de 1 mM de palmitate complexé à 1,33% d'albumine et 10 mM de lactate ou dans un milieu contenant le véhicule pendant 4h. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes pour l'expression protéique de SIRT1 et de 3 expériences indépendantes pour l'expression de PGC-1 α . * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Nous avons évalué l'expression de LRPPRC et de COXIV en réponse à ces traitements. Comparativement aux conditions de base, le LP seul augmente de 23% ($p=0,045$) et de 19% ($p<0,05$) les niveaux d'expression LRPPRC et de COXIV respectivement, dans les cellules témoins. Le traitement ZMP+LP augmente significativement de 63% ($p<0,001$) et de 38% ($p<0,001$) les niveaux de d'expression de LRPPRC et de COXIV respectivement, comparativement aux conditions de base (Figure 33, p. 77). Dans les cellules LSFC, tous ces effets sont abolis. En résumé, nos résultats démontrent une augmentation de l'expression des protéines mitochondriales en réponse au LP dans les cellules de témoins. Un effet additif est observé lorsque les cellules sont prétraitées avec du ZMP. Ces effets sont abolis dans les cellules LSFC.

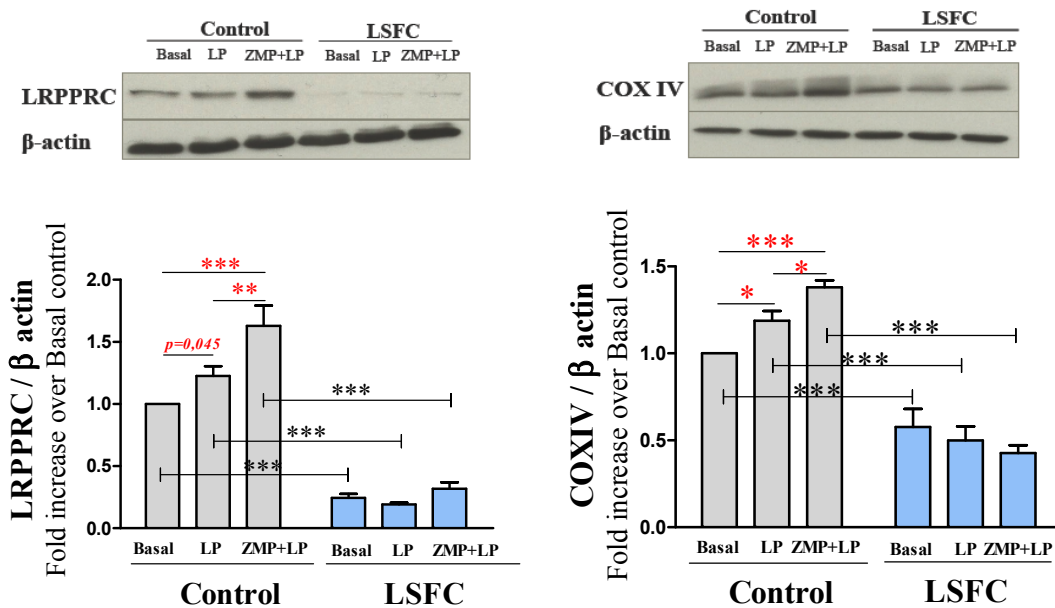


Figure 33. Effet du LP et du ZMP sur l'expression protéique de LRPPRC et de COXIV

Les cellules ont été incubées avec 0,5 mM de ZMP ou le véhicule pendant 48h. Les cellules ont ensuite été incubées avec une combinaison de 1 mM de palmitate complexé à 1,33% d'albumine et 10 mM de lactate ou dans un milieu contenant le véhicule pendant 4h. Les résultats représentent une moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes et sont considérés significatifs pour un $p<0,05$. ** $p<0,01$ *** $p<0,001$

Discussion

Discussion

Le LSFC est une maladie mitochondriale rare et, jusqu'à présent, orpheline. Tel que mentionné précédemment, plus de 80% des enfants atteints meurent en bas âge suite à des crises d'acidose lactique. Ces crises sont souvent associées à un changement dans l'homéostasie énergétique tel que l'effort physique, le choc émotionnel, l'infection ou encore un changement dans l'apport nutritionnel (43, 44). Le LSFC est une maladie qui a été très peu étudiée jusqu'à présent. Par conséquent, les mécanismes impliqués dans la physiopathologie et l'apparition de ces crises sont encore largement inconnus. Néanmoins, les rares études qui portent sur la maladie ont démontré que la mutation du gène *lrpprc* est associée à une déficience tissu-spécifique du complexe IV de la chaîne respiratoire (57, 58). Comme toutes les maladies mitochondriales, le LSFC est caractérisé par une importante dysfonction mitochondriale (60) entraînant plusieurs altérations métaboliques, incluant une probable diminution de la capacité de production d'ATP par la phosphorylation oxydative (7). Certains mécanismes de compensation face à ce déficit énergétique, ont été observés dans d'autres maladies mitochondriales, dont l'activation de la voie de l'AMPK (62, 63, 64, 187). De plus, les rôles de cette enzyme dans le maintien de l'homéostasie énergétique lui confèrent un intérêt particulier comme cible thérapeutique dans les maladies mitochondriales (68, 69, 70). Ainsi, dans une maladie comme le LSFC où aucune piste mécanistique n'a encore été explorée, caractériser la voie de l'AMPK nous semblait une étape importante. L'enjeu ici étant de comprendre l'effet de la mutation du gène *lrpprc* sur la régulation du métabolisme énergétique et déceler les voies de signalisation qui seraient potentiellement altérées dans les cellules LSFC.

Bien que les fibroblastes de peau ne soient pas le meilleur modèle pour l'étude du métabolisme énergétique, les résultats de la présente étude donnent des pistes mécanistiques intéressantes qui sont discutées ci après. Ces pistes pourront servir de base pour une étude approfondie de la régulation du métabolisme énergétique chez les patients LSFC ou dans un modèle de souris, lorsque celui-ci sera disponible.

Conditions de base. Notre hypothèse de départ suggérait que la mutation du gène *lrpprc* et la déficience en COX dans les fibroblastes LSFC auraient pour conséquence une diminution des niveaux d'ATP et donc une augmentation de l'activité de l'AMPK. Nos résultats réfutent cette hypothèse et démontrent que dans les conditions expérimentales étudiées, l'activité de l'AMPK est similaire dans les cellules LSFC et les cellules témoins. Ceci est en accord avec une étude récente dans notre laboratoire, qui démontre que, dans les conditions basales, les cellules LSFC ont des niveaux d'ATP similaires aux cellules témoins (59). Mais si l'activité de l'AMPK n'est pas augmentée dans les cellules LSFC, quel mécanisme métabolique compense-t-il le déficit de la production d'énergie dans ces cellules ?

Il a été récemment suggéré que les cellules ayant une dysfonction mitochondriale puissent compenser la diminution de la production d'énergie par la mitochondrie en augmentant la production d'ATP par la glycolyse (193). Cette adaptation est notamment retrouvée dans les cellules de type cancéreuses. Ces dernières consomment beaucoup de glucose comparativement aux cellules normales et celui-ci est converti à plus de 90% en lactate, indépendamment des conditions d'aérobie. Ce phénomène, appelé « effet Warburg », a été décrit pour la première fois dans les cellules tumorales par Otto Warburg dans les années 1920 (194). Plusieurs années plus tard, ce chercheur a émis l'hypothèse que l'augmentation de la glycolyse est probablement un mécanisme de compensation suite à une dysfonction du métabolisme oxydatif (195). Subséquemment, ce phénomène sera aussi rapporté dans des cellules prolifératives sans dysfonction de la phosphorylation oxydative (196). Les cellules prolifératives, telles que les cellules cancéreuses, ont un grand besoin d'ATP, or le taux d'ATP produit par glycolyse est généralement très faible comparativement à celui de la phosphorylation oxydative (197, 198). Selon Warburg, dans ces cellules, le flux glycolytique peut être très augmenté et la quantité d'ATP produite peut dépasser celle issue de la phosphorylation oxydative (195). En plus de fournir l'énergie nécessaire, DeBerardinis et *coll.* ont proposé que pour les cellules sans dysfonction mitochondriale, ce phénomène permettrait de produire des intermédiaires nécessaires à la biosynthèse protéique et lipidique pour leur survie. Quant aux cellules avec une dysfonction mitochondriale, cela constituerait un moyen important de consommer les nutriments extracellulaires et de produire d'ATP indépendamment de la mitochondrie (198).

Dans les maladies mitochondriales, l'existence de l'effet Warburg est corroborée, entre autres, par des taux élevés de lactate (26). D'autres effets retrouvés dans les maladies mitochondriales favoriseraient aussi ce phénomène. Notamment, une des conséquences de la dysfonction de la phosphorylation oxydative est une accumulation cytosolique du succinate et des ROS. Ces derniers induisent la stabilisation du facteur inductible par l'hypoxie (HIF1 α) dans les conditions normoxiques, qui stimule la glycolyse (199, 200). Dans notre étude, quelques éléments viennent aussi appuyer l'existence probable de l'effet Warburg dans les cellules LSFC. Des résultats préliminaires (n=2) suggèrent une augmentation de l'expression protéique d'HIF1 α dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins (Figure 34, p. 81). Le HIF1 α favorise la glycolyse en stimulant l'expression de plusieurs protéines tels que GLUT1 et la phosphofructokinase L (PFKL) (201, 202). Une augmentation de HIF1 α pourrait donc contribuer à une augmentation de la glycolyse. Des expériences supplémentaires pourraient mieux définir la contribution de HIF1 α dans ce processus.

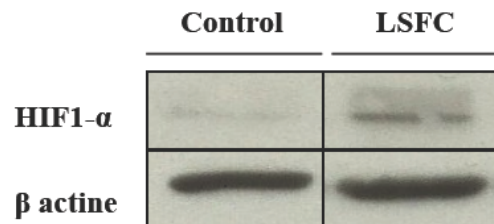


Figure 34. Expression protéique de HIF1- α en conditions basales. (n=2). HIF1- α : facteur inductible par l'hypoxie, LSFC : syndrome de Leigh, type canadien français.

Un autre élément qui soutient une activation de la glycolyse est la surexpression de la voie Akt/mTOR dans les cellules LSFC. En effet, dans les cellules de patients, nous observons une augmentation des niveaux de phosphorylation et d'expression d'Akt, accompagnée d'une augmentation de l'expression de mTOR. La voie Akt/mTOR participe à la régulation de la glycolyse aérobie (effet Warburg) mais aussi de la biosynthèse cellulaire (198). L'Akt stimule la glycolyse via la régulation de la traduction des ARNm de HIF1 α , et la synthèse des lipides via la phosphorylation de l'ATP citrate lyase (203, 204, 205). L'Akt phosphoryle et inhibe aussi la protéine TSC2, permettant l'activation de mTOR. Cette

dernière stimule la synthèse des protéines via notamment la régulation du facteur d'initiation à la traduction 4E (206, 207). Dans l'effet Warburg, les enzymes glycolytiques sont surexprimées pendant que celles favorisant le métabolisme oxydatif mitochondrial, telle que l'AMPK, sont réprimées (198, 208). Ainsi, l'augmentation de l'expression de HIF1 α , de la voie Akt/mTOR dans les cellules LSFC, concorderait avec l'absence d'augmentation de l'activité de l'AMPK. Des expériences supplémentaires, particulièrement la variation du flux glycolytique dans les cellules LSFC, permettraient d'évaluer la contribution de ce processus au maintien des niveaux d'ATP.

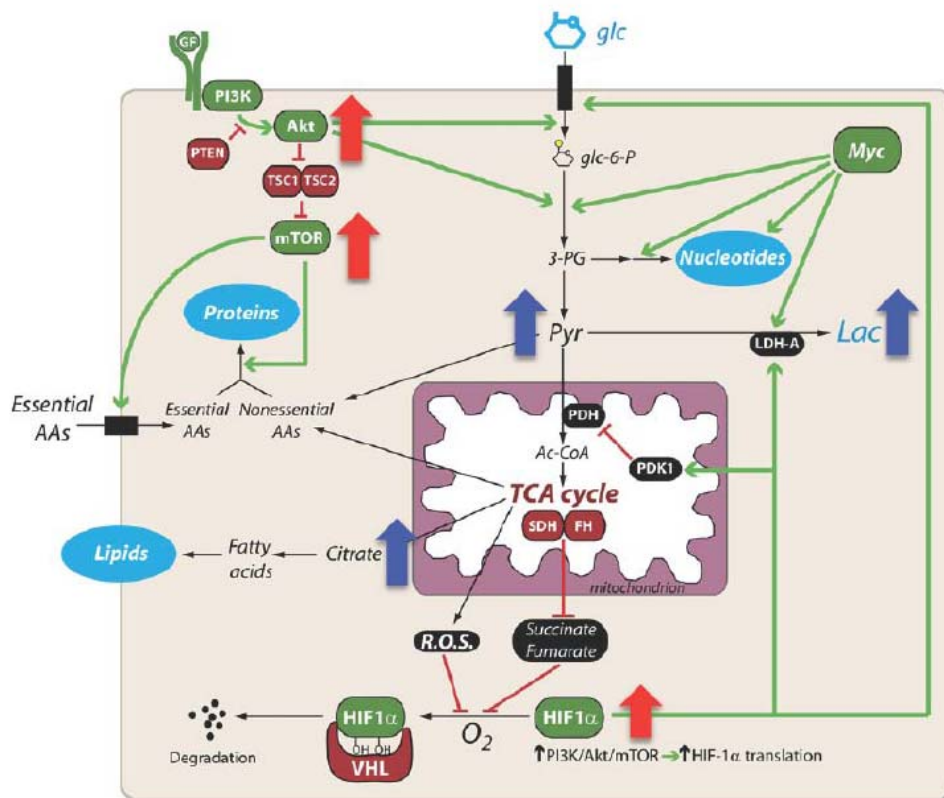


Figure 35. Régulation du métabolisme des cellules en prolifération. Figure adaptée de DeBerardinis R.J. et al. *Cell metab* 7, 11-20. 2008. La figure illustre certaines voies prédominantes dans les cellules prolifératives telles que l'augmentation de la glycolyse, la production de lactate, la synthèse des protéines, des lipides et des nucléotides. Ces voies sont stimulées par la surexpression de la voie PI3K/Akt/mTOR, la surexpression de HIF1- α et de

Myc.↑: Protéines augmentées dans les cellules LSFC et mesurées dans la présente étude. ↑: Métabolites augmentés dans le plasma des patients LSFC et mesurés au cours d'une étude clinique de notre laboratoire. PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase; PTEN : homologue de la phosphatase/tensine; TSC : tuberous sclerosis complex; mTOR : cible mammalienne de la rapamycine; glc-6-P : glucose-6-phosphate; 3-PG : 3-phosphoglycérate; PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1; SDH : succinate déshydrogénase; FH : fumarate hydratase; HIF-1a : facteur inductible par hypoxie 1a; VHL : von Hippel-Lindau.

Un autre mécanisme compensatoire souvent observé dans des modèles de maladies mitochondriales est l'augmentation de la biogenèse mitochondriale (62, 185, 186). Nous avons ainsi examiné certaines protéines clés impliquées dans la régulation de ce processus. Nos résultats démontrent une augmentation significative des niveaux de phosphorylation et d'expression de SIRT1 qui active, par déacétylation, PGC-1 α . On observe aussi une tendance à l'augmentation de l'expression de PGC-1 α ($p=0,08$) dans les cellules LSFC.

L'AMPK régule la biogenèse mitochondriale via la phosphorylation de PGC-1 α et le contrôle de l'activité de SIRT1. Selon ce paradigme, la déacétylation de PGC-1 α par SIRT1 nécessite une phosphorylation préalable par l'AMPK ce qui a pour rôle de stabiliser la protéine afin qu'elle puisse être déacétylé (209). Dans cette optique, l'activation de SIRT1 et l'accumulation de PGC-1 α devraient être proportionnelles à l'augmentation de l'activité de l'AMPK. Or dans notre étude, on observe l'accumulation de PGC-1 α indépendamment de l'augmentation de l'activité de l'AMPK. Bien que surprenant, ceci n'est pas impossible. Premièrement, l'AMPK stimule l'activité de SIRT1 via l'augmentation de NAD⁺, mais cette action n'est pas exclusive à l'activation de cette dernière. En effet, l'étude de Sasaki et *coll.* démontre que l'activité de SIRT1 est également régulée par phosphorylation, notamment par la cycline B/CDK1 (210). D'autre part, SIRT1 est activé en se liant directement à la «protéine nucléaire activatrice de SIRT1» (active regulator of SIRT1 ou AROS) (211). En outre, la régulation de l'activité de SIRT1 implique aussi l'augmentation de son expression par entre autres le complexe p53/FOXO3a (212). Deuxièmement, l'AMPK n'est pas la seule enzyme phosphorylant PGC1 α . L'étude de Puigserver et *coll.* suggère que la p38MAPK phosphoryle PGC-1 α augmentant sa stabilité et son activité (213, 214). D'ailleurs, on peut supposer que

l'augmentation des niveaux de phosphorylation de la p38MAPK ($p=0,09$ Figure 25, p. 64; $p=0,045$ Figure 30, p. 72) contribue à l'accumulation PGC-1 α dans les cellules LSFC. Ainsi, il semble que nos résultats appuient une activation de la voie SIRT1/PGC-1 α indépendamment de l'AMPK (Figure 36, p. 85). Toutefois, il serait important de mesurer les niveaux de phosphorylation et d'acétylation de PGC-1 α pour avoir un meilleur profil d'activité de celui-ci.

L'activation de la voie de SIRT1/ PGC-1 α est en accord avec de nombreuses études sur le vieillissement qui montrent que le nombre de mitochondries et de copies de l'ADNmt est augmenté dans les cellules avec une déficience de la phosphorylation oxydative (215, 216, 217, 218). En effet, les mitochondries anormales sont souvent dégradées par mitophagie (174, 175, 176). L'organisme remplace ces dernières en augmentant la biogenèse mitochondriale. Cette augmentation serait un mécanisme compensatoire qui permettrait à la cellule de maintenir la respiration mitochondriale et une production d'ATP adéquate (219).

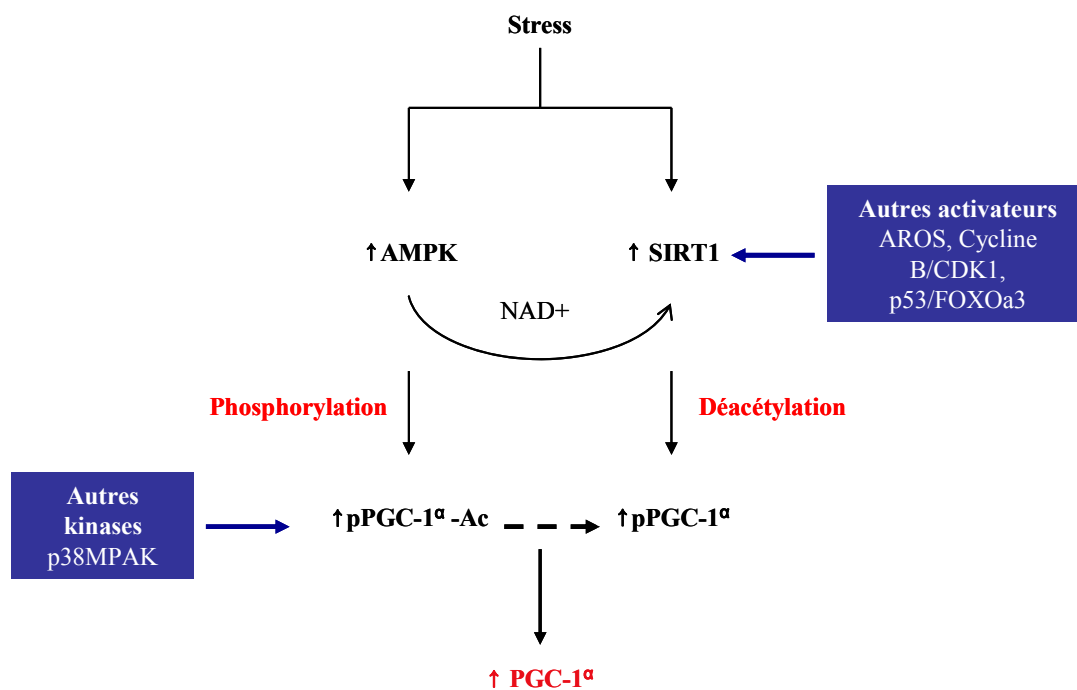


Figure 36. Mécanismes potentiels de régulation de la voie de SIRT1/PGC-1 α . AMPK : protéine kinase activée par l'AMP, SIRT1 : sirtuine 1, NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide, PGC-1 α : co-activateur transcriptionnel 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes, pPGC-1 α -Ac : PGC-1 α phosphorylé et acétylé, pPGC-1 α : PGC-1 α phosphorylé et déacétylé.

Comme discuté précédemment, la p38MAPK est une protéine qui joue un rôle dans plusieurs processus biologiques incluant le transport du glucose, l'inflammation, la croissance, la différenciation, le cycle et la mort cellulaire (123, 124). Dans notre étude, nous avons évalué la p38MAPK comme une des cibles de l'AMPK. Rappelons que ces deux protéines agissent en synergie pour stimuler le transport du glucose dans des situations de stress énergétique comme l'exercice physique. L'inhibition de l'un bloque l'action de l'autre sur le transport du glucose (127, 128, 129). On observe une augmentation à tendance significative des niveaux de phosphorylation de la p38MAPK dans les cellules LSFC comparativement aux témoins en conditions basales ($p=0,09$ Figure 25, p. 64; $p=0,045$ Figure

30, p. 72). En l'absence d'augmentation de l'activité de l'AMPK, nos résultats suggèrent que la phosphorylation de la p38MAPK soit indépendante de l'AMPK, et son rôle dans le transport du glucose semble moins privilégié. Cette augmentation de la phosphorylation de la p38MAPK peut donc se traduire par plusieurs autres conclusions. La p38MAPK est activée par le stress et les cytokines, et l'un de ces principaux rôles le mieux documenté est celui de marqueur inflammatoire (123). Ainsi on peut émettre l'hypothèse qu'il y aurait une activation de l'état inflammatoire dans les cellules LSFC. Cependant jusqu'à présent, nous ne disposons pas de données suffisantes chez les patients pour appuyer cette hypothèse. Des expériences supplémentaires visant à évaluer d'autres protéines cibles impliquées dans ce processus nous permettraient de tirer des conclusions plus concrètes sur le rôle de la p38MAPK.

Pour résumer, nos résultats suggèrent qu'en conditions basales les cellules LSFC seraient dans une phase de prolifération mitochondriale probablement pour remplacer les mitochondries déficientes. De plus, pour palier le déficit énergétique ces cellules augmentent la glycolyse aérobie via Akt/mTOR et HIF1 α . Cela concorde avec l'absence d'activation de l'AMPK.

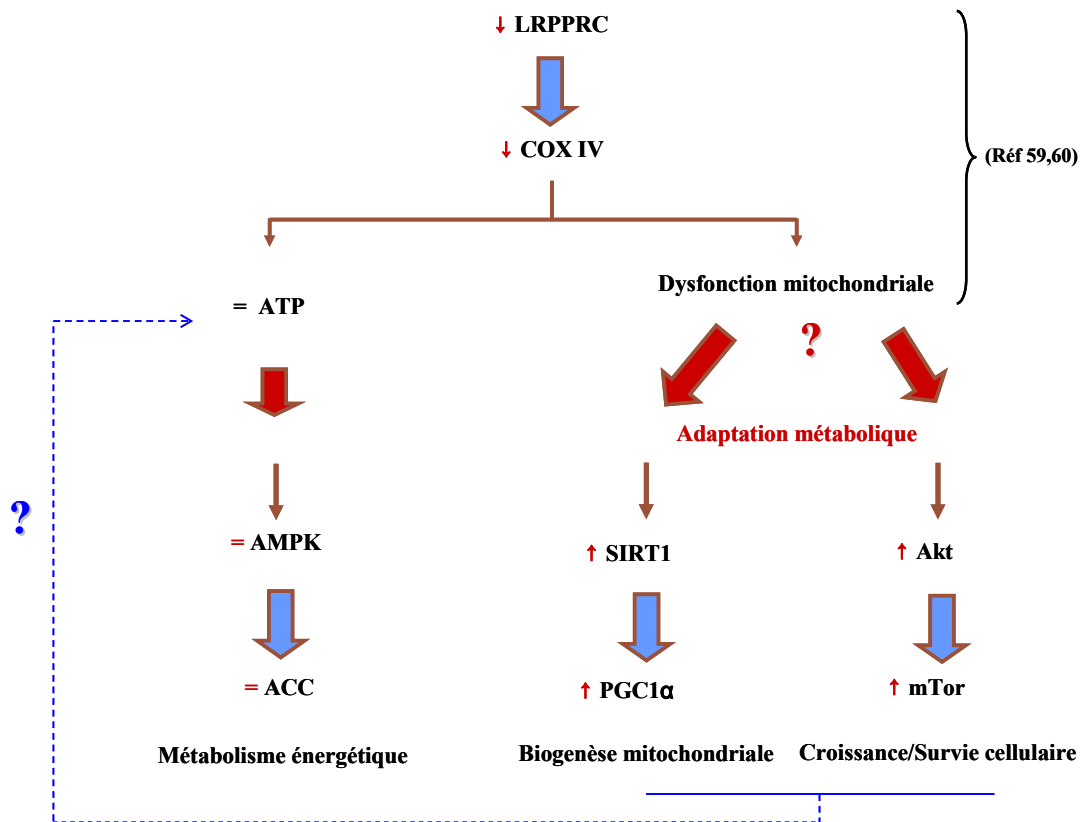


Figure 37. Récapitulatif : Métabolisme de base des cellules LSFC

En conditions basales, les cellules LSFC démontrent une diminution des niveaux protéiques de LRPPRC et de COX et cette déficience entraîne une importante dysfonction mitochondriale. Malgré cela, les cellules LSFC exhibent des niveaux d'ATP normaux (59,60). Nos résultats démontrent que, dans les cellules LSFC, l'activité de l'AMPK n'est pas plus augmentée que la normale. Par ailleurs, on observe une surexpression des voies de la biogenèse mitochondriale et de la croissance et la survie cellulaire, tel un probable mécanisme de compensation à la dysfonction mitochondriale pour rétablir le déficit énergétique. LRPPRC : leucine-rich PPR-motif containing protein, COX IV : sous-unité IV de la cytochrome c oxydase, ATP : adénosine triphosphate, AMPK : protéine kinase activée par AMP, ACC : acétyl CoA carboxylase, SIRT1 : sirtuine 1, PGC- 1 α : co-activateur transcriptionnel 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes, Akt : protéine kinase B, mTOR : mammalian target of rapamycin.

Conditions de stress. L'enquête faite auprès des parents (44) a permis d'émettre l'hypothèse que les crises apparaissent dans des conditions de stress (infection, exercice physique, etc.). Par conséquent, il nous semblait logique de caractériser la voie de l'AMPK dans ces conditions.

DNP

Le DNP est un élément liposoluble capable de traverser les membranes biologiques (95). Dans la mitochondrie, ce dernier transporte des protons au travers de la membrane interne, et induit un découplage de la chaîne respiratoire entraînant la diminution du gradient électrochimique (95). Cela a pour conséquence une diminution de la synthèse d'énergie sous forme d'ATP et une activation de l'AMPK (220, 221). Le DNP a longtemps été utilisé en clinique pour traiter l'obésité car son rôle de découpleur de la phosphorylation oxydative entraîne une augmentation du métabolisme des glucides et des lipides résultant en une perte de poids. Il a été retiré du marché lorsque des études ont révélé qu'une surdose chronique de ce médicament induisait la mort (95). Aujourd'hui, le DNP est utilisé en recherche mais sous restrictions.

Nos résultats démontrent que le DNP active l'AMPK aussi bien dans les cellules LSFC que les cellules témoins. Ces résultats démontrent que l'AMPK est activable dans les cellules LSFC en réponse à une diminution des niveaux d'ATP. Cela suggère que l'absence d'activation de l'AMPK dans les cellules de patients en conditions basales est probablement due à des niveaux d'ATP normaux (59). L'augmentation de la glycolyse aérobie pourrait contribuer à cette normalisation des niveaux d'ATP. Des expériences complémentaires nous permettront de confirmer cette hypothèse. Notamment, une inhibition spécifique de la voie Akt/mTOR par la rampamycine par exemple, dans les cellules de patients nous donnerait une idée plus claire sur la contribution de cette voie à la normalisation des niveaux d'ATP.

LP et ZMP

Au repos chez un sujet sain, le taux de lactatémie varie de 0,8 à 2 mM (222). Chez les patients LSFC ce taux peut atteindre 12 à 26 mM au cours d'une crise (43, 44). Cependant, il existe des situations physiologiques tel que l'exercice physique, où ce taux peut atteindre 20 mM (223). Ainsi, une concentration de 10 mM de lactate n'est pas forcément considérée

comme toxique. D'ailleurs, à cette concentration, le lactate seul n'induit pas de mort cellulaire dans les cellules LSFC (59). Par contre, il augmente l'effet du palmitate sur la nécrose et l'apoptose (59). Rivard et *coll.* proposent que le lactate exacerbe les effets délétères du palmitate notamment en favorisant l'accumulation des acyls-CoA pouvant induire une lipotoxicité (résultats non publiés). À ce propos, d'après l'étude clinique de Thompson et *coll.*, on observe une accumulation des acyl carnitines dans le plasma des patients LSFC à jeun (résultats non publiés/communication personnelle). Dans la présente étude, nous discuterons particulièrement des effets du palmitate sur l'activité de l'AMPK et sur l'expression protéique des différents marqueurs des voies métaboliques.

Le palmitate est l'acide gras saturé le plus abondant chez l'homme. À lui seul, il représente 28% des acides gras libres présents dans le plasma (189). On le retrouve dans les conditions physiologiques à jeun au repos, à des concentrations entre 100-500 μ M (189). Ces concentrations peuvent atteindre 500-1000 μ M lors d'un exercice physique prolongé (189). Dans les conditions pathologiques telles que l'obésité et le diabète de type 2, ces concentrations fluctuent entre 600 et 900 μ M (189). La concentration de 1000 μ M, environ 2 à 10 fois supérieures aux conditions physiologiques au repos, utilisée dans la présente étude se rapproche donc des concentrations retrouvées chez un patient diabétique.

Effet du LP et du ZMP sur l'activité de l'AMPK et de l'ACC

Un excès chronique d'acides gras libres, notamment en palmitate, est associé à plusieurs effets délétères incluant le stress du réticulum endoplasmique, l'inflammation, et l'insulinorésistance (224, 225, 226). L'activation de l'AMPK, quant à elle, est associée à plusieurs effets protecteurs incluant l'inhibition du stress oxydatif, de l'inflammation ainsi qu'une amélioration de la résistance à l'insuline (227). Plusieurs études démontrent, que l'activité de l'AMPK est inhibée dans les cellules incubées avec un excès de palmitate alors que d'autres démontrent que la stimulation pharmacologique de l'activité de l'AMPK atténue les effets délétères du palmitate (224, 225, 226, 227). Cependant, les effets du palmitate sur l'activité de l'AMPK varient considérablement dépendamment du temps d'exposition et/ou des niveaux de palmitate. En général, une exposition chronique au palmitate est associée à

une inhibition de l'activité de l'AMPK alors qu'une exposition à court terme stimule l'activité de cette enzyme (228, 229).

Nos résultats démontrent qu'une incubation de 4h avec le LP est associée à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK, de même que celle de son substrat l'ACC dans les cellules de témoins. À ma connaissance, aucune donnée n'existe sur l'activation de l'AMPK par le lactate. Par contre, plusieurs données de la littérature affirment qu'à court terme, l'excès d'acides gras libres active l'AMPK, inhibe l'ACC, augmentant ainsi la β oxydation (228, 229). On retrouve ici l'idée de base de l'hypothèse de Randle qui stipule que l'augmentation de la disponibilité des acides gras libres stimule leur β oxydation (230). On peut ainsi émettre l'hypothèse que dans les cellules de témoins, les concentrations élevées de palmitate augmentent aussi la β -oxydation. Cette hypothèse concorderait avec des résultats de notre laboratoire (59) qui démontrent une augmentation des niveaux d'ATP dans les cellules de témoins en réponse à une incubation de 4 h avec le LP. On peut supposer que les concentrations élevées du palmitate en stimulant la β oxydation génèreraient en aval une augmentation de coenzymes réduits nécessaires pour la phosphorylation oxydative. Cela conduirait, in fine, à une augmentation de la synthèse d'ATP. Des expériences complémentaires, incluant la mesure directe de ce processus, nous permettraient de confirmer cette hypothèse.

Bien que plusieurs études s'accordent pour dire qu'à court terme le palmitate active l'AMPK, les mécanismes par lesquels le palmitate active cette dernière sont encore controversés. Plusieurs hypothèses ont été proposées. En 2002, Kawaguchi et *coll.* ont proposé que les acides gras activent l'AMPK via l'augmentation des niveaux de l'AMP (231). Selon ce concept, l'activation des acides gras libres à longue chaîne consommerait beaucoup d'ATP pour leur entrée dans la mitochondrie, résultant en une augmentation des niveaux d'AMP. À l'opposé, l'étude de Watt et *coll.* (228) soutient l'hypothèse que les acides gras libres activent l'AMPK indépendamment des niveaux d'AMP. Ces derniers suggèrent que les acides gras, en se liant directement à la sous-unité β ou γ de l'AMPK, favoriseraient la phosphorylation de celui-ci par LKB1 et donc son activation. Puisqu'on observe une augmentation significative des niveaux d'ATP dans nos cellules de témoins (59), la deuxième hypothèse semble la plus plausible.

Comme cité précédemment, les niveaux élevés de palmitate sont chroniquement toxiques. Ils sont associés *in vivo* à des maladies métaboliques et *in vitro* à une augmentation de la mort cellulaire (225, 226). L'activation à court terme de l'AMPK par le palmitate permet l'utilisation d'une plus grande quantité de substrats et pourrait constituer une tentative de protection de la cellule pour éviter une accumulation des lipides.

De manière surprenante, les effets à court terme du palmitate sur l'activité de l'AMPK et celle de l'ACC décrits précédemment sont abolis dans les cellules LSFC. La raison pour laquelle l'AMPK des cellules LSFC est activable par le DNP mais pas par le palmitate devra être clarifiée par des expériences supplémentaires. Cependant, on peut émettre certaines hypothèses. Notamment, rappelons que la mutation du gène *lrpprc* entraîne une dysfonction mitochondriale et que la chaîne respiratoire des fibroblastes LSFC fonctionne seulement à 50% de son activité normale (43, 60). Il est très probable que la capacité à oxyder les acides gras soit très limitée dans les fibroblastes LSFC. Dans ce cas, les niveaux élevés de palmitate pourraient entraîner une accumulation en amont de métabolites toxiques comme les céramides. Ces derniers sont des activateurs des phosphatases PP2A, des enzymes impliquées dans la déphosphorylation et l'inactivation de l'AMPK (232). Une activation de ces phosphates pourrait potentiellement prévenir l'activation de l'AMPK.

De façon intéressante, nos résultats démontrent que le prétraitement des cellules avec le ZMP a un effet additif sur la phosphorylation de l'ACC induite par le LP dans les cellules témoins. Ces résultats sont en accord avec la littérature (233, 234) et l'étude de Fillimore et *coll.* qui démontre qu'une activation chronique de l'AMPK, associée à une augmentation des acides gras libres, a un effet additif sur plusieurs processus du métabolisme incluant l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la β -oxydation (235). La présence d'un effet additif suggère qu'il puisse exister deux voies parallèles pouvant augmenter la phosphorylation de l'ACC. En premier lieu, le ZMP est un activateur direct de l'AMPK et donc une activation de cette enzyme provoquerait la phosphorylation de l'ACC. Deuxièmement, il a été démontré que les acides gras libres sont des régulateurs allostériques de l'ACC favorisant sa phosphorylation par l'AMPK (236, 237). Dans les cellules LSFC, cet effet additif du prétraitement avec le ZMP est absent. Cependant,

il est important de rappeler que le LP ne semble pas stimuler la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC dans les cellules LSFC.

Effet du LP et du ZMP sur la voie Akt/mTOR

La voie Akt est impliquée dans plusieurs processus physiologiques. Elle régule notamment la croissance cellulaire via son action sur la protéine mTOR. La protéine Akt est aussi un important régulateur de la sensibilité à l'insuline ainsi que toutes les voies métaboliques liées à celui-ci notamment la captation du glucose et la synthèse des lipides et des protéines. Ainsi, la dérégulation de l'Akt est associée à diverses maladies incluant le cancer, le diabète et les maladies neurologiques (238, 239, 240).

La relation entre les acides gras libres et la voie de l'Akt a été particulièrement étudiée dans le cadre de la sensibilité à l'insuline. Il a été rapporté qu'une exposition chronique aux acides gras libres, tel que le palmitate, est associée au développement de la résistance à l'insuline via, entre autres, l'inhibition de l'activité de l'Akt (241). Par contre, les effets à court terme du palmitate sur la voie Akt ont été rarement documentés. L'étude de Pu et coll. suggère qu'une exposition aiguë au palmitate puisse contribuer à la captation du glucose via l'activation de l'Akt. Le palmitate en se liant à la membrane plasmique, induirait la captation du glucose en favorisant la translocation du transporteur GLUT4. Selon cet auteur, le palmitate active Akt via l'activation de l'AMPK jusqu'à une incubation maximale de 3h. Ces effets stimulateurs du palmitate sur la voie AMPK/Akt s'estompent avec le temps (242, 243). En accord avec ce dernier, dans notre étude on n'observe pas d'activation de l'Akt en réponse à une incubation de 4h avec le LP, aussi bien dans les cellules de témoins que dans les cellules LSFC.

De façon intéressante, la combinaison ZMP+LP diminue les niveaux de phosphorylation de l'Akt alors qu'elle augmente significativement son expression totale dans les cellules de témoins. Dans les cellules LSFC, le ZMP+LP diminue aussi les niveaux de phosphorylation de l'Akt mais l'expression totale reste inchangée. Durant les dernières années, des études ont proposé que dans certaines situations, l'AMPK stimulerait la phosphorylation de l'Akt notamment sur le résidu serine 473 (238, 244, 245). Cela servirait de médiateur dans son rôle anti-inflammatoire, puisque la voie PIK3/Akt régule aussi la production des cytokines anti-inflammatoires comme IL10 (246). Si on considère que le ZMP

active l'AMPK, on se serait attendu que ce dernier induise la phosphorylation ser473 de l'Akt en réponse à un excès d'acides gras libres pour atténuer leurs effets inflammatoires (247). On peut supposer que le rôle inhibiteur de l'AMPK sur la voie anabolique de croissance cellulaire Akt/mTOR prime dans nos conditions d'étude.

Effet du LP et du ZMP sur la voie SIRT1/PGC-1 α

Parmi les facteurs connus dans la littérature qui stimulent la biogenèse mitochondriale, on retrouve l'activation de l'AMPK et la disponibilité en acides gras libres. Cette situation est retrouvée particulièrement lors d'un exercice physique où l'activation de l'AMPK et l'augmentation des acides gras libres circulants stimulent l'expression de PGC-1 α pour favoriser la β -oxydation mais aussi la biogenèse mitochondriale (248, 249, 250). Dans notre étude, et en accord avec la littérature, l'augmentation de SIRT1, accompagnée d'une augmentation de COXIV, suggère une augmentation de la biogenèse mitochondriale en réponse à des niveaux élevés de palmitate dans les cellules témoins. De même, en accord avec l'étude de Fillimore et *coll.* (235), on observe un effet additif en présence d'un prétraitement chronique avec le ZMP. Toutefois, les mécanismes par lesquels le palmitate active la voie SIRT1/PGC-1 α demeurent à être clarifiés. Il est probable qu'en activant l'AMPK, le palmitate favorise la stimulation de la voie SIRT1/PGC-1 α . Des expériences ultérieures, incluant la mesure des marqueurs directs de la biogenèse mitochondriale, seront effectuées pour confirmer l'augmentation de cette dernière en réponse au LP et au ZMP+LP dans les cellules témoins.

Tous ces effets du LP et de la combinaison ZMP+LP observés dans les cellules de témoins sont abrogés dans les cellules LSFC. Cependant, il est important de rappeler que la voie SIRT1/PGC-1 α est déjà surexprimée dans les cellules LSFC. De façon intéressante, et parallèlement à l'augmentation de la voie SIRT1/PGC-1 α , on observe une augmentation de l'expression protéique de LRPPRC en réponse au LP et au ZMP+LP dans les cellules témoins mais pas dans les cellules LSFC. Selon l'équipe de Spiegelman, LRPPRC serait une cible en aval de PGC-1 α (55). Nos résultats suggèrent ainsi que LRPPRC est requis pour l'augmentation de COX (Figure 38, p. 94). En effet, alors qu'on observe dans les cellules témoins l'augmentation de l'expression de LRPPRC et de COXIV proportionnellement à

l'activation de la voie SIRT1/PGC-1 α , aucun changement dans l'expression de LRPPRC et de COXIV n'a été observé dans les cellules de patients LSFC.

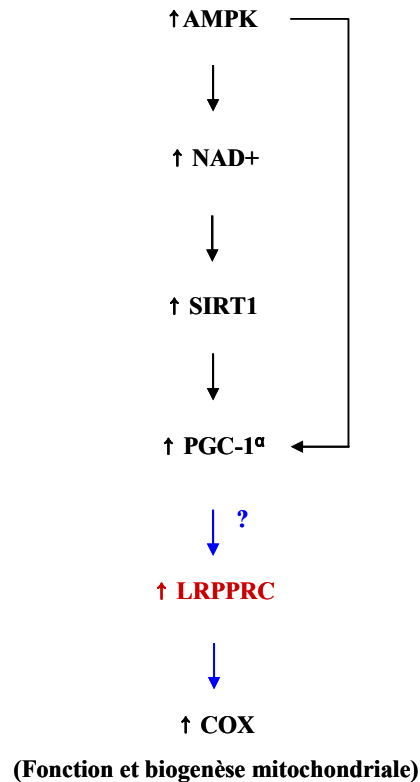


Figure 38. Mécanisme potentiel de régulation de la biogenèse mitochondriale par la voie AMPK/SIRT1/PGC-1 α . AMPK : protéine kinase activée par AMPK, NAD⁺ : nicotinamide adenine dinucléotide, SIRT1 : sirtuine1, PGC-1 α : co-activateur transcriptionnel 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes, LRPPRC : leucine-rich PPR-motif containing protein, COX : cytochrome c oxydase.

Pour résumer, nos résultats démontrent que l'AMPK des cellules LSFC est activable en réponse à un déficit des niveaux d'ATP. Cependant, l'AMPK n'est pas activée à court terme, en présence des niveaux élevés de palmitate et tous les marqueurs des voies métaboliques incluant la β -oxydation et la biogenèse mitochondriale, semblent altérées dans les cellules LSFC.

Conclusion

Conclusion

Le LSFC fait partie des 5 maladies récessives les plus rencontrées au Saguenay-Lac-St-Jean où elle est considérée comme un problème de santé publique, notamment de part son caractère incurable. La compréhension des mécanismes physiopathologiques pourrait permettre de découvrir d'éventuelles cibles thérapeutiques.

La mutation du gène *lrpprc* est associée à une diminution de 50% de l'activité de COX dans les fibroblastes de patients LSFC (43, 44), ce qui prédit l'existence d'un stress énergétique. Nos résultats suggèrent que la voie de l'AMPK ne constitue pas le mécanisme de compensation utilisé dans les fibroblastes LSFC pour maintenir les niveaux d'ATP dans les conditions basales. D'autres mécanismes semblent être privilégiés par les cellules LSFC. En l'occurrence, nos résultats démontrent une surexpression des voies SIRT1/PGC-1 α et Akt/mTOR dans les fibroblastes de patients. En outre, il apparaît que la dysfonction mitochondriale induite par la mutation altère l'activité de l'AMPK en réponse à un stress nutritionnel. Cela pourrait contribuer à la plus grande susceptibilité des cellules LSFC à la mort cellulaire induite par celui-ci.

Les résultats obtenus au cours de cette étude, permettent un avancement des connaissances sur la physiopathologie du LSFC. Toutefois, ces résultats devront être validés dans des modèles animaux lorsque ceux-ci seront disponibles. Les fibroblastes de peau ne sont pas des cellules qui consomment beaucoup d'énergie, par conséquent il est possible que ces cellules ne disposent pas des mêmes mécanismes de régulation que les cellules avec un grand besoin énergétique comme le cœur ou le muscle squelettique. Ainsi par exemple, si l'on n'observe pas d'augmentation significative de la protéine glycolytique PFK2 dans les fibroblastes de peau, les résultats pourraient être différents dans un autre type cellulaire comme le muscle squelettique. De plus, il est possible que la mesure d'autres marqueurs aurait été plus informative. Par exemple, il existe plusieurs isoformes de la PFK telle que la PFKFB3. La PFKFB3 est une isoforme ubiquitaire surexprimée notamment dans les cellules prolifératives et il pourrait être intéressant d'évaluer son activité dans les fibroblastes LSFC (252, 253). Rappelons aussi que le LSFC est caractérisé par une atteinte tissu-spécifique. Il est

donc possible que les tissus les plus touchés comme le foie où l'activité de COX est à seulement 10% de la normale exhibent des altérations métaboliques plus sévères que celles observées dans les fibroblastes de peau. D'autre part, certains tissus comme le cœur présentent des niveaux presque normaux de COX suggérant la présence d'autres mécanismes de compensation, qui sont absents dans les fibroblastes de peau. Une comparaison des conséquences de la mutation de *lrpprc* dans différents tissus pourrait nous éclairer sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie, de même que les raisons de sa spécificité tissulaire.

Par ailleurs, il est important de noter que nous avons uniquement procédé à une caractérisation des voies métaboliques par quelques marqueurs. Cela nous a permis de proposer quelques mécanismes de régulation, cependant il serait plus judicieux d'évaluer l'activité de marqueurs supplémentaires de même que l'activité de certaines voies directement. Ainsi, pour confirmer l'augmentation de la glycolyse et de la biosynthèse cellulaire par la voie Akt/mTOR, on pourrait évaluer les substrats respectifs HIF1 α et E4BP de ces voies (200, 201, 155). De plus, on pourrait évaluer l'activité de la glycolyse directement. L'évaluation de l'expression génique de c-myc, un gène codant pour les facteurs de transcription qui régulent la croissance cellulaire donnerait un meilleur profil de l'état prolifératif des cellules LSFC (254). Quelques marqueurs cibles de PGC-1 α tels que le facteur nucléaire de la chaîne respiratoire 1 (NRF-1) et le facteur de transcription mitochondrial (TFAM) permettraient de confirmer l'augmentation de la biogenèse mitochondriale (255). De plus, la mesure des copies de l'ADNmt constituerait un bon reflet de cette dernière. Le rôle potentiel des voies Akt/mTOR et SIRT1/PGC-1 α dans le maintien des niveaux d'ATP peut-être confirmé par une inhibition spécifique de ces dernières et observer si les niveaux d'ATP chutent dans les cellules LSFC. Pour comprendre le rôle de l'AMPK dans l'induction de la mort cellulaire par le LP, une inhibition spécifique de la protéine permettrait d'observer si l'activation de l'AMPK offre une protection contre la mort cellulaire.

Plusieurs progrès restent à faire pour mieux comprendre la physiopathologie du LSFC. Avoir un modèle murin LSFC sera une grande étape à la réalisation de notre objectif,

permettant notamment d'avoir des modèles expérimentaux plus réalistes pour l'étude du métabolisme énergétique.

Bibliographie

- (1) Schaefer, A. M., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Chinnery, P. F. (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 1659, 115-120.
- (2) Wallace, D.C. (1982). Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev*, 46, 208-240.
- (3) Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283,1482-1488.
- (4) Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125, 1241-1252.
- (5) Voet, D., Voet, J. G. (1990). Biochemistry. *New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & sons*, 1223 pages.
- (6) Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002). Biochemistry 5th edition, *New York: W H Freeman*, 1100 pages.
- (7) Ylikallio, E., Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med*, 44, 41-59.
- (8) Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V., Zeviani, M. (2009). Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys*, 1793, 200-211.
- (9) Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Shannon, R. J., Hirst, J., Walker, J. E. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem*, 281, 32724-32727.
- (10) Antonicka, H., Ogilvie, I., Taivassalo, T., Anitori, R. P., Haller, R. G., Vissing, J., Kennaway, N. G., Shoubridge, E. A. (2003). Identification and characterization of a

- common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem*, 278, 43081-43088.
- (11) Distelmaier, F., Koopman, W. J., Van den Heuvel, L. P., Rodenburg, R. J., Mayatepek, E., Willems, P. H., Smeitink, J. A. (2009). Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain*, 132, 833-842.
 - (12) Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J. 2nd., Nikoskelainen, E. K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242, 1427-1430.
 - (13) Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A., Rötig, A. (1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*, 11, 144-149.
 - (14) Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P. L., Douglas, F., George, E., Sköldberg, F., Husebye, E. S., Eng, C., Maher, E. R. (2001). Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet*, 69, 49-54.
 - (15) Baysal, B. E., Ferrell, R. E., Willett-Brozick, J. E., Lawrence, E. C., Myssiorek, D., Bosch, A., Van der Mey, A., Taschner, P. E., Rubinstein, W. S., Myers, E. N., Richard, C. W. 3rd., Cornelisse, C. J., Devilee, P., Devlin, B. (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*, 287, 848-851.
 - (16) Niemann, S., Muller, U. (2000). Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*, 26, 268-270.
 - (17) Crofts, A. R. (2004). The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol*, 66, 689-733.
 - (18) Benit, P., Lebon, S., Rustin, P. (2009). Respiratory-chain diseases related to

- complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 181-185.
- (19) Houstek, J., Pickova, A., Vojtiskova, A., Mracek, T., Pecina, P., Jesina, P. (2006) Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 1400-1405.
- (20) Wang, Z. G., White, P. S., Ackerman, S. H. (2001). Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem*, 276, 30773-30778.
- (21) De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., De Clercq, I., Eyskens, F., Gerlo, E., Smet, J., Van Coster, R.(2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet*, 41, 120-124.
- (22) Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, J.P. Mesirov, T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, N., Altshuler, D., Groop, L. C. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately down regulated in human diabetes. *Nat Genet*, 34, 267-273.
- (23) Ballinger, S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 38, 1278-1295.
- (24) Almeida, A., Almeida, J., Bolanos, J. P., Moncada, S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. (2001). *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 15294-15299.
- (25) Lu, F., Selak, M., O'Connor, J., Croul, S., Lorenzana, C., Butunoi, C., Kalman, B. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 177, 95-103.
- (26) Robinson, B. H. (2006). Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab*, 89, 3-13.

- (27) Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-344.
- (28) Bolanos, J. P., Heales, S. J., Land, J. M., Clark, J. B. (1995). Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem*, 64, 1965-1972.
- (29) Chavez, E., Melendez, E., Zazueta, C., Reyes-Vivas, H., Perales, S. G. (1997). Membrane permeability transition as induced by dysfunction of the electron transport chain. *Biochem Mol Biol Int*, 41, 961-968.
- (30) Balakirev, M. Y., Khramtsov, V. V., Zimmer, G. (1997). Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem*, 246, 710-718.
- (31) Hong, S. J., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2004). Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 259-264.
- (32) Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- (33) Jeong, S. Y., Seol, D. W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*, 41, 11-22.
- (34) Green, D. R., Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626-629.
- (35) Leigh, D. (1951). Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 14, 216-221.
- (36) Pronicki, M., Matyja, E., Piekutowska-Abramczuk, D., Szymanska-Debinska, T., Karkucinska-Wieckowska, A., Karczmarewicz, E., Grajkowska, W., Kmiec, T., Popowska, E., Sykut-Cegielska, J. (2008). Light and electron microscopy characteristics of the muscle of patients with *SURF1* gene mutations associated with

Leigh syndrome. *J Clin. Pathol*, 61, 460-466.

- (37) Debray, F. G., Lambert, M., Lortie, A., Vanasse, M., Mitchell, G. A. (2007). Long-term outcome of Leigh syndrome caused by the NARP-T8993C mtDNA mutation. *Am J Med Genet A*, 143 A, 2046-2051.
- (38) Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H. H., Danks, D. M., Kirby, D. M., Chow, C. W., Christodoulou, J., Thorburn, D. R. (1996). Leigh syndrome: Clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol*, 39, 343-351.
- (39) Finsterer, J. (2008). Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol*, 39, 223-235.
- (40) Piao, Y. S., Tang, G. C., Yang, H., Lu, D. H. (2006). Clinico-neuropathological study of a Chinese case of familial adult Leigh syndrome. *Neuropathology*, 26, 218-221.
- (41) Van Maldergem, L., Trijbels, F., DiMauro, S., Sindelar, P. J., Musumeci, O., Janssen, A., Delberghe, X., Martin, J. J., Gillerot, Y. (2002). Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Ann Neurol*, 52, 750-754.
- (42) Martin, E., Burger, R., Wiestler, O. D., Caduff, R., Boltshauser, E., Boesch, C. (1990). Brainstem lesion revealed by MRI in a case of Leigh's disease with respiratory failure. *Pediatr Radiol*, 20, 349-350.
- (43) Morin, C., Mitchell, G., Larochelle, J., Lambert, M., Ogier, H., Robinson, B. H., De Braekeleer, M. (1993). Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet*, 53, 488-496.
- (44) Debray, F. G., Morin, C., Janvier, A., Villeneuve, J., Maranda, B., Laframboise, R., Lacroix, J., Decarie, J. C., Robitaille, Y., Lambert, M., Robinson, B. H., Mitchell, G. A. (2011). LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet*, 48, 183-189.
- (45) Lee, N., Daly, M. J., Delmonte, T., Lander, E. S., Xu, F., Hudson, T. J., Mitchell, G.

- A., Morin, C., Robinson, B. H., Rioux J. D. (2001). A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16. *Am J Hum Genet*, 68, 397-409.
- (46) Mootha, V. K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G. A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T. J., Robinson, B. H., Rioux, J. D., Lander, E. S. (2003). Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 605-610.
- (47) Sterky, F. H., Ruzzenente, B., Gustafsson, C. M., Samuelsson, T., Larsson, N. G. (2010). LRPPRC is a mitochondrial matrix protein that is conserved in metazoans. *Biochem Biophys Res Commun*, 398, 759-764.
- (48) Liu, L., McKeehan, W. L. (2002). Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytoplasmic shuttling, and chromosome activity. *Genomics*, 79, 124-136.
- (49) Xu, F., Morin, C., Mitchell, G., Ackerley, C., Robinson, B. H. (2004). The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochem J*, 382, 331-336.
- (50) Ruzzenente, B., Metodiev, M. D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C. B., Camara, Y., Milenkovic, D., Zickermann, V., Wibom, R., Hulthenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Brandt, U., Stewart, J. B., Gustafsson, C. M., Larsson, N. G. (2012). LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J*, 31, 443-456.
- (51) Michaud, M., Barakat, S., Magnard, S., Rigal, D., Baggetto, L. G. (2011). Leucine-rich protein 130 contributes to apoptosis resistance of human hepatocarcinoma cells. *Int J Oncol*, 38, 169-178.

- (52) Liu, L., Sanosaka, M., Lei, S., Bestwick, M. L., Frey Jr, J. H., Surovtseva, Y. V., Shadel, G. S., Cooper, M. P. (2011). LRP130 Protein remodels mitochondria and stimulates fatty acid oxidation. *J Biol Chem*, 286, 41253-41264.
- (53) Mili, S., Pinol-Roma, S. (2003). LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol*, 23, 4972-4982.
- (54) Topisirovic, I., Siddiqui, N., Lapointe, V. L., Trost, M., Thibault, P., Bangeranye, C., Piñol-Roma, S., Borden, K. L. (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J*, 28, 1087-1098.
- (55) Cooper, M. P., Uldry, M., Kajimura, S., Arany, Z., Spiegelman, B. M. (2008). Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130. *J Biol Chem*, 283, 31960-31967.
- (56) Gohil, V. M., Nilsson, R., Belcher-Timme, C. A., Luo, B., Root, D. E., Mootha, V. K. (2010). Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. *J Biol Chem*, 285, 13742-13747.
- (57) Sasarman, F., Brunel-Guitton, C., Antonicka, H., Wai, T., Shoubridge, E.A. (2010). LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell*, 21, 1315-1323.
- (58) Merante, F., Petrova-Benedict, R., MacKay, N., Mitchell, G., Lambert, M., Morin, C., De Braekeleer, M., Laframboise, R., Gagné, R., Robinson, B. H. (1993). A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint- Jean region of Quebec. *Am J Hum Genet*, 53, 481-487.
- (59) Rivard, M. E., Thompson-Legault, J., Burelle, Y., Morin, C., Coderre, L., Des Rosiers, C. (2011). Susceptibility to nutrient-induced cell death in Leigh syndrome French Canadian type (LSFC) patient fibroblasts. *FASEB J*, 25, 722.15.
- (60) Bemeur, C., Beleac, E., Deschenes, S., Rivard, M. E., Coderre, L., Des Rosiers, C.,

- Burelle, Y. (2012). Alterations in mitochondrial function in fibroblasts from patients with Leigh Syndrome French Canadian type (LSFC). *FASEB J*, 26, 586.2.
- (61) Annesley, S. J., Carilla-Latorre, S., Escalante, R., Fisher, P. R. (2013). Mitochondrial respiratory complex function and the phenotypic consequences of dysfunction. *Methods Mol Biol*, 983, 345-366.
- (62) Germain, M., Nguyen, A. P., Khacho, M., Patten, D. A., Screatton, R. A., Park, D. S., Slack, R. S. (2013). LKB1-regulated adaptive mechanisms are essential for neuronal survival following mitochondrial dysfunction. *Hum Mol Genet*, 22, 952-962.
- (63) Hsu, C. C., Wang, C. H., Wu, L. C., Hsia, C. Y., Chi, C. W., Yin, P. H., Chang, C. J., Sung, M. T., Wie, Y. H., Lu, S. H., Lee, H. C. (2013). Mitochondrial dysfunction represses HIF-1 α protein synthesis through AMPK activation in human hepatoma HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 4743-4751.
- (64) Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., Schon, E. A., Lamperti, C., Zeviani, M. (2011). In Vivo Correction of COX Deficiency by Activation of the AMPK/ PGC-1 α Axis. *Cell Metab*, 14, 80-90.
- (65) Beg, Z. H., Allmann, D. W., Gibson, D. M. (1973). Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, 54, 1362-1369.
- (66) Carlson, C. A., Kim, K. H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem*, 248, 378-380.
- (67) Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. A., Hardie, D. G. (1989). Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem*, 186, 129-136.
- (68) Hardie, D. G., Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, 23, 1112-1119.

- (69) Steinberg, G. R., Kemp, B. E. (2009). AMPK in health and disease. *Physiol Rev*, 89, 1025-1078.
- (70) Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. *Biochem Soc Trans*, 39, 1-13.
- (71) Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 1, 15-25.
- (72) Oakhill, J. S., Scott, J. W., Kemp, B. E. (2012). AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab*, 23, 125-132.
- (73) Carling, D., Mayer, F. V., Sanders, M. J., Gamblin, S. J. (2011). AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Biol*, 7, 512-518.
- (74) Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., Järvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpää, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A. S., Stratton, M. R., De la Chapelle, A., Aaltonen, L. A. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391, 184-187.
- (75) Lizcano, J. M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Mäkelä, T. P., Hardie, D. G., Alessi, D. R. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J*, 23, 833-843.
- (76) Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Mäkelä, T. P., Alessi, D. R., Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2, 28.
- (77) Baas, A. F., Boudeau, J., Sapkota, G. P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N. A., Alessi, D. R., Clevers, H. C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the

- STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J*, 22, 3062-3072.
- (78) Boudeau, J., Baas, A. F., Deak, M., Morrice, N. A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A. R., Clevers, H. C., Alessi, D. R. (2003). MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J*, 122, 5102-5114.
- (79) Oakhill, J. S., Steel, R., Chen, Z. P., Scott, J. W., Ling, N., Tam, S., Kemp, B. E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 332, 1433-1435.
- (80) Oakhill, J. S., Chen, Z. P., Scott, J. W., Steel, R., Castelli, L. A., Ling, N., Macaulay, S. L., Kemp, B. E. (2010). β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 19237-19241.
- (81) Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, 2, 9-19.
- (82) Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2, 21-33.
- (83) Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T., Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett*, 377, 421-425.
- (84) Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A., Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, 403, 139-148.

- (85) Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 281, 32207-32216.
- (86) Marsin, A. S., Bouzin, C., Bertrand, L., Hue, L. (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 277, 30778-30783.
- (87) Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S., Lopaschuk, G. D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 270, 17513-17520.
- (88) Salt, I. P., Johnson, G., Ashcroft, S. J. H., Hardie, D. G. (1998). AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic β cells, and may regulate insulin release. *Biochem J*, 335, 533-539.
- (89) Wu, S. B., Wei, Y.H. (2012). AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 233-247.
- (90) Winder, W. W., Hardie, D. G. (1996). Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol*, 270, E299-E304.
- (91) Mu, J., Brozinick, J. T., Valladares, O., Bucan, M., Birnbaum, M. J. (2001). A role for AMP-activated protein kinase in contraction and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*, 7, 1085-1094.
- (92) Wang, Q., Liang, B., Shirwany, N. A., Zou, M. H. (2011). 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One*, 6, e17234.
- (93) Chanda, D., Kim, S. J., Lee, I. K., Shong, M., Choi, H. S. (2008). Sodium arsenite

- induces orphan nuclear receptor SHP gene expression via AMP-activated protein kinase to inhibit gluconeogenic enzyme gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E368-E379.
- (94) Yamaguchi, S., Katahira, H., Ozawa, S., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Shimoyama, T., Takahashi, K., Yoshimoto, K., Imaizumi, M. O., Nagamatsu, S., Ishida, H. (2005). Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E643-E649.
- (95) Harper, J. A., Dickinson, K., Brand, M. D. (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev*, 2, 255-265.
- (96) Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D., Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415, 339-343.
- (97) Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M. J., James, D. E., Kemp, B. E., Pedersen, B. K., Febbraio, M. A. (2006). Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 55, 2688-2697.
- (98) Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B. B., Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 8, 1288-1295.
- (99) Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Kumagai, K., Kozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Awazawa, M., Takamoto, I., Froguel, P., Hara, K., Tobe, K., Nagai, R.,

- Ueki, K., Kadowaki, T. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 cause abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 13, 332-339.
- (100) Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C. R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S. R., Carling, D., Small, C. J. (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*, 279, 12005-12008.
- (101) Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., Arena, J. P., Liberators, P. A., Rosenblum, C. I., Hamelin, M., Hreniuk, D. L., Palyha, O. C., Anderson, J., Paress, P. S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K. K., McKee, K. K., Pong, S. S., Chaung, L. Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D. J., Dean, D. C., Melillo, D. G., Patchett, A. A., Nargund, R., Griffin, P. R., DeMartino, J. A., Gupta, S. K., Schaeffer, J. M., Smith, R. G., Van der Ploeg, L. H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273, 974-977.
- (102) Clark, H., Carling, D., Saggerson, D. (2004). Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *Eur J Biochem*, 271, 2215-2224.
- (103) Fediuc, S., Gaidhu, M. P., Ceddia, R. B. (2006). Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J Lipid Res*, 47, 412-420.
- (104) Watt, M. J., Steinberg, G. R., Chen, Z. P., Kemp, B. E., Febbraio, M. A. (2006). Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J Physiol*, 574, 139-147.
- (105) Han, R., Lai, R., Ding, Q., Wang, Z., Luo, X., Zhang, Y., Cui, G., He, J., Liu, W., Chen, Y. (2007). Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. *Diabetologia*, 50, 1960-1968.
- (106) Drew, B. G., Fidge, N. H., Gallon-Beaumier, G., Kemp, B. E., Kingwell, B. A. (2004). High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase

- activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, *101*, 6999-7004.
- (107) Musi, N., Hirshman, M. F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., Zhou, G., Williamson, J. M., Ljunqvist, O., Efendic, S., Moller, D. E., Thorell, A., Goodyear, L. J. (2002). Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, *51*, 2074-2081.
- (108) Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, *108*, 1167-1174.
- (109) LeBrasseur, N. K., Kelly, M., Tsao, T. S., Farmer, S. R., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Tomas, E. (2006). Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *291*, E175-E181.
- (110) Park, C. E., Kim, M. J., Lee, J. H., Min, B. I., Bae, H., Choe, W., Kim, S. S., Ha, J. (2007). Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mol Med*, *39*, 222-229.
- (111) Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Cohen, R. A. (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, *55*, 2180-2191.
- (112) Hwang, J. T., Ha, J., Park, I. J., Lee, S. K., Baik, H. W., Kim, Y. M., Park, O. J. (2007). Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett*, *247*, 115-121.
- (113) Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M. C., Brown, L. J., Ogunbayo, O. A., Evans, A. M., Hardie, D. G. (2010). Use of cells expressing gamma subunit variants to Identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab*, *11*, 554-565.

- (114) Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., Hardie, D.G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, 229, 558-565.
- (115) Kristiansen, S. B., Solskov, L., Jessen, N., Løfgren, B., Schmitz, O., Nielsen-Kudsk, J. E., Nielsen, T. T., Bøtker, H. E., Lund, S. (2009). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases myocardial glucose uptake during reperfusion and induces late pre-conditioning: potential role of AMP-activated protein kinase. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 105, 10-16.
- (116) Chen, S., Murphy, J., Toth, R., Campbell, D. G., Morrice, N. A., Mackintosh, C. (2008). Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators. *Biochem J*, 409, 449-459.
- (117) Pehmøller, C., Treebak, J. T., Birk, J. B., Chen, S., Mackintosh, C., Hardie, D. G., Richter, E. A., Wojtaszewski, J. F. (2009). Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E665-E675.
- (118) McGee, S. L., van Denderen, B. J., Howlett, K. F., Mollica, J., Schertzer, J. D., Kemp, B. E., Hargreaves, M. (2008). AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes*, 57, 860-867.
- (119) Fryer, L. G., Fougelle, F., Barnes, K., Baldwin, S. A., Woods, A., Carling, D. (2002). Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J*, 363, 167-174.
- (120) Mu, J., Brozinick, J. T., Valladares, O., Bucan, M., Birnbaum, M. J. (2001). A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*, 7, 1085-1094.
- (121) Pelletier, A., Joly, E., Prentki, M., Coderre, L. (2005). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes.

Endocrinology, 146, 2285-2294.

- (122) Takata, K., Hirano, H. (1997). Mechanism of glucose transport across the human and rat placental barrier: a review. *Microsc Res Tech*, 38, 145-152.
- (123) Ono, K., Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 12, 1-13.
- (124) Roux, P. P., Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 320-344.
- (125) Ryder, J. W., Fahlman, R., Wallberg-Henriksson, H., Alessi, D. R., Krook, A., Zierath, J. R. (2000). Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement Of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1. *J Biol Chem*, 275, 1457-1462.
- (126) Tardif, A., Julien, N., Chiasson, J. L., Coderre, L. (2003). Stimulation of glucose uptake by chronic vanadate pretreatment cardiomyocytes requires PI 3-kinase and p38 MAPK activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284, E1055-1064.
- (127) Xi, X., Han, J., Zhang, J. Z. (2001). Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 276, 41029-41034.
- (128) Li, J., Miller, E. J., Ninomiya-Tsuji, J., Russell, R. R. 3rd, Young, L. H. (2005). AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ Res*, 97, 872-879.
- (129) Lemieux, K., Konrad, D., Klip, A., Marette, A. (2003). The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *FASEB J*, 17, 1658-1665.

- (130) Carling, D., Hardie, D. G. (1989). The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1012, 81-86.
- (131) Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D., Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*, 10, 1247-1255.
- (132) Marsin, A. S., Bouzin, C., Bertrand, L., Hue, L. (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 277, 30778-30783.
- (133) Da Silva Xavier, G., Leclerc, I., Salt, I. P., Doiron, B., Hardie, D. G., Kahn, A., Rutter, G. A. (2000). Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4023-4028.
- (134) Leclerc, I., Kahn, A., Doiron, B. (1998). The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett*, 431, 180-184.
- (135) Lochhead, P. A., Salt, I. P., Walker, K. S., Hardie, D. G., Sutherland, C. (2000). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*, 49, 896-903.
- (136) Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S. C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foufelle, F., Carling, D. (2000). Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol*, 20, 6704-6711.
- (137) Koo, S. H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreaton, R. A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., Takemori, H., Montminy, M. (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437,

1109-1111.

- (138) Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W., Leff, T. (2003). AMP-activated protein kinase regulates HNF4 α transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem*, 278, 27495-27501.
- (139) Andreelli, F., Foretz, M., Knauf, C., Cani, P. D., Perrin, C., Iglesias, M. A., Pillot, B., Bado, A., Tronche, F., Mithieux, G., Vaulont, S., Burcelin, R., Viollet, B. (2006). Liver adenosine monophosphate-activated kinase- α 2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology*, 147, 2432-2441.
- (140) Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S. B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., Gomas, E., Nicolas, G., Wojtaszewski, J. F., Kahn, A., Carling, D., Schuit, F. C., Birnbaum, M. J., Richter, E. A., Burcelin, R., Vaulont, S. (2003). The AMP-activated protein kinase α 2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest*, 111, 91-98. Bonen, A., Dyck, D. J., Ibrahimi, A., Abumurad, N. A. (1999). Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 276, E642-E649.
- (141) Long, Y. C., Barnes, B. R., Mahlapuu, M., Steiler, T. L., Martinsson, S., Leng, Y., Wallberg-Henriksson, H., Andersson, L., Zierath, J. R. (2005). Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. *Diabetologia*, 48, 2354-2364.
- (142) Van Oort, M. M., van Doorn, J. M., Hasnaoui, M. E., Glatz, J. F., Bonen, A., van der Horst, D. J., Rodenburg, K. W., P Luiken, J. J. (2009). Effects of AMPK activators on the subcellular distribution of fatty acid transporters CD36 and FABPpm. *Arch Physiol Biochem*, 115, 137-146.
- (143) Chabowski, A., Momken, I., Coort, S. L., Calles-Escandon, J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Bonen, A. (2006). Prolonged AMPK activation increases the

- expression of fatty acid transporters in cardiac myocytes and perfused hearts. *Mol Cell Biochem*, 288, 201-212.
- (144) Davies, S. P., Sim, A. T., Hardie, D. G. (1990). Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur J Biochem*, 187, 183-190.
- (145) Munday, M. R. (2002). Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*, 30, 1059-1064.
- (146) McGarry, J. D., Brown, N. F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, 244, 1-14.
- (147) McGarry, J. D., Mannaerts, G. P., Foster, D. W. (1977). A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest*, 60, 265-270.
- (148) Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109, 1125-1131.
- (149) Yang, J., Craddock, L., Hong, S., Liu, Z. M. (2009). AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J Cell Biochem*, 106, 414-426.
- (150) Beg, Z. H., Stonik, J. A., Brewer, H. B. Jr. (1978). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 3678-3682.
- (151) Clarke, P. R., Hardie, D. G. (1990). Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J*, 9, 2439-2446.
- (152) Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L, Bonenfant, D.,

- Oppliger, W., Jenoe, P., Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, *10*, 457-468.
- (153) Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, *110*, 163-175.
- (154) Schalm, S. S., Fingar, D. C., Sabatini, D. M., Blenis, J. (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol*, *13*, 797-806.
- (155) Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*, *278*, 15461-15464.
- (156) Bolster, D. R., Crozier, S. J., Kimball, S. R., Jefferson, L. S. (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem*, *277*, 23977-23980.
- (157) Inoki, K., Zhu, T., Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, *115*, 577-590.
- (158) Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, *320*, 1496-1501.
- (159) Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A., Guan, K. L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.*, *18*, 1533-1538.

- (160) Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30, 214-226.
- (161) Browne, G. J., Finn, S. G., Proud, C. G. (2004). Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J Biol Chem*, 279, 12220-12231.
- (162) Jorgensen, S. B., Trebak, J. T., Viollet, B., Schjerling, P., Vaulont, S., Wojtaszewski, J. F., Richter, E. A. (2006). Role of AMPK alpha2 in basal, training, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292, E331-E339.
- (163) Jorgensen, S. B., Wojtaszewski, J. F., Viollet, B., Andreelli, F., Birk, J. B., Hellsten, Y., Schjerling, P., Vaulont, S., Neuffer, P. D., Richter, E. A., Pilegaard, H. (2005). Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J*, 19, 1146-1148.
- (164) Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 12017-12022.
- (165) Canto, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J. R., Auwerx, J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab*, 11, 213-219.
- (166) Mizushima, N. (2009). Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335, 71-84.
- (167) Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246, 603-608.
- (168) Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., Esumi, H. (2001). Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-

- aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 562-567.
- (169) Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M. J., Thompson, C. B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 18, 283-293.
- (170) Rattan, R., Giri, S., Singh, A. K., Singh, I. (2005). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 280, 39582-39593.
- (171) Xiang, X., Saha, A. K., Wen, R., Ruderman, N. B., Luo, Z. (2004). AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 161-167.
- (172) Vousden, K. H., Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2, 594-604.
- (173) Winder, W. W., Holmes, B. F., Rubink, D. S., Jensen, E. B., Chen, M., Holloszy, J. O. (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 88, 2219-2226.
- (174) Yang, Z., Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335, 1-32.
- (175) Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21, 2861-2873.
- (176) Ganley, I. G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284, 12297-12305.
- (177) Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J. L., Oshiro, N., Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200

- complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20, 1981-1991.
- (178) Chan, E. Y. (2009). mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Sci Signal*, 2, pe51.
- (179) Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J. L., Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*, 181, 497-510.
- (180) Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331, 456-461.
- (181) Lee, J. W., Park, S., Takahashi, Y., Wang, H. G. (2010). The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One*, 5, e15394.
- (182) Shang, L., Chen, S., Du, F., Li, S., Zhao, L., Wang, X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 4788-4793.
- (183) Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., D'Amelio, M., Nardacci, R., Romagnoli, A., Piacentini, M., Cecconi, F., Fimia, G. M. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*, 191, 155-168.
- (184) Dimauro, S., Schon, E. A. (2008). Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 31, 91-123.
- (185) Lee, H. C., Yin, P. H., Chi, C. W., Wei, Y. H. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci*, 9, 517-526.

- (186) Wu, S. B., Wei, Y. H. (2012). AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: Implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 233-247.
- (187) Srivastava, S., Diaz, F., Iommarini, L., Aure, K., Lombes, A., Moraes, C. T. (2009). PGC-1alpha/beta induced expression partially compensates for respiratory chain defects in cells from patients with mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet*, 18, 1805-1812.
- (188) Wenz, T., Diaz, F., Spiegelman, B. M., Moraes, C. T. (2008). Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab*, 8, 249-256.
- (189) Roden, M. (2004). How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci*, 19, 92-96.
- (190) Hardie, D. G. (1992). Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1123, 231-238.
- (191) Hers, I., Vincent, E. E., Tavaré, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*, 23, 1515-1527.
- (192) Inoki, K., Kim, J., Guan, K. L. (2012). AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 381-400.
- (193) Marroquin, L. D., Hynes, J., Dykens, J. A., Jamieson, J. D., Will, Y. (2007). Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci*, 97, 539-547.
- (194) Warburg, O. (1925). Uber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin Wochenschr*, 4, 534-536.
- (195) Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-270.
- (196) Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., Saavedra, E.

- (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*, 274, 1393-1418.
- (197) Pfeiffer, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292, 504-507.
- (198) DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*, 7, 11-20.
- (199) Brière, J. J., Favier, J., Bénit, P., El Ghouzzi, V., Lorenzato, A., Rabier, D., Di Renzo, M. F., Gimenez-Roqueplo, A. P., Rustin P. (2005). Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1alpha nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet*, 14, 3263-3269.
- (200) Mansfield, K. D., Guzy, R. D., Pan, Y., Young, R. M., Cash, T. P., Schumacker, P. T., Simon, M. C. (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell Metab*, 1, 393-399.
- (201) Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*, 276, 9519-9525.
- (202) Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., Wang, G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 269, 23757-23763.
- (203) Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2002). Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell*, 13, 2276-2288.
- (204) Wieman, H. L., Wofford, J. A., Rathmell, J. C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell*, 18, 1437-1446.

- (205) Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., Thompson, C. B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, *64*, 3892-3899.
- (206) Roos, S., Jansson, N., Palmberg, I., Saljo, K., Powell, T. L., Jansson, T. (2007). Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *J Physiol*, *582*, 449-459.
- (207) Gingras, A. C., Raught, B., Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*, *15*, 807-826.
- (208) Dandapani, M., Hardie, D. G. (2013). AMPK: opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells? *Biochem Soc Trans*, *41*, 687-693.
- (209) Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, *458*, 1056-1060.
- (210) Sasaki, T., Maier, B., Koclega, K. D., Chruszcz, M., Gluba, W., Stukenberg, P. T., Minor, W., Scrable, H. (2008). Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One*, *3*, e4020.
- (211) Kim, E. J., Kho, J. H., Kang, M. R., Um, S. J. (2007). Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol Cell*, *28*, 277-290.
- (212) Nemoto, S., Fergusson, M. M., Finkel, T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*, *306*, 2105-2108.
- (213) Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J. C., Zhang, C. Y., Krauss, S., Mootha, V. K., Lowell, B. B., Spiegelman, B. M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*, *8*, 971-982.

- (214) Fan, M., Rhee, J., St-Pierre, J., Handschin, C., Puigserver, P., Lin, J., Jäeger, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Spiegelman, B. M. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK. *Genes Dev*, 18, 278-289.
- (215) Lee, H. C., Lu, C. Y., Fahn, H. J., Wei, Y. H. (1998). Aging- and smoking- associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett*, 441, 292-296.
- (216) Gadaleta, M. N., Rainaldi, G., Lezza, A. M. S., Milella, F., Fracasso, F., Cantatore, P. (1992). Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. *Mutat Res*, 275, 181-193.
- (217) Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Estivill, X., Urbano-Marquez, A., Nunes, V. (1997). Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging. *Mol Brain Res*, 52, 284-289.
- (218) Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1995). Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta*, 1271, 165-170.
- (219) Lee, H. C., Yin, P. H., Chi, C. W., Wei, Y. H. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci*, 9, 517-526.
- (220) Hayashi, T., Hirshman, M. F., Fujii, N., Habinowski, S. A., Witters, L. A., Goodyear, L. J. (2000). Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes*, 49, 527-531.
- (221) Patel, N., Khayat, Z. A., Ruderman, N. B., Klip, A. (2001). Dissociation of 5'AMP-activated protein kinase activation and glucose uptake stimulation by mitochondrial uncoupling and hyperosmolar stress: differential sensitivities to intracellular Ca²⁺ and protein kinase C inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 1066 -1070.
- (222) Robinson, B. H. (2001). Lactic Acidemia: Disorders of Pyruvate Carboxylase and

Pyruvate Dehydrogenase. *McGraw-Hill, New York, Toronto.*

- (223) Hermansen, M. S., Pruetz EDR, L., Vagi, O., Waldum, H., Wesselaas, T. (1975). Lactate removal at rest and during exercise. *Birkhauser Verlag, Basel.*
- (224) Koyama, T., Kume, S., Koya, D., Araki, S., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sugimoto, T., Haneda, M., Sugaya, T., Kashiwagi, A., Maegawa, H., Uzu, T. (2011). SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med, 51*, 1258-1267.
- (225) Mayer, C. M., Belsham, D. D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology, 151*, 576-585.
- (226) Lu, J., Wang, Q., Huang, L., Dong, H., Lin, L., Lin, N., Zheng, F., Tan, J. (2012). Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: prevention by AMPK activator. *Endocrinology, 153*, 5275-5284.
- (227) Yang, Z., Kahn, B. B., Shi, H., Xue, B. Z. (2010). Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *J Biol Chem, 285*, 19051-19059.
- (228) Watt, M. J., Steinberg, G. R., Chen, Z. P., Kemp, B. E., Febbraio, M. A. (2006) Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J Physiol, 574*, 139-147.
- (229) Fediuc, S., Gaidhu, M. P., Ceddia, R. B. (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J Lipid Res, 47*, 412-420.
- (230) Randle, P. J. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev, 14*, 263-283.

- (231) Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 277, 3829-3835.
- (232) Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., Zou, M. H. (2007). Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 282, 9777-9788.
- (233) Thomson, D. M., Brown, J. D., Fillmore, N., Condon, B. M., Kim, H. J., Barrow, J. R., Winder, W. W. (2007). LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E1572-E1579.
- (234) Smith, A. C., Bruce, C. R., Dyck, D. J. (2005). AICAR further increases fatty acid oxidation and blunts triacylglycerol hydrolysis in contracting rat soleus muscle. *J Physiol*, 565, 547-553.
- (235) Fillmore, N., Jacobs, D. L., Mills, D. B., Winder, W. W., Hancock, C. R. (2010). Chronic AMP-activated protein kinase activation and a high-fat diet have an additive effect on mitochondria in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 109, 511-520.
- (236) Ogiwara, H., Tanabe, T., Nikawa, J., Numa, S. (1978). Inhibition of rat-liver acetyl-coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A. Formation of equimolar enzyme-inhibitor complex. *Eur J Biochem*, 89, 33-41.
- (237) Rubink, D. S., Winder, W. W. (2005). Effect of phosphorylation by AMP-activated protein kinase on palmitoyl-CoA inhibition of skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *J Appl Physiol*, 98, 1221-1227.
- (238) Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T., Hay, N. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev*, 15, 2203-2208.

- (239) Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E.B. 3rd, Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., Birnbaum, M. J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 292, 1728-1731.
- (240) Hers, I., Vincent, E. E., Tavaré, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*, 23, 1515-1527.
- (241) Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Grémeaux, T., Gonzalez, T., Barrès, R., Tanti, J. F. (2003). Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Biochem Soc Trans*, 31, 1152-1156.
- (242) Pu, J., Peng, G., Li, L., Na, H., Liu, Y., Liu, P. Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells. *J Lipid Res*, 52, 1319-1327.
- (243) Hardy, R. W., Ladenson, J. H., Henriksen, E. J., Holloszy, J. O., McDonald, J. M. (1991). Palmitate stimulates glucose transport in rat adipocytes by a mechanism involving translocation of the insulin sensitive glucose transporter (GLUT4). *Biochem Biophys Res Commun*, 177, 343-351.
- (244) Ouchi, N., Kobayashi, H., Kihara, S., Kumada, M., Sato, K., Inoue, T., Funahashi, T., Walsh, K. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, 279, 1304-1309.
- (245) Levine, Y. C., Li, G. K., Michel, T. (2007). Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK → Rac1 → Akt → endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem*, 282, 20351-20364.
- (246) Sag, D., Carling, D., Stout, R. D., Suttles, J. (2008). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol*, 181, 8633-8641.

- (247) Hotamisligil, G. S. (2007). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and type 2 diabetes. *Novartis Found Symp*, 286, 86-94; discussion 94-8, 162-3, 196-203.
- (248) Wright, D. C., Han, D. H., Garcia-Roves, P. M., Geiger, P. C., Jones, T. E., Holloszy, J. O. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem*, 282, 194-199.
- (249) Nikolaidis, M. G., Mougios, V. (2004). Effects of exercise on the fatty-acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med*, 34, 1051-1076.
- (250) Winder, W. W., Hardie, D. G. (1996). Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 270, E299-E304.
- (251) Gaidhu, M. P., Fediuc, S., Ceddia, R. B. (2006). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside-induced AMP-activated protein kinase phosphorylation inhibits basal and insulin-stimulated glucose uptake, lipid synthesis, and fatty acid oxidation in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 281, 25956-25964.
- (252) Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., Koike, T. (2005). Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res*, 11, 5784-5792.
- (253) Mor, I., Cheung, E. C., Vousden, K. H. (2011). Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76, 211-216.
- (254) Adhikary, S., Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 635-645.
- (255) Jones, A. W., Yao, Z., Vicencio, J. M., Karkucinska-Wieckowska, A., Szabadkai, G. (2012). PGC-1 family coactivators and cell fate: roles in cancer, neurodegeneration,

cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling.
Mitochondrion, 12, 86-99.