

Université de Montréal

**Dysfonctions mitochondriales associées à l'acidose lactique
du Saguenay-Lac-Saint-Jean révélées par l'étude d'un
nouveau modèle murin de la maladie**

par
Alexanne Cuillerier

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en sciences pharmaceutiques

Janvier 2016

© Alexanne Cuillerier, 2016

Résumé

Le syndrome de Leigh version canadienne-française (LSFC) est une maladie autosomale récessive causée par une mutation du gène *LRPPRC*, encodant une protéine du même nom. LRPPRC est impliquée dans la traduction des gènes mitochondriaux qui encodent certains complexes de la chaîne respiratoire. Les répercussions biochimiques incluent un déficit tissu spécifique de la cytochrome *c* oxydase (COX), principalement dans le foie et le cerveau, et la survenue de crises d'acidose fatales chez 80 % des enfants atteints avant l'âge de 3-4 ans.

L'identification d'options thérapeutiques demeure encore un défi de taille et ceci est en partie relié au manque de connaissances des fonctions biologiques de LRPPRC et des mécanismes impliqués dans la pathogenèse du LSFC, au niveau des dysfonctions mitochondriales résultantes. Afin d'étudier ces mécanismes, le consortium de l'acidose lactique, dont fait partie notre laboratoire, a récemment développé un modèle murin portant une ablation de *LRPPRC* spécifique au foie (souris H-*Lrpprc*^{-/-}). L'objectif principal est de déterminer si ce modèle reproduit le phénotype pathologique observé dans les cultures de fibroblastes humains issus de biopsies de peau de patients LSFC.

Dans le cadre des travaux de ce mémoire, nous avons amorcé la caractérisation de ce nouveau modèle, en examinant le phénotype général, l'histopathologie hépatique et les fonctions mitochondriales, et en nous focalisant principalement sur les fonctions respiratoires et la capacité à oxyder divers types de substrats. Nous avons observé un retard de croissance, une hépatomégalie ainsi que plusieurs anomalies histologiques du foie chez la souris H-*Lrpprc*^{-/-}. De plus, l'ablation de *LRPPRC* induit un déficit du complexe IV, mais aussi de l'ATP synthase, et affecte l'oxydation des acides gras à longues chaînes.

À la lumière de ces résultats, nous croyons que le modèle murin H-*Lrpprc*^{-/-} contribuera à l'avancement des connaissances générales sur LRPPRC, nous permettant de mieux comprendre l'influence de la protéine sur les fonctions mitochondriales.

Mots-clés : LSFC, acidose lactique, mitochondrie, dysfonctions mitochondriales, cytochrome *c* oxydase, LRPPRC

Abstract

The French Canadian variant of Leigh Syndrome (LSFC) is an inherited disease caused by a point mutation in the *LRPPRC* gene, encoding for a protein of the same name. LRPPRC is involved in the translation of mitochondrial genes, encoding several OXPHOS complexes. Biochemical impacts include a tissue-specific reduction of cytochrome c oxidase (COX), namely in the brain and liver, and the onset of fatal acidotic crises that cause an 80% mortality before the age of 3-4.

Identification of therapeutic strategies remains a significant challenge, in part due to the limited knowledge about biological functions of LRPPRC and the mechanisms involved in the pathogenesis of LSFC at the level of the resulting mitochondrial dysfunctions. To gain better knowledge on these mechanisms, our research consortium has recently developed a novel mouse model with a liver specific knockout of *LRPPRC* (H-*Lrpprc*^{-/-} mouse). Our main goal is to determine whether this novel mouse model reproduces the mitochondrial dysfunction previously observed in human fibroblasts from LSFC patients.

As a part of this master's project, we have initiated the characterization of this novel mouse model, examining general phenotype, hepatic histopathology, and mitochondrial functions, by focusing on respiratory functions and the ability for the oxidation of several substrates. We observed growth delay and hepatomegaly in our H-*Lrpprc*^{-/-} model as well as several histological abnormalities in the liver. Moreover, *LRPPRC* ablation induces not only complex IV deficiency, but also ATP synthase deficiency and affects the mitochondrial capacity to oxidize long chain fatty acids.

Based on these results, we believe that the H-*Lrpprc*^{-/-} mouse model will contribute to the general advancement of knowledge on LRPPRC, providing a better understanding of its involvement in the different mitochondrial functions.

Keywords : LSFC, lactic acidosis, mitochondria, mitochondrial dysfunctions, cytochrome *c* oxidase, LRPPRC

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XIV
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	2
1. BASES DE LA BIOLOGIE MITOCHONDRIALE	2
1.1. <i>Structure et fonction bioénergétique des mitochondries</i>	2
1.1.1. Structure	3
1.1.2. Génome.....	4
1.1.3. Fonctions bioénergétiques.....	6
1.1.3.1. β -oxydation.....	7
1.1.3.2. Glycolyse.....	8
1.1.3.3. Cycle de Krebs	9
1.1.4. Chaîne de transport des électrons et oxydation phosphorylante (OXPHOS)	11
2. MALADIES RARES, ORPHELINES ET MITOCHONDRIALES	16
2.1. <i>Définition des Maladies rares</i>	16
2.2. <i>Désordres mitochondriaux</i>	17
2.2.1. Maladies mitochondriales causées par des altérations de l'ADN mitochondrial.....	18
2.2.1.1. Transmission exclusivement maternelle.....	19
2.2.1.2. Concept d'hétéroplasmie et threshold effect.....	19
2.2.1.3. Ségrégation mitotique.....	20
2.2.1.4. Catégorisation des mutations de l'ADN mitochondrial.....	20
2.2.1.4.1. Réarrangements (suppression) [29].....	20
2.2.1.4.2. Mutations ponctuelles	21
2.2.2. Maladies mitochondriales causées par des altérations de l'ADN nucléaire	22
2.2.2.1. Catégorisation des mutations de l'ADN nucléaire	22
2.2.2.1.1. Perturbation de la signalisation inter-génomique	22

2.2.2.1.2.	Perturbation de la dynamique mitochondriale	23
2.2.2.1.3.	Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire par mécanismes indirects	24
2.2.2.1.4.	Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire par mécanismes directs	24
3.	LE SYNDROME DE LEIGH	25
3.1.	<i>Phénotype</i>	26
3.2.	<i>Mutations causales</i>	28
4.	LA VARIANTE CANADIENNE-FRANÇAISE DU SYNDROME DE LEIGH	28
4.1.	<i>Phénotype</i>	29
4.2.	<i>Causes génétiques</i>	30
4.3.	<i>LRPPRC</i>	31
5.	MODÈLES EXPÉRIMENTAUX.....	33
	OBJECTIFS, HYPOTHÈSE ET MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.....	35
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	37
1.	HISTOLOGIE	37
1.1.	<i>Hématoxyline & Éosine (H&E)</i>	37
1.1.1.	Principe	37
1.1.2.	Protocole.....	37
1.2.	<i>Oil Red'O</i>	38
1.2.1.	Principe	38
1.2.2.	Protocole.....	39
1.3.	<i>Microscopie électronique</i>	39
1.3.1.	Principe	39
1.3.2.	Protocole.....	40
1.4.	<i>Coloration COX-SDH</i>	40
1.4.1.	Principe	40
1.4.2.	Protocole.....	40
2.	ISOLATION DES MITOCHONDRIES HÉPATIQUES.....	42
2.1.	Principe	42
2.2.	Protocole.....	42
3.	DOSAGE DE PROTÉINES.....	43
3.1.	Principe	43
3.2.	Protocole.....	43
4.	ENZYMOLOGIE	44
4.1.	<i>Principe général</i>	44
4.2.	<i>Activité de la citrate synthase</i>	44

4.2.1. Principe	44
4.2.2. Protocole.....	45
4.3. <i>Activité du complexe I</i>	46
4.3.1. Principe	46
4.3.2. Protocole.....	46
4.4. <i>Activité du complexe II</i>	47
4.4.1. Principe	47
4.4.2. Protocole.....	48
4.5. <i>Activité du complexe IV</i>	49
4.5.1. Principe	49
4.5.2. Protocole.....	49
4.6. <i>Activité de l'ATP synthase</i>	50
4.6.1. Principe	50
4.6.2. Protocole.....	50
5. RESPIRATION MITOCHONDRIALE.....	51
5.1. Principe.....	51
5.2. Protocole.....	51
6. ANALYSES STATISTIQUES	53
RÉSULTATS	54
1. PHÉNOTYPE GÉNÉRAL DE LA SOURIS <i>H-LRPPRC</i> ^{-/-}	54
2. HISTOPATHOLOGIE.....	57
2.1. <i>Perte de l'organisation lobulaire et anomalies hépatiques multiples</i>	57
2.2. <i>Dimorphisme mitochondrial</i>	62
2.3. <i>Évidence histochimique de déficit en cytochrome oxydase</i>	64
3. ENZYMOLOGIE	66
4. RESPIRATION MITOCHONDRIALE.....	68
4.1. <i>Respiration en présence de substrats du complexe I</i>	68
4.2. <i>Respiration en présence de substrats du complexe II</i>	70
4.3. <i>Respiration en présence de substrats du complexe IV</i>	71
4.4. <i>Oxydation des acides gras</i>	73
DISCUSSION	75
I. DIFFÉRENCES ET SIMILARITÉS PHÉNOTYPIQUES ENTRE LE MODÈLE <i>H-LRPPRC</i> ^{-/-} ET DIFFÉRENTES PATHOLOGIES MITOCHONDRIALES HUMAINES À RÉPERCUSSION HÉPATIQUE.....	75
II. ATTEINTE DU COMPLEXE IV ET CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES SUR LA RESPIRATION	79

III. ATTEINTE DE L'ATP SYNTHASE ET CONSÉQUENCE FONCTIONNELLE SUR LA RESPIRATION	82
IV. ALTÉRATION DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE SUPPORTÉE PAR LE PALMITOYL-COA	84
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	86
BIBLIOGRAPHIE.....	I

Liste des tableaux

Tableau I : Sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire encodées dans l'ADN mitochondrial.....	6
Tableau II : Traitements des coupes histologiques et temps d'incubation associés	38
Tableau III : Composition des colorants COX et SDH.....	41
Tableau IV : Composition des tampons A et B	42
Tableau V : Composition du tampon de réaction CS	45
Tableau VI : Composition du tampon de réaction CI.....	46
Tableau VII : Composition du tampon de réaction CII	48
Tableau VIII : Composition du tampon de réaction CIV	49
Tableau IX : Composition du tampon de réaction ATP synthase.....	50
Tableau X : Composition du tampon de respiration mitochondriale (pH ajusté à 7,4)	52
Tableau XI : Séquences de substrats et d'inhibiteurs utilisés pour la mesure de la respiration mitochondriale	52

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la mitochondrie	4
Figure 2 : ADN mitochondrial humain.....	5
Figure 3 : β -oxydation.....	8
Figure 4 : Cycle de Krebs	10
Figure 5 : Transfert des électrons dans le Complexe I	12
Figure 6 : Transfert des électrons dans le Complexe II	13
Figure 7 : Transfert des électrons dans le Complexe III.....	13
Figure 8 : Transfert des électrons dans le Complexe IV.....	14
Figure 9 : Pompage des protons dans l'espace intermembranaire lors du transfert des électrons	15
Figure 10 : Classification des désordres mitochondriaux	18
Figure 11 : Poids des animaux à 5 semaines d'âge.....	55
Figure 12 : Poids relatif du foie	56
Figure 13 : Caractérisation macroscopique du foie en H&E	57
Figure 14 : Caractérisation microscopique du foie en H&E.....	59
Figure 15 : Quantification de la stéatose hépatique par la coloration Oil Red'O	62
Figure 16 : Contenu mitochondrial des hépatocytes en microscopie électronique en transmission	63
Figure 17 : Caractérisation des mitochondries hépatiques en microscopie électronique en transmission	64
Figure 18 : Colorations spécifiques à l'activité COX et SDH	66
Figure 19 : Activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire	67
Figure 20 : Respiration mitochondriale stimulée par des substrats spécifiques du complexe I	69
Figure 21 : « <i>Acceptor Control of Respiration</i> » (ACR)	70
Figure 22 : Respiration mitochondriale stimulée par des substrats spécifiques du complexe II	71
Figure 23 : Respiration mitochondriale stimulée par des substrats spécifiques du complexe IV	72

Figure 24 : Titration au KCN	73
Figure 25 : Oxydation du palmitoyl-CoA.....	74

Liste des abréviations

AA : Antimycine A

ACR : *Acceptor control of respiration*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADN_{mt} : Acide désoxyribonucléique mitochondrial

ADN_{nu} : Acide désoxyribonucléique nucléaire

ADP : Adénine diphosphate

ANT : Translocateur des nucléotides adénylés

ARN : Acide ribonucléique

ARN_m : Acide ribonucléique messenger

ARN_t : Acide ribonucléique de transfert

ARN_r : Acide ribonucléique ribosomal

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : ATP monophosphatase

AVC : Accident vasculaire cérébral

BCA : Acide bicinchoninique

Bcl2 : *B-cell lymphoma 2*

BSA : Albumine de sérum bovin

CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone

CoA : Coenzyme A

CI : Complexe I

CII : Complexe II

CIII : Complexe III

CIV : Complexe IV

COX : Cytochrome *c* oxydase

COX10 : Facteur d'assemblage hème A: farnésyltransférase du complexe IV

COX15 : Facteur d'assemblage homologue 15 du complexe IV

CPT-I : Carnitine palmitoyltransférase I

CPT-II : Carnitine palmitoyltransférase II

CS : Citrate synthase
CV : Complexe V ou ATP synthase
Cyt b : Cytochrome *b*
Cyt c : Cytochrome *c*
DAB : 3,3'-diaminobenzidine
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DCIP : 2,6-dichlorophénolindophénol
DTNB : Acide 6,6'-dinitro-3,3'-dithiodibenzoïque
EGTA : Éthylène glycol bis(2-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-acide tétraacétique
FAD₊/FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide
FMN/ FMNH₂ : Flavine mononucléotide
GDAP1 : *Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1*
GDP : Guanoside diphosphate
GTP : Guanoside triphosphate
H&E : Hématoxyline et éosine
HSP/HSP60 : *Heat Shock Protein*
KCN : Cyanure de potassium
K_i : Constante d'inhibition
KO : *Knockout*
KSS : Syndrome Kearns-Sayre
LDH : Lactate déshydrogénase
LHON : Neuropathie optique héréditaire de Leber
LRPPRC : *Leucine rich pentatricopeptide motif containing protein*
LS : Syndrome de Leigh
LSFC : Variante canadienne-française du syndrome de Leigh
ME : Membrane mitochondriale externe
MELAS : Encéphalomyopathie mitochondriale avec acidose lactique et épisodes de type AVC
MERRF : Épilepsie avec myoclonie et *Ragged Red fibers*
MI : Membrane mitochondriale interne
MILS : Syndrome de Leigh à transmission maternelle
NAD⁺/ NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NARP : Neuropathie, ataxie et *retinis pigmentosa*
NBT : Nitro bleu tétrazolium
NIH : *National Institutes of Health*
OCT : Composé pour température de coupe optimale
O/N : *Overnight*
OXPHOS : Oxydation phosphorylante
PBS : Tampon phosphate salin
PC : Pyruvate carboxylase
PDH : Pyruvate déshydrogénase
PEO : Ophtalmoplégie progressive externe
PEP : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
Pi : Phosphate inorganique
PK : Pyruvate kinase
PMS : Phénazine méthosulfate
PPR : Pentatricopeptide
SDH : Succinate déshydrogénase
SLIRP : *SRA-temp loop interacting RNA binding protein*
TIM : Translocase de la membrane mitochondriale interne
TOM : Translocase de la membrane mitochondriale externe
TMPD : N,N,N',N'-Tétraméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride
TNB : Trinitrobenzène
VCL : Veine centrolobulaire
VDAC : Canal anionique voltage dépendant

Comme le dit si bien Nicolas : «Fais-le bien ou fais-le pas.»

Remerciements

Je désire adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr Yan Burelle, qui m'a guidée tout au long de mes études à la maîtrise. Son enthousiasme et sa passion pour la science et la recherche sont contagieux et je suis heureuse de pouvoir poursuivre mes études dans son laboratoire.

J'aimerais aussi remercier ma codirectrice, Dre Chantal Bémour, pour son aide, ses conseils et ses encouragements tout au long de mon cheminement.

J'aimerais remercier les autres membres du consortium de l'acidose lactique, dont fait partie le laboratoire de Dr Burelle, ainsi que les familles des patients LSFC pour leur collaboration.

J'aimerais remercier les membres passés et présents du laboratoire, François, David, Nicolas, Virgilio et Sonia, qui ont contribué au projet LSFC. Vous avez été, et vous êtes toujours disponibles pour répondre à mes questions, vous m'avez énormément appris et le projet ne serait pas aussi grand sans vous. Merci pour votre aide, vos conseils et surtout pour votre amitié, vous constituez l'âme du laboratoire.

J'aimerais évidemment remercier mes parents, Monique et Michel, ainsi que ma sœur Laurence pour leur soutien, leurs encouragements, leur compréhension et surtout pour leur grand intérêt envers mes études. Vous êtes devenus, malgré vous, des novices de la physiologie mitochondriale et du LSFC. J'espère que la suite de mes études supérieures vous intéressera tout autant.

Finalement, j'aimerais remercier les organismes subventionnaires pour leur soutien financier, particulièrement la Fondation du Grand Défi Pierre Lavoie qui a soutenu le projet LSFC tout au long de ma maîtrise.

Avant-propos

Le présent travail de maîtrise a été réalisé dans le laboratoire de Dr Yan Burelle, dont la thématique générale est l'étude des dysfonctions mitochondriales et leur rôle dans le développement de diverses pathologies. Depuis quelques années, son laboratoire fait partie intégrante du consortium de recherche sur le syndrome de Leigh version canadienne-française (LSFC, ou acidose lactique du Saguenay-Lac-Saint-Jean), une maladie génétique mitochondriale prévalente dans cette région du Québec. Ce groupe de recherche multidisciplinaire comprend les membres des laboratoires de Dre Bémour du CRCHUM, des Drs DesRosiers et Rioux de l'Institut de cardiologie de Montréal, Dre Laprise de l'Université du Québec à Chicoutimi, Dre Lesage de l'Université de Montréal et Dr Shoubridge de l'Université McGill. Ce consortium, qui a été mis sur pied à l'issue de la découverte de la mutation causale dans le gène *LRPPRC*, a notamment comme objectifs *i)* de mieux comprendre le rôle de la protéine LRPPRC normale et mutante, et *ii)* d'établir les mécanismes responsables de la maladie, afin de transposer ces découvertes au développement de traitements pour les patients.

Une des missions importantes du laboratoire est de caractériser les différents modèles murins développés par le consortium pour l'étude du LSFC. Le présent mémoire présente une première caractérisation du modèle de souris portant une ablation spécifique de la protéine LRPPRC dans le foie (souris H-*Lrpprc*^{-/-}). Tel qu'élaboré dans ce mémoire, un des premiers objectifs était de définir l'impact de la déficience en LRPPRC sur la composante métabolique de la fonction mitochondriale, puisque l'aspect énergétique constitue une composante centrale de la pathophysiologie des maladies mitochondriales.

Dans ce contexte, la revue de littérature qui introduit ce travail, présente de manière succincte la structure et la fonction bioénergétique des mitochondries. Les maladies mitochondriales, qui sont des pathologies rares et orphelines, sont ensuite abordées avec une attention plus particulière au Syndrome de Leigh et à sa variante canadienne-française.

Introduction

1. Bases de la biologie mitochondriale

Les mitochondries sont des organelles complexes, mais essentielles à de nombreux processus cellulaires, dont le dysfonctionnement entraîne plusieurs maladies dégénératives, le vieillissement et le cancer [1]. La mitochondrie est aujourd'hui considérée comme une plateforme de signalisation en plus de ses autres rôles. Elle est impliquée dans la régulation de l'homéostasie du calcium cellulaire et dans l'initiation de l'apoptose, elle produit les espèces réactives de l'oxygène et surtout, elle est responsable de la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate par la phosphorylation oxydative [1]. La majorité des maladies mitochondriales implique un déficit énergétique causé par une perturbation de la fonction bioénergétique de l'organelle [2].

1.1. Structure et fonction bioénergétique des mitochondries

Plusieurs évidences indiquent que la présence ubiquitaire des mitochondries dans les cellules eucaryotes serait le résultat d'une endosymbiose entre une eubactérie anaérobie et une archéobactérie consommatrice d'oxygène il y a environ 1 million d'années [3-5]. L'incorporation de ce nouvel organite aurait permis, en augmentant la production d'énergie cellulaire, la complexification génétique de l'organisme [5]. L'origine bactérienne de la mitochondrie lui confère sa structure unique et particulière, lui permettant d'exercer ses fonctions cruciales pour la cellule.

1.1.1. Structure

Dans la cellule, les mitochondries sont organisées en un réseau dynamique et elles interagissent avec d'autres composantes cellulaires tels le cytosquelette et le réticulum endoplasmique [6, 7]. La mitochondrie est composée d'une membrane externe (ME) qui englobe l'espace intermembranaire, et d'une membrane interne (MI) qui délimite la matrice (Figure 1). Ces deux membranes ont des structures et des fonctions très distinctes de même que les deux compartiments qu'elles limitent.

La ME est lisse et sa structure s'apparente à celle de la membrane plasmique. Elle est plutôt homogène, riche en phospholipides, dont des concentrations relativement élevées de phosphatidylinositol [8], et les protéines qui la composent sont encodées dans le génome nucléaire. Parmi ces protéines on retrouve les porines (ou VDAC : *Voltage-gated Anion channels*), des protéines transmembranaires permettant la diffusion de molécules de faible masse moléculaire (moins de 10 kDa). On y retrouve également plusieurs protéines appartenant à la famille des Bcl2, impliquées dans la régulation positive et négative de la voie mitochondriale de l'apoptose [9]. Par ailleurs, la ME est importante pour la biogenèse mitochondriale et la division de l'organelle ainsi que pour le maintien de la morphologie mitochondriale [10].

La MI est riche en cardiolipide, un phospholipide anionique fortement imperméable aux protons qui confère à la MI la charge négative nécessaire au maintien du potentiel de membrane [11], et contient une forte proportion de protéines dont les complexes de la chaîne respiratoire, cette dernière étant formée d'environ 90 polypeptides [10]. Cette membrane continue, d'une plus grande superficie que la ME, est fortement repliée sur elle-même formant des structures nommées *cristae* [12, 13]. Les différentes régions créées par les repliements de la MI ont des fonctions distinctes : les repliements situés près de la ME facilitent le transport des lipides et l'importation de protéines cytosoliques tandis que les invaginations dans la matrice, les *cristae*, sont fortement enrichies en complexes de la chaîne respiratoire [4]. Les polypeptides formant la chaîne respiratoire sont majoritairement encodés dans le génome

nucléaire et sont synthétisés dans le cytosol. Seulement 13 sous-unités essentielles de la chaîne respiratoire sont encodées dans le génome mitochondrial et synthétisées dans la mitochondrie [7].

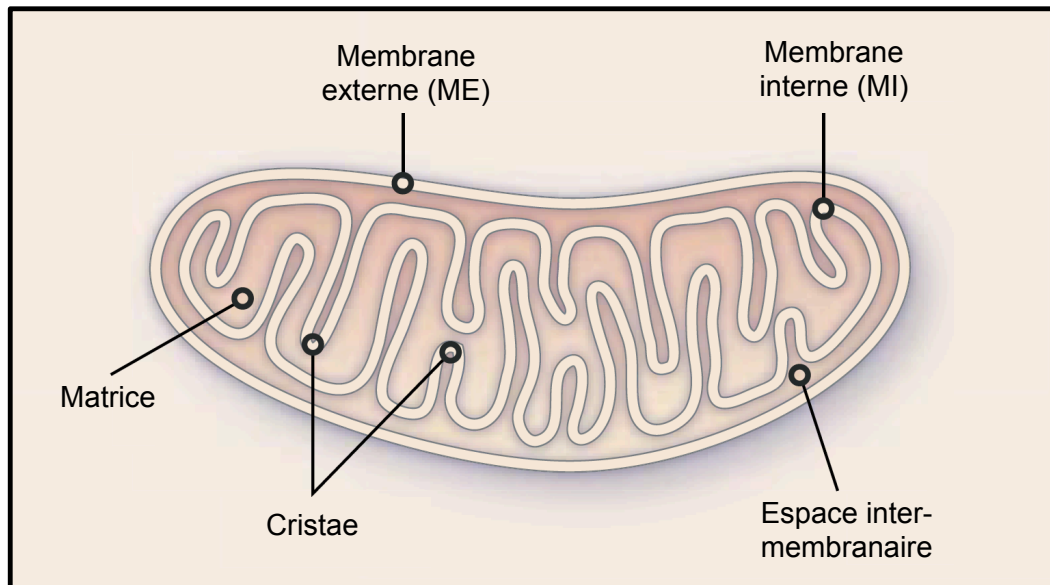


Figure 1 : Structure de la mitochondrie. Adapté de [13].

1.1.2. Génome

La mitochondrie a donc la particularité d'être sous la gouverne de deux génomes : le génome nucléaire et le génome mitochondrial. Ce dernier est associé à la face interne de la MI et possède plusieurs caractéristiques de l'ADN bactérien [7].

En effet, l'ADN mitochondrial est une molécule double brin circulaire contenant 16 569 paires de bases et dont la structure et l'organisation sont très conservées chez les mammifères (Figure 2) [14, 15]. Le génome mitochondrial est dépourvu d'histones et ne possède aucun intron. Les régions codantes sont donc successives ou séparées par seulement quelques bases. Par ailleurs, la transcription est bidirectionnelle sur le double brin circulaire [14, 16] et le code génétique mitochondrial est différent du code génétique nucléaire. En effet, un même codon peut encoder des acides aminés différents selon qu'il provienne du génome

nucléaire ou mitochondrial. Par exemple, le codon UGA, qui code pour un STOP dans le noyau, représente un Tryptophane dans la mitochondrie. Enfin, une autre particularité du génome mitochondrial est qu'il est présent en plusieurs copies dans chaque organelle et donc en plusieurs centaines ou milliers de copies dans une cellule, selon la quantité de mitochondries présentes [16].

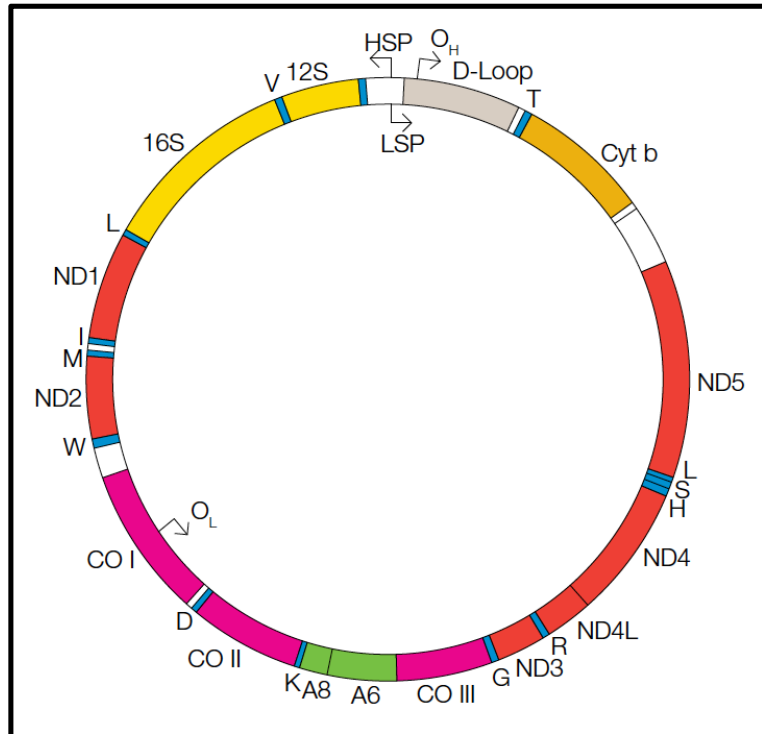


Figure 2 : ADN mitochondrial humain. Tiré de [15]. Le cercle extérieur représente le brin lourd H et le cercle interne le brin léger L. Les origines de réplication des brins sont indiquées par O_H et O_L, les promoteurs par HSP/LSP et les sens de réplication sont indiqués par les flèches. La séquence régulatrice non-codante de l'ADNmt est représentée par D-Loop. Les gènes codant pour les ARNr sont indiqués par 12s et 16S et les ARNt par les lettres T, L, S, H, R, G, K, D, W, M, I et V. Les gènes débutant par : ND encodent des sous-unités du complexe I; Cyt b encode pour une sous-unité du complexe III; CO encodent des sous-unités du complexe IV; A encodent des sous-unités de l'ATP synthase.

L'ADN mitochondrial contient 37 gènes. Parmi eux, on compte 13 ARNm codant pour des sous-unités de base de trois des quatre complexes de la chaîne respiratoire ainsi que de

l'ATP synthase [15, 17]. On y retrouve également 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiaux (ARNr) qui sont essentiels à la traduction de ces 13 ARNm [16]. Le tableau I présente la liste des sous-unités de la machinerie d'oxydation phosphorylante qui sont encodées dans l'ADN mitochondrial [15].

Tableau I : Sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire encodées dans l'ADN mitochondrial

Complexe de la chaîne respiratoire	Sous-unités encodées dans l'ADN mitochondrial
Complexe I	ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6
Complexe III	Cytochrome <i>b</i>
Complexe IV	COX I, COX II, COX III
ATP synthase	ATPase 6, ATPase 8

Étant donné le faible nombre de gènes encodés dans l'ADN mitochondrial, ces organelles dépendent grandement de l'ADN nucléaire pour remplir leurs fonctions. En effet, plus de 1000 gènes nucléaires encodent pour des protéines mitochondriales remplissant différentes fonctions [4]. Ceci inclus notamment les protéines nécessaires à la formation des complexes d'importation des protéines mitochondriales (les complexes TIM et TOM), les enzymes nécessaires au maintien de l'ADN mitochondrial, certains cofacteurs d'importance pour le transport des électrons (coenzyme Q10 et cytochrome *c*), des facteurs requis pour l'assemblage de certains complexes de la chaîne respiratoire ainsi que la vaste majorité (89/102) des sous-unités formant ces complexes [18].

1.1.3. Fonctions bioénergétiques

La mitochondrie acquiert une spécialisation selon le type cellulaire dans lequel elle se retrouve [7]. Le contenu ainsi que la morphologie de l'organite varient d'un organe à l'autre [19]. Par exemple, dans les cardiomyocytes, les mitochondries sont plus nombreuses et présentent un plus grand nombre de *cristae* comparativement aux hépatocytes. Cette

différence quantitative et qualitative permet un ajustement en fonction de l'importance de la demande énergétique dans chaque organe. De ce fait, les symptômes propres aux maladies mitochondriales se présentent de manière plus sévère et évidente lorsque les mutations sont présentes dans des tissus à forte demande énergétique [15, 20].

La mitochondrie répond à la demande énergétique en produisant de l'ATP à partir des nutriments de l'alimentation : les glucides, les lipides et les protéines. Avant de pouvoir être utilisés par la mitochondrie, les nutriments complexes doivent être dégradés en éléments plus simples par les voies du métabolisme intermédiaire qui englobent plusieurs réactions enzymatiques successives menant à la production d'ATP [9].

1.1.3.1. β -oxydation

Avant leur utilisation, les triglycérides sont hydrolysés en acides gras qui seront ensuite oxydés à travers la voie de la β -oxydation (Figure 3) dans la matrice mitochondriale. Les acides gras à courte chaîne (14 carbones et moins) passent la MI de la mitochondrie sous forme d'acides gras libres et ne requièrent aucun système de transport particulier. À l'opposé, les acides gras à longue chaîne (15 carbones et plus) doivent être importés dans la matrice mitochondriale par un système de transport à plusieurs étapes. Les acides gras sont d'abord convertis en acyl-CoA par l'enzyme acyl-CoA synthase localisée à la surface externe de la ME mitochondriale. L'acyl-CoA formé est importé dans l'espace intermembranaire via une translocase pour y être couplé à la L-carnitine par l'enzyme carnitine palmitoyltransférase I (CPT-I). L'acylcarnitine formé est ensuite importé dans la matrice par la carnitine-acylcarnitine translocase et par la suite converti en acyl-CoA libre par la CPT-II localisée à la face interne de la MI. Au cours de cette étape, la molécule de L-carnitine formée retourne dans l'espace intermembranaire par la translocase pour être réutilisée alors que l'acyl-CoA entre dans la voie de la β -oxydation [9].

La β -oxydation est un cycle de quatre réactions, une première oxydation suivie d'une hydratation, puis une deuxième oxydation et finalement un clivage, qui scinde de manière

itérative le lien entre le 2^e et 3^e carbone de l'acyl-CoA. Chaque tour de β -oxydation produit 1 FADH_2 , 1 NADH , 1 H^+ et une molécule d'acétyl-CoA qui entrera dans le cycle de Krebs [9].

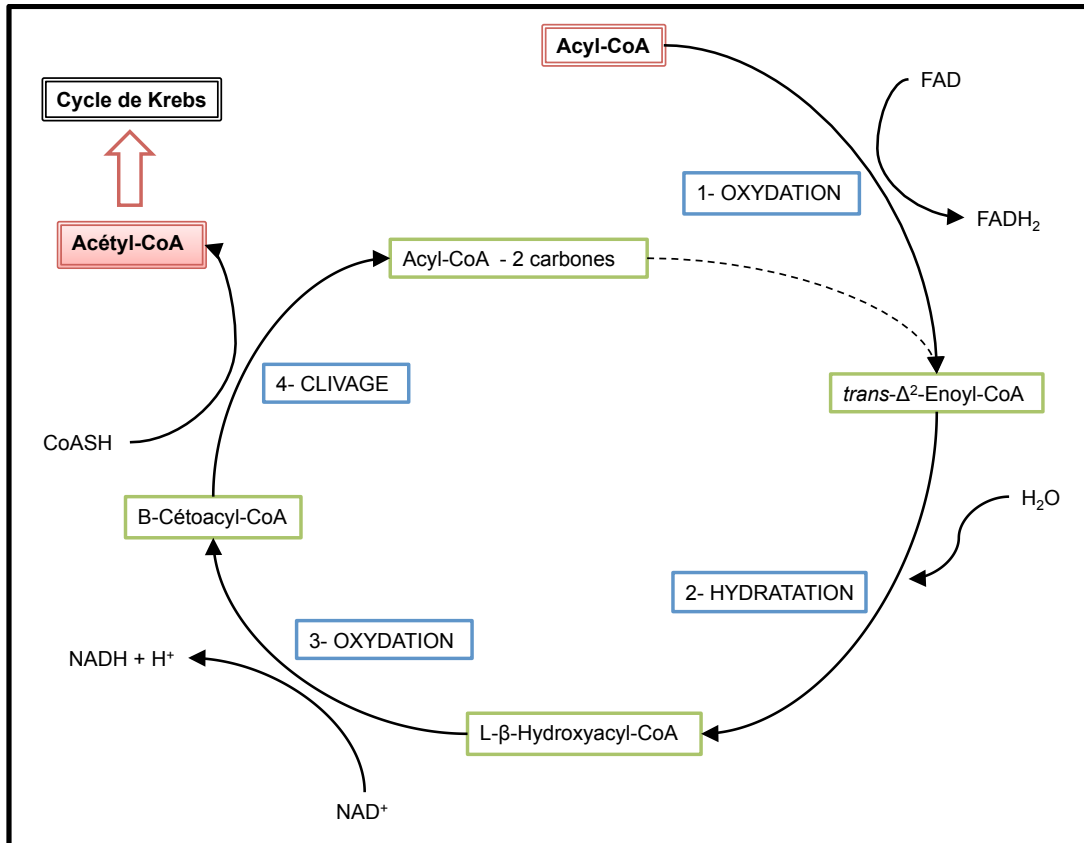


Figure 3 : β -oxydation. Adapté de [9]. CoA/CoASH : Coenzyme A; FAD/FADH_2 : Flavine adénine dinucléotide; NAD^+/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

1.1.3.2. Glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique anaérobie qui a lieu dans le cytosol, comprenant 10 réactions qui convertiront 1 molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate. Les premières étapes regroupent des réactions phosphorylantes où 2 molécules d'ATP sont consommées pour convertir 1 molécule de glucose en 2 molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate. Les étapes subséquentes comprennent des réactions de conversion des deux glycéraldéhyde-3-phosphate en deux pyruvates où 2 NAD^+ , 2 Pi et 4 ADP sont consommés et

2 NADH, 2 H₂O et 4 ATP sont produits. Au final, la production nette de la glycolyse est de 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. En situation anaérobie, le pyruvate est converti en lactate par le processus de fermentation impliquant l'enzyme lactate déshydrogénase. Lorsque l'oxygène devient limitant, par exemple dans le muscle squelettique en exercice, le pyruvate généré par la glycolyse ne peut plus être oxydé par le cycle de Krebs et la glycolyse ralentit au fur et à mesure que les quantités de NAD⁺ disponibles diminuent. Dans cette situation, le pyruvate est réduit en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase, régénérant du NAD⁺ à partir du NADH + H⁺ qui est utilisé pour maintenir le flux de la glycolyse et produire rapidement une importante quantité d'ATP pour subvenir aux besoins cellulaires. Le lactate accumulé au cours de la période anaérobie diffusera dans la circulation sanguine et sera capté par le foie où il sera reconverti en glucose via la gluconéogenèse. Au contraire, en situation aérobie, les molécules de pyruvate produites par la glycolyse sont importées dans les mitochondries par un transporteur monocarboxylate et converties en 2 molécules d'acétyl-CoA par l'enzyme multifonctionnelle pyruvate déshydrogénase (PDH) [9].

1.1.3.3. *Cycle de Krebs*

Dans la matrice mitochondriale, le cycle de Krebs est la voie terminale du catabolisme où l'acétyl-CoA provenant des glucides, des corps cétoniques, des acides gras et des acides aminés, est oxydé pour produire du NADH et du FADH₂. L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs et passe par 8 réactions impliquant 9 enzymes. Au cours de ces réactions, l'acétyl-CoA entrant est décarboxylé en 2 molécules de CO₂. De plus, les réactions de ce cycle impliquent plusieurs étapes de déshydrogénation qui permettent la production de 3 NADH + H⁺, et 1 FADH₂, des équivalents réduits qui vont par la suite agir comme donneur d'électrons aux complexes de la chaîne respiratoire pour l'oxydation phosphorylante. Par ailleurs, une des étapes du cycle de Krebs mène à la formation d'une molécule de GTP par phosphorylation au niveau du substrat [9, 21].

En plus des équivalents réduits, le cycle de Krebs fournit des précurseurs essentiels à des voies de biosynthèse comme la néoglucogenèse, la synthèse des acides gras (incluant les

stéroïdes) et le métabolisme des acides aminés. D'autre part, le cycle de Krebs nécessite un renouvellement de ses métabolites intermédiaires pour fonctionner, notamment de l'oxalo-acétate qui est nécessaire au démarrage du cycle. Cet apport lui est fourni par le biais des réactions anaplérotiques qui rétablissent les concentrations des métabolites pour que le cycle de Krebs ne soit pas interrompu. La plus importante de ces réactions est catalysée par la pyruvate carboxylase qui permet la synthèse de l'oxalo-acétate à partir du pyruvate dans la mitochondrie [9].

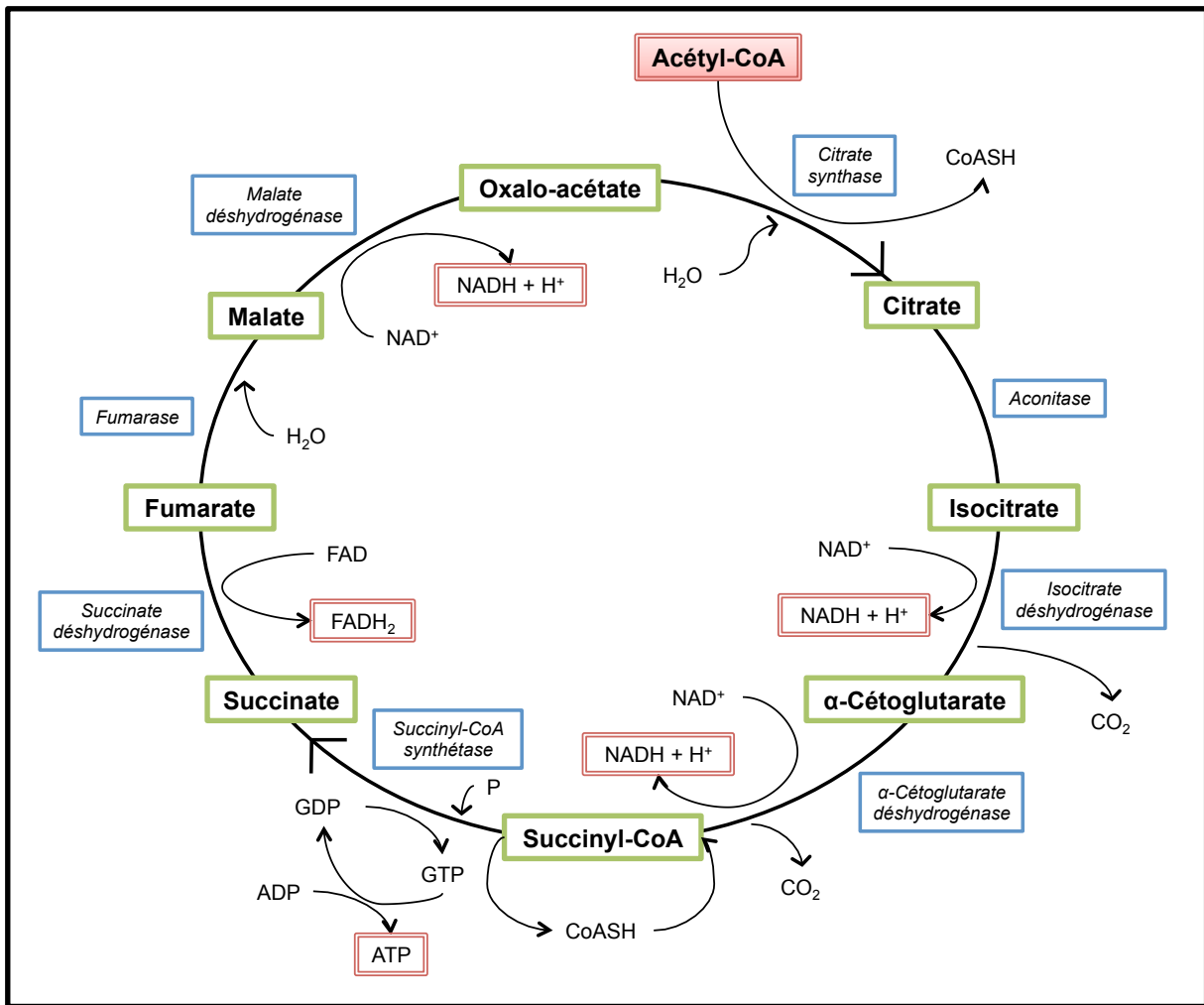


Figure 4 : Cycle de Krebs. Adapté de [9]. ADP : Adénosine diphosphate; ATP : Adénoside triphosphate; CoA/CoASH : Coenzyme A; FAD/FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide; GDP : Guanoside diphosphate; GTP : Guanoside triphosphate; NAD⁺/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

1.1.4. Chaîne de transport des électrons et oxydation phosphorylante (OXPHOS)

La chaîne de transport des électrons, ou chaîne respiratoire, oxyde les équivalents réduits provenant du cycle de Krebs (NADH et FADH₂) dans le but de générer un gradient de protons de part et d'autre de la MI qui sera utilisé par l'ATP synthase pour générer l'ATP. Cette oxydation se fait à travers la MI par l'intermédiaire de quatre complexes multi-protéiques. Les électrons fournis par l'oxydation du NADH et du FADH₂ parcourent la chaîne, en paire, pour ultimement être couplés à l'oxygène moléculaire (O₂), qui agit comme accepteur final [9].

L'organisation de la chaîne respiratoire dans la MI se fait selon des arrangements de supercomplexes formés d'assemblages de divers complexes avec des stoechiométries différentes [22]. Cette conformation permet un transport plus efficace des électrons, une stabilité accrue des complexes dans la MI et une réduction de la production de radicaux libres par la chaîne respiratoire [22]. La formation de supercomplexes constitue un mécanisme d'adaptation de la mitochondrie aux changements des besoins énergétiques de la cellule, puisque les échanges d'électrons au sein de ces arrangements sont plus efficaces que les échanges par diffusion latérale entre les différents complexes libres [23]. Les arrangements de supercomplexes les plus courants sont des agencements de complexes I-III, I-III-IV et III-IV avec des complexes II plus fréquemment retrouvés sous forme libre [23].

Les réactions d'oxydation débutent au complexe I (CI), aussi appelé NADH déshydrogénase. Le CI est un lien direct entre les voies de la glycolyse, du cycle de Krebs, de la β -oxydation et la chaîne de transport des électrons. La NADH déshydrogénase oxyde le NADH et transfère les électrons au coenzyme-Q, qui devient réduit par le gain. L'énergie libérée par cette réaction d'oxydoréduction est couplée au transfert de 2 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (Figure 5) [9].

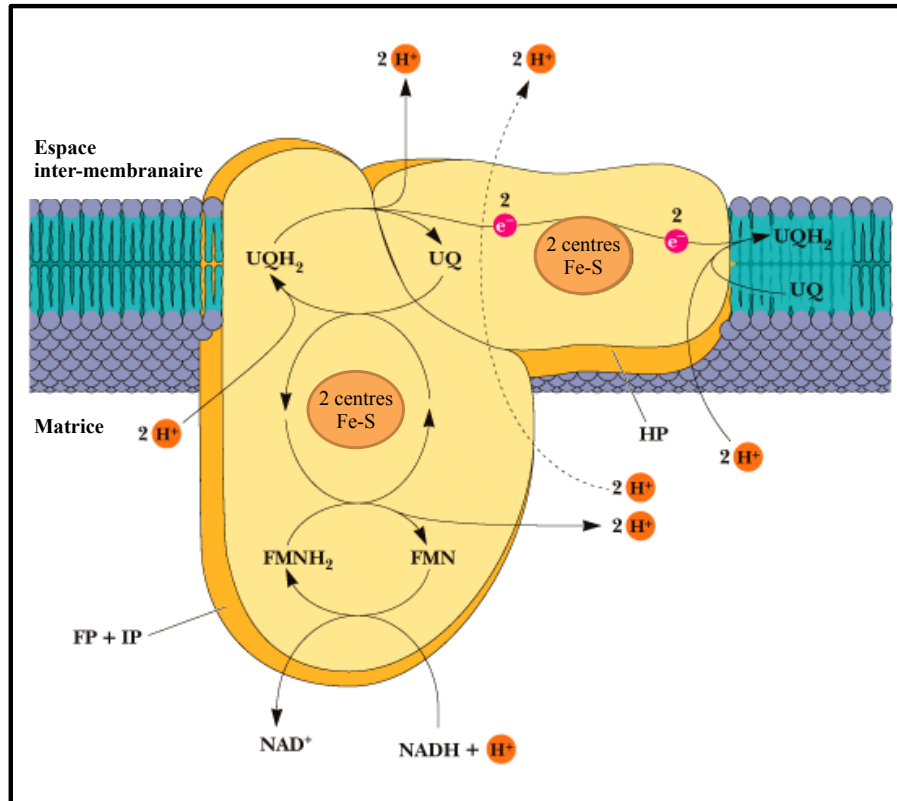


Figure 5 : Transfert des électrons dans le Complexe I. Adapté de [9]. HP : Protéine hydrophobe; FMN/FMNH₂ : flavine mononucléotide; FP : flavoprotéine; IP : protéine fer-soufre; NAD⁺/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide; UQ/UQH₂ : ubiquinone.

Les électrons peuvent également faire leur entrée dans la chaîne respiratoire au niveau du complexe II (Figure 6) aussi appelé succinate déshydrogénase. En lien direct avec le cycle de Krebs, le CII oxyde le succinate en fumarate réduisant le FAD en FADH₂. Le FADH₂ transfère aussitôt ses électrons aux centres fer-soufre du CII qui les cèdent à leur tour à l'ubiquinone (aussi appelé coenzyme-Q). Le coenzyme-Q est un transporteur mobile d'électrons, qui permet le transfert des électrons des CI et CII vers le CIII. La variation d'énergie engendrée par le transfert des électrons du succinate à l'ubiquinone dans le CII n'est cependant pas suffisante pour permettre un transfert de protons vers l'espace intermembranaire [9].

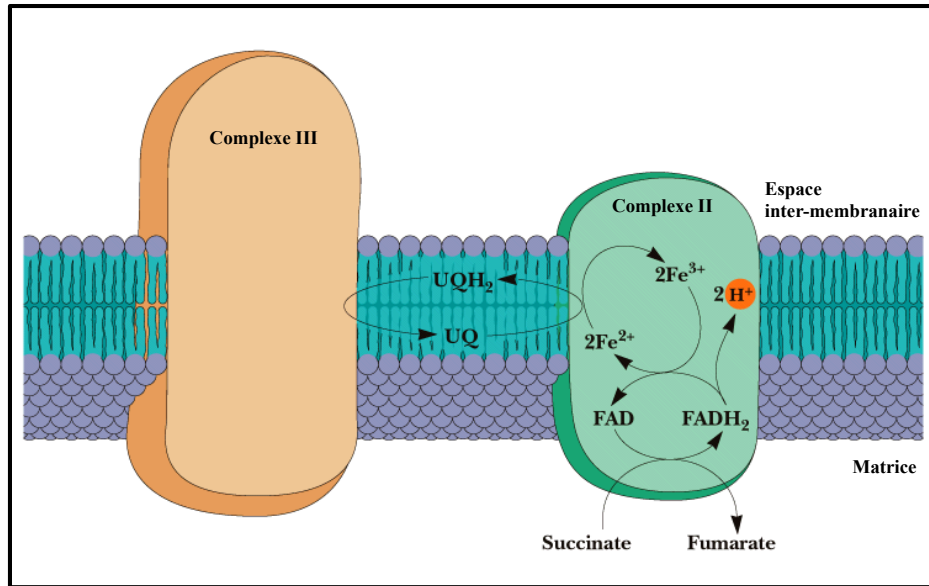


Figure 6 : Transfert des électrons dans le Complexe II. Adapté de [9]. FAD/FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide; UQ/UQH₂ : ubiquinone.

Le coenzyme-Q réduit par le complexe I ou II donne ses électrons au cytochrome *b* et *c*₁ du complexe III (ou coenzyme-Q-cytochrome *c* réductase). Ce transfert, qui se fait par l'intermédiaire d'un cycle impliquant l'ubiquinone, permet le pompage de 2 protons vers l'espace intermembranaire (Figure 7) [9].

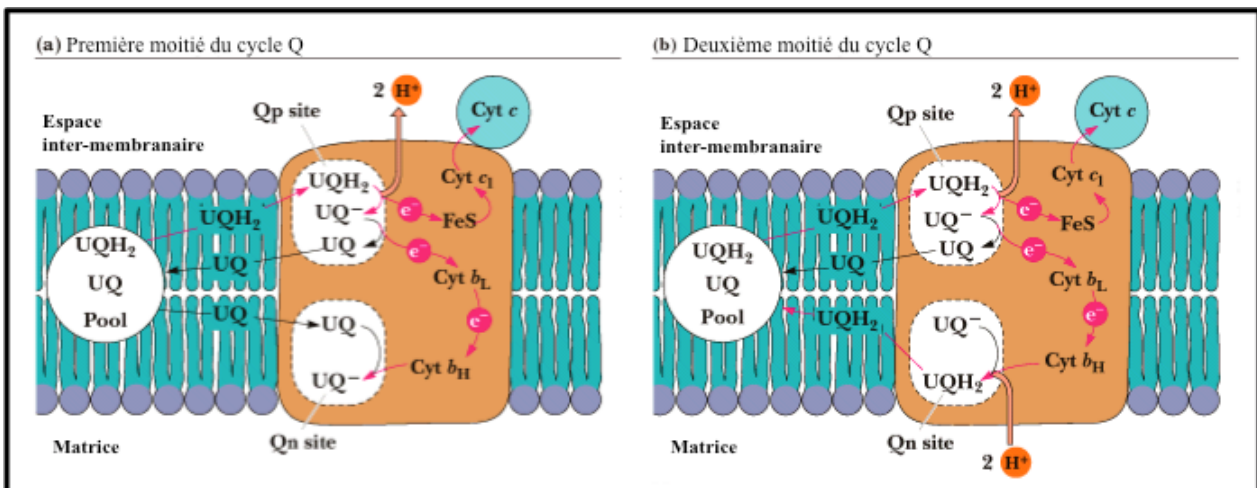


Figure 7 : Transfert des électrons dans le Complexe III. Adapté de [9]. Cyt *b* : cytochrome *b*; Cyt *c* : cytochrome *c*; UQ/UQH₂ : ubiquinone.

Le cytochrome c_1 du complexe III cède ensuite ses électrons au cytochrome c , une molécule faiblement associée à la membrane interne qui agit comme transporteur mobile d'électrons vers le complexe IV (cytochrome c oxydase), la destination finale des électrons dans le processus de la respiration. Ce complexe accepte les électrons provenant du cytochrome c et il catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau ($2\text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$) (Figure 8). Les réactions du CIV sont aussi accompagnées d'un transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire qui contribue, avec les complexes I et III, à la production du gradient électrochimique en H^+ (Figure 9) [9].

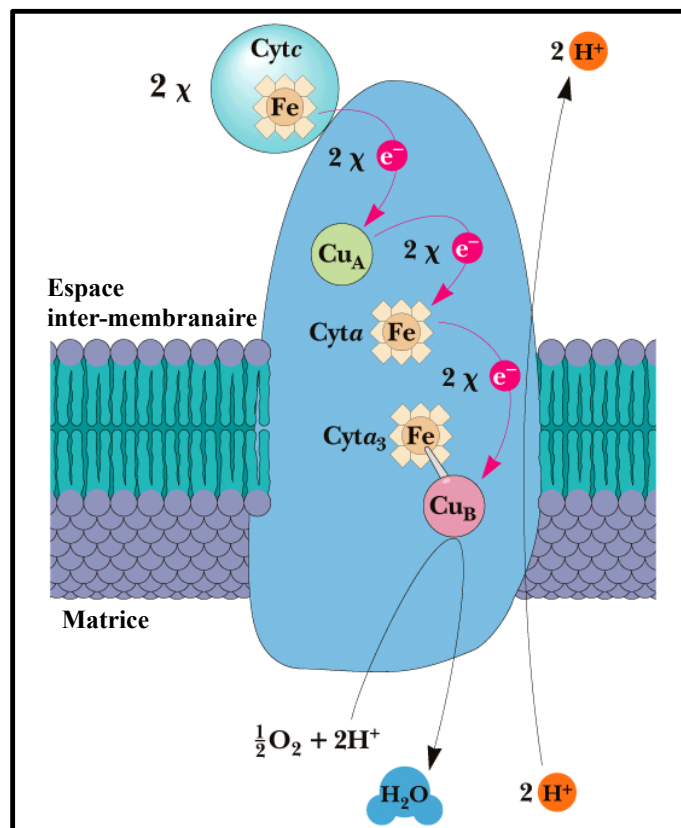


Figure 8 : Transfert des électrons dans le Complexe IV. Adapté de [9]. Cyt a : cytochrome a ; Cyt c : cytochrome c .

Ce gradient électrochimique transmembranaire constitue une importante énergie potentielle qui alimente plusieurs processus énergétiquement coûteux, dont la synthèse d'ATP.

Cette synthèse survient au niveau du complexe V (ATP synthase) où la réentrée de protons dans la matrice libère l'énergie requise pour la phosphorylation de l'ADP en ATP [9].

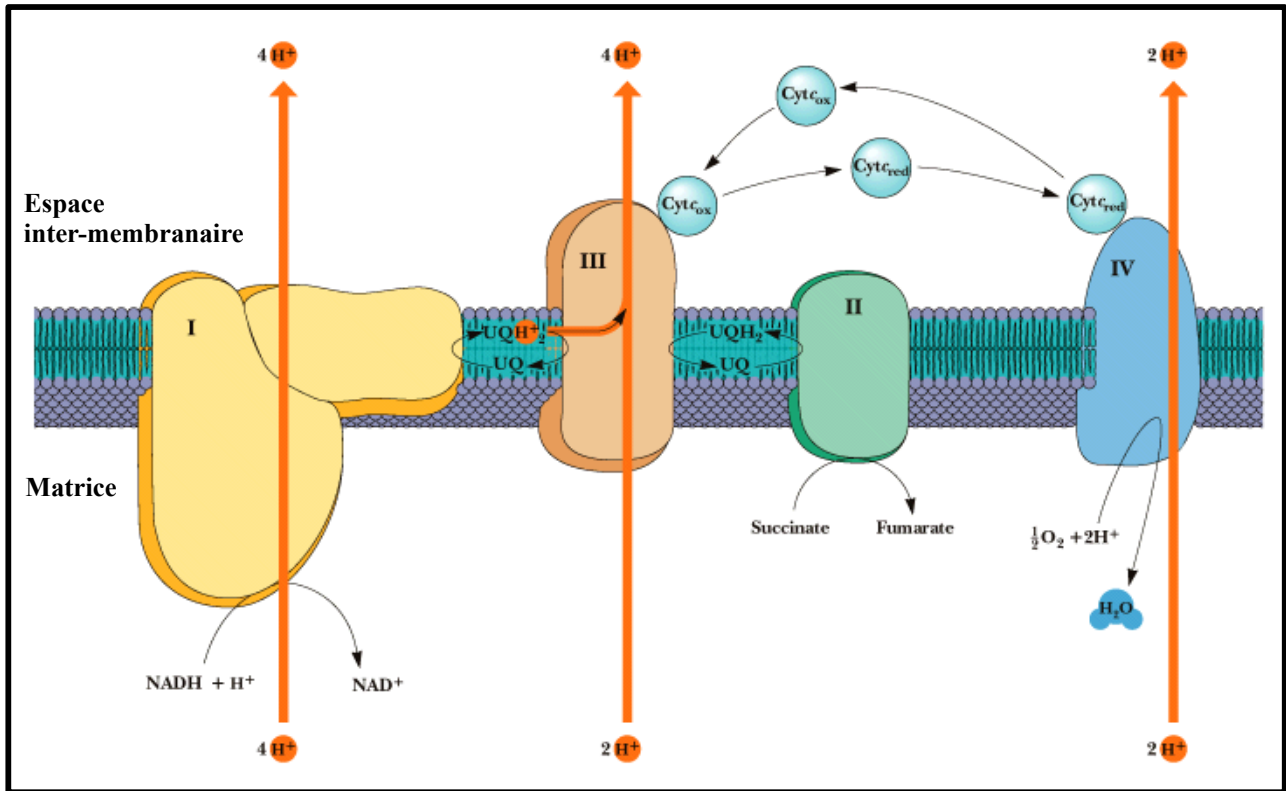


Figure 9 : Pompage des protons dans l'espace intermembranaire lors du transfert des électrons. Adapté de [9]. NAD^+/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

L'ATP produit est ensuite exporté hors de la mitochondrie en échange de l'ADP. Ces deux molécules chargées ne peuvent traverser librement les membranes et doivent être transportées par l'ATP-ADP translocase (ou *adenine nucleotide translocase*, ANT) dans un ratio 1:1. Ce transporteur est situé dans la MI de la mitochondrie et il représente environ 15 % du contenu protéique total [9].

2. Maladies rares, orphelines et mitochondriales

2.1. Définition des Maladies rares

Une maladie rare est généralement définie comme une affection prévalant dans une faible proportion de la population. Cette prévalence peut varier d'un pays ou d'une région à l'autre en fonction du bagage génétique des populations et des facteurs environnementaux. De ce fait, une maladie peut être considérée très rare dans une certaine région, mais affecter plus d'individus dans une autre, expliquant pourquoi il n'existe pas de seuil de prévalence universel. Cependant, il est admis qu'une maladie est rare si sa prévalence est comprise entre 1/1500 et 1/200 000 [24, 25].

De manière générale, la vaste majorité (80 %) des maladies rares sont attribuables à des mutations génétiques [26, 27]. Ces mutations sont acquises de manière spontanée et/ou transmises à la descendance par voie autosomique, par l'intermédiaire du chromosome X, ou encore par le génome mitochondrial. Le pourcentage des maladies rares restant (c.-à-d. 20 %) englobe, quant à lui, certains types de cancers, quelques déficits immunitaires et des manifestations peu communes de certaines infections ou intoxications.

À ce jour, plus de 6000 maladies rares ont été identifiées à travers le monde [28]. Ces pathologies se manifestent à tout stade de la vie, affectent un ou plusieurs tissus/systèmes physiologiques et sont très variables en terme de sévérité des atteintes. Ces pathologies sont pour la majorité orphelines, c'est-à-dire laissées pour compte par l'industrie pharmaceutique. De ce fait, il est estimé que seulement 400 d'entre elles auraient un traitement curatif, laissant plus de 90 % des patients sans espoir de thérapie [29].

Au Québec, 4 maladies rares affectent particulièrement la population du Saguenay-Lac-Saint-Jean : *i) la tyrosinémie héréditaire de type I, ii) la neuropathie sensitivomotrice, iii) l'ataxie récessive spastique et iv) le syndrome de Leigh version canadienne-française (LSFC*

ou acidose lactique du Saguenay-Lac-St-Jean). Le taux de porteurs pour les mutations causant ces maladies sont de 1/20 à 1/23 par habitant et la prévalence de 1/1800 à 1/2117 naissances [30]. La présence de ces maladies dans la région est attribuable à la colonisation de cette dernière par un faible nombre d'individus porteurs des mutations causales au 19^e siècle, et par le faible brassage génétique qui s'est opéré depuis, du fait de l'éloignement géographique.

2.2. Désordres mitochondriaux

Les maladies mitochondriales occupent une place importante dans la famille des maladies rares. En effet, leur prévalence à l'échelle mondiale est relativement élevée (1/2000 - 1/5000), et probablement sous-estimée compte tenu de la difficulté de leur diagnostic [31-33]. Au plan clinique, les patients présentent un large spectre de symptômes donnant lieu à des phénotypes très complexes et variables [34]. Par ailleurs, la grande diversité des mutations causales connues, la complexité de la biochimie mitochondriale, et les rôles multiples de ces organelles dans les divers tissus font en sorte que les désordres mitochondriaux ont une pénétrance variable d'un organe à l'autre chez un même individu.

Les maladies mitochondriales impliquent une perturbation d'au moins un des nombreux rôles que joue la mitochondrie dans la cellule, soit la production d'ATP; la génération d'espèces réactives de l'oxygène; le contrôle de l'homéostasie du calcium et la régulation de l'apoptose [35]. Les désordres mitochondriaux peuvent se transmettre génétiquement de façon mendélienne, de façon exclusivement maternelle ou apparaître sporadiquement [36]. Puisque les mitochondries sont omniprésentes dans presque la totalité des cellules, tous les tissus peuvent être affectés par des dysfonctionnements mitochondriaux donnant lieu à des maladies mitochondriales multisystémiques [31]. La mitochondrie étant sous un double contrôle génétique, les désordres mitochondriaux sont regroupés en deux catégories principales : 1) ceux causés par des mutations de l'ADN nucléaire et 2) ceux causés par des mutations de l'ADN mitochondrial et plusieurs sous-catégories illustrées dans la figure 10 ci-dessous [3].

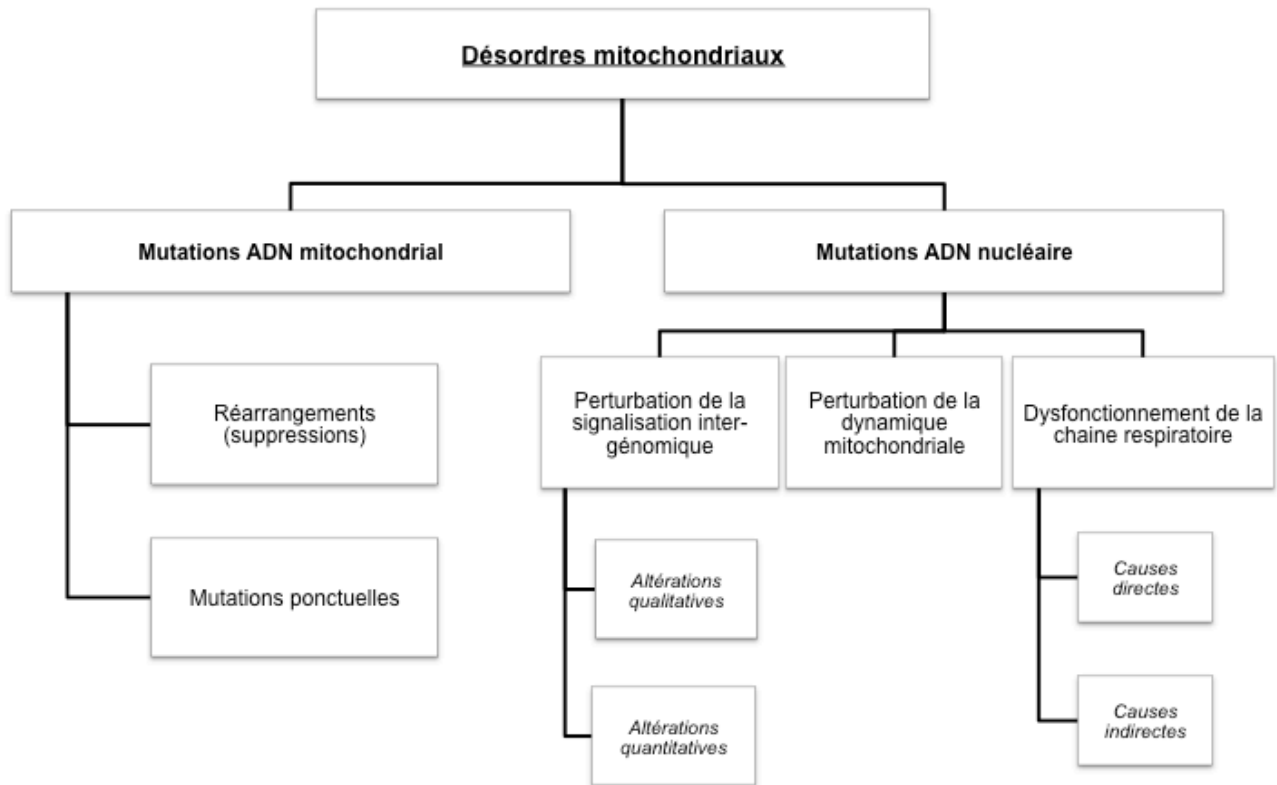


Figure 10 : Classification des désordres mitochondriaux. À partir de [3, 31, 35, 37, 38].

2.2.1. Maladies mitochondriales causées par des altérations de l'ADN mitochondrial

Les maladies mitochondriales attribuables à des mutations de l'ADN mitochondrial sont extrêmement variables au plan clinique. D'une part, elles peuvent être très spécifiques à un complexe ou généralisées à plusieurs complexes selon que la mutation se situe au niveau d'un ARNm codant pour un polypeptide particulier ou à une composante de la machinerie de traduction (c.-à-d. mutation dans les ARNt ou ARNr). De plus, le mode de transmission de l'ADN mitochondrial, qui diffère de manière très importante de la transmission mendélienne, ajoute une variabilité importante qui s'explique par trois aspects [31] :

2.2.1.1. *Transmission exclusivement maternelle*

Le premier aspect est la transmission exclusivement maternelle des mutations. En effet, suite à la fécondation, seul l'ADN mitochondrial provenant de l'oocyte se retrouve dans les cellules de l'embryon. Ainsi, la mère transmet son ADN mitochondrial, et les mutations associées, également à tous ses enfants (garçons et filles), mais seules ses filles pourront le transmettre à leurs progénitures [35].

2.2.1.2. *Concept d'hétéroplasmie et threshold effect*

Le deuxième aspect, qui est probablement plus important que le premier pour expliquer la grande variabilité de ces pathologies, est la présence d'hétéroplasmie variable. Les cellules contiennent des quantités variables de mitochondries, chacune possédant plusieurs copies d'ADN circulaire. Des mutations spontanées peuvent survenir à tout stade de vie dans certaines copies d'ADN mitochondrial ou être directement transmises lors de l'embryogenèse par quelques mitochondries maternelles affectées. Au cours de la division cellulaire, les mitochondries sont distribuées aléatoirement entre les deux cellules filles, répartissant inégalement les mutations dans les cellules et éventuellement dans les tissus. L'hétéroplasmie est un phénomène qui a lieu lorsque des mutations pathogéniques et des brins d'ADN sauvages coexistent au sein d'une même cellule, tissu ou individu. Cependant, le phénotype pathologique ne survient que lorsque les proportions d'ADN mutés atteignent un seuil (*threshold effect*), déterminé dans chaque type cellulaire selon la demande énergétique du tissu, donnant lieu à des présentations cliniques très variables [3]. Ainsi chez un même individu, plusieurs tissus portant en quantités variables la même mutation de l'ADN mitochondrial peuvent être affectés à différents niveaux engendrant des désordres tissus-spécifiques [31].

2.2.1.3. Ségrégation mitotique

Enfin, le troisième aspect est la ségrégation mitotique, un phénomène qui survient suite à la division cellulaire lorsqu'une cellule fille surpasse le *threshold*, déclenchant ainsi le passage d'un phénotype compensé à un phénotype pathologique. La ségrégation mitotique fait donc en sorte que la présentation clinique de certains patients évolue au cours de la vie et que de nouveaux symptômes apparaissent avec l'âge [35].

Globalement, les désordres mitochondriaux causés par des mutations de l'ADN mitochondrial ont une prévalence de 1/5000 dans la population générale, et le taux de porteur est estimé à au moins 1/200 pour l'une des multiples mutations pathogéniques connues [38]. Les mutations de l'ADN mitochondrial sont donc la principale cause de maladies mitochondriales se développant chez l'adulte [36]. Ceci s'explique en partie par le fait que le génome mitochondrial est plus susceptible aux mutations que le génome nucléaire dû à l'absence d'histones et à sa localisation dans la matrice mitochondriale, un environnement où les espèces réactives de l'oxygène hautement mutagènes sont générées [16].

2.2.1.4. Catégorisation des mutations de l'ADN mitochondrial

Génétiquement, les mutations de l'ADN mitochondrial sont classées en deux sous-catégories;

2.2.1.4.1. Réarrangements (suppression) [35]

La première catégorie de mutation comprend les réarrangements de l'ADN mitochondrial avec une suppression de plusieurs paires de bases successives. Les désordres mitochondriaux engendrés par ces réarrangements ont une pénétrance variable en fonction de la longueur de la suppression et du gène touché [32]. Parmi les maladies associées, on retrouve trois affections sporadiques connues :

1. Le syndrome de Pearson, un désordre infantile fatal caractérisé par une anémie sidéroblastique et une dysfonction du pancréas exocrine;
2. Le syndrome de Kearns-Sayre (KSS), un syndrome multisystémique se manifestant avant l'âge de vingt ans, caractérisé principalement par une altération des mouvements oculaires, une rétinopathie pigmentaire et de l'arythmie de type bradycardie;
3. L'ophtalmoplégie externe progressive (PEO), un syndrome moins sévère et moins invasif avec des symptômes de ptosis, d'ophtalmoplégie et de faiblesse musculaire.

2.2.1.4.2. Mutations ponctuelles

Plus de 200 mutations ponctuelles pathogéniques de l'ADN mitochondrial ont été identifiées et peuvent causer des désordres autant systémiques que sporadiques et tissus spécifiques selon le gène atteint. Les syndromes les plus connus, chacun pouvant être causé par différentes mutations ponctuelles [35], sont :

- L'encéphalomyopathie mitochondriale avec acidose lactique et épisodes de type AVC (MELAS) qui se manifeste dans l'enfance ou l'adolescence après un développement normal causant des symptômes de vomissements récurrents, des maux de tête semblables aux migraines et des symptômes d'AVC sans lésion cérébrale associée;
- L'épilepsie avec myoclonie et *Ragged Red fibers* (MERRF) qui se manifeste par une surdité, une démence et une neuropathie périphérique;
- Neuropathie, ataxie et *retinis pigmentosa* (NARP) chez les jeunes adultes avec des symptômes de démence, de convulsions et de faiblesse musculaire ou le syndrome de Leigh transmis maternellement (MILS), une encéphalopathie infantile fatale; ces deux syndromes, étant causés par deux mutations ponctuelles différentes du même nucléotide [37], sont un excellent exemple de la variabilité de la sévérité des désordres mitochondriaux;
- Neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON), caractérisée par une perte de la vue chez les jeunes adultes, principalement de sexe masculin, causée par une atrophie bilatérale du nerf optique.

2.2.2. Maladies mitochondriales causées par des altérations de l'ADN nucléaire

Contrairement aux pathologies causées par des mutations de l'ADN mitochondrial, les maladies mitochondriales causées par des altérations de l'ADN nucléaire se transmettent de façon mendélienne. De plus, elles peuvent affecter plusieurs aspects de la biologie mitochondriale au-delà de la chaîne respiratoire. En effet, le génome nucléaire encode non seulement des sous-unités et facteurs d'assemblage de la chaîne respiratoire, mais également les protéines impliquées dans plusieurs fonctions incluant : i) l'importation des protéines cytosoliques vers la mitochondrie; ii) le maintien et la réplication du génome mitochondrial; iii) la fission et la fusion mitochondriales et iv) la synthèse des lipides formant la MI [37].

2.2.2.1. Catégorisation des mutations de l'ADN nucléaire

Les mutations du génome nucléaire engendrent des désordres mitochondriaux qui sont classés en quatre sous-catégories [35]:

2.2.2.1.1. Perturbation de la signalisation intergénomique

Étant donné la taille réduite du génome mitochondrial, ces organelles dépendent de l'ADN nucléaire pour la synthèse de facteurs essentiels à sa réplication [3]. Les mutations dans ces gènes causent des altérations qualitatives ou quantitatives de l'ADN mitochondrial.

Les altérations qualitatives sont causées par des mutations dominantes ou récessives qui engendrent des délétions multiples de l'ADN mitochondrial et qui sont cliniquement accompagnées de PEO et de plusieurs autres symptômes [3, 35]. Les mutations nucléaires qui touchent la thymidine phosphorylase (causant le syndrome MNGIE : encéphalomyopathie neurogastrointestinale mitochondriale) et le translocateur adénine/nucléotide ANT1 (causant le PEO autosomal dominant) affectent directement le *pool* de nucléotides disponibles dans la mitochondrie et ont des mécanismes pathogéniques similaires [37].

Les altérations quantitatives sont, quant à elles, causées par des mutations nucléaires récessives qui engendrent des déplétions de l'ADN mitochondrial, généralement en perturbant l'homéostasie des nucléotides mitochondriaux. La déplétion de l'ADN mitochondrial est un phénomène rare, mais sévère, où des doubles brins circulaires entiers sont supprimés créant un déséquilibre des ratios ADNmt/ADNnu. Les présentations cliniques les plus courantes sont des myopathies et des hépatopathies fatales détectables en bas âge [37]. Puisque ces altérations affectent directement l'ADN mitochondrial, elles sont aussi associées aux phénomènes d'hétéroplasmie et de ségrégation mitotique mentionnés précédemment [39].

2.2.2.1.2. Perturbation de la dynamique mitochondriale

Les mitochondries se déplacent dans la cellule sur les microtubules grâce à des kinésines et des dynéines. Les mutations affectant cette dynamique sont notamment responsables de plusieurs neuropathies puisque le transport des mitochondries du corps cellulaire, où elles sont synthétisées, vers les terminaisons axonales, où elles sont utilisées, est capital pour la neurotransmission [35]. Parmi les affections les plus communes de ce genre, on note :

- Des mutations dans le gène *KIF5A*, qui encode un type de kinésine, causent une paraplégie spastique autosomale dominante [35];
- Des mutations dans le gène *OPA1* causent une forme autosomale dominante d'atrophie du nerf optique, l'équivalent mendélien du LHON [35];
- Des mutations du gène *GDAP1*, qui encode une protéine régulatrice du réseau mitochondrial, causent en très bas âge un syndrome neuropathique autosomal récessif sévère [35].

2.2.2.1.3. Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire par mécanismes indirects

Dans cette catégorie, on retrouve des mutations qui ne concernent pas les gènes impliqués dans la synthèse de la chaîne respiratoire (c.-à-d. sous-unités structurales et facteurs d'assemblage), ou la régulation de l'ADNmt, mais qui malgré tout, résultent en une perte d'activité respiratoire.

Plus spécifiquement, on retrouve dans cette catégorie des gènes codant pour la synthèse des lipides de la membrane interne et du système d'importation des protéines mitochondriales. Une des pathologies les mieux décrites de cette catégorie est le syndrome de Barth, une maladie récessive liée au X causé par une déficience dans la biosynthèse des cardiolipides de la MI, qui cause une myopathie, une cardiopathie et une leucopénie [35]. Quant aux mutations affectant les systèmes d'importation protéiques vers la mitochondrie, deux pathologies ont été principalement décrites. Des mutations dans le gène *TIMM8A*, qui encode la protéine DD1 impliquée dans le transport protéique de l'espace intermembranaire, causent le syndrome Mohr-Tranebjaerg lié au X et caractérisé par une surdité neurosensorielle, une cécité corticale et des symptômes psychiatriques. De plus, des mutations dominantes dans le gène codant pour la chaperonne HSP60 causent une paraplégie spastique héréditaire [37].

2.2.2.1.4. Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire par mécanismes directs

2.2.2.1.4.1. Mutation au niveau de sous-unités structurales des complexes

L'ADN nucléaire encode toutes les protéines composant le complexe II et la plupart des sous-unités structurales des autres complexes de même que le coenzyme-Q et le cytochrome *c*. Des mutations pathogéniques ont été identifiées pour plusieurs de ces

composantes. Celles-ci sont généralement associées à des phénotypes sévères et fatals qui sont détectables en bas âge. Les mutations touchant les complexes I, II et IV sont associées à des formes autosomales récessives du syndrome de Leigh [31, 35], qui seront abordées plus en détails dans la section suivante, alors que les patients atteints de mutations au niveau du coenzyme-Q souffrent de myopathies, d'encéphalopathies, de néphropathies et d'ataxies [35].

2.2.2.1.4.2. Mutation au niveau de facteurs d'assemblage et des protéines auxiliaires de la chaîne respiratoire

On retrouve également encodé dans le génome nucléaire un certain nombre de facteurs requis pour l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. Plusieurs mutations pathogéniques ont également été identifiées à ce niveau [35]. Tous les complexes sont affectés par ce type de mutations, particulièrement le complexe IV. En effet, pour ce dernier, des mutations ont été identifiées dans six des protéines auxiliaires nécessaires à son assemblage: SURF1, SCO2, SCO1, COX10 et COX15. Ces atteintes indirectes du complexe IV causent généralement des encéphalopathies du type syndrome de Leigh (SURF1) [31], ou d'autres désordres infantiles multisystémiques fatals, accompagnés de cardiomyopathies (mutations dans SCO2 et COX15), de néphropathie (COX10) ou d'hépatopathie (SCO1) [3, 35, 37].

3. Le Syndrome de Leigh

Le syndrome de Leigh (LS) est la maladie mitochondriale la plus répandue dans la petite enfance, avec une incidence de 1/40 000 naissances dans la population totale [40]. En 1951, Denis Leigh a fait la première description de cette neuropathologie, qu'il avait alors nommée encéphalopathie nécrosante subaigüe en raison des lésions cérébrales présentes chez son patient [41]. Le LS implique une atteinte cérébrale prédominante, mais comporte une certaine variabilité dans les présentations cliniques [42].

3.1. Phénotype

Malgré l'hétérogénéité des symptômes, les patients doivent présenter trois caractéristiques incontournables pour obtenir un diagnostic du LS : **1)** le trouble doit être neurodégénératif et progressif; **2)** les symptômes variables doivent être associés à des dysfonctions mitochondriales causées par un défaut génétique héréditaire; et **3)** les lésions cérébrales doivent être bilatérales, symétriques et concentrées au niveau des ganglions de la base et du tronc cérébral, mais peuvent s'étendre au cervelet, au thalamus et à la moelle épinière [40, 43]. Les lésions neuropathologiques sont observables en imagerie par résonance magnétique où elles apparaissent comme des plaques dégénérantes constituées de tissu nécrosé [40]. Les neurones y sont généralement endommagés (corps cellulaire gonflé, axones démyélinisés) et les cellules gliales sont atrophiées et accompagnées d'une prolifération des astrocytes [41]. De plus, les régions atteintes présentent une importante prolifération vasculaire et une hypertrophie des vaisseaux, illustrées par des zones brun-rouge sur les coupes histologiques [40, 41]. Des concentrations élevées de lactate sont fréquemment détectées dans les lésions par spectroscopie à résonance magnétique et sont aussi détectables dans les prélèvements de liquide céphalo-rachidien [40].

Les symptômes neurologiques sont révélés physiquement par un retard de croissance ou une régression des acquis psychomoteurs, de l'hypotonie, de l'ataxie, de la dystonie et des anomalies ophtalmologiques [42]. Les premières manifestations cliniques du LS surviennent vers l'âge de 2 ans après un développement normal et l'évolution de la maladie se fait très rapidement, menant fréquemment au décès vers l'âge de 3 ans [40]. Dans plusieurs cas rapportés, le déclenchement des premiers symptômes du LS a lieu peu après un épisode infectieux [41, 43].

De façon générale, les tests sanguins de patients atteints du LS font également état de plusieurs perturbations indicatrices d'une anomalie métabolique systémique, incluant une faible concentration plasmatique de bicarbonate, des concentrations élevées de pyruvate et de lactate, ainsi qu'une glycémie anormalement faible à jeun [44]. La concentration élevée en

lactate reflète en partie une réorientation du métabolisme tissulaire vers la glycolyse afin de pallier au déficit mitochondrial [40]. Cette réorientation chronique peut être accentuée de manière aigüe et donner lieu à des crises d'acidose métabolique [40]. Par ailleurs, comme le lactate et le pyruvate sont d'importants précurseurs pour la néoglucogenèse hépatique, ces données suggèrent également que les patients LS présentent des anomalies hépatiques. À cet égard, il est rapporté que l'activité de la pyruvate carboxylase (PC), une enzyme clé de la néoglucogenèse permettant la conversion du pyruvate en oxaloacétate dans la mitochondrie, est sévèrement réduite chez certains patients LS [44]. D'autres anomalies hépatiques telles que la stéatose, la fibrose, la prolifération aberrante des mitochondries et la cirrhose sont également rapportées à divers degrés chez les patients LS [45]. Certaines présentations cliniques impliquent également une perte de la vue et/ou de l'ouïe, une cardiomyopathie et une néphropathie [44, 46]. La pénétrance du LS dépend évidemment de la mutation en cause, cette dernière pouvant affecter partiellement ou globalement la chaîne respiratoire dans un ou plusieurs tissus.

Les causes moléculaires du LS se situent au niveau des complexes de l'oxydation phosphorylante (I, IV et V), du coenzyme-Q et du métabolisme du pyruvate (complexe de la pyruvate déshydrogénase) [45, 47]. De manière générale, ces dysfonctions entraînent une diminution de la capacité de production de l'ATP, qui représente probablement une cause importante de lésion tissulaire. Au niveau cérébral, la gliose observable chez les patients est perçue comme une conséquence de la privation énergétique, résultant en une perte de neurones et à la formation de tissu cicatriciel fibreux. La nature nécrotique des lésions observées au niveau cérébral chez les patients LS est un indicateur d'une crise énergétique tissulaire, puisque ce type de mort, contrairement à l'apoptose, est observé en réponse à un effondrement important des niveaux cellulaires en ATP [40]. De manière intéressante, la spécificité des régions cérébrales affectées et leur évolution suggèrent que la demande énergétique des structures varie au cours du développement. Le tronc cérébral et les ganglions de la base, deux structures constamment touchées dans le LS, ont un métabolisme particulièrement élevé au cours des 6 premiers mois de vie, et ce en condition basale, expliquant en partie la présentation précoce de la pathologie [40]. Au niveau hépatique, l'hypoglycémie à jeun, la prolifération

aberrante des mitochondries, la stéatose, la fibrose et la cirrhose sont également des indicateurs d'une limitation bioénergétique.

3.2. Mutations causales

Les présentations génétiques du LS sont variées, impliquant des mutations dans plus de 50 gènes nucléaires et mitochondriaux [40]. De façon récurrente, ce sont des gènes nucléaires encodant des facteurs d'assemblage des sous-unités de la chaîne respiratoire qui sont touchés dans le LS [48]. Par exemple, *SURF1* est le gène le plus souvent muté chez les patients LS qui ont une déficience du complexe IV. Dans ce cas, les mutations entraînent automatiquement une perte de fonction de la protéine qui joue habituellement un rôle dans l'assemblage des sous-unités d'origine nucléaire et mitochondriale de ce complexe. Malgré sa présence ubiquitaire, la protéine SURF1 est moins abondante dans le système nerveux, rendant le cerveau et la moelle épinière plus vulnérables dans le LS [49]. Une autre variante du LS est causée par des mutations dans le gène *SCO2*, engendrant un phénotype sévère qui comprend une hypertrophie cardiaque néonatale et une encéphalopathie fatale dans les premiers jours de vie [46]. Récemment, des mutations ont également été identifiées dans le gène *LRPPRC* causant un LS distinct et d'intérêt grandissant : la variante canadienne-française du syndrome de Leigh (LSFC).

4. La variante canadienne-française du syndrome de Leigh

La variante canadienne-française du syndrome de Leigh (communément appelée acidose lactique) est l'une des quatre maladies génétiques à forte prévalence dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean. La prévalence est de 1/2000 naissances et les porteurs sont estimés à 1/23 [50, 51]. L'espérance de vie moyenne des enfants atteints du LSFC est de 3-4 ans et il n'existe aucun traitement pour les guérir [52].

4.1. Phénotype

Le phénotype des enfants souffrant de l'acidose lactique est similaire au syndrome de Leigh classique et comprend un retard de croissance et du langage, de l'hypotonie, de l'ataxie, des anomalies respiratoires et les lésions cérébrales typiques du LS au niveau des ganglions de la base et du tronc cérébral [53, 54]. Les traits du visage de ces enfants sont distincts et incluent un faciès inexpressif, des sourcils arqués, de l'hirsutisme léger et un front proéminent [53]. De plus, le LSFC se distingue du LS classique par la survenue des crises acidotiques fulminantes qui engendrent la mort de 80 % des enfants avant l'âge de 2 ans et qui laisse un léger retard mental chez les survivants [53, 55]. Il a été rapporté que les crises acidotiques ont habituellement lieu suite à une infection fébrile sévère, une modification des habitudes alimentaires, un effort physique ou un choc émotionnel [53]. Quelques jours précédents les crises, la somnolence et l'ataxie sont augmentées chez les patients. Les signes de l'épisode d'acidose se développent rapidement en 1 à 2 heures au cours desquelles les enfants présentent une respiration de Kussmaul (une forme de dyspnée caractéristique des acidoses métaboliques qui consiste en une respiration profonde et difficile marquée de pauses entre les inspirations et les expirations), une stupeur ou un état comateux, une infiltration parenchymateuse pulmonaire et de l'hypoxie [53]. Les concentrations de lactate sanguin et du liquide céphalo-rachidien sont constamment élevées chez les patients LSFC, mais deviennent excessives en cours de crises acidotiques [56, 57]. De plus, les lésions cérébrales de type Leigh sont exacerbées au cours des crises. Un autre type de crise peut survenir chez les patients LSFC, indépendamment des crises acidotiques. Ces épisodes de détérioration neurologique sévères sont semblables à un accident vasculaire cérébral (AVC) en imagerie, mais aucune atteinte vasculaire n'est présente (aucune ischémie cérébrale ou bien les lésions ne correspondent pas à l'anatomie vasculaire) et les lésions suivent plutôt l'anatomie cérébrale [58].

Dans le cas du LSFC, l'atteinte n'est pas exclusivement cérébrale et comprend des anomalies hépatiques similaires à celles retrouvées dans le LS classique, notamment une stéatose microvésiculaire [53]. Des anomalies du métabolisme hépatique pourraient, dans le

cas du LSFC, être impliquées dans les taux anormalement élevés de lactate sanguin et dans les crises acidotiques [55].

Biochimiquement, les patients LSFC ont une déficience du complexe IV principalement au cerveau et au foie où l'activité est réduite à 10-20 % de l'activité normale [54, 56]. Bien que le défaut du complexe IV soit généralisé, les fibroblastes et les muscles squelettiques sont relativement épargnés avec une activité réduite à 50 %, tandis que le cœur et les reins ont une activité tout près de la normale [54, 56]. Des études récentes sur des fibroblastes issus de biopsies de patients LSFC ont révélé de nombreuses autres anomalies morphologiques et fonctionnelles. Parmi celles-ci, les expériences de respiration mitochondriale sont conséquentes au défaut du complexe IV avec une respiration stimulée par l'ADP réduite chez les patients LSFC. Cependant, malgré une activité réduite du complexe IV, le contenu en ATP des fibroblastes LSFC était normal en condition basale [51]. Par contre, des expériences de susceptibilité à des facteurs de stress ont démontré que les fibroblastes LSFC étaient plus sensibles à la mort cellulaire lorsqu'ils étaient exposés au palmitate (un acide gras abondamment présent dans les graisses/huiles animales ou végétales) ou à une combinaison de palmitate et de lactate. Ceci révèle que les fibroblastes des patients LSFC sont fragiles, mais présentent une activité résiduelle du complexe IV qui est suffisante pour être fonctionnels en conditions basales [51].

4.2. Causes génétiques

L'acidose lactique se transmet génétiquement de manière autosomique récessive et le syndrome est causé par des mutations au niveau du chromosome 2p16-21 dans le gène *LRPPRC* [52, 59]. Deux mutations ont été identifiées parmi les patients LSFC, la plus commune est le changement de base A354V de l'exon 9 (C → T) et la seconde mutation est une délétion de 8 nucléotides dans l'exon 8 qui résulte en un STOP prématuré [59]. La quasi-totalité des patients LSFC sont homozygotes pour la mutation A354V. Seul un patient a été identifié portant les deux mutations, une sur chaque allèle, faisant de lui un hétérozygote composé [59]. Le gène *LRPPRC* n'encode pour aucune sous-unité connue de COX ou aucun

de ces facteurs d'assemblage [59]. Il encode plutôt une protéine de 130 kDa du même nom, LRPPRC (*leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein*).

4.3.LRPPRC

LRPPRC fait partie de la famille des *pentatricopeptide repeat* (PPR), qui est très conservée à travers l'évolution avec plusieurs centaines d'homologues chez la plante, une dizaine chez la levure et 7 homologues chez l'humain [60]. Cette famille de protéines est caractérisée par des répétitions (jusqu'à trente) d'une séquence de 35 acides aminés riche en leucines arrangées dans un motif canonique (solénoïde d'hélices alpha) [61]. Ces motifs ont une grande affinité pour les ARN et constituent le site de liaison à ces derniers, rendant les protéines PPR indispensables au métabolisme des ARN mitochondriaux [48, 60, 62, 63].

Chez l'humain, les 7 protéines PPR jouent un rôle spécifique dans la régulation de l'expression des gènes mitochondriaux, allant de la transcription et du traitement des ARN à la traduction et à la maturation [62]. LRPPRC a été la première protéine PPR identifiée chez l'Homme et son abondance est variable entre les organes avec une forte expression dans les muscles squelettiques > cœur > rein > foie > cerveau et poumons ou l'expression est la plus faible [60, 64]. La localisation de LRPPRC est presque exclusivement mitochondriale, cependant certaines expériences ont démontré que, physiquement et fonctionnellement, LRPPRC pouvait aussi être localisé dans le noyau [48, 64].

En présence de la mutation A354V, l'importation de LRPPRC à la matrice mitochondriale est diminuée, voir même complètement absente dans certaines régions de l'organelle, et son expression cytosolique est augmentée, malgré que la mutation n'affecte pas la séquence c-terminale ciblant la mitochondrie [63-65]. Chez les patients LSFC, le contenu cellulaire en LRPPRC portant la mutation A354V est globalement diminué de 70 % dans tous les tissus [64]. Les mécanismes proposés pouvant être responsables de cette faible abondance de LRPPRC muté dans l'acidose lactique sont : i) que la protéine LRPPRC pourrait ne pas être produite en quantité suffisante, ii) elle pourrait être faiblement importée dans les

mitochondries; iii) ou elle pourrait être dégradée prématurément après son importation dans l'organelle [64].

La baisse du contenu en LRPPRC affecte directement le complexe IV, particulièrement les sous-unités encodées dans l'ADN mitochondrial. Les trois sous-unités d'origine mitochondriale COX I, COX II et COX III forment le cœur catalytique de l'enzyme qui est indispensable au bon fonctionnement du complexe et en présence de la mutation A354V, les taux d'ARNm de COX I et COX III sont considérablement réduits [64]. Il en résulte une diminution de la synthèse des protéines mitochondriales et un défaut d'assemblage du complexe IV. La déficience en complexe IV, induite par la mutation, est majeure dans les tissus où LRPPRC est naturellement moins abondant, soit le cerveau et le foie où l'activité du complexe IV est presque nulle [56, 64]. Alors que dans le muscle squelettique, où LRPPRC est normalement abondant, la mutation A354V induit un défaut combiné d'assemblage des complexes IV et I, diminuant de 50 % l'activité du complexe IV [56, 61]. En somme, il semblerait que certains tissus s'adaptent mieux que d'autres à la mutation A354V, ajustant leur machinerie de traduction mitochondriale pour ainsi demeurer fonctionnels [61].

Cependant, la stabilisation ne se limite pas seulement aux ARNm de COX I et COX III; des expériences sur des fibroblastes humains ont démontré que lorsque les taux de LRPPRC normaux et mutés sont réduits à presque 100%, les taux d'ARNm de toutes les sous-unités d'origine mitochondriale sont considérablement réduits, affectant globalement l'assemblage de la chaîne respiratoire [63, 66]. De plus, ces mêmes expériences ont aussi démontré que ce sont les taux cellulaires de LRPPRC, plutôt que la mutation A354V, qui affectent la stabilisation des ARNm mitochondriaux. Lorsque LRPPRC normal est réduit de 70 %, les niveaux d'ARNm mitochondriaux, la quantité de sous-unités de COX et les proportions de complexes OXPHOS assemblés sont équivalents à ce qui est retrouvé dans les cellules de patients LSFC [63].

LRPPRC exerce son rôle de stabilisateur à travers un complexe de 250 kDa qu'il forme avec la protéine SLIRP (*stem-loop interacting RNA binding protein*), qui est aussi connue pour son rôle de stabilisateur d'ARNm et sa localisation à la mitochondrie [63]. Dans la

mitochondrie, ce complexe séquestre et stabilise un *pool* extraribosomal d'ARNm mitochondriaux pour les protéger de la dégradation exonucléolytique précédant leur traduction [60, 63]. Une perturbation de la formation de ce complexe affecte automatiquement la traduction des gènes mitochondriaux et la stabilité de ces ARNm. De ce fait, une diminution des taux de SLIRP entraîne une baisse des taux de LRPPRC et inversement, un *knockdown* de LRPPRC induit une perte complète de SLIRP suggérant que les deux protéines sont interdépendantes [62].

D'autres rôles ont aussi été attribués à LRPPRC. Notamment, une surexpression de la protéine a démontré que LRPPRC stimule la transcription des gènes mitochondriaux. Dans des cultures d'hépatocytes primaires, une augmentation de LRPPRC est proportionnelle à une augmentation de la densité des *crisetae* et une augmentation des complexes de la chaîne respiratoire, indépendamment de la masse mitochondriale. De la même façon, dans des souris transgéniques surexprimant LRPPRC au niveau hépatique, la respiration mitochondriale stimulée par l'ADP et la capacité respiratoire maximale sont proportionnellement augmentées [67, 68]. Cependant, les mécanismes responsables de cette régulation transcriptionnelle par LRPPRC sont encore controversés et demeurent à l'étude [65]. Parmi ses autres rôles, LRPPRC pourrait moduler le co-activateur transcriptionnel PGC1 α (*peroxisome proliferator-activating receptor coactivator α*) au niveau hépatique en formant un complexe avec ce dernier [48]. PGC1 α régule plusieurs événements cellulaires dont l'homéostasie du glucose hépatique qui est nécessaire à l'activation de l'expression des gènes de la néoglucogenèse [48]. La possibilité que LRPPRC et PGC1 α forment un complexe impliqué dans la néoglucogenèse est intéressante dans un contexte comme le LSFC où une mutation de LRPPRC pourrait empêcher le bon fonctionnement de ce complexe et induire un déséquilibre du lactate [48].

5. Modèles expérimentaux

Plusieurs types cellulaires portant des *knockout* de LRPPRC ont été développés ainsi que des modèles de surexpression de la protéine, amenant de nouvelles informations sur les

rôles de LRPPRC dans la cellule [48, 63, 67]. Le modèle *in vitro* le mieux adapté à l'étude du LSFC provient de biopsies de peau des patients (fibroblastes LSFC) dont le phénotype mitochondrial a récemment été établi, amenant une meilleure compréhension de la maladie [51]. Cependant, il est impossible d'obtenir des biopsies d'autres organes puisque l'intervention est trop invasive et risquée étant donnée la fragilité des patients LSFC et leur susceptibilité aux crises acidotiques. Quant aux modèles *in vivo*, un *knockout* ubiquitaire de LRPPRC [69, 70] et une mutation ubiquitaire de sa séquence c-terminale [71] sont tous deux létaux *in utero*. Il existe un modèle murin comportant un *knockout* conditionnel de LRPPRC au niveau cardiaque, qui induit un phénotype sévère et mortel en très bas âge, mais ce modèle ne serait pas pertinent pour l'étude du LSFC puisque le cœur est peu ou pas affecté dans la pathologie humaine [69, 70].

Le consortium de l'acidose lactique travaille au développement de modèles murins pour l'étude du LSFC; une souris portant la mutation ubiquitaire A354V dans le gène *LRPPRC* ainsi que deux modèles portant des *knockout* de LRPPRC spécifiques aux organes principalement affectés dans le LSFC, soit le cerveau et le foie, pour mieux comprendre l'implication de la protéine dans la pathogenèse de ces organes. La souris portant une ablation de la protéine LRPPRC exclusivement au foie (souris H-*Lrpprc*^{-/-}) est maintenant disponible et constitue le seul modèle expérimental *in vivo* disponible pour l'étude de la maladie. Ce modèle murin a été généré à l'aide du système de recombinaison Cre/loxP, qui est fréquemment utilisé pour induire le *knockout* d'un gène dans un tissu ou un type cellulaire spécifique. Brièvement, Cre est une recombinase régulée par un promoteur spécifique qui reconnaît une séquence cible loxP et qui catalyse la recombinaison des gènes entre deux séquences loxP de même orientation. Les sites loxP sont insérés aux extrémités du gène d'intérêt et la totalité du fragment entre les deux sites est supprimée, produisant le *knockout*. La régulation de la recombinase Cre se fait par un promoteur spécifique au tissu, inductible ou encore temps dépendant [72]. Dans le cas de la souris H-*Lrpprc*^{-/-}, le promoteur spécifique albumine a été choisi puisque le gène est exprimé exclusivement au foie. La souris H-*Lrpprc*^{-/-} représente un bon modèle hépatique du LSFC et permettra d'étudier le rôle de LRPPRC dans le foie et son implication dans la pathogenèse hépatique de la maladie.

Objectifs, hypothèse et méthode expérimentale

À la lumière des évidences révélées dans cette revue de littérature, il est très pertinent d'étudier l'implication de la protéine LRPPRC dans la pathophysiologie hépatique du LSFC. L'étude, dans le cadre de ce projet de maîtrise, a été réalisée à l'aide du nouveau modèle murin du LSFC portant une ablation de LRPPRC spécifiquement au foie développé par le consortium de l'acidose lactique, la souris *H-Lrpprc^{-/-}*, et les expériences sont concentrées sur l'évaluation du phénotype mitochondrial.

Notre hypothèse est que les dysfonctions mitochondriales préalablement observées chez les patients LSFC et dans les fibroblastes issus de biopsies de ces patients [51] se retrouveront dans les mitochondries hépatiques de notre modèle murin et qu'elles seront sans doute exacerbées étant donnée l'ablation de LRPPRC dans l'organe d'intérêt. Nous savons que les patients LSFC ont tous présenté une stéatose microvésiculaire [53], alors nous nous attendons à en observer parmi les lésions hépatiques que nous retrouverons chez notre modèle murin. D'ailleurs, la stéatose est souvent le premier symptôme décelé chez les patients souffrant de maladie mitochondriale avec hépatopathie, mais la stéatose peut rapidement évoluer vers la fibrose, la cholestase et la nécrose [73]. De plus, les expériences réalisées sur les fibroblastes ont révélé une diminution de l'activité du complexe IV et conséquemment une diminution de la respiration mitochondriale [51], des mesures qui seront sans doute aggravées dans le foie des souris hépato-KO. Puisqu'un *knockdown* de LRPPRC dans des modèles cellulaires affecte la chaîne respiratoire dans sa totalité [63], nous nous attendons à retrouver des atteintes principalement au complexe IV, mais aussi aux autres complexes étant donné que notre modèle murin comporte une ablation du gène *LRPPRC*.

Notre objectif est d'établir le phénotype général et hépatique de la souris *H-Lrpprc^{-/-}* ainsi que d'établir la caractérisation des fonctions mitochondriales.

Pour ce faire, nous aurons recours à diverses techniques telles l'histologie, la microscopie, la mesure de la respiration mitochondriale par polarographie et la spectrophotométrie.

Matériel et méthodes

1. Histologie

1.1. Hématoxyline & Éosine (H&E)

1.1.1. Principe :

La coloration H&E est composée de deux colorants : l'hématoxyline et l'éosine. L'hématoxyline est un colorant basique qui teinte en bleu-violet les structures acides comme les noyaux, les ribosomes et les réticulums. Tandis que l'éosine est un colorant acide qui teinte en rose ou rouge les structures basiques comme les protéines. Le cytoplasme est normalement coloré en rose-rouge dû à sa forte teneur en protéines, qui sont basiques.

1.1.2. Protocole :

Les animaux ont été anesthésiés à l'hydrate de chloral 8%, au dosage de 600mg/Kg. Le foie a été excisé et rapidement rincé dans le PBS, puis un lobe a été sélectionné et transféré dans une cassette de fixation avant d'être incubé dans une solution de formaline 10% (*Chaptec inc*) pour 24 heures. Les échantillons ont ensuite été enrobés dans la paraffine et des coupes de 4 µm ont été faites au microtome. Les coupes ont été colorées selon les étapes résumées dans le tableau II.

Tableau II : Traitements des coupes histologiques et temps d'incubation associés

<u>Colorant/ Solvant</u>	<u>Temps (minutes: secondes)</u>
Toluène (2X)	5 :00
Éthanol pur (3X)	2 :00
Lavage	0 :20
Lavage	1 :00
Hématoxyline	0 :55
Lavage (2X)	0 :20
Bicarbonate de sodium 0,5%	0 :20
Lavage	0 :15
Lavage	3 :30
Éosine	0 :45
Éthanol 95%	0 :30
Éthanol pur	0 :40
Éthanol pur	2 :40
Toluène (3X)	2 :00

Les coupes ont été imagées en lumière blanche aux grossissements 10X-20X-40X à l'aide du microscope Nikon Eclipse TE2000-S et les images ont été prises par la caméra Hamamatsu C4742-95 et le logiciel *SimplePCI*.

1.2.Oil Red'O

1.2.1. Principe :

L'Oil Red'O est un lysochrome, c.-à-d. un colorant liposoluble, appartenant à la famille des Sudan puisqu'il contient un groupement azoté. Il colore en rouge les lipides et les triglycérides neutres contenus dans les coupes histologiques de tissu frais.

1.2.2. Protocole :

Les animaux ont été anesthésiés à l'hydrate de chloral 8 %, au dosage de 600mg/Kg. Le foie a été excisé et placé dans un moule pour être rapidement enrobé d'OCT (*Tissue-Tek* #4583). Les moules contenant les échantillons ont ensuite été plongés dans l'isopentane refroidi dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Des coupes de 10 µm ont été réalisées au cryostat à -20°C et ont reposées à température pièce pendant 1 heure avant le début des étapes de coloration. Les coupes ont été incubées dans une solution de formaline 10 % (*Chaptec inc.*) pendant 5 minutes et ont été lavées 3 X 1 minute dans l'eau distillée. Les coupes ont ensuite été incubées dans la solution d'Oil Red'O (0,5% dans du propylène glycol chauffé à 95°C sous agitation, puis filtrée 2X avec un filtre 0,45 µm et 2X avec un filtre 0,22 µm) ou de propylène glycol pur (coupe contrôle) pour 30 minutes. Les coupes ont été lavées 3 X 1 minute dans l'eau distillée et montées avec le *ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI* (*Invitrogen* #P36935). Les coupes ont finalement été imagées par microscopie en fluorescence (*Leica MZ FLIII*). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (*NIH*) pour la quantification des gouttelettes lipidiques et les analyses ont été faites sur 10 hépatocytes différents pour chaque groupe.

1.3. Microscopie électronique

1.3.1. Principe :

La microscopie électronique à transmission produit des images en 2D en faisant traverser un faisceau d'électrons à travers des couches ultrafines de tissu (50-100nm). Les coupes sont colorées par des métaux lourds qui produisent des régions denses aux électrons (des régions opaques gris foncé créées par la liaison forte du métal à la structure cellulaire qui empêche le passage des électrons à travers la coupe) et des régions transparentes aux électrons (des régions claires où il n'y a pas de métal lié aux structures cellulaires pour gêner le passage des électrons).

1.3.2. Protocole :

Les animaux ont été anesthésiés à l'hydrate de chloral 8 %, au dosage de 600 mg/Kg et perfusés, par la veine cave, avec 10 mL de PBS suivi de 5mL d'une solution de glutaraldéhyde 2,5 %. Le foie a été excisé et coupé en fines tranches à l'aide d'un scalpel sur une plaque de verre avant d'être incubé O/N à 4°C dans la solution de glutaraldéhyde 2,5 %. Des coupes de 90-100nm ont été montées sur un grillage de cuivre et imagées avec un microscope électronique à transmission (*FEI Tecnai 12 BioTwin 120 kV TEM*) à divers grossissements.

1.4. Coloration COX-SDH

1.4.1. Principe :

La coloration COX-SDH implique deux colorants spécifiques pour les activités enzymatiques de la COX et de SDH. Dans la coloration spécifique pour l'activité de COX, le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) agit comme donneur d'électrons au cytochrome *c*. Le produit de la réaction, qui résulte en l'oxydation du DAB, donne un pigment de couleur brune qui s'accumule dans les mitochondries et permet l'identification des cellules dont l'activité de COX est intacte. En ce qui concerne la coloration spécifique pour l'activité de SDH, le nitrobleu tetrazolium (NBT) agit comme accepteur d'électrons et le phénazine méthosulfate (PMS) agit de façon intermédiaire comme donneur d'électrons. Une fois réduit, le NBT est converti en un pigment bleu-violet et permet l'identification des cellules dont le métabolisme mitochondrial est élevé (de couleur violet foncé) et celles dont le métabolisme est plus glycolytique (de couleur bleu pâle).

1.4.2. Protocole :

Les animaux ont été anesthésiés à l'hydrate de chloral 8 %, au dosage de 600mg/Kg. Le foie a été excisé et placé dans un moule pour être rapidement enrobé d'OCT (*Tissue-Tek #4583*). Les moules contenant les échantillons ont ensuite été plongés dans l'isopentane refroidi dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Des coupes (trois coupes successives par lame) de 10 µm ont été réalisées au cryostat à -20°C et ont reposées à température pièce

pendant 1 heure avant de débiter les étapes de coloration. Pendant le séchage des coupes, les colorants COX et SDH ont été préparés dans un tampon sodium phosphate 0,1M (0,05M NaH₂PO₄ et 0,05M Na₂HPO₄; pH 7,0) selon le tableau III à partir d'aliquotes conservées à -80°C.

Tableau III : Composition des colorants COX et SDH

	<u>Produit</u>	<u>Concentration finale</u>
Colorant COX	Cytochrome <i>c</i>	100µM
	DAB	4mM
	Catalase	Une pincée (bout d'une spatule)
Colorant SDH	Sodium succinate	0,13M
	PMS	0,2mM
	Sodium azide	0,1mM
	NBT	1,5mM

Toutes les coupes ont été encerclées avec le crayon « *liquid bloquer* » (*Sigma*) et la 1^{re} et la 3^e coupe ont été incubées avec 200 µl chacune de colorant COX et la 2^e coupe a été incubée avec 200 µl de tampon sodium phosphate pendant 30 minutes dans un environnement humide à 37°C. Les lames ont été rincées avec de l'eau distillée et la 2^e et 3^e coupe ont été incubées avec 200µl chacune de colorant SDH et la 1^{re} coupe a été incubée avec 200 µl de tampon sodium phosphate pendant 30 minutes dans un environnement humide à 37°C. Les lames ont été rincées avec de l'eau distillée et ont été montées avec du glycérol-gélatine (*Sigma*). Les coupes ont été imagées en lumière blanche aux grossissements 10X-20X-40X à l'aide du microscope Nikon Eclipse TE2000-S et les images ont été prises par la caméra Hamamatsu C4742-95 et le logiciel *SimplePCI*.

2. Isolation des mitochondries hépatiques

2.1. Principe :

Le principe d'isolation des mitochondries hépatiques repose sur la centrifugation différentielle des composantes cellulaires.

2.2. Protocole :

Tableau IV : Composition des tampons A et B

	<u>Produit</u>	<u>Concentration finale (mM)</u>
Tampon A (rinçage)	Sucrose	300
	Tris-HCl (pH 7,4)	10
	EGTA-Tris-Base (pH 7,4)	1
Tampon B (suspension)	Sucrose	300
	Tris-HCl (pH 7,4)	10
	EGTA-Tris-Base (pH 7,4)	0,05

Toutes les manipulations ont été faites sur glace ou dans des tampons refroidis à 4°C et toute la verrerie (bêchers, tubes de polycarbonate, *Potter*, seringues) a préalablement été rincée avec le tampon A afin d'éliminer tout résidu de calcium dommageable aux mitochondries.

Suite à un jeûne de 16 heures, les souris ont été pesées et rapidement sacrifiées. Le foie a ensuite été prélevé un lobe à la fois, en faisant attention de ne pas crever la vésicule biliaire, et plongé dans 30 ml de tampon A, puis pesé. Après avoir décanté 20 ml du tampon A, le foie a été coupé en petits morceaux de 2mm³ à l'aide d'un ciseau à lame triple et le volume a été comblé à 30 ml pour laisser les morceaux sédimenter. Ensuite, 15 ml de solution ont été retirés et le reste de la suspension (15 ml de tampon A restant + morceaux de foie) transférée dans un tube *Potter* pour être homogénéisée (5 allers-retours à 500rpm). L'homogénat a été transféré dans un tube de polycarbonate et le volume comblé à 30 ml avec le tampon A. Les tubes ont

été centrifugés 10 minutes à 1000 g, 4°C, le surnageant a été transféré dans un tube propre et centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant a ensuite été prélevé avec une seringue de 20 ml munie d'une canule métallique de 18G, en prenant soin de ne pas prélever la couche grasseuse blanchâtre, et transféré dans un tube propre. L'homogénat a été centrifugé une première fois 10 minutes à 8000g, 4°C, le surnageant a été aspiré et jeté, puis le culot a été resuspendu doucement dans 2 ml de tampon B. Le volume a été comblé à 30 ml avec du tampon B et la suspension a été centrifugée pour une deuxième fois 10 minutes à 8000 g, 4°C. Le surnageant a été aspiré et jeté, le culot resuspendu dans 2 ml de tampon B, puis le volume comblé à 30 ml avec du tampon B et la suspension a été centrifugée pour une troisième fois 10 minutes à 8000 g, 4°C. Finalement, le surnageant a été aspiré, puis jeté et le culot a été resuspendu dans 200 µl de tampon B. La préparation de mitochondries a été dosée et conservée sur glace jusqu'à utilisation.

3. Dosage de protéines

3.1. Principe :

Le dosage de protéines se fait par dosage colorimétrique à l'aide de l'acide bicinchonique (*Thermo Scientific Pierce BCA Assay Kit*). Les protéines de l'échantillon réduisent l'ion cuivre Cu^{2+} en Cu^+ et l'acide bicinchonique, qui est un sel de sodium, forme un complexe violet avec l'ion cuivre Cu^+ dans un environnement alcalin. Le complexe violet a une absorbance, variant en fonction de la concentration protéique, qui peut être lue entre 540 nm et 590 nm par spectrophotométrie (lecteur *Safire Tecan*). La concentration en protéines des préparations de mitochondries est établie en fonction de la gamme étalon.

3.2. Protocole :

Une gamme étalon de cinq points standards, allant de 0 mg/ml à 1mg/ml, a été préparée à partir d'une solution de BSA 2mg/ml. Les échantillons de mitochondries ont été quant à eux dilués avec de l'eau distillée dans une proportion de 1/50 et 1/100 selon la concentration de protéine anticipée. Un volume de 25 µl des standards et des échantillons (chacun en triplicata) a été déposé dans une plaque 96 puits, auquel a été ajouté 200 µl du

mélange de réactifs BCA contenant 98 % v/v de BCA et 2 % v/v de sulfate de cuivre. Après une incubation de 30 minutes à 37°C l'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 562 nm.

4. Enzymologie

Le dosage enzymatique a été réalisé sur des préparations de mitochondries isolées et chaque échantillon a été dosé en triplicata. Les préparations de mitochondries ont subi 3 cycles de gel/dégel avant d'être utilisées pour le dosage. Toutes les lectures ont été exécutées par spectrophotométrie à l'aide du lecteur Safire et du logiciel Magellan V4.00 (*Tecan*). Le calcul de l'activité enzymatique a été réalisé en tenant compte du coefficient d'extinction molaire du donneur/accepteur d'électrons utilisé pour chaque complexe et des dilutions effectuées lors du dosage.

$$\text{Activité enzymatique} \left(\frac{\frac{\text{nmole}}{\text{minute}}}{\text{mg prots}} \right) = \frac{\text{moyenne des pentes}}{(0,552 * \text{Coeff.ext.molaire})} \times \frac{\text{somme des volumes (ul)/1000}}{\text{qte prots dans puits (ug)}} \times 1000$$

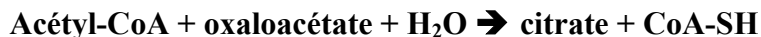
4.1.Principe général

Le dosage de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire est basé sur le principe du transfert d'électrons d'un donneur à un accepteur. La vitesse d'apparition de l'accepteur réduit ou la disparition du donneur oxydé est mesurée par spectrophotométrie et permet de quantifier l'activité enzymatique.

4.2.Activité de la citrate synthase

4.2.1. Principe :

L'enzyme citrate synthase catalyse la réaction suivante dans le cycle de Krebs :



L'activité de la citrate synthase est mesurée afin d'obtenir un indice du contenu tissulaire en mitochondries. Le dosage de l'activité enzymatique de la citrate synthase repose sur la réaction du 5,5'-dithiobis-(acide 2-nitrobenzoic) (DTNB) avec les groupements thiols (-SH) du CoA-SH qui forment le composé jaune 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB) détectable à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'activité enzymatique de la citrate synthase.

4.2.2. Protocole :

La réaction a été faite dans le tampon de réaction CS suivant, préparé à partir d'aliquotes plus concentrées de chacun des produits utilisés :

Tableau V : Composition du tampon de réaction CS

<u>Produit</u>	<u>Concentration finale</u>
Tris	200mM
Acétyl-CoA	200µM
DTNB	200µM
Triton	10%

Dans une plaque 96 puits, 70 µM d'oxaloacétate ont été placés dans le coin inférieur gauche des puits. Dans le coin supérieur droit, 15-20µg de protéines d'homogénat de mitochondries ont été déposées. Pour chaque échantillon, il y avait trois puits de réaction (contenant l'oxaloacétate) et trois puits contrôles (sans l'oxaloacétate). Ensuite 200µl du tampon de réaction CS a été ajouté aux puits, la plaque a immédiatement été insérée dans le lecteur et la lecture en cinétique a démarré à 412 nm pour 16 minutes à 30°C. Les pentes ont été notées et la vitesse de réaction a été calculée selon le coefficient d'extinction molaire du TNB (13,6).

4.3. Activité du complexe I

4.3.1. Principe :

Le complexe I catalyse la réaction suivante dans la mitochondrie :



Le dosage de l'activité enzymatique du complexe I repose sur la vitesse d'oxydation du NADH en présence de l'accepteur d'électrons décylubiquinone (un analogue de l'ubiquinone). La diminution de l'absorbance du NADH, qui est mesurée à 340nm, est proportionnelle à la vitesse de réaction. Afin de bien isoler l'activité du complexe I, les complexes III et IV sont inhibés par leurs inhibiteurs respectifs, soit l'antimycine A et le cyanure de potassium (KCN).

4.3.2. Protocole :

La réaction a été faite dans le tampon de réaction CI suivant, préparé à partir d'aliquotes plus concentrées de chacun des produits utilisés :

Tableau VI : Composition du tampon de réaction CI

Produit	Concentration finale
Tampon KPi	50mM
BSA	1mg/ml
KCN	0,25mM
AA	0,4μM
Décylubiquinone	100μM
NADH (frais)	200μM

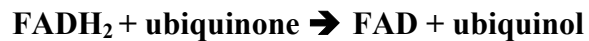
Dans une plaque 96 puits, 4 μM de roténone, l'inhibiteur spécifique du complexe I, a été placé dans le coin inférieur gauche des puits. Dans le coin supérieur droit, 8-10 μg de protéines d'homogénat de mitochondries ont été déposées. Pour chaque échantillon, il y avait trois puits de réaction (sans la roténone) et trois puits contrôles (avec la roténone). Ensuite, 200 μl du tampon de réaction CI a été ajouté, la plaque a immédiatement été insérée dans le

lecteur et la lecture en cinétique a démarrée à 340 nm pour 10 minutes à 37°C. Les pentes ont été notées et la vitesse de réaction a été calculée selon le coefficient d'extinction molaire du NADH (6220).

4.4. Activité du complexe II

4.4.1. Principe :

Le complexe II catalyse successivement les réactions suivantes dans la mitochondrie :



Le dosage de l'activité enzymatique du complexe II repose sur la vitesse de réduction du 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) par l'ubiquinol. La couleur bleue du DCIP, absorbant la lumière à 600 nm, diminue lorsqu'il est réduit. La vitesse de réaction est donc proportionnelle à la diminution de la couleur bleue du DCIP. Afin de bien isoler l'activité du complexe II, les complexes I, III et IV sont inhibés par leurs inhibiteurs respectifs, soit la roténone, l'antimycine A et le KCN.

4.4.2. Protocole :

La réaction a été faite dans le tampon de réaction CII suivant, préparé à partir d'aliquotes plus concentrées de chacun des produits utilisés :

Tableau VII : Composition du tampon de réaction CII

<u>Produit</u>	<u>Concentration finale</u>
Tampon KPi-EDTA	50mM - 2mM
BSA	1mg/ml
KCN	0,25mM
Roténone	4 μ M
AA	0,4 μ M
Décylubiquinone	100 μ M
DCIP	100 μ M
Succinate	10mM
ATP	0,2mM

Dans une plaque 96 puits, 10 mM de malonate, l'inhibiteur spécifique du complexe II, a été placé dans le coin inférieur gauche des puits. Dans le coin supérieur droit, 15-20 μ g de protéines d'homogénat de mitochondries ont été déposées. Pour chaque échantillon, il y avait trois puits de réaction (sans le malonate) et trois puits contrôles (avec le malonate). Ensuite, 200 μ l du tampon de réaction CII a été ajouté, la plaque a immédiatement été insérée dans le lecteur et la lecture en cinétique démarrée à 600 nm pour 11 minutes à 30°C. Les pentes ont été notées et la vitesse de réaction a été calculée selon le coefficient d'extinction molaire du DCIP (16,30).

4.5. Activité du complexe IV

4.5.1. Principe :

Le complexe IV catalyse la réaction suivante dans la mitochondrie :



Le dosage de l'activité enzymatique du complexe IV repose sur la vitesse d'oxydation du cytochrome *c* préalablement réduit. La vitesse de réaction est proportionnelle à la diminution de l'absorbance du cytochrome *c* réduit à 550nm.

4.5.2. Protocole :

La réaction a été faite dans le tampon de réaction CIV suivant, préparé à partir d'aliquotes plus concentrées de chacun des produits utilisés :

Tableau VIII : Composition du tampon de réaction CIV

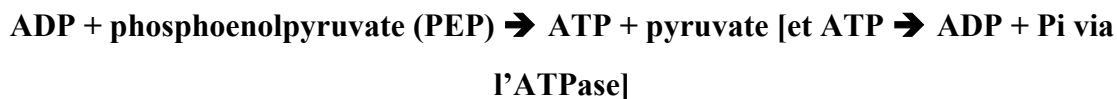
<u>Produit</u>	<u>Concentration finale</u>
Tampon KPi	50mM
Dodécylmaltoside	0,1%
Cytochrome <i>c</i>	Une pincée
H ₂ O	N/A

Dans une plaque 96 puits, 1-3 µg de protéines d'homogénat de mitochondries ont été déposés dans le coin supérieur droit. Pour chaque échantillon, il y avait trois puits de réaction (contenant les protéines) et trois puits contrôles (sans les protéines). Ensuite, 200 µl du tampon de réaction CIV a été ajouté, la plaque a immédiatement été insérée dans le lecteur et la lecture en cinétique démarrée à 550 nm pour 7 minutes à 30°C. Les pentes ont été notées et la vitesse de réaction a été calculée selon le coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* (29,50).

4.6. Activité de l'ATP synthase

4.6.1. Principe :

L'ATP synthase catalyse la synthèse d'ATP à partir de l'ADP et du Pi dans la mitochondrie. L'activité enzymatique de l'ATP synthase est mesurée indirectement via l'activité de la pyruvate kinase (PK) et de la lactate déshydrogénase (LDH) qui catalysent respectivement les réactions suivantes :



Le dosage de l'activité enzymatique de l'ATP synthase repose sur la vitesse d'oxydation du NADH. La vitesse de réaction est proportionnelle à la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm.

4.6.2. Protocole :

La réaction a été faite dans le tampon de réaction ATP synthase suivant, préparé à partir d'aliquotes plus concentrées de chacun des produits utilisés :

Tableau IX : Composition du tampon de réaction ATP synthase

<u>Produit</u>	<u>Concentration finale</u>
Tampon KPi	50mM
BSA	1mg/ml
NADH	200µM
ATP	1mM
MgCl ₂	5mM
PEP	5mM
LDH	20U/ml
PK	20U/ml

Dans une plaque 96 puits, 20 µg de protéines d'homogénat de mitochondries ont été déposés dans le coin supérieur droit et 0,5 µM d'oligomycine, l'inhibiteur spécifique de l'ATP synthase, a été placé dans le coin inférieur gauche. Pour chaque échantillon, il y avait trois puits de réaction (sans l'oligomycine) et trois puits contrôles (avec l'oligomycine). Ensuite, 200 µl du tampon de réaction ATP synthase a été ajouté, la plaque a immédiatement été insérée dans le lecteur et la lecture en cinétique démarrée à 340 nm pour 5 minutes à 37°C. Les pentes ont été notées et la vitesse de réaction a été calculée selon le coefficient d'extinction molaire du NADH (6220).

5. Respiration mitochondriale

5.1. Principe :

La respiration mitochondriale est déterminée via la consommation d'oxygène des mitochondries lorsque les complexes de la chaîne respiratoire sont stimulés avec leurs substrats et/ou leurs inhibiteurs spécifiques, selon la séquence désirée. La consommation d'oxygène est mesurée par polarographie sur l'oxygraphe *Oxytherm (Hansatech instruments)* qui est composé d'une chambre de mesure, dont la température est régulée par un bain circulant, et d'une électrode de Clark. L'électrode de Clark comprend une cathode en platine et une anode en argent qui sont reliées entre elles par une solution d'électrolytes (solution KCl 3 M) et qui sont séparées de la chambre de mesure par une membrane de téflon perméable à l'oxygène. L'oxygène contenu dans la chambre de mesure diffuse à travers la membrane pour être réduit à la surface de la cathode, générant un courant qui diffuse dans la solution de KCl et qui va oxyder l'anode. Le courant est stoichiométriquement proportionnel à la réduction de l'oxygène et il est converti en un signal enregistré par un dispositif de commande.

5.2. Protocole :

Les mitochondries hépatiques isolées ont été incubées dans la chambre de mesure à une concentration de 0,5 mg/ml dans le tampon de respiration détaillé dans le tableau X et supplémenté en Pi (9 mM), MgCl₂ (2,5 mM) et BSA (0,002 mg/ml), sous constante agitation (vitesse d'agitation : 20) à 23°C.

Tableau X : Composition du tampon de respiration mitochondriale (pH ajusté à 7,4)

<u>Produit</u>	<u>Concentration finale</u>
KCl	0,125M
Tris-MOPS	0,01M
EGTA	0,0001M
Pi	0,001M

L'enregistrement a débuté avant l'ajout des mitochondries et les séquences de substrats et d'inhibiteurs, détaillées dans le tableau XI, ont ensuite été ajoutées à la chambre de mesure. Les pentes, correspondant à la consommation d'oxygène, ont été notées et analysées à l'aide d'Excel.

Tableau XI : Séquences de substrats et d'inhibiteurs utilisés pour la mesure de la respiration mitochondriale

	<u>Produit</u>	<u>Concentration finale</u>
Séquence 1 (substrats spécifiques du complexe I)	Glutamate/malate	5mM/2,5mM
	ADP	1mM
	CCCP	0,18 μ M
Séquence 2 (substrat spécifique du complexe II)	Succinate	5mM
	ADP	1mM
	CCCP	0,18 μ M
Séquence 3 (substrats spécifiques du complexe IV)	Antimycine A	8 μ M
	TMPD/Ascorbate	0,9mM/9mM
	ADP	1mM
	KCN	Titration selon le groupe
Séquence 4 (oxydation des acides gras à longues chaînes)	Malate	5mM
	ADP	1mM
	Palmitoyl-CoA	20 μ M

6. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type de la moyenne (SEM). Les données ont été analysées avec un test de Student bilatéral paramétrique pour des données non appariées, afin de comparer les moyennes des deux groupes dans chaque expérience, sauf pour la courbe de titrage au KCN où nous avons utilisé une régression non linéaire. La taille de l'échantillon (n , représentant le nombre d'animaux) varie de 5 à 10 selon le type d'expérience et la valeur exacte est donnée dans la légende des figures de la section résultats. Concernant le poids moyen des animaux et le poids relatif du foie, les tailles d'échantillons étaient de 30 et 17 respectivement. Les données sont dites significatives lorsque $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 6 (*Graphpad*).

Résultats

1. Phénotype général de la souris H-*Lrpprc*^{-/-}

Les souris H-*Lrpprc*^{-/-} se sont avérées parfaitement viables et de manière générale, la majorité d'entre elles affichaient une activité locomotrice d'apparence normale, et ce malgré la période de jeûne de 16 heures précédant l'expérimentation. Seules deux souris, sur la cinquantaine étudiées, ont démontré des signes de faiblesse extrême le matin de l'expérience (recroquevillement à l'extérieur du nid, insensibilité aux stimuli), un état qui était probablement relié en partie à la présence d'une hypoglycémie franche (3,1 mmol/L vs >5 mmol/L chez la souris à jeun normale).

Sinon, le phénotype le plus apparent était la petite taille des souris H-*Lrpprc*^{-/-}. Tel qu'illustré à la figure 11, le poids corporel des souris H-*Lrpprc*^{-/-} mesuré à l'âge de cinq semaines était 30 % inférieur à celui des souris normales ($12,1 \pm 0,4$ vs $16,1 \pm 0,5$ g; $p < 0,0001$).

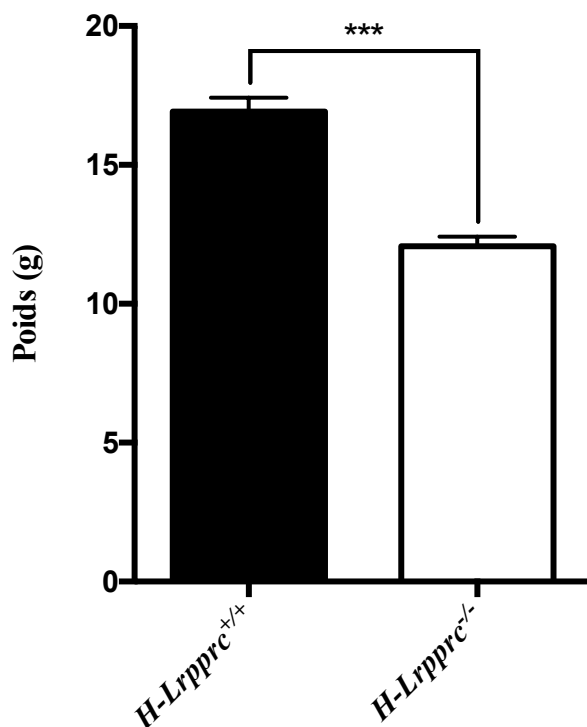


Figure 11 : Poids des animaux à 5 semaines d'âge. Les valeurs correspondent au poids des animaux avant le sacrifice, suite à un jeûne de 16 heures. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'erreur type de la moyenne, $n = 30$ pour chaque groupe; $p < 0,0001$.

À la dissection, aucune anomalie évidente n'était visible au niveau des tissus extrahépatiques. Cependant, comparativement aux souris normales, les souris H-Lrp1rc^{-/-} présentaient une hépatomégalie. Cette observation a été confirmée par la mesure du rapport poids du foie/poids corporel. Tel qu'illustré à la figure 12, ce rapport était 25 % plus élevé chez les souris H-Lrp1rc^{-/-} comparativement aux souris normales ($0,046 \pm 0,002$ vs $0,039 \pm 0,001$; $p < 0,01$).

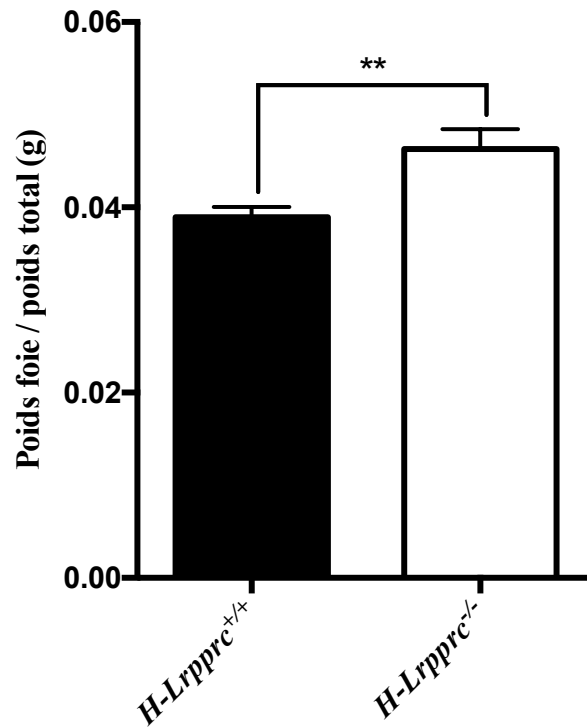


Figure 12 : Poids relatif du foie. Les valeurs correspondent au rapport [poids du foie/poids corporel] pour chaque animal; les valeurs ont été prises avant le sacrifice, suite à un jeûne de 16 heures. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'erreur type de la moyenne, $n = 17$ pour *H-Lrprrc*^{+/+} et $n = 16$ pour *H-Lrprrc*^{-/-}; $p < 0,01$.

Par ailleurs, le foie des souris *H-Lrprrc*^{-/-} présentait des taches rouge foncé sur l'ensemble des lobes, recouvrant environ 50 % de la superficie hépatique. De plus, la vésicule biliaire était manifestement gonflée, atteignant jusqu'à quatre fois le volume de celle des souris normales.

2. Histopathologie

2.1. Perte de l'organisation lobulaire et anomalies hépatiques multiples

Les analyses histologiques ont révélé plusieurs anomalies hépatiques chez la souris *H-Lrpprc*^{-/-}. À faible grossissement (10X) en coloration hématoxyline-éosine (H&E), il est possible d'examiner l'intégrité structurelle des lobules hépatiques. Dans le tissu sain, chaque lobule se caractérise par une veine centrolobulaire entourée de six espaces portes répartis symétriquement au pourtour et constitués d'un trio veine/artère/canalicule biliaire interlobulaire. Dans chaque lobule, des capillaires sinusoides, bordés de travées d'hépatocytes alignés les uns à la suite des autres, partent des veines interlobulaires pour se jeter dans la veine centro-lobulaire [74]. Cet ensemble anatomique, qui forme généralement une structure hexagonale, était clairement discernable dans le foie des souris normales (Figure 13). Cependant, chez les souris *H-Lrpprc*^{-/-} la morphologie des lobules était difficilement discernable, et la majorité des vaisseaux sanguins étaient dilatés.

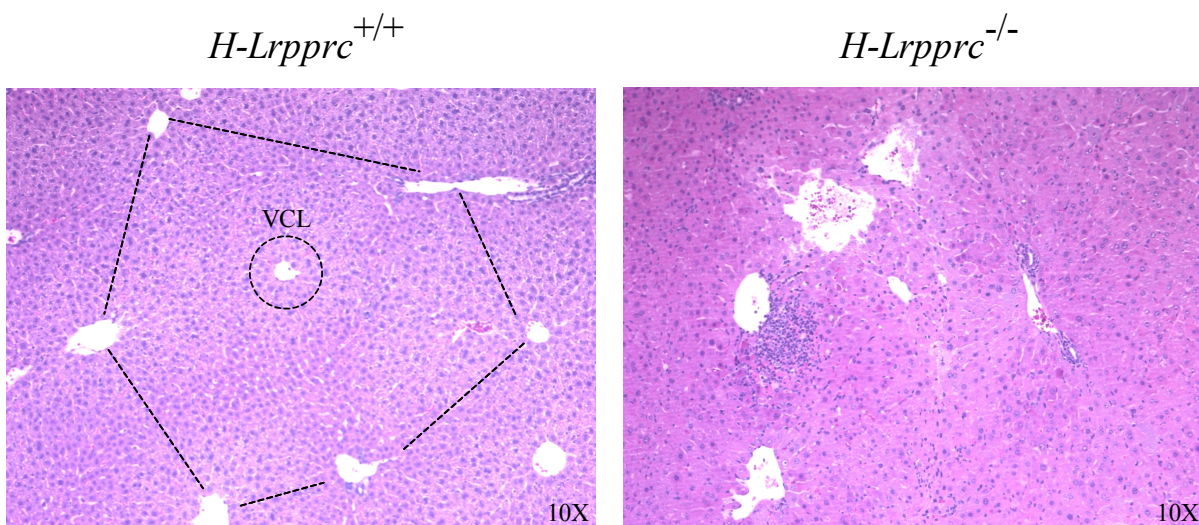
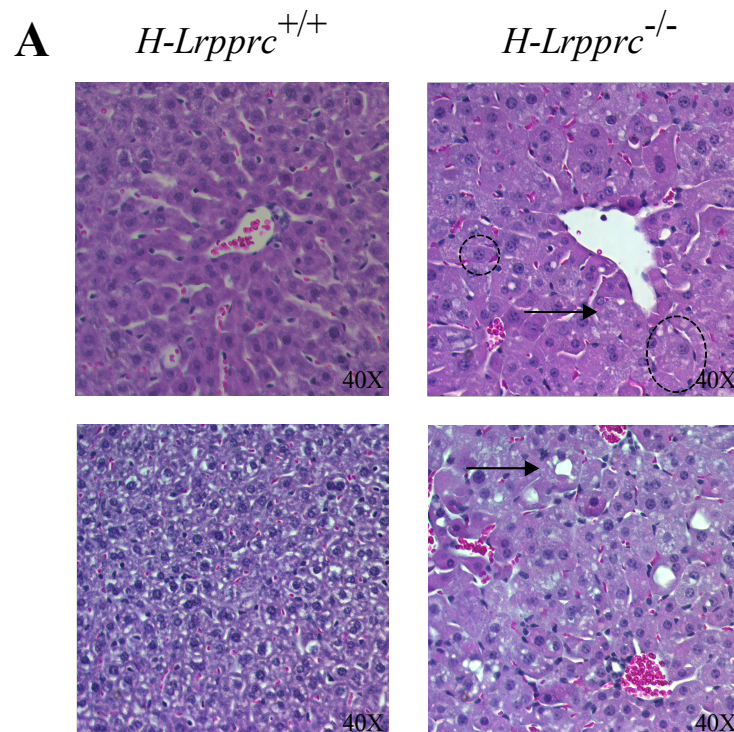


Figure 13 : Caractérisation macroscopique du foie en H&E. Coloration hématoxyline & éosine des coupes de foies, enrobés dans la paraffine, de souris de 5 semaines d'âge. Les traits pointillés délimitent un lobule hépatique et le cercle indique une veine centrolobulaire (VCL) dans la coupe histologique du groupe *H-Lrpprc*^{+/+}. Images observées au grossissement 10X.

De plus, comparativement aux hépatocytes des souris saines, ceux des souris *H-Lrp1^{-/-}* affichaient des tailles hétérogènes. Certains hépatocytes étaient de petite taille avec un cytoplasme homogène rose foncé, tandis que d'autres étaient de grande taille avec un cytoplasme contenant de nombreuses vacuolisations (Figure 14, A).

À plus fort grossissement (20X et 40X), l'observation de ces coupes a également révélé la présence d'infiltration lymphocytaire autour des espaces portes et dans le parenchyme chez les souris *H-Lrp1^{-/-}*. Cette infiltration se caractérise par la présence d'amas de cellules mononucléées de petite taille, de couleur bleu/violet foncé et contenant un faible volume cytoplasmique (Figure 14, B-I). La présence de cholestase biliaire, caractérisée par l'accumulation d'une forte pigmentation rouge dans les canalicules biliaires bordant les hépatocytes, était également visible chez les souris *H-Lrp1^{-/-}* (Figure 14, B-II). Plusieurs plaques de nécrose et de régénération portale et lobulaire étaient également visibles en périphérie des infiltrations lymphocytaires. Ces régions étaient d'apparence plus pâle et contenaient des hépatocytes atrophiques et des corps apoptotiques. (Figure 14, B-III). Finalement, une caractéristique importante des hépatocytes *H-Lrp1^{-/-}* était la présence de nombreuses vacuoles incolores en H&E (Figure 14, A).



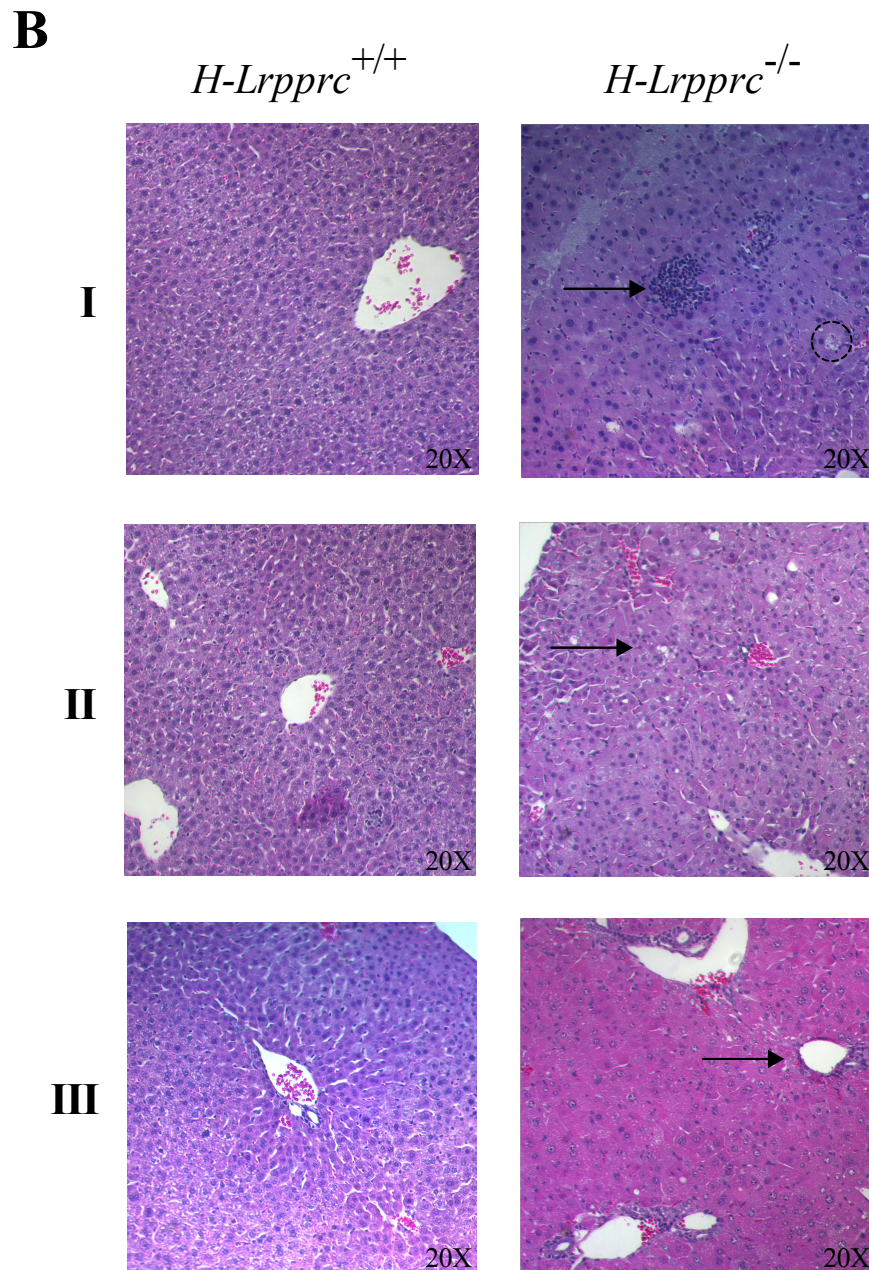
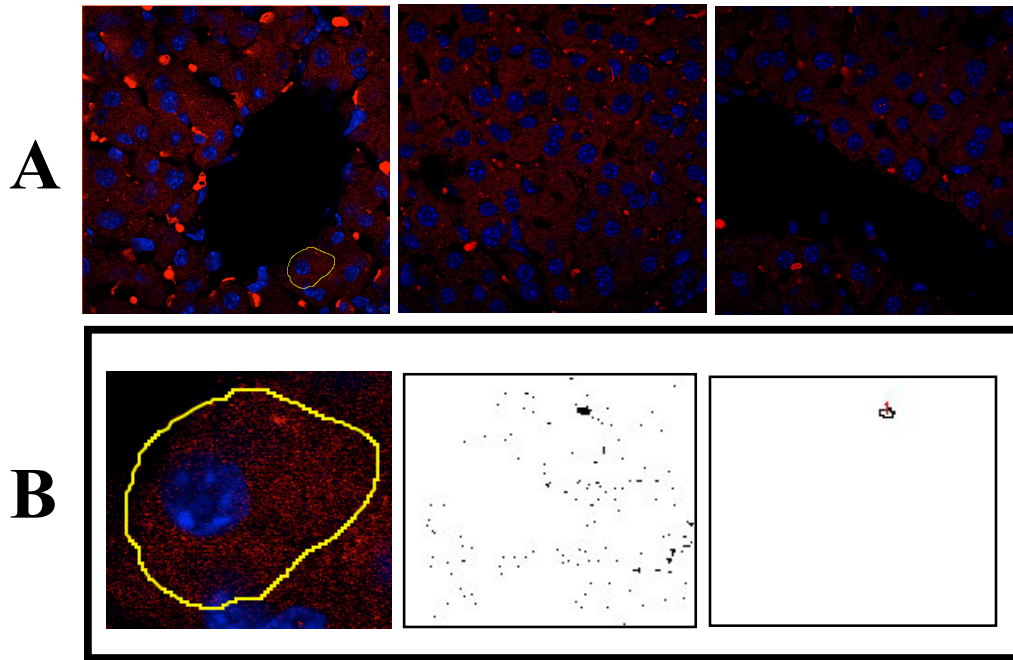


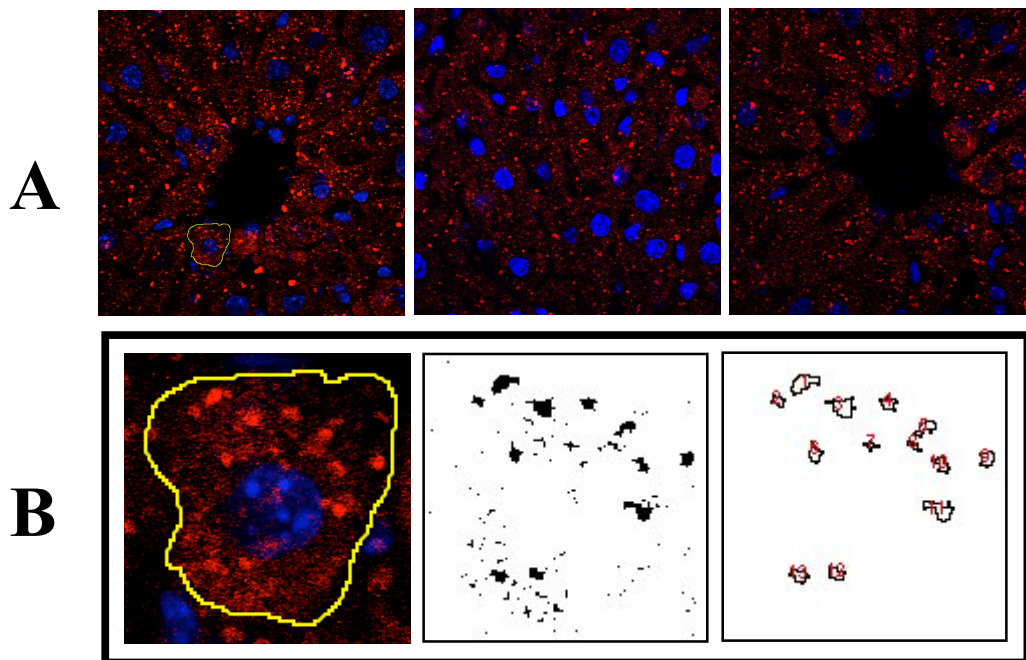
Figure 14 : Caractérisation microscopique du foie en H&E. Coloration hématoxyline & éosine des coupes de foies, enrobés dans la paraffine, de souris de 5 semaines d'âge. Dans les coupes du groupe *H-Lrpprc*^{-/-}, les cercles indiquent en A des hépatocytes de tailles hétérogènes et en B-I des corps apoptotiques tandis que les flèches indiquent en A : des vacuolisations et en B : I- infiltration lymphocytaire; II- cholestase biliaire; III- plaque de nécrose et de régénération. Images observées aux grossissements 20X et 40X.

Une coloration Oil Red'O a été réalisée afin de déterminer si ces vacuoles représentaient des gouttelettes lipidiques. Telle que présentée à la figure 15 A-B, la coloration des gouttelettes lipidiques était beaucoup plus marquée dans les hépatocytes *H-Lrpprc*^{-/-} comparativement aux hépatocytes normaux, indiquant la présence d'une stéatose hépatique. Suite à une analyse morphométrique, il s'est avéré que cette stéatose était de forme microvésiculaire. En effet, telle que présentée à la figure 15 C, la taille moyenne des gouttelettes lipidiques était similaire dans les deux groupes expérimentaux. Cependant, la quantité de petites vésicules disséminées dans les hépatocytes était 20 fois supérieure chez les souris *H-Lrpprc*^{-/-}, résultant en un contenu lipidique total très supérieur à la normale.

H-Lrpprc^{+/+}



H-Lrpprc^{-/-}



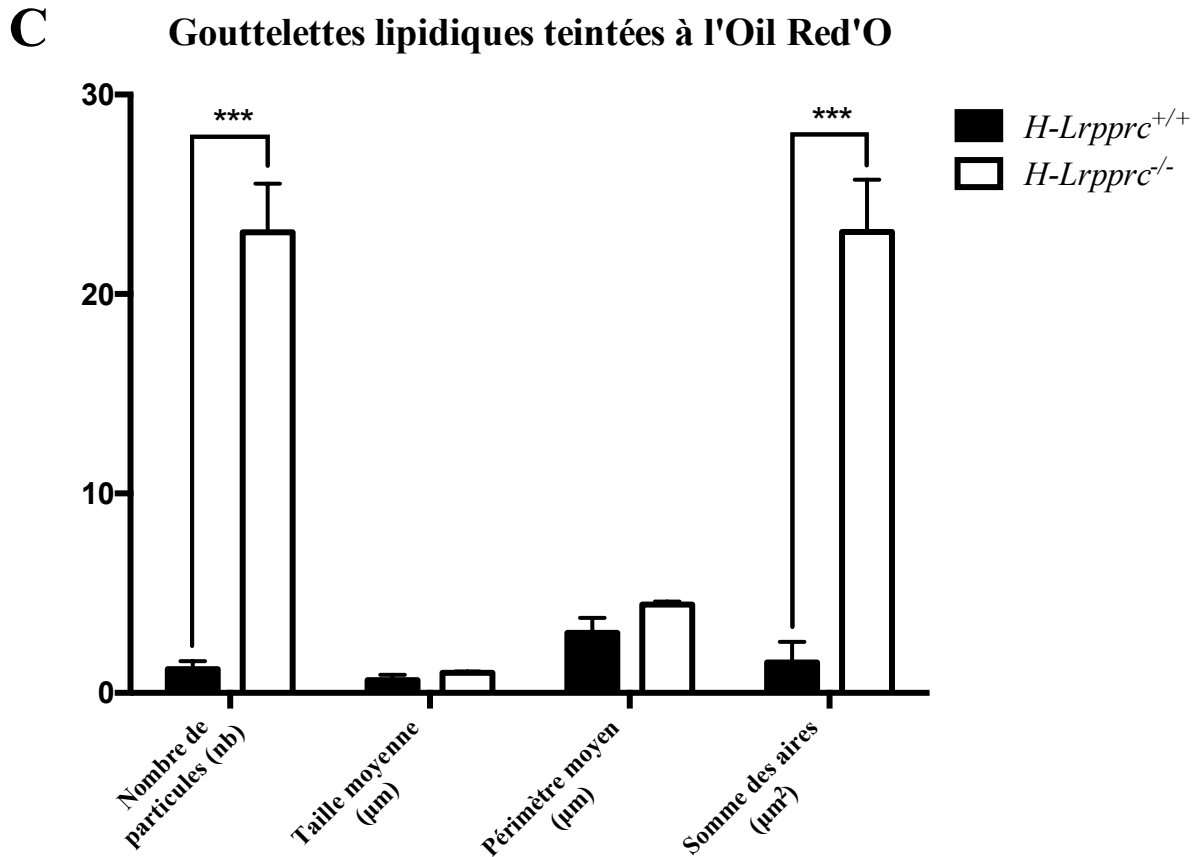


Figure 15 : Quantification de la stéatose hépatique par la coloration Oil Red'O. Coloration Oil Red'O des coupes de foies congelés de souris de 5 semaines d'âge. A-B : coupes de foie colorées à l'Oil Red'O. B : exemple de sélection d'un hépatocyte pour la quantification de son contenu en gouttelettes lipidiques; C : quantification des gouttelettes lipidiques teintées à l'Oil Red'O selon leur nombre, leur taille, leur périmètre et la somme des aires. $n = 10$ hépatocytes pour chaque groupe; *** = $p < 0,0001$. Images observées aux grossissements 40X et 60X.

2.2. Dimorphisme mitochondrial

Afin d'examiner plus spécifiquement la morphologie mitochondriale, des expériences de microscopie électronique en transmission ont été réalisées. Un phénotype marquant observé dans les hépatocytes *H-Lrpprc*^{-/-} était une augmentation de la surface cellulaire occupée par

des mitochondries et un accroissement de la taille moyenne des mitochondries prises individuellement (Figure 16).

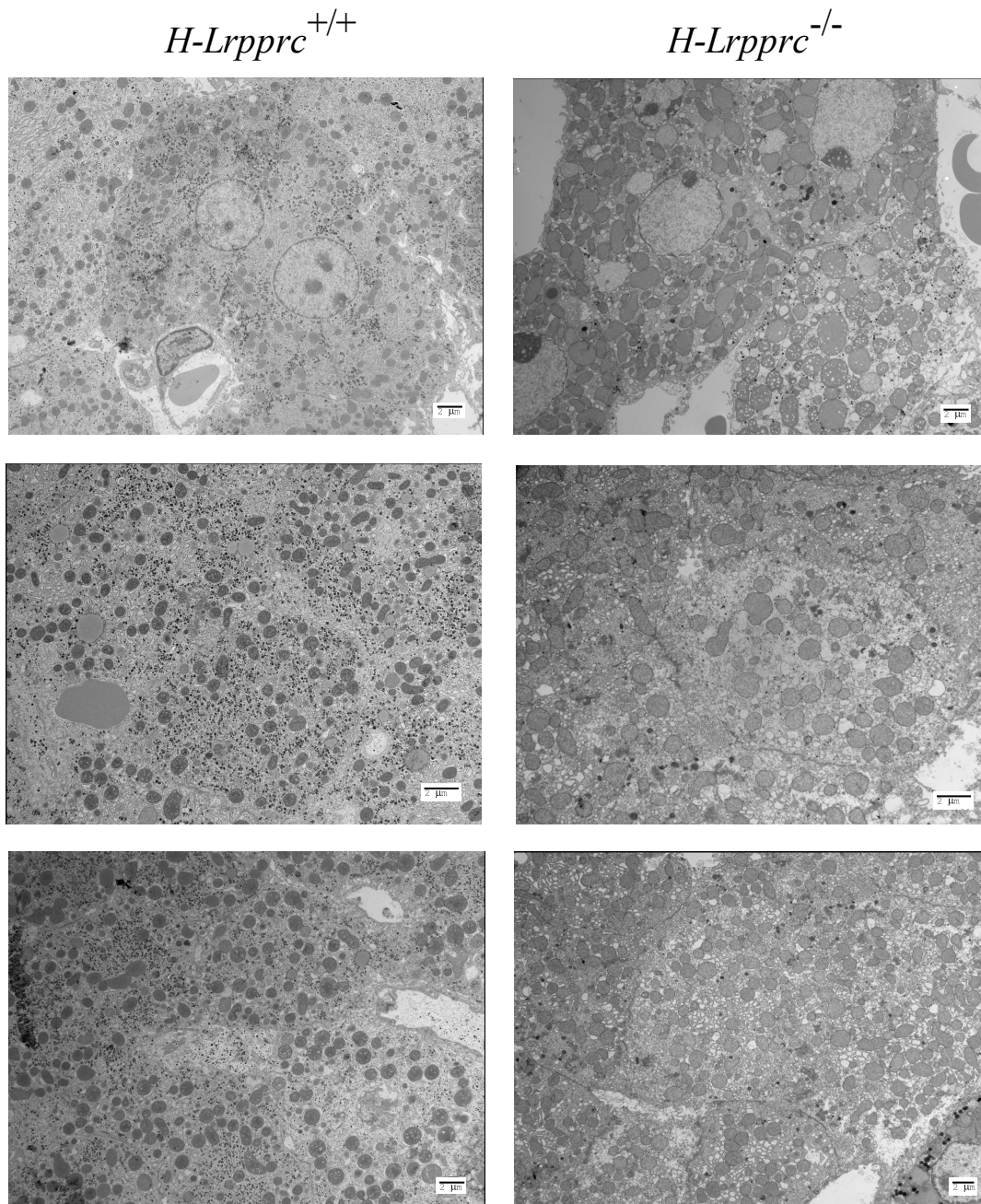


Figure 16 : Contenu mitochondrial des hépatocytes en microscopie électronique en transmission. Coupes de foie de souris observées aux grossissements 1200X-1400X-1900X.

Des images prises à un plus fort grossissement (4800X) ont également révélé la présence de plusieurs anomalies structurales dans les mitochondries *H-Lrpprc*^{-/-} notamment une perte de l'organisation des *cristae* résultant en la présence de nombreuses vacuoles de taille variable (Figure 17).

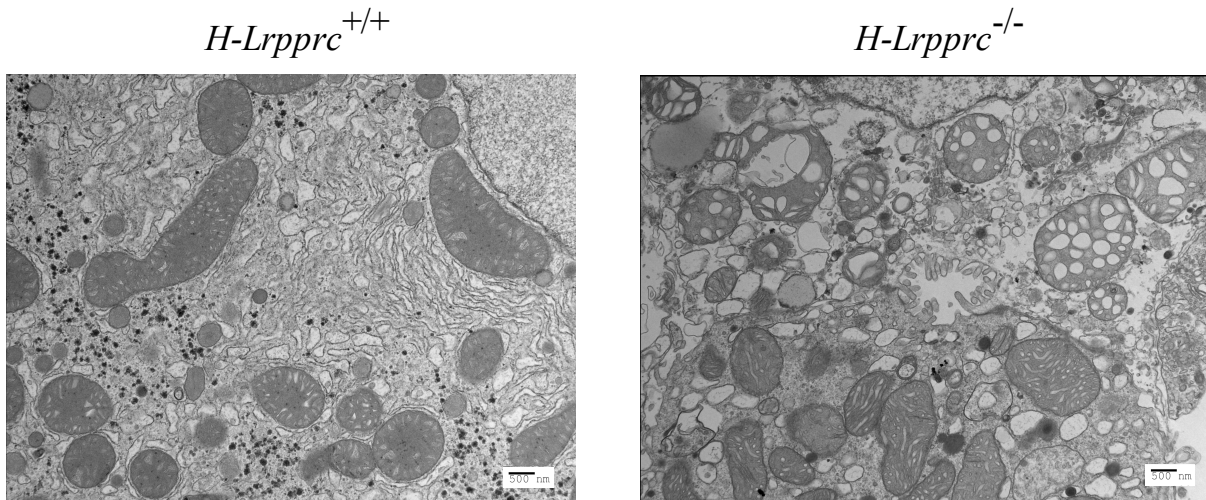
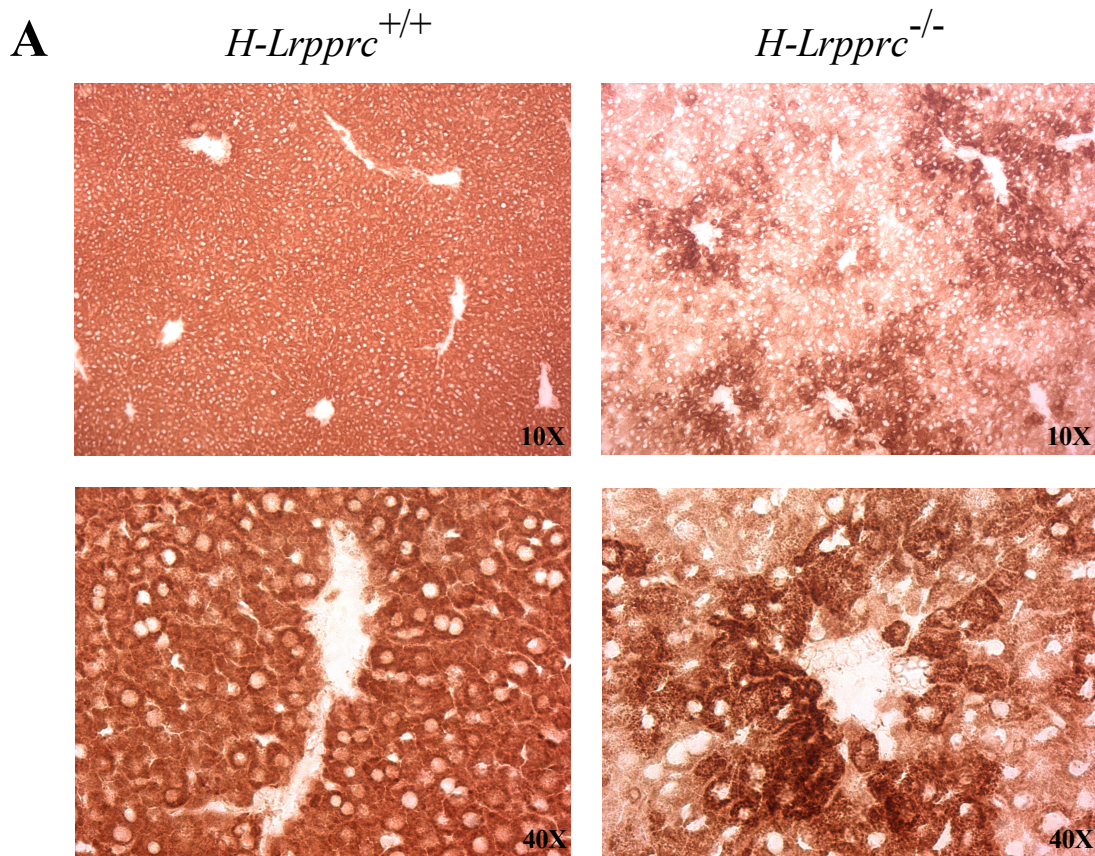


Figure 17 : Caractérisation des mitochondries hépatiques en microscopie électronique en transmission. Coupes de foie observées au grossissement 4800X.

2.3.Évidence histochimique de déficit en cytochrome oxydase

Afin de déterminer l'impact de l'inactivation hépato-spécifique de *LRPPRC* sur l'activité de la cytochrome oxydase (COX), le principal complexe de la chaîne respiratoire affecté chez les patients, l'activité de cette enzyme ainsi que celle du complexe II (SDH) a été évaluée qualitativement à l'aide de colorations sur coupe. Normalement, la population d'hépatocytes est biochimiquement hétérogène au sein des lobules hépatiques avec deux sous-populations : 1) les hépatocytes périveineux et 2) les hépatocytes périportaux. Ces deux populations sont notamment influencées par la pression partielle en oxygène dans les sinusoides, qui est plus forte dans la région périportale et graduellement plus faible vers la région périveineuse. Cette variation de l'environnement influence directement la spécialisation métabolique des hépatocytes. Ainsi, les hépatocytes périportaux ont un métabolisme oxydatif plus important et sont le lieu de la néoglucogénèse, tandis que les hépatocytes périveineux ont

un métabolisme plus glycolytique [75]. Tel que le démontre la figure 18, cette spécialisation métabolique était visible chez les souris saines, particulièrement au niveau de l'activité SDH. La coloration spécifique à l'activité de cette enzyme était en effet plus foncée dans les régions périportales que dans les régions périveineuses (Figure 18-B). Parallèlement, l'activité COX était répartie de manière plus uniforme dans les lobules hépatiques (Figure 18-A). Chez les souris *H-Lrpprc*^{-/-}, le zonage de l'activité SDH était clairement perdu, témoignant d'une perte de la spécialisation métabolique lobulaire. De plus, l'activité COX était globalement très faible, voire absente dans la majorité du parenchyme hépatique. Seules certaines zones localisées en périphérie de certains vaisseaux sanguins affichaient une coloration d'intensité plus normale.



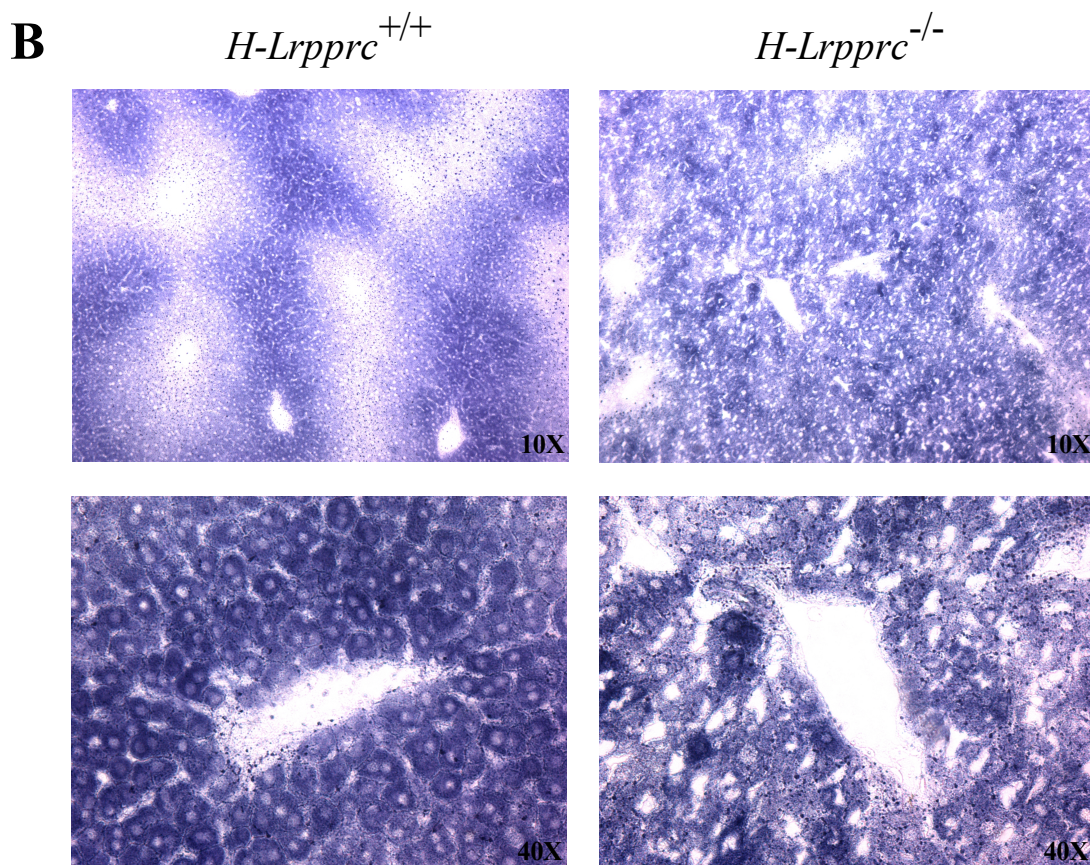


Figure 18 : Colorations spécifiques à l'activité COX et SDH. Coupes de foie successives congelées et colorées pour l'activité de COX (A, brun) et SDH (B, violet). Images observées aux grossissements 10X et 40X.

3. Enzymologie

Afin d'investiguer plus précisément l'impact de l'ablation de *LRPPRC* sur la chaîne respiratoire, l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire et d'une enzyme marqueuse du cycle de Krebs a été mesurée en spectrophotométrie à partir de préparations de mitochondries isolées. Les enzymes de la chaîne respiratoire ont des activités catalytiques très différentes les unes des autres. Afin de faciliter la comparaison entre les deux groupes expérimentaux, l'activité de chaque enzyme a donc été exprimée en pourcentage des valeurs obtenues chez les souris saines. Tel que montré à la figure 19, aucune différence significative

n'a été observée entre les deux groupes expérimentaux au niveau de l'activité de la citrate synthase et des complexes I et II. Par contre, en lien avec les colorations COX réalisées en histochimie, l'activité du complexe IV était réduite de 80 % dans les mitochondries *H-Lrpprc*^{-/-} comparativement aux mitochondries normales. De manière intéressante, l'activité de l'ATP synthase était également réduite de 85 % dans le groupe *H-Lrpprc*^{-/-}. De plus, cette activité résiduelle observée dans les mitochondries *H-Lrpprc*^{-/-} était complètement insensible à l'oligomycine, un inhibiteur spécifique de l'ATP synthase.

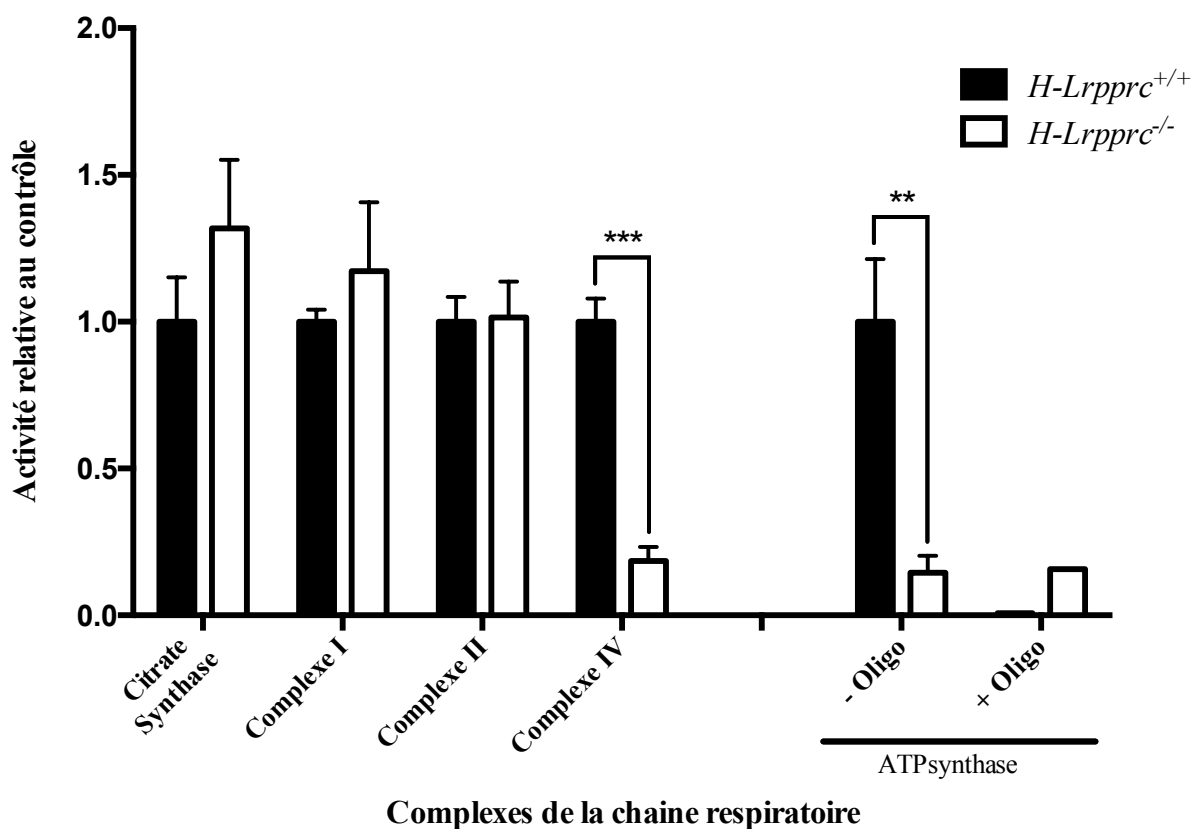


Figure 19 : Activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire. Activité enzymatique mesurée à partir de préparations de mitochondries hépatiques isolées. $n = 7-8$ pour chaque groupe; $** = p < 0,01$ et $*** = p < 0,0001$.

4. Respiration mitochondriale

Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de ces déficits enzymatiques, la respiration mitochondriale a été mesurée par polarographie sur mitochondries isolées sous différentes conditions expérimentales.

4.1. Respiration en présence de substrats du complexe I

En présence de glutamate et de malate (stade 2), des substrats alimentant le complexe I, la respiration basale (stade 2) était 48 % plus élevée dans le groupe H-*Lrpprc*^{-/-}, indiquant un léger découplage des mitochondries (Figure 20). La respiration maximale stimulée par l'ajout d'une concentration saturante d'ADP (stade 3), était 40 % plus basse dans les mitochondries du groupe H-*Lrpprc*^{-/-}. Afin de déterminer si cette différence était causée par une limitation au niveau de la chaîne respiratoire ou de l'appareil de phosphorylation (c.-à-d. ATP synthase), la respiration a été découplée de la phosphorylation par l'ajout du protonophore CCCP. Dans cette condition, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes, suggérant que la perte d'activité de l'ATP synthase, plutôt que le déficit de COX, était le principal facteur responsable de la diminution de la respiration en stade 3.

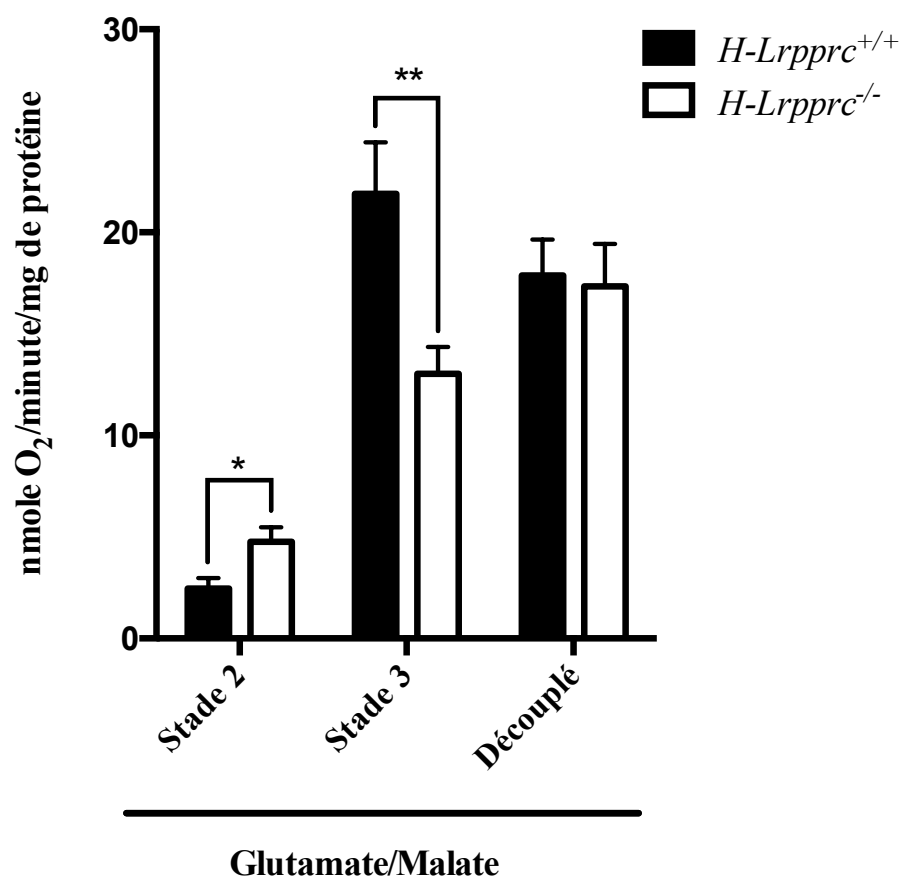


Figure 20 : Respiration mitochondriale stimulée par des substrats spécifiques du complexe I. Respiration mitochondriale mesurée sur des préparations de mitochondries hépatiques isolées stimulées avec 5mM glutamate, 2,5mM malate, 1mM ADP et 0,18 μ M CCCP. $n = 9$ pour chaque groupe; * = $p < 0,05$ et ** = $p < 0,01$.

L'efficacité du couplage entre la respiration et la phosphorylation, mesurée par le rapport entre la respiration basale et la respiration stimulée par l'ADP (ou *Acceptor Control Ratio*), était profondément diminuée de 80 % dans les mitochondries *H-Lrpprc*^{-/-}. Cette différence était explicable à la fois par le léger découplage de la respiration basale en stade 2 et la diminution de la respiration stimulée par l'ADP en stade 3 (Figure 21).

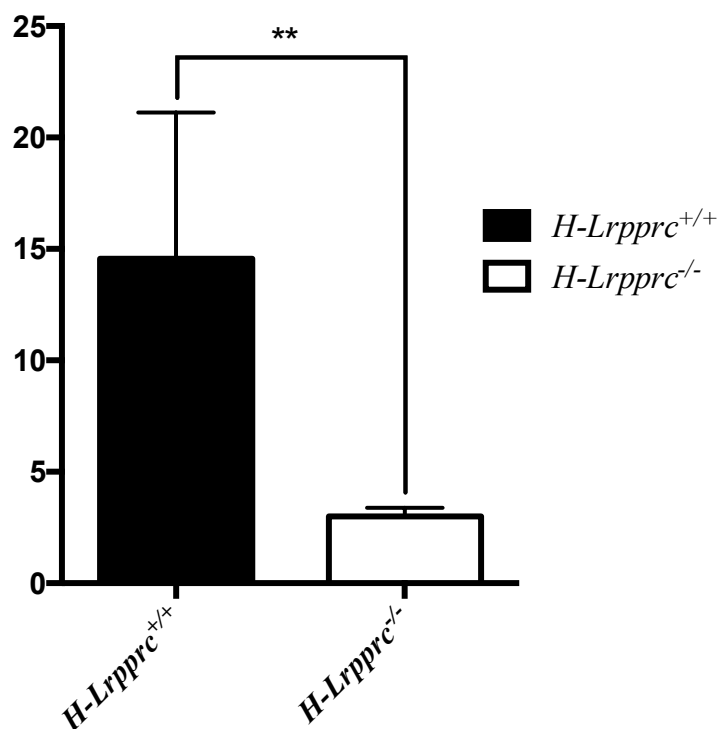


Figure 21 : «Acceptor Control of Respiration» (ACR). Rapport des valeurs de la respiration mitochondriale stimulée par l'ADP (1 mM) sur les valeurs de la respiration mitochondriale stimulée par les substrats glutamate (5 mM) et malate (2,5 mM). n = 9 pour chaque groupe; ** = p < 0,01.

4.2. Respiration en présence de substrats du complexe II

Afin de placer la chaîne respiratoire sous une contrainte différente, les expériences de respirométrie ont été répétées en utilisant le succinate, qui contourne le complexe I et agit comme donneur d'électrons au niveau du complexe II. Dans ces conditions, le profil respiratoire était similaire à celui observé en présence de substrats pour le complexe I. La respiration basale était légèrement supérieure dans le groupe *H-Lrpprc*^{-/-}, sans être statistiquement différente. La respiration stimulée par l'ADP était 55 % plus basse que celle observée dans les mitochondries normales et cette différence était abolie par l'ajout de CCCP (Figure 22).

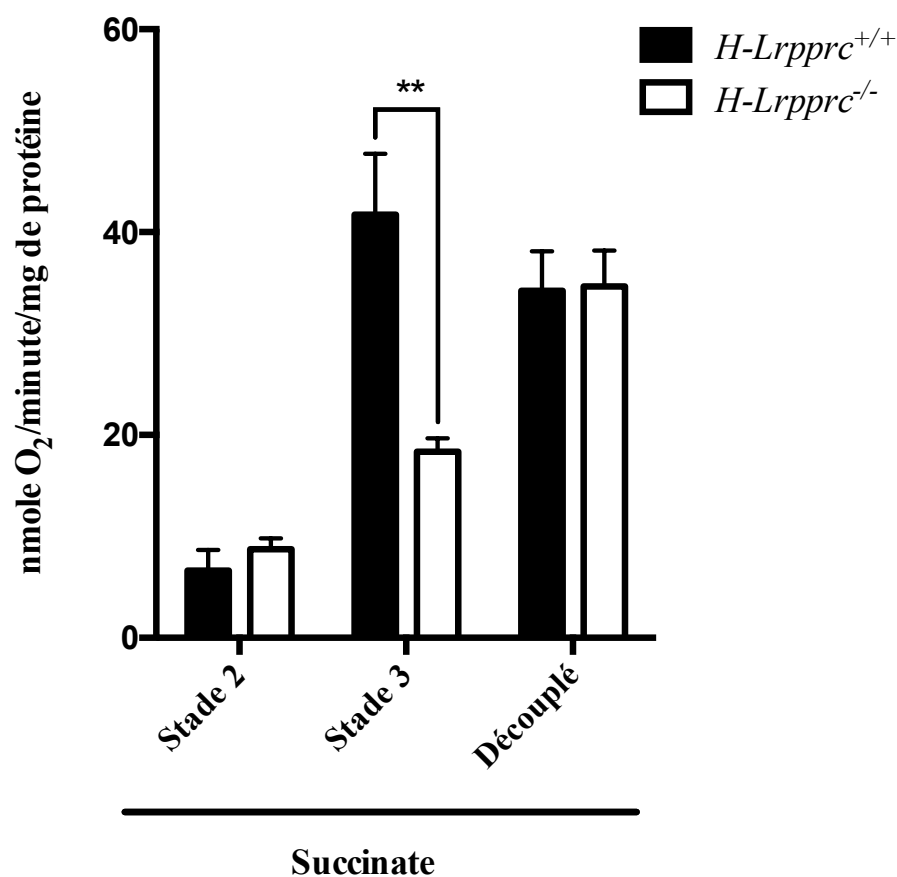


Figure 22 : Respiration mitochondriale stimulée par des substrats spécifiques du complexe II. Respiration mitochondriale mesurée sur des préparations de mitochondries hépatiques isolées stimulées avec 5 mM succinate, 1 mM ADP et 0,18 μ M CCCP. $n = 7$ pour chaque groupe; ** = $p < 0,01$.

4.3. Respiration en présence de substrats du complexe IV

De manière à isoler spécifiquement le fonctionnement du complexe IV, la respiration a été mesurée en présence du couple TMPD/ascorbate, un donneur artificiel d'électrons pour le cytochrome *c*. De façon surprenante, la respiration maximale en présence de TMPD/ascorbate n'était réduite que de 20 % dans le groupe *H-Lrpprc*^{-/-} comparativement au contrôle (Figure

23), témoignant d'une activité résiduelle de COX non-négligeable malgré l'ablation de *LRPPRC*.

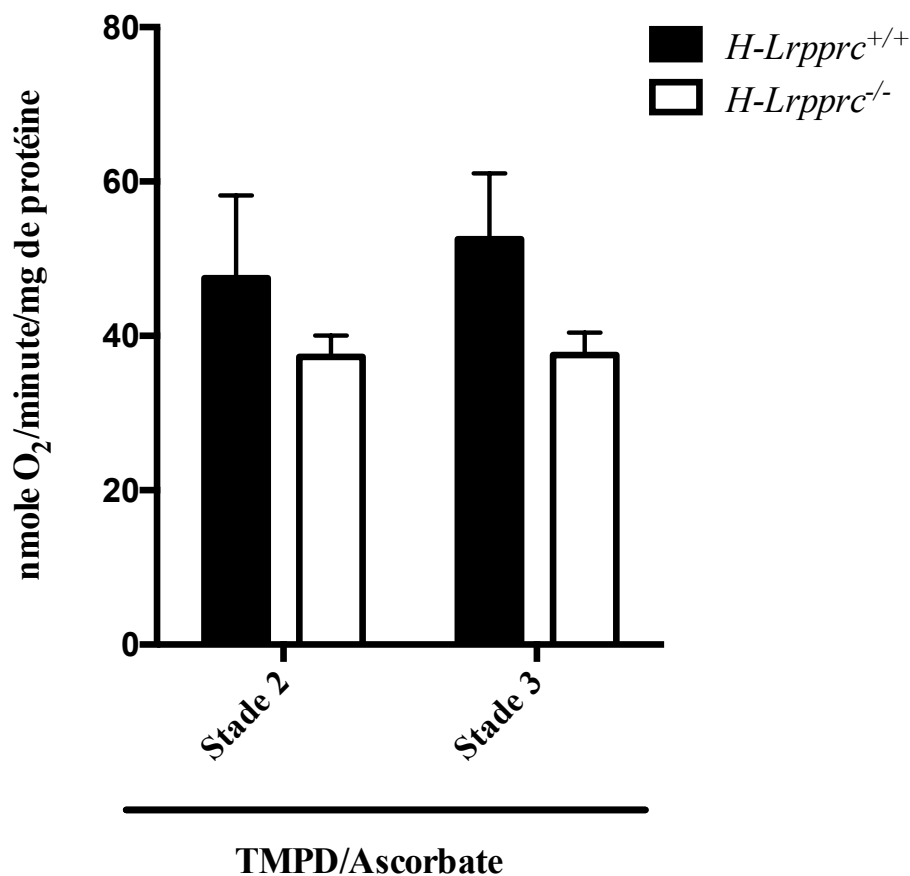


Figure 23 : Respiration mitochondriale stimulée par des substrats spécifiques du complexe IV. Respiration mitochondriale mesurée sur des préparations de mitochondries hépatiques isolées stimulées avec 0,9 mM TMPD, 9 mM ascorbate, 1 mM ADP. $n = 5$ pour chaque groupe.

Pour examiner le comportement de la COX vis-à-vis une inhibition progressive, la respiration supportée par le TMPD/ascorbate a été inhibée graduellement avec du cyanure de potassium (KCN), un inhibiteur irréversible de la COX (Figure 24). La constante d'inhibition (K_i) observée dans les mitochondries saines étaient de 135 μM . Cependant, dans les mitochondries *H-Lrpprc*^{-/-} le K_i était de 35 μM , soit presque 4 fois moins que dans les contrôles, témoignant d'une diminution importante du nombre d'enzymes disponibles, pouvant être éventuellement confirmée par immunobuvardage de type Western.

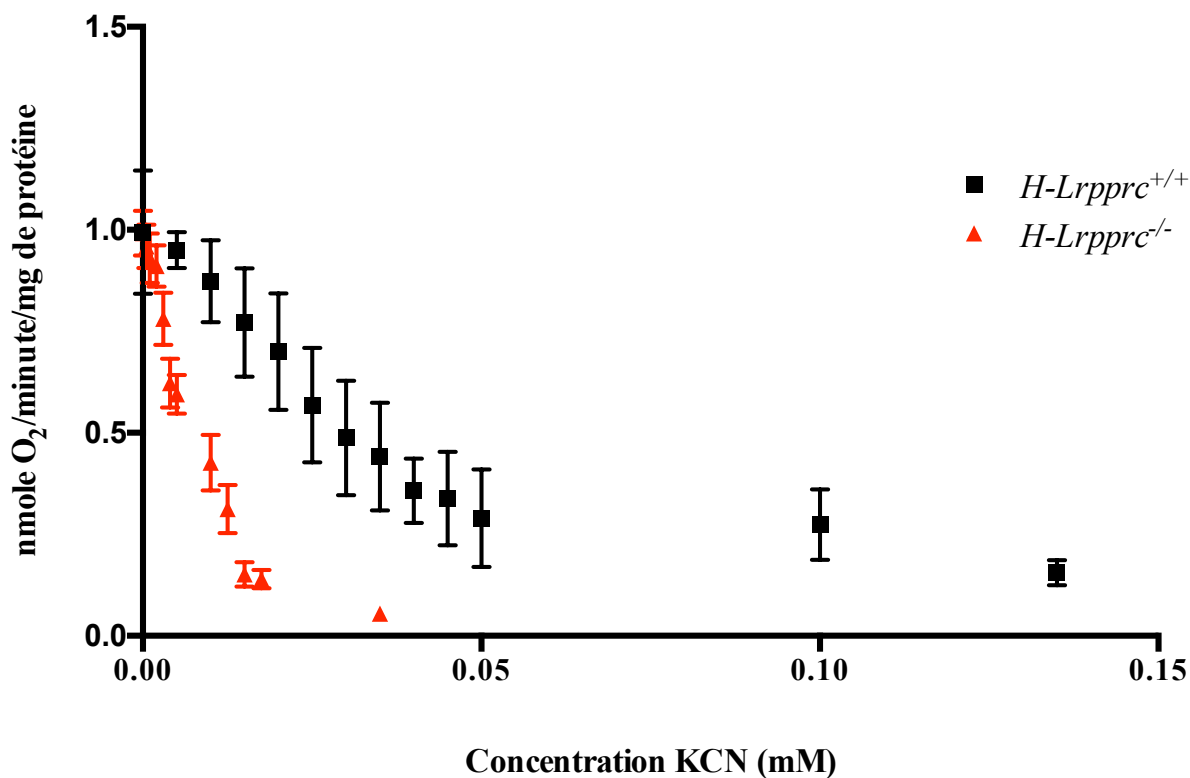


Figure 24 : Titrage au KCN. Respiration mitochondriale, stimulée par les substrats spécifiques du complexe IV, graduellement inhibée par des concentrations additionnelles de KCN. Respiration mitochondriale mesurée sur des préparations de mitochondries hépatiques isolées stimulées avec 0,9 mM TMPD, 9 mM ascorbate et 1 mM ADP. $n = 5$ pour chaque groupe.

4.4. Oxydation des acides gras

Afin de mesurer la capacité à oxyder les acides gras, des expériences ont également été réalisées en présence de palmitoyl-CoA, un acide gras à longue chaîne dépendant du système CPT1-CPT-III pour son transport dans la mitochondrie. Telle qu'illustrée à la figure 25, la respiration en stade 3 supportée par le palmitoyl-CoA était réduite de 50 % dans le groupe $H-Lrpprc^{-/-}$.

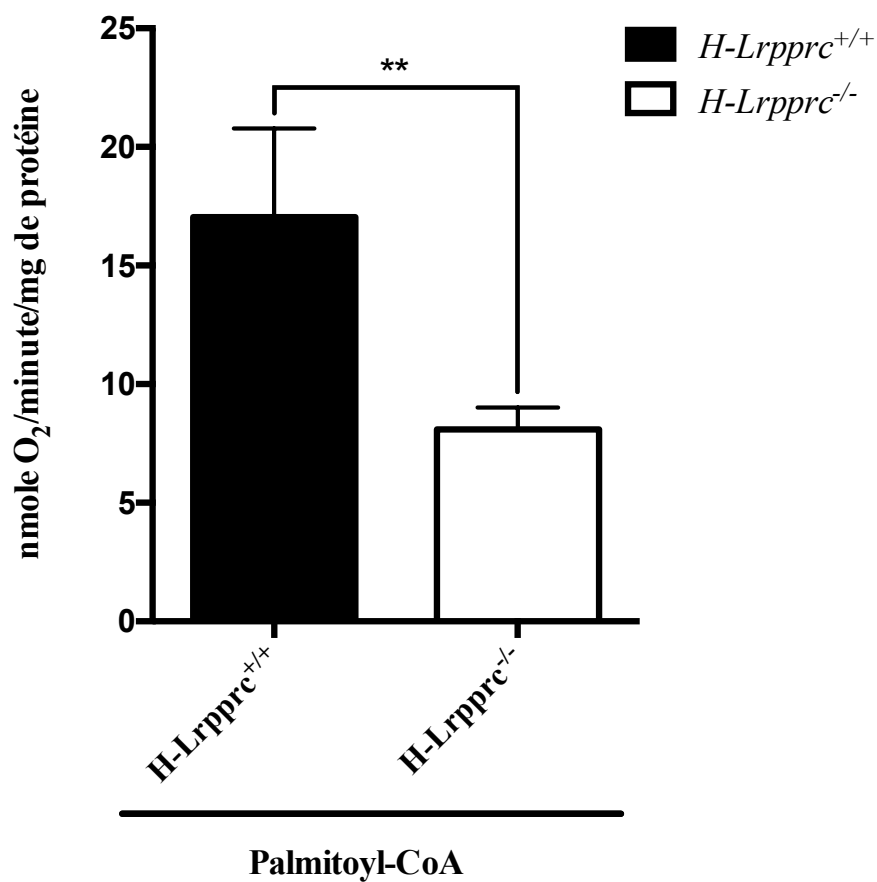


Figure 25 : Oxydation du palmitoyl-CoA. Respiration mitochondriale mesurée sur des préparations de mitochondries hépatiques isolées stimulées avec 5 mM malate, 1 mM ADP et 20 μ M palmitoyl-CoA. $n = 8$ pour chaque groupe; ** = $p < 0,01$.

Discussion

Au cours de ces travaux de maîtrise, nous avons réalisé un premier effort de caractérisation du phénotype des souris *H-Lrpprc*^{-/-} afin de déterminer leur utilité potentielle pour comprendre le rôle du foie dans le Syndrome de Leigh version Canadienne-Française. Les expériences réalisées sur des animaux de cinq semaines ont permis d'établir que les souris sont parfaitement viables et ne présentent généralement pas de phénotype comportemental particulier, même lorsque soumises au jeûne. Cependant, ces souris affichent un retard de croissance et présentent un profil histopathologique compatible avec un déficit mitochondrial au foie. Au plan biochimique, nos résultats confirment que la perte de LRPPRC induit bel et bien un déficit sévère de COX, un résultat qui était attendu, compte tenu des multiples évidences expérimentales obtenues chez les patients LSFC. Au-delà de ce déficit, nos résultats suggèrent également que la perte de LRPPRC induit une incapacité particulière pour l'oxydation des acides gras à longues chaînes. De plus, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme, la déficience en LRPPRC induit une importante perte d'activité du complexe V responsable de la synthèse de l'ATP. Dans nos expériences, cette perte d'activité du complexe V explique en grande partie le déficit respiratoire identifié sur les mitochondries isolées.

I. Différences et similarités phénotypiques entre le modèle *H-Lrpprc*^{-/-} et différentes pathologies mitochondriales humaines à répercussion hépatique

Sur le plan du phénotype général et de l'histopathologie hépatique, notre modèle murin, de déficience en LRPPRC, a reproduit en partie certains traits observés chez les patients LSFC, ainsi que chez d'autres patients atteints de maladies mitochondriales avec atteintes hépatiques.

Sur le plan de la croissance, il est connu que les patients LSFC affichent un retard de croissance caractérisé par un poids moyen à la naissance inférieur à la normale (-10 à 12 %) [55] et une fréquence anormalement élevée d'individus avec un poids corporel inférieur au 3^e percentile [53]. De manière intéressante, ce retard pondéral était clairement visible chez les souris H-*Lrpprc*^{-/-} (-30 % vs les souris saines : Figure 11, p. 55) à l'âge de cinq semaines, suggérant que le déficit en LRPPRC au niveau hépatique est suffisant pour induire au moins en partie ce retard de croissance. Par ailleurs, tout comme chez les patients, nous avons observé une variabilité interindividuelle au niveau de la sévérité de la présentation clinique. En effet, bien que la majorité des souris étudiées ne présentaient pas de phénotype clinique sévère après une nuit de jeûne, deux individus sur les 50 étudiés, soit 4 % de la population, ont affiché une hypoglycémie sévère. Cette présentation variable est similaire à ce qui est observé en clinique chez l'Homme où la même mutation au niveau du gène *LRPPRC* peut induire une mortalité périnatale, ou permettre la survie jusqu'à l'âge adulte [55]. Évidemment, il est difficile de conclure que la présentation clinique variable observée chez les souris H-*Lrpprc*^{-/-} est causée par les mêmes mécanismes biologiques que chez les patients compte tenu de la nature du modèle utilisé, soit un *knockout* de la protéine native à l'aide d'un système Cre/Lox. Néanmoins, ces observations illustrent bien que la déficience en LRPPRC au niveau hépatique augmente probablement de manière substantielle la vulnérabilité à un stress de nature métabolique tel que le jeûne.

Sur le plan de la masse hépatique, il est bien connu que le foie a la capacité unique de répondre aux dommages tissulaires en augmentant son volume afin de maintenir sa masse cellulaire et ses fonctions [76]. Dans notre étude, une telle hépatomégalie était observable chez les souris H-*Lrpprc*^{-/-}, chez qui le ratio poids du foie/poids corporel était 25 % plus élevée que chez les souris saines (Figure 12, p. 56). Bien que la présence d'hépatomégalie n'ait pas été étudiée chez les patients LSFC elle a été rapportée dans plusieurs cas d'hépatopathies mitochondriales. En effet, l'hépatomégalie est fréquemment observée chez des patients atteints du syndrome de déplétion de l'ADN mitochondrial, de la maladie d'Alpers, du Syndrome de Pearson et dans des cas de mutation du gène *SCO1*, qui encode une chaperonne impliquée dans l'incorporation du cuivre au niveau du complexe IV [46, 77, 78]. Globalement nos

données et les évidences de la littérature suggèrent donc que l'hépatomégalie pourrait être présente chez les patients LSFC.

En ce qui concerne le volet microscopique de notre caractérisation, aucune analyse histopathologique du foie n'a été réalisée chez les patients LSFC à ce jour, rendant la comparaison impossible. Cependant, les multiples anomalies que nous avons observées sont récurrentes dans plusieurs hépatopathies mitochondriales causées par une atteinte de la chaîne respiratoire [77, 79]. En effet, le profil histologique typique des hépatopathies mitochondriales comprend de l'inflammation périportale et centrolobulaire, de la fibrose, de la cholestase, de la nécrose, une accumulation de glycogène ainsi que de la stéatose microvésiculaire [73, 79]. Nos colorations en hématoxyline-éosine confirment, à fort grossissement, la présence d'inflammation périportale et centro-lobulaire dans notre modèle *H-Lrprrc*^{-/-}, telles qu'illustrées à la figure 14 (p. 59). Tout comme dans d'autres hépatopathies mitochondriales, nous avons aussi retrouvé de la cholestase biliaire dans le foie *H-Lrprrc*^{-/-} (Figure 14-BII, p. 59). La cholestase, dans les maladies mitochondriales, est habituellement causée par un dysfonctionnement des pompes dépendantes à l'ATP pour l'exportation des sels biliaires [77, 80]. Ces pompes, qui constituent la principale force motrice du flux biliaire, pourraient être dysfonctionnelles chez les souris *H-Lrprrc*^{-/-} et causer la stase de la bile au niveau hépatique.

Nous avons également été en mesure d'identifier plusieurs plaques de nécrose et de nombreux corps apoptotiques sur les coupes de foie *H-Lrprrc*^{-/-} colorées en hématoxyline-éosine (Figure 14-BIII, p. 59). Bien que les mécanismes responsables de cette mort cellulaire soient incertains, la diminution de la production d'ATP cellulaire est considérée comme un facteur important. En effet, un déficit modéré des niveaux d'ATP cellulaire, en combinaison avec d'autres facteurs, peut permettre l'exécution du programme apoptotique, alors que l'effondrement des niveaux d'ATP induit clairement la nécrose cellulaire [81].

Parallèlement, nous avons aussi observé, à l'aide de la coloration Oil Red'O, une stéatose microvésiculaire importante dans le foie *H-Lrprrc*^{-/-} (Figure 15, p. 62). Ce type de stéatose, qui consiste en une accumulation de petites gouttelettes de lipides neutres à l'intérieur des hépatocytes, est caractéristique des hépatopathies mitochondriales et peut avoir

plusieurs causes [77, 79]. Parmi celles-ci, on note une incorporation incontrôlée d'acides gras libres par les hépatocytes, une altération de la β -oxydation des acides gras, et une augmentation de la synthèse des triglycérides. Bien que nous n'ayons pas réalisé une étude mécanistique poussée, nous avons observé que les mitochondries isolées à partir du foie des souris H-*Lrpprc*^{-/-} présentaient une incapacité marquée pour l'oxydation du palmitoyl-CoA, un acyl-CoA dérivé de l'acide palmitique, un des acides gras saturés à longue chaîne les plus abondants dans la diète. Il est donc possible que la stéatose microvésiculaire que nous avons observée chez les souris H-*Lrpprc*^{-/-} soit en partie reliée à une β -oxydation diminuée et une redirection des acides gras vers l'estérification en triglycérides.

En ce qui concerne l'analyse par microscopie électronique, nous avons retrouvé des évidences de prolifération aberrante des mitochondries caractérisée par une augmentation du nombre et de la surface individuelle des organelles (Figure 16, p. 63). Par ailleurs, un grand nombre de mitochondries présentaient une matrice dilatée et vacuolisée, ainsi qu'une perte de l'organisation normale des *cristae* (Figure 17, p. 64). Bien qu'aucune donnée de ce type ne soit disponible chez les patients LSFC, ces observations sont généralement compatibles avec les perturbations de la morphologie mitochondriale retrouvées chez les patients atteints d'hépatopathies mitochondriales [77]. La relation entre ces anomalies structurales et la sévérité des déficits fonctionnels demeure inconnue. Cependant, il est de plus en plus clair qu'il existe un lien bidirectionnel entre les changements de la morphologie et la modulation des fonctions mitochondriales [82].

En bref, notre modèle murin de déficience hépatique en LRPPRC, reproduit certains aspects du phénotype général et histopathologique des patients atteints de LSFC et d'autres maladies mitochondriales avec répercussion hépatique, notamment le retard de croissance et l'hépatomégalie, l'inflammation périportale et centrolobulaire, la cholestase, la nécrose, la stéatose microvésiculaire et finalement l'altération de la morphologie mitochondriale.

II. Atteinte du complexe IV et conséquences fonctionnelles sur la respiration

Historiquement, le LSFC a été caractérisé au plan biochimique comme un défaut tissu-spécifique du complexe IV (COX) affectant particulièrement le cerveau et le foie, où l'activité résiduelle est estimée à 20 % [53, 56]. Dans notre étude, nous avons donc évalué de manière spécifique la présence d'un déficit au niveau de ce complexe en réalisant des analyses histochimiques et enzymatiques. Sur les coupes histologiques, nous avons observé une forte diminution de la coloration brun-marron témoignant d'une perte de l'activité de COX relative à celle de la SDH dans la majorité des hépatocytes H-*Lrpprc*^{-/-} (Figure 18, p. 66). De plus, l'activité enzymatique du complexe IV, mesurée en spectrophotométrie sur des homogénats de mitochondries solubilisées, était diminuée de 80 % comparativement aux valeurs contrôles (Figure 19, p. 67), alors que l'activité du complexe I et II était inchangée (Figure 19, p. 67). Ces données ont été corroborées par des expériences d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes, menées par le laboratoire de notre collègue Eric Shoubridge, démontrant un assemblage normal des complexes I, II, et III couplé à une diminution sévère de l'assemblage du complexe IV (résultats non publiés). Par ailleurs, des données préliminaires provenant de notre laboratoire indiquent que les niveaux de transcrits pour les sous-unités de la chaîne respiratoire encodées dans l'ADN mitochondrial sont peu ou pas affectés pour le complexe I, mais lourdement diminués pour le complexe IV (COX-I, COX-II, COX-III). Globalement, nos données suggèrent donc que tout comme chez les patients LSFC [56, 61], le complexe IV est le seul complexe de la chaîne respiratoire à être touché par un défaut d'assemblage chez la souris H-*Lrpprc*^{-/-}.

Ceci étant, il est important de mentionner que chez les souris H-*Lrpprc*^{-/-} certains hépatocytes en périphérie des espaces portes et des veines centrolobulaires affichaient une intensité de coloration normale pour COX (Figure 18A, p. 65-66). Cette observation, combinée à la présence d'une activité enzymatique résiduelle de 20% pour le complexe IV, suggère une ablation incomplète de *LRPPRC* dans notre modèle, permettant ainsi l'assemblage de COX dans certaines cellules. Ceci pourrait s'expliquer en partie par la

recombinaison imparfaite de la Cre recombinase utilisée pour inactiver l'expression de *LRPPRC*. En effet, dans le modèle d'*Albumine-Cre* utilisé, le pourcentage de recombinaison est estimé à 75 % à 3 semaines et à 90 % à 12 semaines postnatales [83]. De plus, une perte progressive de l'expression de l'*Albumine-Cre* a été observée dans les hépatocytes avec ce modèle, particulièrement chez les souris n'exprimant qu'un seul allèle *Cre* (c.-à-d. chez des souris hétérozygotes *Cre*) [84]. Cette étude a également mis en évidence que la régénérescence hépatique pouvait induire la réexpression du gène *COX10* initialement inactivé à l'aide du système *Alb-Cre/LoxP* [84]. La source de cette régénérescence semble être principalement des cellules souches extrahépatiques n'exprimant pas l'*Alb-Cre* qui colonisent les espaces périvasculaires avant de se différencier [84]. Cependant, d'autres sources cellulaires sont également envisageables telles que *i*) des hépatocytes adultes qui pour des raisons obscures auraient échappés à une ablation complète du gène ciblé, ou *ii*) des cellules souches intrahépatiques [84]. Fait intéressant, il est connu que la régénérescence hépatique débute dans la région périportale et se fait graduellement jusqu'à la région centrolobulaire [76]. Cette propriété de la régénérescence hépatique pourrait expliquer en partie la concentration des hépatocytes COX-positifs dans les régions périportales chez les souris *H-Lrpprc*^{-/-}.

Afin d'investiguer les conséquences du défaut d'assemblage et d'activité biochimique du complexe IV, nous avons mesuré l'activité de l'holoenzyme en condition native en mesurant la respiration en présence de TMPD/ascorbate, un donneur artificiel d'électrons pour le cytochrome *c* (Figure 23, p. 72). Deux raisons nous ont amenés à réaliser une telle mesure. La première raison est que l'activité biochimique de COX mesurée par spectrophotométrie sur des lysats solubilisés est toujours en vaste excès de la réelle capacité de l'enzyme lorsque celle-ci fonctionne au sein de la chaîne respiratoire intacte. De ce fait, une perte d'activité biochimique de l'ordre de 80-90 % peut-être enregistrée sans qu'il y ait d'effets notoires sur la respiration [69]. La deuxième raison est que l'extraction avec des détergents qui est requise pour le dosage biochimique de COX semble, dans certains cas, amplifier l'impact de déficits génétiques de COX sur l'activité de l'enzyme possiblement via une déstabilisation accrue des enzymes après extraction des membranes [85].

En accord avec ces données, nous avons observé un déficit non significatif de l'ordre de 20% de l'activité de COX mesurée par respirométrie, alors que dans les mêmes échantillons le déficit d'activité mesuré par spectrophotométrie sur des lysats mitochondriaux solubilisés était beaucoup plus grand (c.-à-d. 80 %). Ces données suggèrent donc que l'activité résiduelle de COX dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} est quasi suffisante pour pourvoir à l'activité de la chaîne respiratoire lorsque l'enzyme est dans son environnement lipidique natif, à tout le moins *in vitro* dans les conditions utilisées. Cependant, la respiration était plus rapidement inhibée dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} lorsque nous avons réalisé un titrage au KCN, un inhibiteur spécifique et irréversible du complexe IV (Figure 24, p. 73). En effet, la valeur de la constante d'inhibition (K_i) de COX était de 35 μM dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} et près du quadruple pour les mitochondries saines, soit 135 μM. Théoriquement, deux phénomènes pourraient expliquer l'inhibition plus rapide de l'activité de COX par le KCN chez les souris H-*Lrpprc*^{-/-} : **i)** une plus grande affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur ou **ii)** une diminution du nombre de sites d'inhibition disponibles. Malgré qu'une faible valeur de K_i soit habituellement associée à une plus grande affinité de l'inhibiteur, il est peu probable que l'ablation de *LRPPRC* augmente l'affinité de COX pour le KCN. L'interprétation la plus probable est donc que la baisse du K_i dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} reflète la présence d'une moindre quantité de complexes IV assemblés et fonctionnels et donc une diminution du nombre de sites à combler pour atteindre un degré d'inhibition donné.

En définitive, les résultats de nos analyses démontrent donc que notre modèle murin de déficience hépatique en *LRPPRC* reproduit partiellement le déficit du complexe IV observé chez les patients LSFC. Malgré une activité enzymatique considérablement réduite, l'activité résiduelle de COX dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} est néanmoins quasi suffisante pour soutenir une respiration normale en condition optimale *in vitro*. Cependant, les mitochondries opèrent probablement très près du seuil critique au-delà duquel une inhibition de COX, même légère, affecte de façon drastique la respiration et la survie cellulaire. Par ailleurs, nos données combinées à celles de la littérature préexistante indiquent que les propriétés régénératrices du foie et la nature du système de recombinaison utilisé pour inactiver *LRPPRC* constituent des facteurs limitant pour l'étude de l'impact de l'ablation de *LRPPRC* au niveau hépatique. En effet, à terme, la réexpression progressive de *LRPPRC* rendra difficiles des études

physiologiques *in vivo* telles que l'investigation des mécanismes inducteurs de crises ou l'essai de traitements thérapeutiques. Le développement d'une souris portant un *knockin* ubiquitaire pour la mutation A354V pourrait nous permettre d'obtenir un modèle plus pertinent de la pathologie pour l'exploration d'avenues thérapeutiques.

III. Atteinte de l'ATP synthase et conséquence fonctionnelle sur la respiration

Les expériences de respirométrie que nous avons réalisées nous ont également permis de mettre en évidence un déficit au niveau de l'ATP synthase. Pour y arriver, nous avons comparé la respiration dans des conditions où la respiration est couplée ou non à la synthèse d'ATP. En stade 3, en présence d'une concentration saturante d'ADP, nous avons observé une réduction de la respiration dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} peu importe le type de substrat utilisé pour alimenter la chaîne respiratoire (Figures 20 et 22, p. 69 et 71). Cependant, cette différence était abolie par l'ajout du protonophore CCCP dont l'effet est d'induire une translocation massive de protons au travers de la membrane mitochondriale interne. Dans cette condition, la respiration sert presque exclusivement à compenser cette fuite de proton et devient donc indépendante de la synthèse d'ATP.

De ce fait, la baisse de la respiration mitochondriale en stade 3 que nous avons observée est une conséquence d'un dysfonctionnement de l'ATP synthase plutôt qu'un déficit de COX dans notre modèle H-*Lrpprc*^{-/-}, puisque les valeurs de respiration en état découplé étaient équivalentes entre les deux groupes expérimentaux. Afin d'étudier davantage ce dysfonctionnement de l'ATP synthase, nous avons mesuré l'activité enzymatique du complexe par spectrophotométrie. Nous avons observé que l'activité enzymatique de l'ATP synthase était réduite de 85 % dans les homogénats de mitochondries hépatiques H-*Lrpprc*^{-/-}, et que cette activité résiduelle était complètement insensible à l'inhibition par l'oligomycine (Figure 19, p. 67). De façon intéressante, un groupe de recherche travaillant sur un modèle murin comportant une ablation de *Lrpprc* au niveau cardiaque a obtenu des résultats similaires au

niveau de l'ATP synthase et propose un mécanisme qui pourrait s'appliquer à nos résultats. De fait, ils ont aussi observé une diminution de la respiration mitochondriale en condition phosphorylante sans atteinte en état découplé, ainsi qu'une insensibilité du complexe à l'inhibition par l'oligomycine. Ces résultats les ont menés à valider l'intégrité du complexe à l'aide d'électrophorèses non dénaturantes. Ils ont alors remarqué qu'il y avait une perte de l'oligomérisation de l'ATP synthase accompagnée de complexes sous assemblés présentant une résistance à l'oligomycine. Ensuite, ils ont analysé l'abondance des différentes sous unités composant l'ATP synthase et ont constaté que les sous-complexes étaient pauvres en OSCP, la sous-unité sensible à l'oligomycine. Dans notre modèle H-*Lrpprc*^{-/-}, il est donc possible que l'absence de LRPPRC induise aussi un défaut d'assemblage de l'ATP synthase et la formation de sous-complexes contenant peu d'OSCP, conférant la résistance à l'inhibition par l'oligomycine que nous observons. D'ailleurs, nous avons obtenu des résultats préliminaires d'électrophorèse qui vont dans ce sens, mais nous devons compléter les expériences pour confirmer ce défaut d'assemblage.

D'autre part, il a récemment été démontré que les *cristae* sont formés par l'alignement de plusieurs dimères d'ATP synthase le long des courbes de la membrane. Une perte de l'organisation des dimères d'ATP synthase induit des changements sévères dans la morphologie mitochondriale, notamment une perte de la forme normale des *cristae*. Nos résultats suggèrent un défaut d'assemblage du complexe, qui pourrait aussi expliquer la perte de la structure normale des *cristae* que nous avons observées en microscopie électronique (Figure 17, p. 64).

À première vue, le dysfonctionnement de l'ATP synthase que nous observons est exclusif à notre modèle H-*Lrpprc*^{-/-} puisque ce complexe semble intact chez les patients LSFC [61, 64]. Par contre, il a été démontré dans des cultures cellulaires de fibroblastes humains que l'atteinte des complexes de la chaîne respiratoire est plus importante et devient globale lorsque les taux de LRPPRC sont diminués de plus de 90 % à l'aide d'ARN interférents [61, 63]. Il est donc possible que l'ablation de *LRPPRC* dans notre modèle murin ait un impact à plus grande échelle que chez les patients, affectant d'autres complexes respiratoires, notamment l'ATP synthase.

En bref, notre modèle murin, déficient en LRPPRC au niveau hépatique, comprend une atteinte de l'ATP synthase qui lui est propre puisqu'elle n'a pas été observée chez les patients LSFC. Cette atteinte dans le groupe H-*Lrpprc*^{-/-} implique une baisse de la respiration en stade 3, une perte de l'activité enzymatique et une activité résiduelle insensible à l'inhibition par l'oligomycine ainsi qu'une perte de la morphologie normale des *cris*tae. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par un groupe travaillant avec un modèle comportant une ablation de LRPPRC au niveau cardiaque et nous devons compléter les expériences d'électrophorèse pour confirmer un potentiel défaut d'assemblage de l'ATP synthase.

IV. Altération de la respiration mitochondriale supportée par le palmitoyl-CoA

Nos études de respiration mitochondriale nous ont également permis d'étudier spécifiquement la capacité à oxyder les acides gras à longue chaîne, une analyse qui semblait pertinente compte tenu de la stéatose microvésiculaire observée en histologie. Nos résultats ont montré que la respiration en stade 3 supportée par le palmitoyl-CoA était 50 % moindre dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} comparativement aux mitochondries saines (Figure 25, p. 74). Bien que cette différence puisse en théorie être attribuable aux impacts négatifs de l'inactivation de *LRPPRC* sur l'ATP synthase ou dans une moindre mesure sur le complexe IV, nos résultats ne supportent pas une telle hypothèse. En effet, les valeurs absolues de respiration en stade 3 atteintes en présence de substrats autres que le palmitoyl-CoA (c.-à-d. glutamate, malate, succinate) sont beaucoup plus élevées que celle qu'il est possible d'obtenir en présence du palmitoyl-CoA, témoignant du fait que l'entrée des acides gras dans les mitochondries et/ou leur β -oxydation sont les étapes qui contrôlent la respiration en présence de substrats lipidiques. De ce fait, la différence observée entre les souris contrôles et H-*Lrpprc*^{-/-} suggèrent que la déficience en LRPPRC induit un déficit spécifique à ce niveau, un phénomène qui n'a pas été rapporté précédemment.

Bien que nous n'ayons pas poussé plus loin l'investigation des mécanismes sous-jacents, une étude récente a démontré que cela pourrait être causé par une perturbation de la signalisation dépendante de PGC1 α , dont le rôle dans l'adaptation bioénergétique au jeûne est important [86]. En effet, le jeûne stimule l'expression du PGC1 α dans le foie sain [86]. Ce coactivateur transcriptionnel, via des interactions avec certains facteurs de transcription tels que FOXO1 et HNF-4 α , contribue à l'activation de plusieurs gènes mitochondriaux ainsi qu'à la régulation à la hausse des gènes de la PEPCK et de la glucose 6-phosphatase, deux enzymes clés de la néoglucogenèse [48, 86]. En parallèle, l'activation de PGC1 α stimule également l'expression de PPAR γ , un facteur de transcription nécessaire à l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras requise pour supporter la transition vers un métabolisme néoglucogénique. Or, il a récemment été démontré que LRPPRC avait la capacité de former un holo-complexe avec PGC1 α permettant ainsi de réguler sa fonction [48]. Dans cette étude une diminution de l'expression de LRPPRC dans des hépatocytes primaires par des ARN-interférents induisait une baisse de l'expression de PGC-1 α induite par le jeûne [48]. Dans notre modèle H-*Lrpprc*^{-/-}, il est donc possible que le déficit d'oxydation des acides gras soit causé au moins en partie par une baisse de l'expression de PGC-1 α et un dysfonctionnement de l'holocomplexe LRPPRC/PGC-1 α [48]. Ceci aurait notamment comme effet de promouvoir la stéatose hépatique telle qu'observée dans nos expériences.

Somme toute, le modèle H-*Lrpprc*^{-/-} est un modèle utile pour mieux comprendre le rôle de LRPPRC au niveau des diverses facettes de la biologie mitochondriales, mais qui aura des limites pour l'étude du LSFC puisque l'atteinte n'est pas exclusive à COX et la régénérescence hépatique ainsi que la perte du système Cre/LoxP vont limiter l'usage du modèle pour des protocoles à long terme.

Conclusion et perspectives

Nous avons amorcé la caractérisation de la souris H-*Lrpprc*^{-/-}, le premier modèle murin développé afin de mieux comprendre le rôle de la protéine LRPPRC dans la pathogenèse du LSFC. Nous avons établi le phénotype général de l'animal ainsi que le profil histopathologique du foie, qui révèle plusieurs anomalies correspondant aux lésions typiques des hépatopathies mitochondriales. Nous avons débuté l'étude des fonctions mitochondriales de notre modèle murin en mesurant l'activité enzymatique des complexes respiratoires et la respiration mitochondriale. Les résultats obtenus confirment le défaut de COX précédemment observé [51, 53, 56, 61], mais révèlent aussi une potentielle altération de la β -oxydation ainsi qu'une déficience de l'ATP synthase qui n'avaient pas été rapportées chez les patients LSFC.

Les résultats que nous avons obtenus ne constituent qu'une partie de la caractérisation du nouveau modèle murin H-*Lrpprc*^{-/-}. En effet, nous devons compléter les mesures des différentes fonctions mitochondriales, notamment au niveau de la capacité de rétention calcique, de la production d'espèces réactives de l'oxygène et du potentiel de membrane. Nous pensons obtenir des résultats semblables à ceux obtenus précédemment au niveau des fibroblastes humains issus de biopsies de peau de patients LSFC, soit : 1) une diminution de la capacité de rétention calcique; 2) une production de ROS égale ou supérieure et 3) un potentiel de membrane inférieur pour le groupe H-*Lrpprc*^{-/-} [51].

D'autre part, nous aimerions aussi approfondir certains résultats que nous avons obtenus. Particulièrement, ceux au niveau de l'atteinte de l'ATP synthase qui sont particuliers et qui semblent être exclusifs à notre modèle murin H-*Lrpprc*^{-/-}, puisqu'ils n'ont pas été rapportés à ce jour chez les patients LSFC. De façon intéressante, des résultats similaires ont été obtenus chez un modèle murin comportant une ablation de LRPPRC au niveau cardiaque [69]. Ils ont démontré, par des électrophorèses et des *in-gel activity* spécifiques au complexe, que la dysfonction de l'ATP synthase, en absence de LRPPRC, était due à un défaut d'assemblage du complexe et que la sous-unité OSCP était présente en quantité moindre dans les sous-

complexes du modèle murin [69]. Puisque nos résultats sont similaires et que nos deux modèles expérimentaux impliquent une ablation de LRPPRC, nous avons débuté des expériences d'électrophorèse pour valider l'intégrité de l'ATP synthase chez la souris H-*Lrpprc*^{-/-}. Nous aimerions compléter les séries d'électrophorèses et les *in-gel activity* ainsi que mesurer l'abondance d'OSCP dans les complexes sous-assemblés pour valider si la dysfonction de l'ATP synthase que nous observons est aussi due à un défaut d'assemblage dans notre modèle murin H-*Lrpprc*^{-/-}. Par ailleurs, comme les dimères d'ATP synthase semblent constituer la structure la plus plausible du pore de perméabilité transitionnelle (PTP), un pore notamment impliqué dans la régulation des échanges ioniques mitochondriaux et de la mort cellulaire, nous allons certainement procéder à une analyse de ses propriétés régulatrices.

De plus, nous aimerions explorer les mécanismes sous-jacents pouvant potentiellement expliquer l'altération de la respiration mitochondriale supportée par le palmitoyl-CoA chez la souris H-*Lrpprc*^{-/-}. Puisque la respiration en présence de substrats lipidiques est entre autres contrôlée par l'entrée des acides gras dans la mitochondrie, nous débuterons par mesurer l'abondance des transférases CPTI-CPTII dans les préparations de mitochondries hépatiques par immunobuvardage de type Western Blot. Nous pourrons ainsi valider si l'importation du palmitoyl-CoA dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-} est l'élément limitant de la respiration. D'un autre côté, si les systèmes d'importation sont intacts, la respiration supportée par le palmitoyl-CoA pourrait donc être limitée par une altération de la β -oxydation dans les mitochondries H-*Lrpprc*^{-/-}. Puisqu'il a été récemment démontré que LRPPRC formait un holocomplexe avec PGC1 α , qui est impliqué dans la régulation de la β -oxydation et de la néoglucogenèse, nous mesurerons l'expression génétique de PGC1 α ainsi que du facteur de transcription PPAR γ et des deux enzymes clés PEPCCK et G6P afin de valider cette possibilité.

De façon plus globale, nous poursuivrons l'étude du LSFC avec l'arrivée prochaine de la souris portant un *knockin* ubiquitaire pour la mutation A354V, qui nous permettra d'évaluer l'impact de la mutation dans les différents organes. Nous amorcerons la caractérisation de ce nouveau modèle murin en établissant le phénotype mitochondrial et nous pourrons mesurer l'impact des stress inflammatoire et nutritionnel, qui sont considérés comme des éléments

déclencheurs des crises d'acidoses fulgurantes constituant la principale cause de mortalité chez les enfants souffrant du LSFC [55].

Un second modèle murin, qui sera sous peu disponible, est la souris chimère hématopoïétique portant la mutation A354V exclusivement dans ses cellules immunitaires et elle nous permettra d'évaluer l'intégrité de la fonction immunitaire en présence de la mutation A354V. Nous savons que les patients LSFC sont sensibles aux stress environnementaux, dont le stress inflammatoire [55], et il est maintenant connu que la mitochondrie est impliquée dans la réponse immunitaire normale [87]. Les changements dans les fonctions innées et adaptatives des lymphocytes et macrophages sont dépendants de la reprogrammation métabolique par la mitochondrie [87]. De plus, des expériences préliminaires réalisées par le consortium de l'acidose lactique sur des fibroblastes humains et des échantillons sanguins provenant des patients LSFC ont révélé que les dysfonctions mitochondriales induites par le défaut de LRPPRC vont au delà du défaut de l'oxydation phosphorylante et induisent un phénotype métabolique de type *Warburg* (observations non publiées). Ce changement métabolique, qui favorise la glycolyse anaérobie plutôt que la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie malgré la présence d'oxygène, aura sans doute des conséquences sur l'homéostasie cellulaire et le système immunitaire en favorisant un phénotype de type pro-inflammatoire [88]. D'ailleurs, des évidences indiquent que les patients souffrant de maladies mitochondriales auront une atteinte des fonctions immunitaires [89], ce qui nous amène à penser que les cellules immunitaires des patients LSFC auront un profil mitochondrial similaire, ou plus sévère, à celui qui a été précédemment caractérisé dans les fibroblastes humains. Nous pourrons alors valider globalement cette hypothèse à l'aide de la souris chimère hématopoïétique A354V, mais nous pourrons aussi valider spécifiquement la réponse individuelle des monocytes et des lymphocytes humains en présence de différents taux de LRPPRC (faible abondance ou sauvage) à l'aide de cultures cellulaires.

Bibliographie

1. Wallace, D.C., *Mitochondrial Diseases in Man and Mouse*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1482-1488.
2. Thornton, B., et al., *Mitochondrial disease: clinical aspects, molecular mechanisms, translational science, and clinical frontiers*. J Child Neurol, 2014. **29**(9): p. 1179-207.
3. Andreu, A.L. and S. DiMauro, *Current classification of mitochondrial disorders*. J Neurol, 2003. **250**(12): p. 1403-6.
4. Nunnari, J. and A. Suomalainen, *Mitochondria: in sickness and in health*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1145-59.
5. Lane, N. and W. Martin, *The energetics of genome complexity*. Nature, 2010. **467**(7318): p. 929-34.
6. Frey, T.G.M., Carmen A. *The internal structure of mitochondria*. Trends in Biochemical Sciences, 2000. **25**(7): p. 319-324.
7. Vafai, S.B. and V.K. Mootha, *Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 374-83.
8. Horvath, S.E. and G. Daum, *Lipids of mitochondria*. Prog Lipid Res, 2013. **52**(4): p. 590-614.
9. Reginald H. Garret, C.M.G., *Biochemistry*. 4 ed. 2010: Mary Finch.
10. Walther, D.M. and D. Rapaport, *Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(1): p. 42-51.
11. Luevano-Martinez, L.A., et al., *Cardiolipin is a key determinant for mtDNA stability and segregation during mitochondrial stress*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1847**(6-7): p. 587-98.
12. Mannella, C.A., *Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(5-6): p. 542-8.
13. Koopman, W.J.W., Peter H.G.M.; Smeitink, Jan A.M., *Monogenic Mitochondrial Disorders*. The New England Journal of Medicine, 2012(366): p. 1132-1141.
14. Taarnman, J.-W., *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. Biochimica et Biophysica Acta, 1998. **1410**(2): p. 103-123.
15. DiMauro, S.H., Michio.; Naini, Ali B.; Tanji, Kurenai.; Schon, Eric A.; Nagy, Peter L., *The Diagnosis of Mitochondrial Diseases*, C.U.M. Center, Editor.
16. technologies, I.D. *Mitochondrial DNA (mtDNA)*. 2005-2011.
17. Larsson, N.G.C., D. A., *Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders*. Annual Review of Genetics, 1995. **29**: p. 151-178.
18. Chinnery, P.F., *Mitochondrial Disorders Overview*, in *GeneReviews*, E.-i.-c. Roberta A Pagon, Margaret P Adam, Holly H Ardinger, Stephanie E Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D Bird, Chin-To Fong, Heather C Mefford, Richard JH Smith, and Karen Stephens, Editor. 2000: Seattle (WA); University of Washington, Seattle.
19. Kuznetsov, A.V. and R. Margreiter, *Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(4): p. 1911-29.
20. Wallace, D.C., *Diseases of the mitochondrial DNA*. Annual Review of Biochemistry, 1992. **61**: p. 1175-1212.

21. Salway, J.G., *Metabolism at a Glance*. 2004: Balckwell Publishing.
22. Acin-Perez, R. and J.A. Enriquez, *The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1837**(4): p. 444-50.
23. Vartak, R., C.A. Porras, and Y. Bai, *Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly*. *Protein Cell*, 2013. **4**(8): p. 582-90.
24. Richter, T., et al., *Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group*. *Value Health*, 2015. **18**(6): p. 906-14.
25. NIH, *Rare Diseases Act of 2002*, in 107-280, NIH, Editor. 2002.
26. Institute of Medicine (US) Committee on Accelerating Rare Diseases Research and Orphan Product Development; Field MJ, B.T., editors. *Rare Diseases and Orphan Products: Accelerating Research and Development*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2010. 2, Profile of Rare Diseases. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56184/>.
27. Puiu, M.D., D., *Rare diseases, from European resolutions and recommendations to actual measures and strategies*. *Maedica- a Journal of Clinical Medicine*, 2010. **5**(2): p. 128-131.
28. NORD. *NORD Physician Guides*. 2015; Available from: <http://nordphysicianguides.org>.
29. Institutes, R.G. *Get the Facts on Rare Diseases*. 2015; Available from: <http://www.raregenomics.org/rare-disease-facts/>.
30. INESSS. *Quatre maladies récessives du Saguenay-Lac-Saint-Jean - recherche de mutations*. 2014.
31. DiMauro, S.S., E. A., *Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases*. *The New England Journal of Medicine*, 2003. **26**(348): p. 2656-2668.
32. Marusich, M.F.R., Brian H.; Taanman, Jan-Willem.; Jin Kim, Soo.; and R.S. Schillace, Jordan L.; Capaldi, Roderick A. , *Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997. **1362**(2-3): p. 145-159.
33. Debray, F.G.L., M.; Mitchell, G. A., *Disorders of mitochondrial function*. *current opinion in pediatry*, 2008. **4**(20): p. 471-482.
34. Rahman, S., *Emerging aspects of treatment in mitochondrial disorders*. *J Inherit Metab Dis*, 2015. **38**(4): p. 641-53.
35. DiMauro, S. and M. Hirano, *Pathogenesis and treatment of mitochondrial disorders*. *Adv Exp Med Biol*, 2009. **652**: p. 139-70.
36. Shoubridge, E.A., *Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation*. *Human Molecular Genetics*, 2001. **20**(10): p. 2277-2284.
37. DiMauro, S., *Mitochondrial diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1658**(1-2): p. 80-8.
38. Dimauro, S., *A history of mitochondrial diseases*. *J Inherit Metab Dis*, 2011. **34**(2): p. 261-76.
39. Moraes, C.T.S., S.; Tritschler, H. J.; Aprille, J. R.; Andreetta, F.; Bonilla, E.; Schon, E. A.; DiMauro, S., *mtDNA Depletion with Variable Tissue Expression: A Novel Genetic Abnormality in Mitochondrial Diseases*. *Am J Hum Genet*, 1991. **3**(48): p. 492-501.

40. Lake, N.J.B., M. J.; Isohanni, P.; Paetau, A., *Leigh Syndrome: Neuropathology and Pathogenesis*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2015. **6**(74): p. 482-492.
41. Leigh, D., *Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1951. **3**(14): p. 216-221.
42. DiMauro, S.L., A.; Nakase, H.; Mita, S.; Fabrizi, G. M.; Tritschler, H.; Bonilla, E.; Miranda, A. F.; DeVivo D. C.; Schon, E. A., *Cytochrome c Oxidase Deficiency*. Pediatrics Research, 1990. **28**(5): p. 536-541.
43. Baertling, F., et al., *A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014. **85**(3): p. 257-65.
44. Hommes, F.A.P., H. A.; Reerink, J. D., *Leigh's Encephalomyelopathy: an Inborn Error of Gluconeogenesis*. Archives of Disease in Childhood, 1968(230): p. 423-426.
45. Debray, F.G., et al., *Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases*. Pediatrics, 2007. **119**(4): p. 722-33.
46. DiMauro, S., K. Tanji, and E.A. Schon, *The many clinical faces of cytochrome c oxidase deficiency*. Adv Exp Med Biol, 2012. **748**: p. 341-57.
47. Tetreault, M., et al., *Whole-exome sequencing identifies novel ECHS1 mutations in Leigh syndrome*. Hum Genet, 2015. **134**(9): p. 981-91.
48. Cooper, M.P., et al., *Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 2996-3009.
49. Yao, J.S., E. A., *Expression and functional analysis of SURF1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(13): p. 2541-2549.
50. Laberge, A.M., et al., *Population history and its impact on medical genetics in Quebec*. Clin Genet, 2005. **68**(4): p. 287-301.
51. Burelle, Y., et al., *Mitochondrial vulnerability and increased susceptibility to nutrient-induced cytotoxicity in fibroblasts from leigh syndrome French canadian patients*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120767.
52. Lee, N., et al., *A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(2): p. 397-409.
53. Morin, C.M., G.; Larochelle, J.; Lambert, M.; Ogier, H.; Robinson, B. H.; De Braekeleer, M., *Clinical, Metabolic, and Genetic Aspects of Cytochrome C Oxidase Deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean*. Am J Hum Genet, 1993. **2**(53): p. 488-496.
54. Lee, N.D., M. J.; Delmonte, T.; Lander, E. S.; Xu, F.; Hudson, T. J.; Mitchell, G. A.; Morin, C. C.; Robinson, B. H., *A Genomewide Linkage-Disequilibrium Scan Localizes the Saguenay– Lac-Saint-Jean Cytochrome Oxidase Deficiency to 2p16*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(2): p. 397-409.
55. Debray, F.G., et al., *LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency*. J Med Genet, 2011. **48**(3): p. 183-9.
56. Merante, F.P.-B., R.; MacKay, N.; Mitchell, G.; Lambert, M.; Morin, C.; De Braekeleer, M.; Laframboise, R.; Gagné, R.; Robinson, B. H., *A Biochemically Distinct Form of Cytochrome Oxidase (COX) Deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean Region of Quebec*. Am J Hum Genet, 1993. **2**(53): p. 481-487.

57. Legault, J.L., P. L.; Côté, I.; Bouchard, L.; Pichette, A.; Robinson, B. H.; Morin, C., *Low-Concentration Methylene Blue Maintains Energy Production and Strongly Improves Survival of Leigh Syndrome French Canadian Skin Fibroblasts*. J pharm pharm sci, 2011. **3**(14): p. 438-449.
58. Morin, C.D., J.; Robinson, B. H.; Lacroix, J.; Michaud, J.; De Braekeleer, M.; Geoffroy, G.; Lortie, A.; Blanchette, C.; Lambert, M. A.; Mitchell, G. A., *Stroke-Like Episodes in Autosomal Recessive Cytochrome Oxidase Deficiency*. Annals of Neurology, 1999. **3**(45): p. 389-392.
59. Mootha, V.K., et al., *Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(2): p. 605-10.
60. Lightowlers, R.N. and Z.M. Chrzanowska-Lightowlers, *Human pentatricopeptide proteins: only a few and what do they do?* RNA Biol, 2013. **10**(9): p. 1433-8.
61. Sasarman, F., et al., *Tissue-specific responses to the LRPPRC founder mutation in French Canadian Leigh Syndrome*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(2): p. 480-91.
62. Lagouge, M., et al., *SLIRP Regulates the Rate of Mitochondrial Protein Synthesis and Protects LRPPRC from Degradation*. PLoS Genet, 2015. **11**(8): p. e1005423.
63. Sasarman, F.B.-G., C.; Antonicka, H.; Wai, T.; Shoubridge, E. A.; LSFC Consortium., *LRPPRC and SLIRP Interact in a Ribonucleoprotein Complex That Regulates Posttranscriptional Gene Expression in Mitochondria*. Molecular Biology of the Cell, 2010. **21**(8): p. 1315-1323.
64. Xu, F.M., C.; Mitchel, G.; Ackerley, C.; Robinson, B. H., *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, 2004(382): p. 331-336.
65. Liu, L., et al., *LRP130 protein remodels mitochondria and stimulates fatty acid oxidation*. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41253-64.
66. Gohil, V.M., et al., *Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression*. J Biol Chem, 2010. **285**(18): p. 13742-7.
67. Akie, T.E., et al., *OXPPOS-Mediated Induction of NAD⁺ Promotes Complete Oxidation of Fatty Acids and Interdicts Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125617.
68. Liu, L., et al., *Nutrient sensing by the mitochondrial transcription machinery dictates oxidative phosphorylation*. J Clin Invest, 2014. **124**(2): p. 768-84.
69. Mourier, A., et al., *Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(10): p. 2580-92.
70. Ruzzenente, B., et al., *LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs*. EMBO J, 2012. **31**(2): p. 443-56.
71. Xu, F., et al., *LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model*. Biochem J, 2012. **441**(1): p. 275-83.
72. Kaartinen, V. and A. Nagy, *Removal of the floxed neo gene from a conditional knockout allele by the adenoviral Cre recombinase in vivo*. Genesis, 2001. **31**(3): p. 126-9.
73. Chinnery, P.F. and S. DiMauro, *Mitochondrial hepatopathies*. J Hepatol, 2005. **43**(2): p. 207-9.

74. Wheeler, P.R., *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheeler*. 2008. 437.
75. Cano, N., *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. 2007, Paris: Springer.
76. Scheving, L.A., & Russell, W. E. , β -Catenin in the Liver: An Integrator of Proliferation and Metabolism? *Gastroenterology*, 2006. **131**(5): p. 1641-1643.
77. Lee, W.S. and R.J. Sokol, *Mitochondrial hepatopathies: advances in genetics and pathogenesis*. *Hepatology*, 2007. **45**(6): p. 1555-65.
78. Valnot, I.O., Sandrine.; Gigarel, Nadine.; Mehaye, Blandine.; Amiel, Jeanne.; Cormier-Daire, Valérie.; Munnich, Arnold.; Bonnefont, Jean-Paul.; Rustin, Pierre.; Rötig, Agnès., *Mutations of the SCO1 Gene in Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Deficiency with Neonatal-Onset Hepatic Failure and Encephalopathy*. *Am J Hum Genet*, 2000. **67**(5): p. 1104-1109.
79. Molleston, J.P., et al., *Evaluation of the child with suspected mitochondrial liver disease*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013. **57**(3): p. 269-76.
80. Elferink, R., *Cholestasis*. *Gut*, 2003. **52**(2): p. 42-48.
81. Tsujimoto, Y., *Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes*. *Cell Death and Differentiation*, 1997. **4**: p. 429-434.
82. Picard, M., et al., *Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013. **304**(6): p. R393-406.
83. Louet, J.F., et al., *The coactivator SRC-1 is an essential coordinator of hepatic glucose production*. *Cell Metab*, 2010. **12**(6): p. 606-18.
84. Diaz, F., et al., *Pathophysiology and fate of hepatocytes in a mouse model of mitochondrial hepatopathies*. *Gut*, 2008. **57**(2): p. 232-42.
85. Pecina, P., et al., *Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2003. **1639**(1): p. 53-63.
86. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. *Adv Physiol Educ*, 2006. **30**(4): p. 145-51.
87. Galluzzi, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Mitochondria: master regulators of danger signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(12): p. 780-8.
88. Galvan-Pena, S. and L.A. O'Neill, *Metabolic reprogramming in macrophage polarization*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 420.
89. Walker, M.A., et al., *Powering the immune system: mitochondria in immune function and deficiency*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 164309.