

Université de Montréal

**Études des mécanismes d'adaptation du métabolisme énergétique
dans le syndrome de Leigh de type canadien français :
Vers l'identification des cibles thérapeutiques**

Par

Yvette MUKANEZA

Département de nutrition

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en nutrition

Octobre, 2017

© Yvette Mukaneza, 2017

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Études des mécanismes d'adaptation du métabolisme énergétique dans le syndrome de
Leigh de type canadien français :
Vers l'identification des cibles thérapeutiques**

Présentée par :

Yvette MUKANEZA

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guylaine Ferland, président-rapporteur

Dr Lise Coderre, directrice de recherche

Dr Christine Des Rosiers, co-directrice de recherche

Dr Valérie Marcil, membre du jury

Dr Gilles Gouspillou, examinateur externe

Dr Rose Christopher, représentant du doyen de la FESP

Résumé

Le syndrome de Leigh de type canadien français (LSFC) est une maladie mitochondriale infantile causée par des mutations dans le gène *LRPPRC* entraînant une diminution tissu-spécifique de la cytochrome c oxydase (COX) et des crises d'acidose lactique fatales qui surviennent lors d'un stress énergétique. Malheureusement, les facteurs sous-jacents à l'apparition de ces crises demeurent inconnus. Ainsi, l'objectif principal de cette étude est de mieux comprendre la physiopathologie du LSFC en investiguant les mécanismes d'adaptation du métabolisme énergétique. Nous avons précédemment démontré que la déficience en COX dans les fibroblastes de patients LSFC était, d'une part, associée à une altération de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) alors que ces cellules exhibent des taux d'ATP inchangés. D'autre part, ces cellules LSFC sont plus susceptibles à la mort lorsqu'incubées avec une combinaison de 10 mM de lactate et de 1 mM de palmitate (LP), un modèle de surcharge en nutriments mimant les crises chez les patients. Nous avons alors émis l'hypothèse que, premièrement, les cellules LSFC arboreraient une reprogrammation métabolique sous le contrôle du complexe 1 de la « mammalian Target Of Rapamycin » ou mTORC1, permettant une synthèse extra mitochondriale d'ATP. Deuxièmement, un défaut d'activation du senseur énergétique, la protéine kinase activée par l'AMP ou AMPK, contribuerait à la plus grande susceptibilité des cellules LSFC au LP.

Nos résultats montrent qu'en conditions basales la voie Akt/mTORC1/p70-S6K est surexprimée dans les cellules LSFC par rapport aux cellules témoins. Ceci est associé à une augmentation de l'expression du facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1 α) et de sa cible la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDHK1), un inhibiteur de l'oxydation mitochondriale des

glucides via la PDH1 qui est d'ailleurs inhibée dans les cellules LSFC. En accord avec ces observations, nos résultats métabolomiques montrent que la contribution du glucose à la formation du pyruvate, de l'alanine et du lactate est élevée dans les cellules LSFC comparativement aux cellules témoins. De manière inattendue, l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine n'a aucun effet significatif sur l'expression de HIF-1 α et de PDHK1, ni sur les taux d'ATP dans les cellules LSFC. Par contre, la rapamycine augmente l'inhibition de PDH1 et réduit l'expression de LRPPRC et de COX dans ces cellules LSFC. Ces données soutiennent pour la première fois une possible régulation de LRPPRC par mTORC1.

Nous avons également étudié la voie AMPK en réponse à différents stress. L'AMPK est activable en réponse au 2,4-dinitrophénol aussi bien dans les cellules témoins que les cellules LSFC. Le stress nutritionnel LP ne diminue pas les niveaux d'ATP; mais induit la phosphorylation de l'AMPK, la surexpression de SIRT1, COXIV et LRPPRC dans les cellules témoins. Un prétraitement au ZMP, un analogue de l'AMP et activateur de l'AMPK, augmente encore plus les effets observés avec le LP. Tous ces changements en réponse au LP sont abolis dans les cellules LSFC. De façon intéressante, le traitement de nos cellules avec le 2-bromopalmitate, un analogue non métabolisable du palmitate, n'induit pas la phosphorylation de l'AMPK même dans les cellules témoins. Ces résultats suggèrent que le métabolisme du palmitate est requis pour l'activation de l'AMPK et que celui-ci est altéré dans les cellules LSFC.

En conclusion, les cellules LSFC présentent une reprogrammation métabolique de type effet Warburg. mTORC1 ne joue pas de rôle clé dans le maintien de niveaux d'ATP, mais son activation est primordiale pour l'expression de LRPPRC et COX. Par ailleurs, les mécanismes

de défense via l'AMPK en réponse au stress, notamment nutritionnel, semblent altérés dans les cellules LSFC.

Mots-clés : LSFC, LRPPRC, COX, mTOR, rapamycine, AMPK, SIRT1, palmitate

Abstract

Leigh syndrome French-Canadian type (LSFC) is an infantile mitochondrial disease caused by mutations in the *LRPPRC* gene resulting in a tissue-specific decrease in cytochrome c oxidase (COX) and fatal lactic acidosis crises which occur during stressful situations. The pathophysiology underlying this disease and the factors that precipitate these crises remain unknown. Thus, the main objective of this study was to explore adaptive mechanisms of energy metabolism. Our group demonstrated that COX deficiency in patients' LSFC fibroblasts was associated with a reduction in oxidative phosphorylation (OXPHOS) capacity in the absence of any changes in ATP levels. On the other hand, we have demonstrated that LSFC cells showed premature cell death when treated with 10 mM lactate and 1 mM palmitate (LP), a model of nutrient overload. We hypothesized that LSFC cells may display metabolic reprogramming under the control of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), allowing for extra mitochondrial ATP synthesis. We also thought that alteration of the AMP activated protein kinase (AMPK) activity, an energy sensor, may contribute to the greater susceptibility of the LSFC cells to LP.

Our results show that the Akt/mTORC1/p70S6K pathway is upregulated in LSFC cells relative to controls. This is associated with an increase in the expression of hypoxia inducible factor (HIF-1 α) and its target pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK1) resulting in an increase in the phosphorylated and inhibitory form of PDH1, the gatekeeper of mitochondrial glucose oxidation. Consistent with this, glucose contribution to the formation of pyruvate, alanine and lactate is increased in LSFC cells compared to controls. Unexpectedly, inhibition of mTORC1 by rapamycin has no effect on the expression of HIF-1 α and PDHK1, nor on

ATP levels in LSFC cells. However, it increases PDH1 phosphorylation and reduces the expression of LRPPRC and COX in LSFC cells. This is the first time that LRPPRC regulation by mTORC1 is reported.

We have also studied the AMPK activation in response to various stresses. AMPK is activated in response to 2,4-dinitrophenol similarly both in control and LSFC cells. Treatment with LP, a nutritional stress, does not decrease ATP levels; but does induce phosphorylation of AMPK, and overexpression of SIRT1, COXIV and LRPPRC proteins in the control cells. Pretreatment with ZMP, an AMPK-specific activator, further increases the effects of LP. All these changes in response to LP are abolished in LSFC cells. Interestingly, treatment with 2-Bromopalmitate, a non-metabolizable analog of palmitate, does not induce the phosphorylation of AMPK in the control cells. These data suggest that palmitate metabolism is required for AMPK activation and this is prevented in LSFC cells.

In conclusion, LSFC cells exhibit a Warburg-like metabolic reprogramming. mTORC1 doesn't play a key role in maintaining ATP levels but its activation is required for LRPPRC and COX expression. Moreover, adaptive mechanisms in response to nutrient stress via AMPK, appear altered in the LSFC cells.

Keywords: LSFC, LRPPRC, COX, mTOR, rapamycin, AMPK, SIRT1, palmitate

Tables des matières

Résumé	iii
Abstract	vi
Tables des matières	viii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xx
Avant-propos	xxi
CHAPITRE I - INTRODUCTION	1
I.1- LA MITOCHONDRIE ET SES DÉSDORDRES	2
I.1.1- La mitochondrie : un générateur énergétique.....	4
I.1.1.1. Métabolisme intermédiaire.....	4
I.1.1.2. Phosphorylation oxydative	15
I.1.2- Les désordres mitochondriaux	20
I.1.2.1. Mutations génétiques.....	20
I.1.2.2. Altérations métaboliques	23
I.1.2.3. Prise en charge.....	26
I.1.3- Le Syndrome de Leigh de type canadien français.....	29
I.1.3.1. Caractéristiques	29
I.1.3.2. Mécanismes physiopathologiques	32
I.1.3.3. Prise en charge du LSFC	39
I.2- LES MÉCANISMES D'ADAPTATION DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE : RÉGULATION MOLÉCULAIRE	41
I.2.1- La protéine kinase activée par AMP : AMPK.....	43
I.2.1.1. Structure et régulation de l'AMPK.....	43
I.2.1.2. AMPK, un senseur énergétique	51

I.2.2- La « mammalian target of rapamycin » ou mTOR	56
I.2.2.1. Structure et régulation de mTOR.....	56
I.2.2.2. mTOR, un senseur énergétique	61
CHAPITRE II - QUESTIONS DE RECHERCHE, HYPOTHÈSES ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE	68
II.1- Questions de recherche et objectif	69
II.2- Hypothèses.....	71
II.3- Approche expérimentale	73
CHAPITRE III - RÉSULTATS.....	80
III.1- Rôle de mTOR dans le métabolisme énergétique	81
Premier manuscrit	81
III.2- Étude de la voie de l'AMPK en réponse au stress nutritionnel	114
Deuxième manuscrit	114
CHAPITRE IV - DISCUSSION	142
CHAPITRE V - CONCLUSION	167
BIBLIOGRAPHIE.....	i
ANNEXES	xxxix

Liste des tableaux

Tableau I.	Liste des mutations codant pour les composantes structurelles et les facteurs d'assemblage des complexes mitochondriaux.	22
Tableau II.	Paramètres biochimiques des patients LSFC.....	32

Liste des figures

Figure 1.	La structure de la mitochondrie.....	3
Figure 2.	Régulation du complexe de la pyruvate déshydrogénase par les nutriments et les cofacteurs.	6
Figure 3.	Le système carnitine : transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie.....	8
Figure 4.	La β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie.	10
Figure 5.	Le cycle de Krebs.	12
Figure 6.	Principales réactions anapérotiques mitochondriales.....	14
Figure 7.	La chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase.	16
Figure 8.	Structure de l'AMPK.	45
Figure 9.	Les rôles de l'AMPK dans la régulation du métabolisme énergétique.....	55
Figure 10.	Structure, régulation et rôles de mTOR dans l'organisme.	60
Figure 11.	Taux d'ATP produit par glycolyse versus phosphorylation oxydative.	62
Figure 12.	Schéma résumant les principales voies de régulation du métabolisme du glucose par mTOR abordées dans cette thèse.	64
Figure 13.	Schéma résumant les principales voies de régulation de la fonction mitochondriale par mTOR et abordées dans cette thèse.	66
Figure 14.	Schéma illustrant la première hypothèse.....	71
Figure 15.	Schéma illustrant la deuxième hypothèse.....	72
Figure 16.	Protéines impliquées dans la régulation de la glycolyse aérobie évaluées dans l'étude.....	75
Figure 17.	Activation de l'AMPK en réponse à différents types de stress.....	78
Figure 18.	Expression génique et protéique des régulateurs de la glycolyse	149
Figure 19.	Expression protéique des enzymes anapérotiques.....	153
Figure 20.	Expression génique de c-Myc en conditions basales.....	154
Figure 21.	Hypothèse de la régulation de LRPPRC par mTOR.....	157
Figure 22.	Reprogrammation métabolique des cellules LSFC.	158

Figure 23. Effet de l'inhibition de l'activité de l'AMPK sur la survie cellulaire en présence de palmitate/lactate	160
Figure 24. Mécanismes potentiels d'activation de l'AMPK par le palmitate	165

Liste des abréviations

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNn : ADN nucléaire

ADP : adénosine diphosphate

AICAR : 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide

Akt : protéine kinase B

AMPK : protéine kinase activée par l'AMP

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP: adénosine triphosphate

ATP6: ATP synthétase 6

ATP8: ATP synthétase 8

BCS1 : «Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Synthesis»

BSA : albumine de sérum bovin

CACT: carnitine-acyl-carnitine translocase

CaMKK: «Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase Kinase»

CBM : domaine de liaison aux glucides

CBS : cystathionine- β - synthase

CPT : carnitine-palmitoyl-transférase

CoQ : coenzyme Q

CoASH/HSCoA : coenzyme A

COX : cytochrome c oxydase

COXIV: sous-unité IV de COX

CS: citrate synthase

Cyt: cytochrome

DCA: dichloroacétate

DMEM: «Dulbecco's Modified Eagle's Medium»

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNP : 2,4-dinitrophénol

4EBP1 : protéine de liaison au facteur d'initiation 4E

eEF-2-kinase : protéine kinase du facteur d'élongation

eIF4E : facteur d'initiation de la traduction

ENTH: «Epsin N-Terminal Homology»

ETF : flavoprotéine de transfert d'électron

ETF-DH : déshydrogénase de transfert d'électron

FAD : flavine adénine dinucléotide

FADH₂: flavine adénine dinucléotide réduit

FAS : acides gras synthase

FBS : sérum fœtal bovin

FMN : flavine mononucléotide

FOX01 : «Forkhead Box Transcriptional Factor 01»

G6Pase : glucose-6-phosphate

GAP : glycéraldéhyde 3 phosphate

GCMAS : chromatographie de gaz couplée au spectromètre de masse

GDH : glutamate déshydrogénase

GLS : glutaminase

GLUT1 : transporteur du glucose 1

GLUT4 : transporteur du glucose 4

GPAT : glycérol-3-phosphate acyl-transférase

GTP: guanosine triphosphate

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HIF-1 α : « Hypoxia Inducible Factor »

HMG-CoR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase

HO \cdot : hydroxyl

α -KG: α ketoglutarate

LAMTOR1: late endosomal/lysosomal adaptor and mitogen-activated protein kinase and
mTOR activator 1

LHON : neuropathie optique héréditaire de Leber

LKB1 : protéine suppresseur de tumeurs

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

LSFC : syndrome de Leigh, de type canadien français

LDHA : lactate déshydrogénase

MAM: « mitochondrial-associated ER membrane »

ME : enzyme malique

MELAS : syndrome d'encéphalopathie mitochondriale avec acidose lactique et des
pseudoaccidents vasculaires cérébraux

MERRF: «Myoclonic epilepsy with ragged-red fibers »

MO25 : «Mouse protein 25- α »

MOMP : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale

MPC : « Mitochondrial Pyruvate Carrier»

MPE : pourcentage d'enrichissement molaire

mRNP: complexe ribonucléoprotéique nucléaire

mSin1: «mammalian Stress-activated MAP Kinase-interacting protein 1»

mTOR: «Mammalian Target Of Rapamycin»

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH,H⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

OAA: oxaloacetate

O₂⁻ : anion superoxyde

ONOO⁻ : anion peroxinitrite

P70 S6K: Ribosomal protein S6 kinase beta-1

PBS : tampon phosphate salin

PC : pyruvate carboxylase

pCO₂ : pression partielle du gaz carbonique

PDC : complexe de la pyruvate déshydrogénase

PDH1 : pyruvate déshydrogénase E1

PDHK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1

PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase

PFK2 : phosphofructokinase

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

PHD : «prolyl hydroxylase domain»

PK: pyruvate kinase

PP : phosphatases

PPR : motif répété de pentatricopeptide

POLRMT: ARN polymérase mitochondriale

PRAS40: «Prolin Rich Akt Substrate 40 KDa»

Protor 1/2 : «Protein observed with Rictor 1 and 2»

PTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale

RabGAP: «Rab GTPase-Activating Protein»

Raptor: «Regulatory-associated protein of mTOR»

Rheb : «Ras Homolog Enriched in Brain»

Rictor: «Rapamycin-insensitive companion of TOR»

ROS : espèces réactives oxygénées

SCO : «Cytochrome C Oxidase Assembly Protein»

SDH : succinate déshydrogénase

SDS : sodium dodécyl sulfate

SEC1 : «SECretory 1»

SERBP1c: «Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c»

SGK1: serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1

SIRT1: sirtuine 1

siRNA: «Small Interfering RNA»

SLIRP: «Stem- Loop Interacting RNA Binding Protein»

Ste20: «Sterile 20 Group Kinases»

STRAD: «Ste20-Related Adaptor Protein»

SURF1 : «Surfeit gene 1»

TCA : cycle acide tricarboxylique

TFAM : facteur de transcription mitochondrial

TSC1/TSC2 : «Tuberous Sclerosis Complex»

ULK1 : «Unc-51-Like Kinase 1»

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

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

« Je puis tout par celui qui me fortifie »

Philippiens 4 :13

Remerciements

Tout au long de ma vie étudiante, j'ai eu la chance d'être entourée par des personnes qui m'aiment, me protègent, me motivent et m'encouragent. Merci à Dieu pour tous ces privilèges.

Merci papa. Merci maman. Merci pour votre amour, votre soutien, et vos prières. J'ai eu un soutien indéniable de votre part depuis que j'ai décidé de faire un doctorat. Vous m'avez encouragé dans ma décision et motivé tout au long de ces 4 ans. Merci infiniment pour tous les sacrifices que vous avez fait enfin que je puisse avoir la meilleure éducation.

Merci à mes frères (Yves et Dave) et mes sœurs (Yvonne et Doris). Merci pour votre présence et votre soutien moral. Un merci spécial à toi ma Dodo, car au-delà d'une grande sœur, tu es ma meilleure amie; toujours là pour moi à tout moment.

Un grand merci à mes directrices Lise et Christine. 7 ans maintenant qu'on travaille ensemble. J'ai tout simplement grandi avec vous en tant que personne et en tant que scientifique. Chacune de vous a su influencer la femme que je suis devenue. Merci pour l'écoute, pour les conseils et pour tous vos encouragements.

Merci à chaque membre de mon labo : Bertrand, Annick, Caroline, Isabelle, Julie, Marie Ève, Matthieu et la dernière et non la moindre Sandra! Ça a été un plaisir de travailler avec vous tous.

Je tiens à remercier tous les organismes qui ont subventionné mes travaux. Je remercie également tous les membres du consortium d'acidose lactique pour leurs collaborations fructueuses. Plus particulièrement, je tiens à remercier l'association de l'acidose lactique pour tous leurs efforts et leur implication dans la recherche sur la maladie.

Enfin, merci à vous, membres du jury d'avoir bien voulu réviser ce travail.

Avant-propos

Le syndrome de Leigh est la maladie mitochondriale infantile la plus commune dans le monde. Sa variante canadienne, le syndrome de Leigh de type canadien français (LSFC), retrouvée principalement au Québec, a une prévalence d'une naissance sur 2000 et un taux de mortalité dépassant les 80%. Le LSFC a été décrit en 1980, mais il a fallu attendre plus de 20 ans avant qu'il n'y ait des avancées significatives sur cette maladie. Le gène muté responsable de ce syndrome fût découvert seulement en 2003. Grâce à une volonté étonnante des familles des patients, un consortium de recherche a été créé en 2007. Je suis membre de ce consortium depuis 2010. Celui-ci représente 28 chercheurs membres actifs issus de différentes disciplines. Notre principal objectif est de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du LSFC et éventuellement de développer des thérapies. Mon rôle au sein du consortium est d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Ce projet de recherche entre dans le cadre des recherches menées par ce consortium.

Le LSFC est une maladie rare dans le reste du monde et très peu étudiée. J'ai commencé mes recherches sur cette maladie au cours de ma maîtrise, ne disposant d'aucune information dans la littérature sur le métabolisme énergétique des cellules de patients atteints de LSFC. J'ai ainsi débuté mes travaux par une caractérisation de la voie de l'AMPK, voie régulatrice par excellence du métabolisme énergétique. Les données générées durant ma maîtrise ont servi de base pour l'élaboration de mon projet de doctorat présenté dans le présent manuscrit. Elles m'ont notamment orienté vers une deuxième voie régulatrice majeure, la voie mTOR. Pour ce projet de doctorat, les mécanismes physiopathologiques sont mis de l'avant.

Je voudrais souligner les limites en ce qui concerne le modèle expérimental disponible pour l'étude des maladies mitochondriales. D'une part, l'introduction de mutations mitochondriales dans un modèle murin demeure un défi majeur très coûteux; et d'autre part le phénotype résultant diffère parfois entre la souris et l'homme. Ainsi, le modèle murin knock-in porteur de la mutation est létal au niveau embryonnaire, de même que l'ablation totale du gène LRPPRC (Leucine-Rich PPR-motif Containing Protein) responsable du LSFC. Quant à la souris knock-out spécifique pour le foie, celle-ci présente un phénotype plus sévère que celui retrouvé chez l'humain. Les fibroblastes primaires des patients facilement accessibles et manipulables restent donc le modèle privilégié pour l'étude des mécanismes physiopathologiques. C'est ce modèle qui a été utilisé pour mon projet de recherche. Il est également communément utilisé dans la recherche sur les autres maladies mitochondriales.

Dans la présente thèse, vous trouverez une première partie, soit l'introduction, qui englobe deux grands chapitres. Dans le premier chapitre, je parle du fonctionnement et du rôle de la mitochondrie dans l'organisme. J'y aborde également les mécanismes et les caractéristiques de l'ensemble des maladies mitochondriales ainsi que leur prise en charge. Enfin, j'énumère dans ce chapitre les caractéristiques et les mécanismes physiopathologiques du LSFC. Parce qu'on dispose de peu d'informations sur le LSFC, j'ai choisi de présenter le métabolisme mitochondrial avant d'introduire le LSFC pour mieux le cerner en tant que maladie mitochondriale, du phénotype aux différents mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués. Le deuxième chapitre de l'introduction est une revue sur les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique. Dans ce chapitre, je présente deux grandes voies régulatrices de l'équilibre énergétique à savoir la voie AMPK et la voie mTOR. Ces deux voies sont des cibles thérapeutiques privilégiées dans les maladies mitochondriales.

Dans la deuxième partie de cette thèse, je présente mon projet de recherche. Les hypothèses, les objectifs et l'approche expérimentale sont formulés. Les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques.

Enfin, une troisième partie de cette thèse est consacrée à la discussion. Dans cette partie, j'apporte une intégration des résultats obtenus en me basant sur la documentation. J'y propose également des expériences à venir pour aller plus loin dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques du LSFC.

Dans l'ensemble, cette thèse résume les dernières avancées dans la recherche sur le LSFC. Mes travaux apportent, pour la première fois, un éclaircissement sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie du LSFC qui pourront servir de cibles pour la mise au point de thérapies.

CHAPITRE I - INTRODUCTION

I.1- LA MITOCHONDRIE ET SES DÉSORDRES

La mitochondrie est un organe présent en nombre variable dans presque toutes les cellules du corps humain. Elle est dite d'origine bactérienne, car elle dérive d'une endosymbiose entre les cellules procaryotes et eucaryotes, ce qui lui confère une anatomie distincte des autres organelles de l'organisme ([18](#), [261](#)). Structurellement, elle est composée d'une matrice et d'un espace intermembranaire délimités par deux membranes : une membrane externe uniforme et continue, et une membrane interne qui forme des crêtes (Figure 1, p. 3). Elle possède son propre génome, l'acide désoxyribonucléique mitochondrial (ADNmt) qui comprend 37 gènes dont deux codent pour des ARN ribosomiaux, 22 pour des ARN de transfert, et 13 pour des ARN messagers (ARNm) d'un sous-groupe de protéines de la chaîne respiratoire ([52](#), [221](#)). Ainsi, la majeure partie d'un millier de protéines présentes dans la mitochondrie est codée par l'ADN nucléaire (ADNn) puis transportée vers la mitochondrie ([32](#), [195](#)).

La mitochondrie participe à plusieurs fonctions cellulaires attribuées à sa morphologie dynamique. À travers des processus de fusion et de fission, de la biogenèse et de l'autophagie; la mitochondrie joue un rôle dans la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire, le stress oxydatif, la thermogenèse, l'homéostasie calcique et l'apoptose ([33](#), [260](#)). Néanmoins, le principal rôle de la mitochondrie est de synthétiser l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) ([18](#)). Dans cette introduction, je mettrai l'accent principalement sur le rôle de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique.

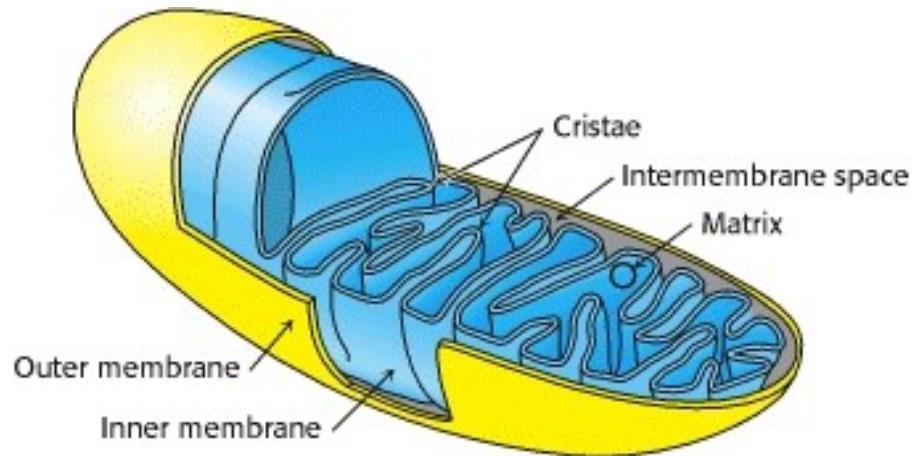


Figure 1. La structure de la mitochondrie.

Figure tirée de Biochemistry 5th Edition, Figure 18.3, 2002 ([17](#)).

I.1.1- La mitochondrie : un générateur énergétique

La mitochondrie est le siège des réactions du métabolisme intermédiaire et de la phosphorylation oxydative (18), des processus impliqués dans la production énergétique et décrits dans les sections ci-dessous.

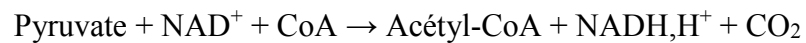
I.1.1.1. Métabolisme intermédiaire

Le métabolisme intermédiaire désigne l'ensemble de réactions anaboliques et cataboliques des principaux substrats énergétiques soient le glucose, les acides gras et les acides aminés. Je discuterai uniquement des principales réactions cataboliques ayant lieu dans la mitochondrie pour générer les substrats utilisés dans la synthèse d'ATP. Il s'agit notamment de la décarboxylation oxydative du pyruvate, de la β -oxydation des acides gras, et enfin du cycle de Krebs. Les deux premiers processus génèrent l'acétyl-CoA qui est ensuite oxydé dans le cycle de Krebs pour donner les coenzymes réduits, substrats de la phosphorylation oxydative (17).

a. La décarboxylation oxydative du pyruvate

Le pyruvate provient principalement de la dégradation du glucose via la glycolyse. Celle-ci a lieu dans le cytosol et permet la formation du pyruvate, de deux molécules d'ATP et de deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH, H^+). Durant ce processus, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate (G-6-P) par une hexokinase, puis en fructose 6 phosphate et enfin en fructose 1,6 biphosphate. Ce dernier est alors clivé pour former du dihydroxyacétone phosphate et du glycéraldéhyde 3 phosphate (GAP). Une série de réactions enzymatiques transforme ensuite le GAP en pyruvate. À cette étape, le pyruvate peut être dirigé vers la mitochondrie ou être converti en lactate et en alanine dans le cytosol (17).

En présence d'oxygène, le pyruvate entre dans la matrice mitochondriale via le transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC - Mitochondrial Pyruvate Carrier) et subit une décarboxylation oxydative. La décarboxylation oxydative est une réaction irréversible catalysée par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDC). Le PDC est composé de six sous-unités : trois enzymes : la pyruvate déshydrogénase E1 (PDH1), la dihydrolipoamide S-acétyltransférase E2, et la dihydrolipoyl déshydrogénase E3 ; deux protéines régulatrices : la PDH kinase (PDHK) et la PDH phosphatase (PDP) ; et une protéine de liaison au E3 (E3 Binding protein- E3BP) ([17](#), [199](#), [226](#)). La PDC convertit le pyruvate et le NAD^+ en acétyl-CoA, NADH, H^+ et CO_2 par la réaction d'oxydation et de réduction suivante :



La conversion du pyruvate en acétyl-CoA joue un rôle capital dans le métabolisme énergétique assurant un lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs. Par ce fait, le complexe PDC joue aussi un rôle central dans l'homéostasie énergétique et son activité est étroitement régulée par différents nutriments et cofacteurs, mais aussi par différentes enzymes (Figure 2, p. 6) ([199](#)). L'acétyl-CoA généré entre majoritairement dans le cycle de Krebs, mais peut aussi être engagé dans des voies anaboliques telle que la lipogenèse ([176](#)).

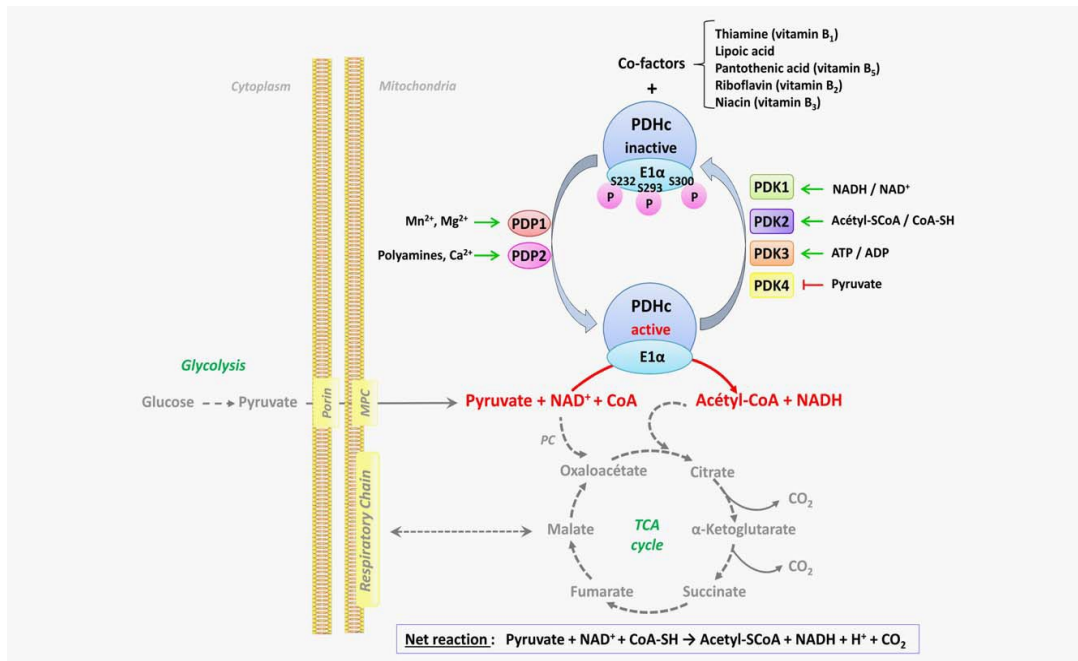


Figure 2. Régulation du complexe de la pyruvate déshydrogénase par les nutriments et les cofacteurs.

Figure tirée de Saunier et al. *Int J Cancer*. 2016 Feb 15;138(4):809-17 (226). PDHc : complexe pyruvate déshydrogénase; PDP : pyruvate déshydrogénase phosphatase; PDK : pyruvate déshydrogénase kinase; NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit; CoA : Coenzyme A; ATP : adénosine triphosphate; ADP : adénosine diphosphate; TCA : cycle tricarboxylique.

Dans certaines conditions, notamment anaérobiques ou de maladie mitochondriale, le pyruvate peut être transformé par des réactions réversibles en lactate ou en alanine chez les organismes supérieurs (17). Ainsi, le lactate et l’alanine peuvent-être une source non négligeable de pyruvate via respectivement, la lactate déshydrogénase (LDH) et l’alanine

aminotransférase (ALT). Du point de vue du bilan énergétique, l'oxydation mitochondriale du pyruvate crée 32 molécules d'ATP comparativement à la fermentation lactique qui produit seulement deux molécules d'ATP (17). Toutefois, il existe, chez l'homme, des conditions dites de « glycolyse aérobie » où malgré la présence d'oxygène, le pyruvate est transformé en lactate plutôt qu'en acétyl-CoA (143). Il s'agit notamment de conditions de prolifération cellulaire ou encore inflammatoire. Dans ces conditions, on observe une activation du flux glycolytique importante de telle façon que la fermentation lactique produit plus d'ATP que l'oxydation mitochondriale (73, 292).

b. La β -oxydation des acides gras libres

La β -oxydation des acides gras libres a lieu dans la matrice mitochondriale (17, 259). Cela nécessite préalablement une étape d'activation i.e. la liaison d'un CoA à l'acide gras pour former un acyl-CoA sous l'action de l'acyl-CoA synthétase. Les acides gras à chaînes moyenne et courte (nombre de carbones inférieurs à 14) traversent librement les membranes interne et externe de la mitochondrie, et leur activation a lieu directement dans la matrice par une acyl-CoA synthétase matricielle. Par contre, l'activation des acides gras à chaîne longue (nombre de carbone supérieur ou égal à 14) s'effectue dans la membrane externe de la mitochondrie. L'acyl-CoA à chaîne longue ne peut traverser librement la membrane interne, donc il est transporté dans la matrice par le système de carnitine illustré ici-bas par la Figure 3 (p.8). Au niveau de la membrane externe, la carnitine se lie à l'acyl-CoA pour former l'acyl-carnitine, une réaction catalysée par la carnitine-palmitoyl-transférase 1 (CPT1). L'acyl-carnitine libéré dans l'espace inter membranaire est pris en charge par l'acyl-carnitine translocase pour traverser la membrane interne. Dans la matrice, l'acyl-carnitine est

retransformé en acyl-CoA par une réaction réversible catalysée par la CPT 2 (17, 259). Lors des défauts de la β -oxydation, il y a accumulation d'acyl-carnitines, leur relâchement par la cellule et leur augmentation dans le plasma (3). Les acyl-carnitines servent ainsi de marqueur pour la fonction de la β -oxydation. Par ailleurs, une accumulation de l'acétyl-CoA par un défaut ou un blocage du cycle de Krebs ou une augmentation de la décarboxylation du pyruvate, peut favoriser l'acétylation de la carnitine dans la matrice par la carnitine acétyl transférase pour former l'acétylcarnitine (3). Ainsi, l'accumulation d'acétylcarnitines dans le plasma reflète une dysfonction mitochondriale.

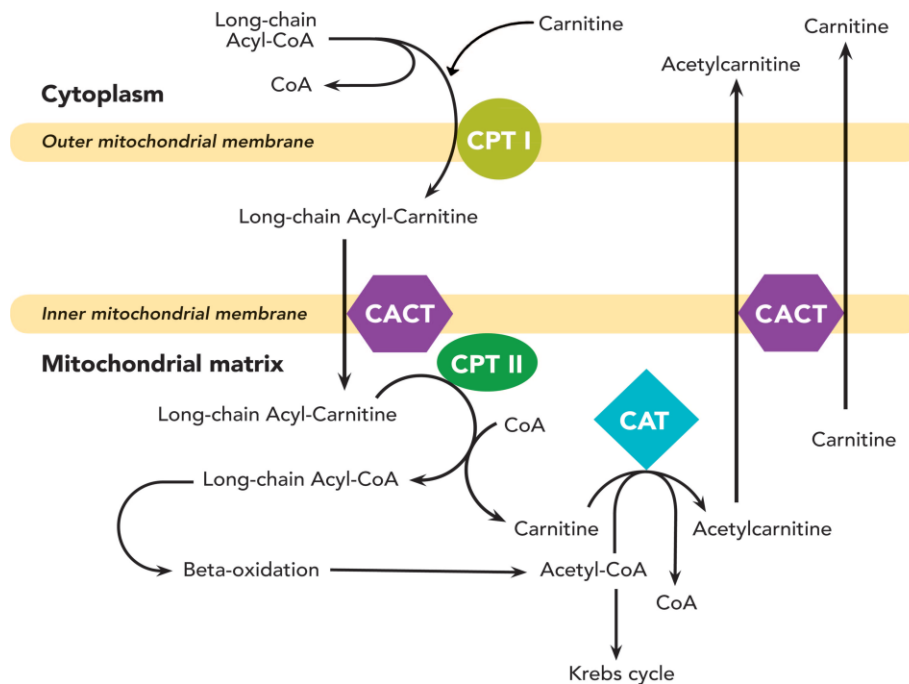


Figure 3. Le système carnitine : transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie.

Figure tirée de Wong GK et al. *Anesthesiology*. 2011 Jun;114(6):1417-24 (268). CoA : Coenzyme A ; CPT1 : carnitine-palmitoyl-transférase ; CACT : acyl-carnitine translocase ; CAT : carnitine acétyl transférase.

Dans la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA est oxydé en quatre étapes soit une déshydrogénation, une hydratation, une deuxième déshydrogénation et enfin un clivage qui libère un acyl-CoA privé de deux carbones qui servira de substrat pour le tour suivant, de même qu'un acétyl-CoA (Figure 4, p. 10) ([17](#), [259](#)). À chaque tour de cycle, une molécule de flavine adénine dinucléotide réduit (FADH_2) et une molécule de NADH , H^+ sont libérées dans la matrice. Pour un acide gras à $2n$ carbones, $(n-1)$ tours d'oxydation sont nécessaires pour la formation de n acétyl-CoA. Par exemple, le palmitoyl-CoA (16 carbones) sera dégradé en huit acétyl-CoA au cours de sept tours de β -oxydation et produira sept molécules de FADH_2 et sept molécules de NADH , H^+ . Dans le cas d'un acide gras avec un nombre impair $(2n+1)$ de carbones, le clivage libère $(n-1)$ acétyl-CoA et un propionyl-CoA. La β -oxydation des acides gras libres est une bonne source d'énergie. L'oxydation complète du palmitate, l'acide gras saturé le plus abondant dans l'organisme, fournit 106 molécules d'ATP ([17](#), [259](#)).

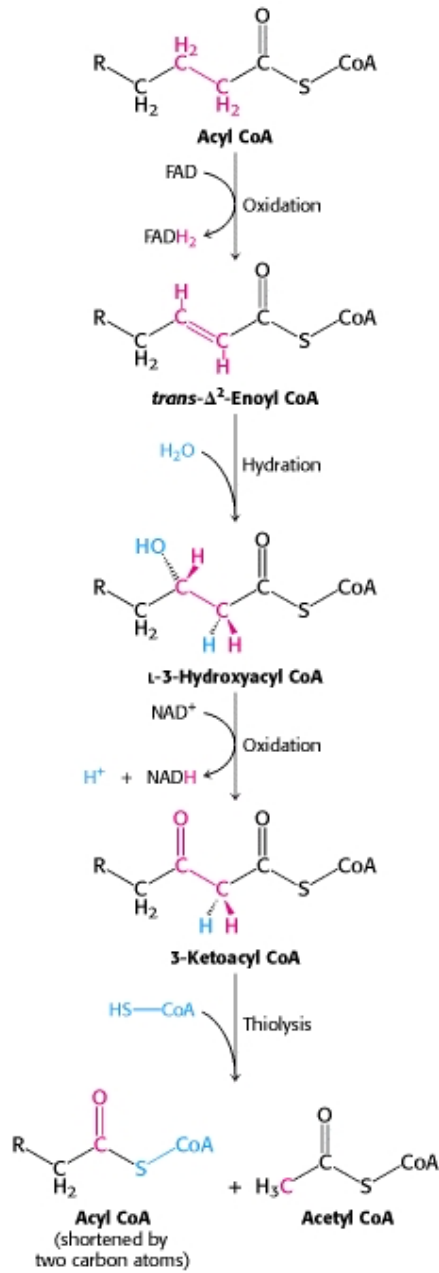


Figure 4. La β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie.

Figure tirée de *Biochemistry 5th Edition*, section 22.2, 2002 (17). NAD: nicotinamide adénine dinucléotide, FAD: flavine adénine dinucléotide.

c. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, appelé aussi le cycle de l'acide citrique, constitue l'étape commune finale du catabolisme oxydatif des glucides et des acides gras ([17](#), [259](#)). La dégradation de ces macronutriments résulte en la formation de l'acétyl-CoA qui est oxydé à son tour en deux molécules de CO₂. Le métabolisme des acides aminés contribue également à l'homéostasie énergétique par le biais du cycle de Krebs ([17](#), [259](#)). En effet, les squelettes carbonés des α -cétoacides issus de la dégradation des acides aminés peuvent être convertis en différents composés, dont des intermédiaires du cycle de Krebs.

Le cycle de Krebs a lieu dans la matrice mitochondriale. Il comprend huit réactions enzymatiques, présentées dans la Figure 5 (p. 12), qui se résument en trois grandes étapes ([17](#), [259](#)). À chaque tour d'oxydation, une molécule d'acétyl-CoA réagit avec une molécule d'oxaloacétate (OAA) pour former du citrate. La première étape du cycle consiste à transformer le citrate en isocitrate par deux réactions enzymatiques de déshydratation et de réhydratation. La deuxième étape est une série de trois réactions de décarboxylation permettant de convertir l'isocitrate en succinate, en passant par l' α cétooglutarate (α KG). Enfin, la troisième étape permet la régénération de l'OAA par une suite de trois réactions de déshydrogénation, d'hydratation et de déshydrogénation. À chaque tour, le cycle libère de l'énergie sous forme d'une molécule de guanosine triphosphate (GTP) et génère des coenzymes réduits, soit une molécule de FADH₂ et trois molécules de NADH, H⁺, qui seront oxydés en présence d'oxygène par la chaîne respiratoire mitochondriale ([17](#), [259](#)).

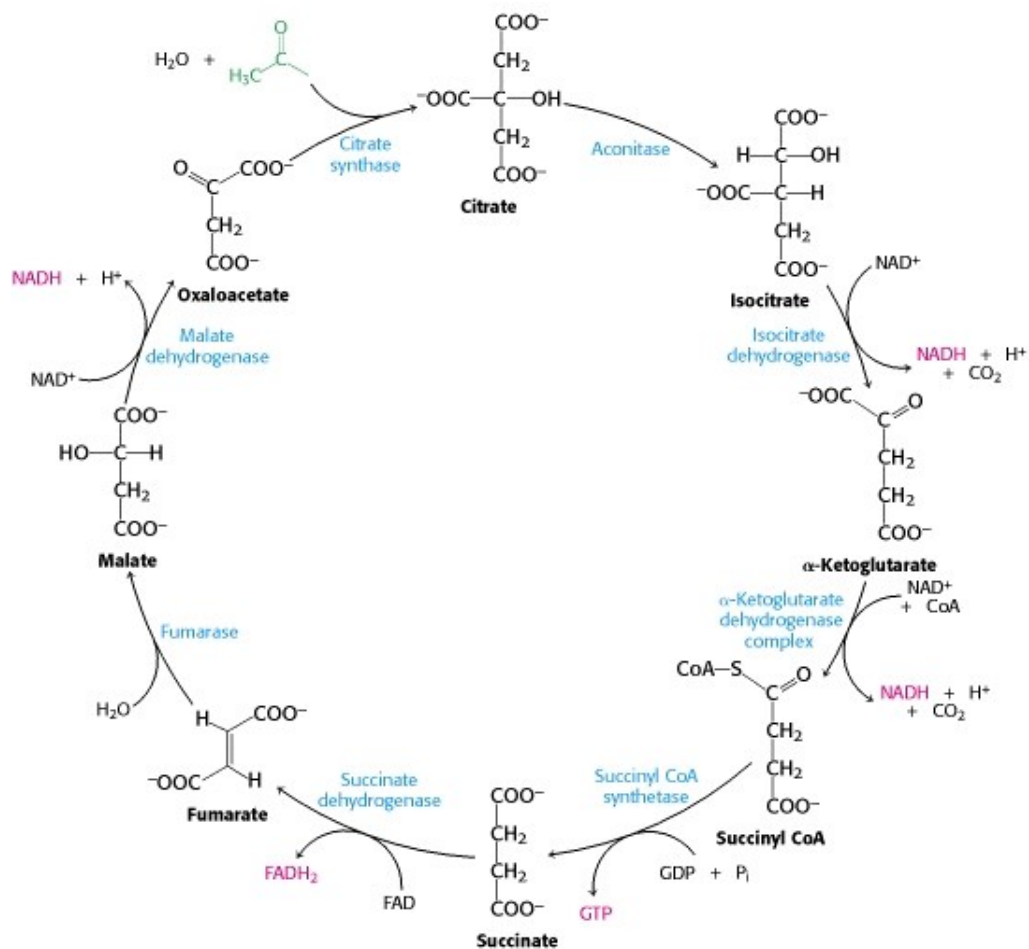


Figure 5. Le cycle de Krebs.

Figure tirée de *Biochemistry 5th Edition*, section 17.1, 2002 (17). NADH,H⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide réduit, FADH₂: flavine adénine dinucléotide réduit, GTP : guanosine triphosphate.

Le cycle de Krebs forme donc un pont entre le métabolisme du glucose et des acides gras d'une part, et la phosphorylation oxydative d'autre part. Une altération du métabolisme telle qu'une diminution de l'activité du PDC et par conséquent la formation d'acétyl-CoA ; ralentit le cycle de Krebs et la génération des coenzymes réduits (2, 226). Il en résulte une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Réciproquement, une dysfonction de la phosphorylation oxydative entraîne une accumulation des coenzymes réduits, un débalancement dans les intermédiaires du cycle de Krebs et une dysfonction de celui-ci (17, 60, 226). L'équilibre autour du cycle de Krebs est primordial pour la fonction et la survie cellulaire (61, 194).

Il existe, autour du cycle de Krebs, des réactions qui servent à maintenir les concentrations des intermédiaires du cycle de Krebs et qui permettent son bon fonctionnement (61, 194). Notamment, on observe une perte d'un ou plusieurs intermédiaires du cycle qui peut être plus ou moins importante selon les conditions de la cellule. Par exemple, les composés à 4 ou 5 carbones du cycle de Krebs issus de la dégradation des acides aminés peuvent être redirigés vers la synthèse des acides gras ou la néoglucogenèse. En contrepartie, il existe une régénération du pool des intermédiaires ou l'anaplérose à travers cinq principales réactions représentées dans la Figure 6 ci-après (p. 14) (61, 190, 194).

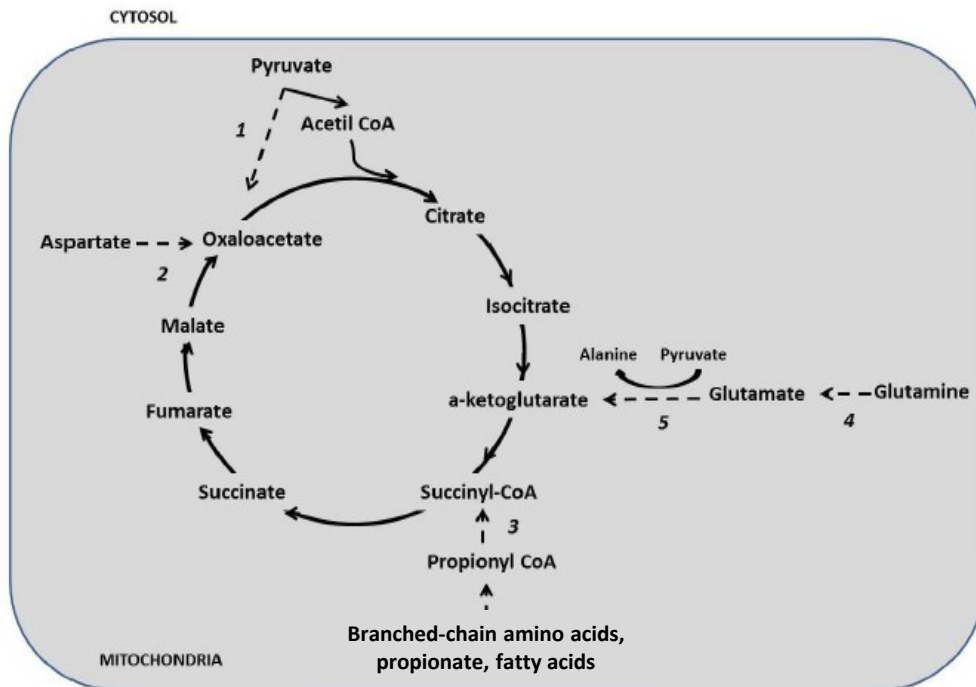


Figure 6. Principales réactions anapérotiques mitochondriales.

Adaptée de Ochoa-Ruiz et al. *Am J Mol Biol.*2012, 2, 291-303 ([190](#)).

(1) La pyruvate carboxylase (PC) catalyse la première réaction anapérotique soit la conversion du pyruvate en oxaloacétate (OAA) dans la matrice mitochondriale. (2) L'aspartate aminotransférase, à travers la transamination de l'aspartate, génère également l'OAA. L'OAA peut ensuite entrer dans le cycle de Krebs ou être transformé en malate. Ce dernier peut traverser la membrane mitochondriale et être reconverti en pyruvate par l'enzyme malique (ME). (3) La propionyl-CoA carboxylase catalyse la formation du succinyl-CoA à partir des précurseurs du propionyl-CoA à savoir les acides aminés, le propionate et les acides gras. (4) La glutaminase (GLS) catalyse la conversion de glutamine en glutamate qui est converti en α -kétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (GDH) (5) ([61](#), [190](#), [194](#)).

I.1.1.2. Phosphorylation oxydative

L'oxydation phosphorylante (OXPHOS) ou phosphorylation oxydative est une série de réactions d'oxydoréduction des coenzymes réduits (NADH, H^+ et $FADH_2$) couplée à la phosphorylation d'adénosine diphosphate (ADP) en ATP (17). Elle a lieu dans la membrane interne des mitochondries et s'effectue au sein de cinq complexes protéiques (I, II, III, IV et V) (Figure 7, p. 16). Les quatre premiers complexes forment la chaîne respiratoire ou chaîne de transport d'électrons et le cinquième complexe est une ATP synthase, qui, comme son nom l'indique, est responsable de la synthèse d'ATP. La chaîne respiratoire comprend également deux petites molécules mobiles : le coenzyme Q (CoQ) ou ubiquinone, et le cytochrome c. Le CoQ permet le transport des électrons des complexes I et II vers le complexe III alors que le cytochrome c transfère les électrons du complexe III vers le complexe IV. De plus, les enzymes glycérol 3- phosphate déshydrogénase et l'ETF-Coenzyme oxydoréductase sont indispensables à l'OXPHOS et participent à l'entrée des électrons dans la mitochondrie. La phosphorylation oxydative joue un rôle fondamental dans la respiration cellulaire et permet la production de plus de 90% de l'énergie dans la majorité des cellules de l'organisme (17).

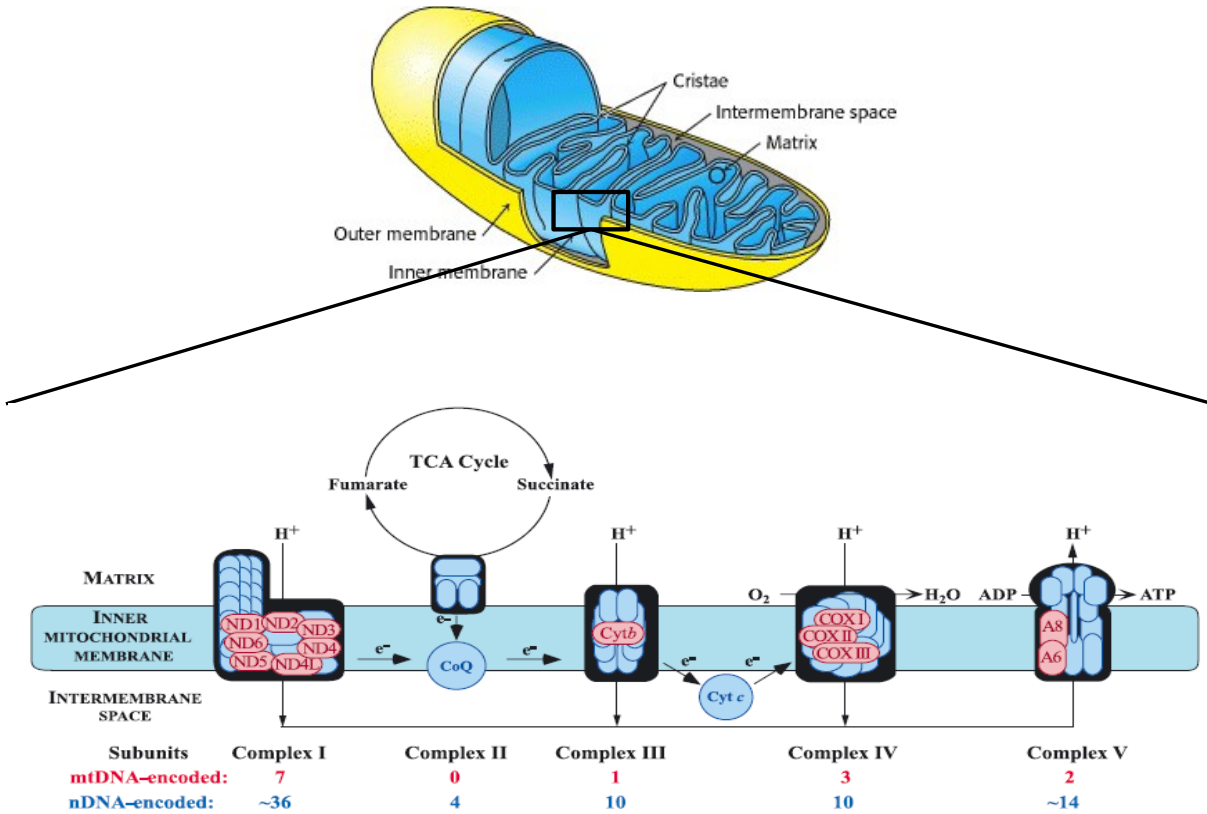


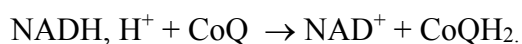
Figure 7. La chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase.

Adaptée de *Biochemistry 5th Edition*, section 18.1, 2002 ([17](#)) et de DiMauro S., *Biochim Biophys Acta*, 1658, 80-88, 2004 ([62](#)). e⁻ : électrons, H⁺ : protons, CoQ : Coenzyme Q, Cyt c : cytochrome c, TCA cycle : cycle acide tricarboxylique, O₂ : dioxygène, H₂O : eau, ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate.

a. La chaîne de transport d'électrons

Les complexes I, II, III, et IV de la chaîne respiratoire comportent des systèmes d'oxydoréduction qui vont transférer les électrons des coenzymes réduits, NADH, H⁺ et FADH₂, vers l'oxygène (O₂) (17). Le rôle de chaque complexe dans le transport des électrons est décrit ci-dessous.

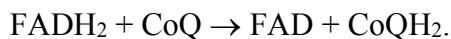
Le complexe I est formé de 45 sous-unités codées à la fois par l'ADNmt et l'ADNn (31). C'est une enzyme NADH-coenzyme Q-oxydoréductase qui possède une flavine mononucléotide (FMN) et six centres fer-soufre. Le complexe I catalyse l'oxydation du NADH, H⁺ en NAD⁺ via la FMN (17). C'est le premier point d'entrée dans la chaîne respiratoire transférant les électrons du NADH, H⁺ sous forme d'ions hydrures H⁻ au CoQ, le réduisant en CoQH₂ selon la réaction suivante :



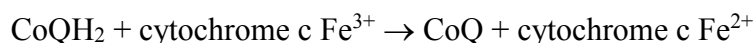
Cette réaction d'oxydoréduction libère de l'énergie qui sert à pomper les protons H⁺ formés de la matrice vers l'espace inter membranaire (17).

Le complexe II est formé de 4 sous-unités protéiques codées par l'ADNn. Il est aussi appelé succinate-coenzyme Q-oxydoréductase et est constitué d'une FAD et de trois centres fer-soufre. Il contient l'enzyme succinate déshydrogénase qui catalyse, en présence de FAD⁺, l'oxydation du succinate en fumarate (17). Le complexe II est une composante du cycle de Krebs qui forme le deuxième point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Il transfère les électrons du FADH₂ au CoQ, par les centres fer-soufre, entraînant sa réduction en CoQH₂. Deux autres enzymes, la glycérol 3-phosphate déshydrogénase et l'ETF-Coenzyme Q oxydoréductase, gèrent les électrons du FADH₂ généré notamment par la β-oxydation (17).

Cette réaction du complexe II ne libère pas suffisamment d'énergie pour le pompage de protons :

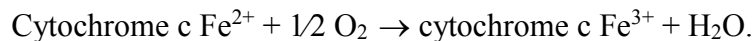


Le complexe III est constitué de 11 sous-unités dont une seule est codée par l'ADNmt (49). Ce complexe ou coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase contient les cytochromes b et c1 ainsi qu'un centre fer-soufre (17, 49). L'enzyme ubiquinol-cytochrome c-oxydoréductase catalyse l'oxydation du CoQH₂ et transfère les électrons, un par un, au cytochrome c ferrique Fe³⁺ le réduisant en cytochrome c ferreux Fe²⁺ selon la réaction suivante :



Cette réaction libère suffisamment d'énergie pour permettre le transfert de protons H⁺ de la matrice vers l'espace inter membranaire (17).

Le complexe IV ou cytochrome c oxydase (COX) est composé de 13 sous-unités (17, 68). Les premières sous-unités (COX1, COX2 et COX3) forment la partie catalytique du complexe et sont codées par l'ADNmt alors que les 10 autres sous-unités (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C et COX8) sont codées par l'ADNn (68). Ce complexe possède également deux atomes de cuivre et deux atomes de fer. La COX catalyse l'oxydation du cytochrome c ferreux Fe²⁺ et les électrons libérés servent à réduire une molécule d'O₂ pour former, dans la matrice, une molécule d'eau selon la réaction suivante :



La consommation d'O₂ ou respiration constitue l'étape finale du transport des électrons et libère suffisamment d'énergie pour le pompage de protons H⁺ vers l'espace inter membranaire (17).

Les conséquences métaboliques d'une mutation affectant la chaîne respiratoire diffèrent selon le complexe mitochondrial qui est dysfonctionnel. Par exemple, le métabolisme du glucose génère essentiellement du NADH, H^+ qui entre dans la chaîne respiratoire par le complexe I (17). L'oxydation des acides gras par contre génère, en plus du NADH, H^+ , une quantité importante de $FADH_2$. Ce dernier entre dans la chaîne mitochondriale par le complexe II (17). Chaque molécule de NADH, H^+ génère 2,5 molécules d'ATP, tandis qu'une molécule de $FADH_2$ formée et oxydée par la chaîne mitochondriale donne 1,5 molécule d'ATP, ce qui est non négligeable (17). Ainsi, dans certaines maladies mitochondriales avec un déficit du complexe I, les acides gras constituent une bonne source énergétique alternative. Notamment, la diète cétogène riche en gras se montre bénéfique pour les patients épileptiques avec une déficience du complexe I (23).

b. La synthèse d'ATP

La synthèse de l'ATP est une réaction énergétique basée sur la phosphorylation de l'ADP en ATP (17). Comme mentionnée précédemment, le flux d'électrons à travers les complexes de I à IV s'accompagne d'un déplacement de protons H^+ de la matrice vers l'espace inter membranaire créant un gradient électrochimique. L'énergie contenue dans ce gradient est libérée lorsque les protons passent de l'espace inter membranaire à la matrice et est couplée à la synthèse d'ATP. Ces réactions sont catalysées par le complexe V ou l'ATP synthase, une enzyme transmembranaire constituée de deux modules : le module FO qui permet le retour des ions H^+ dans la matrice et le module F1 qui contient le site catalytique de phosphorylation de l'ADP (17). Le complexe V est constitué de 16 sous-unités. Deux des sous-unités du module FO sont codées par l'ADNmt alors que les autres sous-unités sont codées par l'ADNn (17, 265).

La synthèse d'ATP se fait selon la réaction suivante :



I.1.2- Les désordres mitochondriaux

La mitochondrie est essentielle à l'organisme grâce à son rôle clé dans le métabolisme énergétique. La dysfonction mitochondriale a donc été associée à plusieurs maladies métaboliques incluant le diabète de type 2, le cancer ou encore les maladies cardiovasculaires ([15](#), [172](#)). Toutefois, le terme « maladies mitochondriales » est réservé aux dysfonctions mitochondriales d'origine génétique. Les maladies mitochondriales sont les maladies métaboliques héréditaires les plus fréquentes dans le monde avec une prévalence d'une naissance sur 5000 ([228](#)). Elles affectent aussi bien les adultes que les enfants et sont caractérisées, entre autres, par un déficit de production d'énergie par la mitochondrie. Elles sont complexes de par leur hétérogénéité étiologique et phénotypique. Il n'existe pas de traitement curatif et par conséquent, ces maladies sont associées à une forte mortalité ([62](#), [205](#), [229](#)).

I.1.2.1. Mutations génétiques

Les maladies mitochondriales sont causées par des mutations au niveau de l'ADNmt ou au niveau de l'ADNn ([9](#), [229](#)). Elles sont transmises de façon autosomique dominante ou récessive. Elles peuvent aussi avoir une transmission maternelle ou liée au chromosome X. Les mutations affectent les gènes qui codent pour les composantes structurales, les facteurs d'assemblage des complexes mitochondriaux, les protéines impliquées dans le maintien de l'ADNmt ou encore des protéines impliquées dans la synthèse ou l'importation des protéines

mitochondriales. Ces mutations conduisent à des défauts de l'OXPHOS, principalement des déficiences en un ou plusieurs des complexes mitochondriaux (229). En tout, des centaines de mutations de l'ADNmt et l'ADNn ont été répertoriées.

Chaque complexe mitochondrial est constitué de plusieurs sous-unités codées par différents gènes. Un déficit au niveau d'un complexe peut donc être causé par des mutations dans différents gènes résultant en des manifestations cliniques très variées (286). Par exemple, la déficience du complexe IV est associée à la myopathie, le syndrome de Leigh ou encore le syndrome de Leigh de type canadien français et peut impliquer des mutations dans les gènes suivants *SURFI*, *SCO1*, *SCO2*, *COX10*, *COX15*, *LRPPRC*, *FASTKD2*. Cette hétérogénéité étiologique et clinique rend complexe l'étude des maladies mitochondriales. Dans le tableau ci-dessous (Tableau 1, p. 22), les mutations les plus communes ont été répertoriées et classées selon le complexe affecté (286).

Tableau I. Liste des mutations codant pour les composantes structurales et les facteurs d'assemblage des complexes mitochondriaux.

Tableau adapté de Ylikallio et al, *Annals of Medicine*, 2012; 44: 41–59 (286)

Complexes mitochondriaux	Défaut génétique	Gènes	Manifestations cliniques majeures
CI	Gène structurel codé par l'ADNmt	<i>ND1 ND2 ND3 ND4 ND4L ND5 ND6</i>	LHON, MELAS, LS
	Gène structurel codé par l'ADNn	<i>NDUFS1 NDUFS2 NDUFS3 NDUFS4 NDUFS6 NDUFS7 NDUFS8 NDUFV1 NDUFV2 NDUFA1 NDUFA2 NDUFA11</i>	LS, encéphalopathie, cardiomyopathie
	Facteur d'assemblage codé par l'ADNn	<i>NDUFAF1 NDUFAF2 C6orf66 C20orf7 ACAD9 C8ORF38</i>	LS, cardioencéphalomyopathie, acidose lactique infantile
CII	Gène structurel codé par l'ADNn	<i>SDH-A SDH-B SDH-C SDH-D</i>	LS, paragangliome, phéochromocytome
	Facteur d'assemblage codé par l'ADNn	<i>SDHAF1 SDHAF2</i>	Leucoencéphalopathie infantile, paragangliome
CIII	Gène structurel codé par l'ADNmt	<i>CYTB</i>	LHON, encéphalopathie, cardiomyopathie, myopathie
	Gène structurel codé par l'ADNn	<i>UQCRB UQCRQ</i>	Hypoglycémie, acidose lactique ou retard psychomoteur avec des signes extrapyramidaux
	Facteur d'assemblage codé par l'ADNn	<i>BCSIL TTC19</i>	Encéphalopathie, insuffisance hépatique, tubulopathie, syndrome de GRACILE, syndrome de Björnstad
CIV	Gène structurel codé par l'ADNmt	<i>COX1 COX2 COX3</i>	Encéphalopathie, myopathie, anémie sidérolastique, myoglobulinurie, MELAS
	Gène structurel codé par l'ADNn	<i>COX6B1 COX4I2</i>	Encéphalomyopathie infantile, ou insuffisance pancréatique exocrine et anémie
	Facteur d'assemblage codé par l'ADNn	<i>SURF1 SCO1 SCO2 COX10 COX15 LRPPRC C2orf64</i>	LS, LS canadien français, encéphalopathie, cardiomyopathie, myopathie, insuffisance hépatique, tubulopathie
CV	Gène structurel codé par l'ADNmt	<i>ATP6 ATP8</i>	LS, NARP, cardiomyopathie
	Gène structurel codé par l'ADNn	<i>ATP5E</i>	Acidurie 3-méthylglutaconique, acidose lactique, retard mental léger, neuropathie périphérique
	Facteur d'assemblage codé par l'ADNn	<i>ATP12 TMEM70</i>	Encéphalopathie, acidose lactique, cardioencéphalomyopathie

I.1.2.2. Altérations métaboliques

Tel que mentionné précédemment, la mitochondrie joue un rôle clé dans la formation de l'ATP, mais aussi dans plusieurs autres fonctions cellulaires à savoir l'apoptose, l'homéostasie calcique ou encore la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) ([17](#), [33](#), [261](#)). Voici quelques conséquences métaboliques les plus communes des maladies mitochondriales.

Premièrement, une déficience en un ou plusieurs des complexes de la chaîne respiratoire entraîne une diminution de la régénération de l'ATP à partir de l'ADP. L'ATP participe à la régulation de l'activité de certaines enzymes par phosphorylation ou en tant qu'effecteur allostérique ([17](#), [259](#)). L'ATP constitue un donneur d'énergie libre pour plusieurs processus biologiques incluant la contraction musculaire, le transport des molécules et des ions; la biosynthèse des protéines, des ARN et des nucléosides triphosphates ([17](#)). Une déficience dans la production d'ATP altère le fonctionnement de ces processus. Les patients présentent ainsi souvent une fatigue généralisée ou encore un retard de croissance.

Deuxièmement, des défauts de la chaîne respiratoire affectent la production de ROS. Durant le transport d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale, 2% des électrons libérés par les complexes I et III interagissent avec l' O_2 pour générer le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ([251](#), [295](#)). Lors d'un défaut de la chaîne respiratoire, on observe une accumulation d'électrons libres et de molécules d' O_2 , favorisant la formation d' $O_2^{\cdot-}$. Ces molécules d' $O_2^{\cdot-}$ interagissent pour produire d'autres types de radicaux. Ainsi, alors que l' $O_2^{\cdot-}$ n'est pas un radical très nocif; deux molécules d' $O_2^{\cdot-}$ engendrent spontanément le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) capable de générer un radical très toxique l'hydroxyle (HO). En présence du monoxyde d'azote (NO), l' $O_2^{\cdot-}$ peut aussi former l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) qui lui

aussi est très toxique ([251](#), [295](#)). Ces radicaux libres, notamment l'HO·, attaquent et détruisent les macromolécules de la cellule comme l'ADN, les lipides et les protéines ([295](#)). Ils attaquent les lipides membranaires entraînant la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale, induisent l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP), libérant ainsi dans le cytosol des protéines comme le cytochrome c ce qui active la voie des caspases pro apoptotiques ([115](#), [193](#), [295](#)). Une augmentation de ROS est d'ailleurs observée dans les cinq maladies mitochondriales les plus communes à savoir l'ataxie de Friedreich, la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON), le syndrome de Leigh, le MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes) et le syndrome de MERRF (Myoclonic epilepsy with ragged-red fibers) ([97](#), [193](#), [286](#)). Un excès d'apoptose participe à la neurodégénération observée fréquemment chez les patients atteints de maladies mitochondriales ([81](#)). En parallèle, l'augmentation de la production de ROS par la mitochondrie entraîne une diminution de la disponibilité du Fe²⁺ et de l'O₂, deux cofacteurs des enzymes PHD (prolyl hydroxylase domain) et FIH (factor inhibiting HIF (Hypoxia Inducible Factor)) ([80](#), [284](#)). Ces deux enzymes régulent la stabilité du facteur de transcription HIF-1α considéré par certains comme une protéine de survie ([284](#)). La stabilisation de HIF-1α a été observée dans plusieurs cancers et favorise la formation d'ATP par la glycolyse aérobie (effet Warburg), le maintien du potentiel de la membrane mitochondriale et de la prolifération ([126](#), [153](#), [160](#)). La stabilisation de HIF-1α dans les maladies mitochondriales est peu étudiée. Toutefois, une récente étude de Jain et al ([114](#)) démontre que l'hypoxie associée à une stabilisation de HIF-1α améliore la survie dans le modèle murin du syndrome de Leigh classique déficient pour le complexe I.

Troisièmement, l'une des conséquences des plus communes des désordres mitochondriaux est l'accumulation de lactate ($[\text{lactate}] > 2\text{mM}$) pouvant conduire à une acidose lactique (54, 209). Pour certaines maladies mitochondriales, l'acidose lactique est présente de manière chronique chez les patients. Pour d'autres, elle survient pendant les crises alors que dans d'autres maladies aucune hyperlactatémie n'est observée (54, 209). Dans une situation de dysfonction mitochondriale, l'acidose lactique résulte principalement d'un changement dans l'état redox de la cellule (54, 209). Le blocage de l'OXPPOS entraîne, en effet, une accumulation de coenzymes réduits NADH, H^+ et FADH_2 ce qui inhibe plusieurs enzymes du cycle de Krebs comme la PDH favorisant une accumulation du pyruvate. Le pyruvate est par conséquent converti en lactate par LDH et relâché dans le sang (54, 198). Il a été rapporté que l'état redox d'une cellule change dépendamment de la sévérité de l'affection de la chaîne respiratoire, et que la lactatémie augmente proportionnellement à la progression de la maladie (209). Certaines situations telles que l'infection et le stress peuvent aussi favoriser un état d'acidose lactique, bien que tous les mécanismes n'aient pas encore été élucidés (54). L'hyperlactatémie chronique est toxique pour l'organisme (54). Des crises d'acidose lactique sévères impliquant des taux élevés de lactate sont associées à un risque élevé de mortalité notamment chez les patients atteints du LSFC (59, 173).

Enfin, une dysfonction mitochondriale est associée à une perturbation du métabolisme en général. La mitochondrie est l'étape finale du métabolisme des macronutriments : glucides et acides gras libres. Notamment, les acides gras sont principalement métabolisés par la mitochondrie (17, 259). Cela engendre, en amont, une accumulation d'acides gras libres qui vont être convertis en triglycérides ou encore en des composés plus toxiques comme des céramides (17). Cela peut favoriser l'apparition des maladies métaboliques comme le diabète

ou les maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de maladies mitochondriales ([16](#), [21](#)). Le diabète est, en l'occurrence, plus fréquent chez les patients atteints d'une maladie mitochondriale avec la mutation m.324A> G ([55](#)). D'ailleurs, le **profil** métabolique des patients LSFC suggère une résistance à l'insuline ([247](#)). En outre, les autopsies révèlent une accumulation de triglycérides dans le foie des patients atteints du LSFC ([59](#), [173](#)).

I.1.2.3. Prise en charge

Rappelons que les maladies mitochondriales sont complexes, de causes multiples avec des phénotypes variés ([62](#), [229](#)). Cette hétérogénéité étiologique et phénotypique rend difficile l'élaboration des thérapies. Pour la majorité des maladies mitochondriales, les traitements sont essentiellement symptomatiques et ciblent des manifestations phénotypiques spécifiques comme l'épilepsie, la psychose, la neuropathie, la myopathie, les problèmes rénaux, les problèmes gastro-intestinaux, etc. Ainsi, on compte parmi les thérapies proposées : des antiépileptiques, la psychothérapie, l'exercice physique, la dialyse ou encore des régimes alimentaires ([23](#), [72](#), [205](#), [258](#)). Depuis les deux dernières décennies, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été suggérées parallèlement à une meilleure compréhension des maladies mitochondriales. Celles-ci ciblent les mécanismes physiopathologiques. Voici quelques traitements émergents.

a. Les substrats énergétiques

La dysfonction mitochondriale engendre des altérations métaboliques incluant des rétrocontrôles négatifs qui limitent l'entrée des substrats énergétiques dans la mitochondrie ([198](#)). Une des approches thérapeutiques préconisées est de favoriser l'apport et l'utilisation de substrats énergétiques par des cofacteurs et des inhibiteurs enzymatiques enfin d'augmenter

la synthèse d'ATP via l'OXPHOS. L'administration de la L-carnitine, la niacine, la thiamine et le dichloroacétate (DCA) a été rapportée bénéfique (72). Rappelons que la L-carnitine est impliquée dans le transport des acides gras vers la mitochondrie et favorise la β -oxydation (17, 259). La niacine est le précurseur de la nicotinamide adénosine déshydrogénase, une enzyme qui favorise le transfert d'électrons des intermédiaires du cycle de Krebs (203). La thiamine et le DCA favorisent l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA en stimulant l'activité du complexe PDC (13, 139, 168, 239). Malheureusement, la plupart des bénéfices rapportés demeurent anecdotiques et ne sont pas reproductibles d'un patient à un autre.

b. Les antioxydants

Comme spécifié auparavant, la mitochondrie produit des ROS. De nombreuses évidences soutiennent le rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie des maladies mitochondriales. Par conséquent plusieurs thérapies mises en place ciblent les ROS (97).

L'approche thérapeutique la plus utilisée est une supplémentation en CoQ₁₀. Toutefois, l'administration de celui-ci s'est avérée efficace uniquement pour les maladies mitochondriales associées aux déficits de la biosynthèse du CoQ (72, 205). Un autre antioxydant, le N-acétylcystéine (NAC) combiné au métronidazole serait bénéfique pour l'encéphalopathie éthylmalonique, mais n'a pas encore été testé pour les autres maladies mitochondriales (72, 205). Enfin, les vitamines C et E ont été suggérés pour traiter les maladies mitochondriales. Un analogue de la vitamine E, le trolox améliore le phénotype cellulaire des patients avec une déficience du complexe I, mais rien n'a encore été confirmé au niveau clinique (63). La vitamine C améliore le retard de croissance, les symptômes

bioénergétiques et les niveaux d'acides biliaires, mais cela a été rapporté chez un seul patient avec une déficience du complexe III ([177](#)).

c. Les activateurs de la biogenèse mitochondriale

Tel que discuté auparavant, l'altération de l'OXPPOS résulte en une diminution de la production de l'ATP. Il a été suggéré qu'une augmentation du nombre de mitochondries, via une augmentation de la biogenèse mitochondriale, pourrait augmenter la production d'ATP ([124](#), [227](#), [244](#)). Plusieurs approches pharmacologiques, nutritionnelles, mais aussi par l'activité physique; ont donc été proposées.

Le resvératrol, le 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) et la nicotinamide riboside, sont des agents pharmacologiques activateurs du facteur de transcription PGC-1 α , un régulateur clé de la biogenèse mitochondriale ([205](#), [227](#), [258](#)). Ces agents démontrent des effets bénéfiques dans des modèles cellulaires ou murins de maladies mitochondriales. Seul le resvératrol a été testé en clinique chez des patients atteints d'ataxie de Friedreich, révélant quelques effets bénéfiques à de fortes doses ([285](#)).

Par ailleurs, la diète cétogène pauvre en glucides est proposée aux patients atteints de maladies mitochondriales associées au déficit du complexe I ([23](#)). Rappelons, en effet, que le métabolisme oxydatif du glucose transite par le complexe I ([17](#)). Il a aussi été montré que la diète cétogène est associée à une augmentation de l'acide décanoïque capable de stimuler la biogenèse mitochondriale ([105](#)). Toutefois, les effets de l'acide décanoïque n'ont jamais été démontrés en clinique.

Enfin, l'activité physique comme thérapie a longuement été discutée dans le contexte des maladies mitochondriales ([245](#)). En effet, la réponse physiologique à un exercice physique

consiste entre autres à une amélioration de la fonction mitochondriale notamment une augmentation de la biogenèse ([41](#), [262](#)). Des essais cliniques démontrent que l'exercice améliore la qualité de vie des patients avec des défauts d'ADNmt ([116](#), [180](#), [244](#)). Cependant, aucune recommandation proprement dite n'a été faite concernant quel type d'exercice serait approprié.

d. Autres approches thérapeutiques

Plusieurs autres approches thérapeutiques demeurent au niveau expérimental. Le contrôle des dynamismes mitochondriales, la thérapie génique, la prévention de la transmission de l'ADNmt, le remplacement enzymatique, etc., sont parmi tant d'autres thérapies plus ou moins efficaces de plus en plus proposées dans le cadre des maladies mitochondriales ([72](#), [205](#), [258](#)).

I.1.3- Le Syndrome de Leigh de type canadien français

I.1.3.1. Caractéristiques

Le LSFC est une maladie infantile neurodégénérative qui s'inscrit dans la lignée des maladies mitochondriales. Cette variante du syndrome de Leigh, a été décrite pour la première fois en 1980 par le pédiatre Jean Larochelle à Chicoutimi auprès d'enfants qui présentaient une hypotonie accompagnée de crises d'acidose métabolique sévères ([59](#), [173](#)). Alors que le syndrome de Leigh classique est observé dans le monde entier, on retrouve le LFSC avec une fréquence plus élevée au Saguenay-Lac-Saint-Jean et à Charlevoix. Dans ces régions, une personne sur 23 est porteuse de la mutation responsable de la maladie et l'on dénombre une naissance sur 2063 atteinte du LSFC. La fréquence élevée de cette maladie est attribuée à un «effet fondateur» où quelques individus porteurs de la mutation ont contribué de façon

importante à l'établissement de celle-ci, en raison des familles nombreuses et de l'isolation relative de la région ([59](#), [173](#)).

Les premiers signes cliniques de la maladie se manifestent au cours de la période néonatale. À la naissance, la majorité des enfants atteints présentent une hypotonie. Cette dernière s'accompagne, dans certains cas, de problèmes de succion, d'une tachypnée transitoire et de trémulations. En outre, certains enfants présentent une hypoglycémie ou encore des taux sanguins d'acide lactique élevés. Vers l'âge d'un an, de nombreux enfants manifestent un retard de développement. En l'occurrence, ils s'assoient, marchent et parlent plus tard. Ils présentent aussi des caractéristiques cranio-faciales distinctes comme un front proéminent, une hypoplasie médio-faciale, une ligne médiane large, un léger hirsutisme, une forme caractéristique en arc des sourcils, et enfin une faiblesse et un manque d'expression faciale. Certains patients plus âgés ont une ataxie tronculaire et présentent ainsi des problèmes de marche ([59](#), [173](#), [217](#)).

Les patients LSFC, développent souvent des crises aiguës de décompensation. Il s'agit soit de crises d'acidose métabolique sévère, des crises neurologiques sans acidose sévère, ou des pseudo-épisodes vasculaires cérébraux. D'après une enquête faite auprès des parents, ces crises apparaissent le plus souvent suite à d'une maladie infectieuse incluant des infections respiratoires et des infections gastro-intestinales ([217](#)). D'autres surviennent lors d'un effort physique, d'un jeûne prolongé ou d'un stress psychologique intense. Les mécanismes impliqués dans le déclenchement de ces crises restent encore inconnus. Elles se produisent en général avant l'âge de 4 ans et sont fatales dans 82% des cas ([59](#), [173](#), [217](#)).

Les crises métaboliques sont caractérisées par une respiration de Kussmaul, une perfusion insuffisante de la peau, une déshydratation, et enfin une acidose lactique associée à

une hyperglycémie. Au cours de ces crises, le pH et le bicarbonate sanguins sont bas et la pression partielle du gaz carbonique ($p\text{CO}_2$) est élevée (Tableau II, p. 32). Ces crises métaboliques peuvent progresser rapidement vers le coma puis la mort, qui peut survenir en moins d'une journée. Au cours de cette période, le patient entre dans une phase de défaillance multiviscérale. À ce jour, il existe peu de traitement ou d'intervention médicale pouvant améliorer l'état du patient. Très rarement, certains patients survivent à la crise et affichent une amélioration de leur état métabolique avec des taux de lactate plasmatique proche de la normale. En général, ces patients développent, dans les jours suivants, une crise secondaire mixte i.e. métabolique/neurologique souvent mortelle ([59](#), [173](#), [217](#)).

Les crises neurologiques sont caractérisées par une détérioration neurologique aiguë ou subaiguë sans acidose sévère. Les patients présentent des convulsions, puis entrent dans une phase de détérioration neurologique, nécessitant souvent une assistance respiratoire et décèdent dans un état végétatif. Ces crises mènent à la mort dans un délai de 34 jours en moyenne (6-66 jours). Toutefois, on observe des pseudo-épisodes vasculaires cérébraux où les patients présentent plusieurs signes d'atteinte neurologique comme des convulsions, une hémiparésie, une ophtalmoplégie, des myoclonies, une faiblesse, et une léthargie. Contrairement aux crises neurologiques, la majorité des patients survivent à ces pseudo-épisodes vasculaires cérébraux et se rétablissent en quelques semaines ([59](#), [173](#), [217](#)).

Tableau II. Paramètres biochimiques des patients LSFC

Informations tirées de ([59](#), [173](#))

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

I.1.3.2. Mécanismes physiopathologiques

À ce jour, notre compréhension de la physiopathologie du LSFC reste incomplète. Depuis la découverte du gène responsable en 2003, on sait maintenant que le LSFC est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive résultant de mutations dans le gène nucléaire *LRPPRC* ([171](#)). Ces mutations entraînent une déficience de la protéine LRPPRC. Les rares études, notamment par notre groupe, ont démontré que la déficience de la protéine LRPPRC entraîne une dysfonction de la mitochondrie et des désordres métaboliques chez les patients LSFC ([22](#), [247](#)).

a. Déficience en LRPPRC

La protéine LRPPRC. LRPPRC ou LRP130 est une protéine d'un poids moléculaire de 130 Kilo daltons qui comporte une séquence de ciblage mitochondriale. La protéine LRPPRC est donc localisée majoritairement dans les mitochondries, mais on la retrouve aussi dans le noyau et le cytoplasme ([241](#)). C'est une protéine riche en leucine qui fait partie de la famille protéique des pentatricopeptides. Cette famille est caractérisée par la présence d'un motif répété de pentatricopeptide (PPR) de 35 acides aminés, répété en tandem et formant une

structure hélicoïdale ([145](#)). La protéine LRPPRC est constituée d'une vingtaine de motifs PPR. Une analyse de sa séquence révèle que l'extrémité N-terminal de LRPPRC contient des séquences répétées riches en leucine LXXLXL qui sont importantes pour le transport nucléaire et sa fonction de facteur de transcription. Le domaine C-terminal de LRPPRC contient des motifs de liaison des ARNm nucléaires et mitochondriaux. Deux domaines d'homologie ont été observés dans la séquence de LRPPRC : le domaine ENTH (N-Terminal Homology) et le domaine SEC1 (SECretory 1). Le domaine ENTH joue un rôle majeur dans l'endocytose. Il favorise la liaison de la clathrine à la membrane ce qui induit la formation des vésicules endocytaires. Le domaine SEC1, quant à lui, est associé au transport vésiculaire incluant la transmission synaptique, l'exocytose et la sécrétion ([141](#)). Ainsi, LRPPRC est une protéine complexe, multifonctionnelle, mais pour laquelle certaines fonctions restent encore incomprises.

Rôle dans l'expression des gènes. La présence de motifs PPR confère à la protéine LRPPRC la capacité de réguler l'expression des gènes à différents niveaux, de l'ADN à la protéine. En effet, les protéines PPR sont capables de lier d'autres protéines, et elles peuvent aussi lier des ARN et de l'ADN ([145](#), [146](#)).

LRPPRC se lie à l'ADN, notamment aux promoteurs de certains gènes tels que *MDR1* et *ABCBI* liés à la résistance aux médicaments. La surexpression de LRPPRC a été rapportée dans plusieurs types de cancers incluant les cancers du poumon, de l'estomac, du côlon, et de l'œsophage ([46](#), [134](#), [249](#)). LRPPRC jouerait un rôle majeur dans le phénotype de résistance aux médicaments observé dans ces cancers ([142](#), [169](#), [249](#)). LRPPRC activerait également la transcription notamment des ARNm mitochondriaux en se liant à l'ARN polymérase

mitochondriale (POLRMT) ([148](#), [149](#), [238](#)). Ce dernier mécanisme reste controversé, car une étude plus récente suggère que LRPPRC n'interagirait pas avec POLRMT ([92](#)).

Le rôle le mieux connu de LRPPRC est celui de la régulation du métabolisme des ARN notamment la stabilité et le transport à la fois des ARNm mitochondriaux (mt-ARNm) et nucléaires (n-ARNm). Selon l'étude de Sasarman *et al* ([224](#)), LRPPRC participe à la formation du complexe ribonucléoprotéique mitochondrial (mRNP) en se liant à la protéine SLIRP (Stem-Loop RNA binding Protein). SLIRP protégerait LRPPRC de la dégradation et les deux protéines seraient interdépendantes. Le complexe LRPPRC/SLIRP contribue à la synthèse et au maintien de la queue polyA des ARNm, laquelle est indispensable à la stabilité et à la traduction des mt-ARNm ([224](#)). Par contre, le rôle du complexe LRPPRC/SLIRP dans le métabolisme des n-ARNm demeure incertain. Bien que SLIRP soit capable de se lier aux n-ARNm, ceux-ci ne semblent pas perturbés en l'absence du complexe LRPPRC/SLIRP ([224](#)).

LRPPRC régule aussi l'exportation des n-ARNm vers le cytoplasme en se liant au facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E) ([250](#)). eIF4E est un facteur-clé de l'exportation et de la traduction des n-ARNm spécifiques tels que cycline D 1, Pim 1 et c-Myc ([235](#)). LRPPRC et eIF4E font partie du complexe RNP nucléaire et favorisent le transit des ARNm du noyau vers le cytoplasme à travers le pore nucléaire via le récepteur CRM1 (Chromosome Region Maintenance) ([250](#)). Par ce mécanisme, LRPPRC et eIF4E jouent un rôle important dans la prolifération et la croissance cellulaire.

Pour résumer, LRPPRC régule l'expression génique en contrôlant la transcription, les changements post-transcriptionnels, et l'initiation de la traduction. Dans l'ensemble, à l'intérieur du complexe RNP, LRPPRC/SLIRP contribue à la stabilité des mt-ARNm alors que

le complexe LRPPRC/eIF4E régule l'exportation des n-ARNm. La liste exhaustive des gènes cibles de LRPPRC demeure inconnue. Mais selon différentes études, on sait que LRPPRC régule l'expression des gènes liés à la résistance aux médicaments, les gènes codants pour les protéines mitochondriales, les gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire, et enfin les gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique ([43](#), [44](#), [46](#), [128](#), [215](#), [250](#)). Par conséquent, une déficience de la protéine LRPPRC pourrait affecter chacun de ces processus. Par exemple, la diminution de la protéine LRPPRC altère la synthèse des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et conduit à des maladies mitochondriales multisystémiques comme le LSFC ([192](#)).

Rôle dans le métabolisme énergétique. LRPPRC joue un rôle dans l'équilibre énergétique. Il a été démontré que LRPPRC forme un complexe avec le facteur de transcription PGC-1 α ([43](#), [44](#)). Ce complexe régule l'expression de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCK) et de la glucose-6-phosphatase (G6Pase), deux enzymes indispensables pour le cycle de Cori qui consiste en une conversion du lactate en glucose dans le foie via la néoglucogenèse ([43](#), [44](#)). LRPPRC joue aussi un rôle important dans le métabolisme des lipides. Liu *et al* ont démontré que la surexpression de LRPPRC stimule la β -oxydation et favorise la réduction des triglycérides et du cholestérol circulant dans le foie *in vivo* et *in vitro* ([148](#), [149](#)). Selon ces auteurs, LRPPRC activerait la β -oxydation sans altérer les gènes impliqués directement dans ce processus, mais plutôt en augmentant l'OXPPOS. L'hypothèse proposée serait que l'activation de l'OXPPOS augmenterait les niveaux de NAD⁺, ce qui favoriserait l'oxydation des acides gras ([149](#)). De façon intéressante, la surexpression de LRPPRC améliore également la sensibilité à l'insuline via la diminution de la production des ROS et de l'activité de PKC ϵ ; et une réduction de l'inflammation dans le foie ([5](#)).

Rôle dans la mort cellulaire. Comme déjà mentionné, la surexpression de LRPPRC a été observée dans diverses tumeurs et son rôle dans le développement du cancer semble établi (249). Certaines études suggèrent que LRPPRC jouerait un rôle dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (249, 291, 297). Ainsi, l'étude de Tian *et al* démontre que la prévention de la surexpression de LRPPRC stimule les processus pro-apoptotiques dans les cellules d'adénocarcinome du poumon (249). De même, les cellules hépatiques déficientes en LRPPRC expriment des niveaux élevés des gènes pro-apoptotiques et l'absence de LRPPRC facilite l'entrée des cellules en apoptose (291). Le mécanisme sous-jacent à ces effets serait que LRPPRC augmente l'expression des gènes de survie de la famille Bcl-2, alors qu'il diminue l'expression des gènes pro-apoptotiques tel que Bax (297). LRPPRC pourrait contrôler également l'autophagie en formant un complexe avec Bcl2 et Beclin 1, empêchant ce dernier de se lier à PI3KCIII (class III phosphoinositide 3 kinase) pour induire l'autophagie (296, 297). En résumé, LRPPRC est une protéine qui favorise la survie et la prolifération cellulaire.

Mutations à l'origine du LSFC. À ce jour, deux mutations causales ont été identifiées dans la population québécoise. La première est une mutation faux-sens due au remplacement d'un nucléotide (C119→T) dans l'exon 9 du gène. Cela entraîne la substitution d'une alanine par une valine en position 354 de la protéine (A354V). Quatre-vingts quinze pour cent des patients sont homozygotes pour cette mutation. La deuxième mutation consiste en une délétion de 8 nucléotides au niveau de l'exon 35 entraînant la formation d'un codon stop à la position 1277 (C1277STOP). Cette deuxième mutation n'a été observée que chez un seul patient, un hétérozygote composé, qui possède les deux mutations A354V et C1277STOP (171). Chez les patients LSFC, la mutation A354V entraîne une diminution généralisée de 70% des niveaux de

LRPPRC ([224](#), [279](#)). Récemment, d'autres mutations du gène *LRPPRC* ont été observées ailleurs dans le monde ([192](#)). Le mécanisme par lequel ces mutations entraînent le déficit de la protéine LRPPRC reste encore inconnu, mais plusieurs hypothèses ont été émises, notamment la possibilité que ces mutations puissent rendre la protéine instable favorisant sa dégradation rapide ([112](#), [224](#)). Notamment, les concentrations d'ARNm de LRPPRC sont normales dans les cellules LSFC suggérant un problème au niveau de la dégradation (Communication personnelle par Sasarman F *et al*).

b. Déficience en COX

La mutation A354V entraîne une déficience tissu-spécifique en COX chez les patients LSFC. Cette déficience est la conséquence du défaut d'assemblage de ce complexe en raison de la diminution des ARNm et parallèlement de l'expression protéique des sous-unités COXI, COXII, COXIII, et de COXIV. Ces sous-unités sont indispensables à l'activité catalytique (COXI-III) et à la stabilité (COXIV) de COX ([278](#), [279](#)). Il en résulte que l'activité de COX est seulement à 50% de l'activité normale dans les muscles squelettiques et les fibroblastes, et à moins de 20% dans le cerveau et le foie. Par contre, l'activité de COX est presque normale dans le cœur ([167](#)). De façon intéressante, la déficience en COX est combinée à une déficience du complexe I dans les muscles squelettiques des patients LSFC ; alors que dans le cœur et le foie, les complexes I et III sont surexprimés ([225](#)). Dans les fibroblastes, seule COX est déficitaire ([225](#)). La raison de cette atteinte tissu-spécifique de la chaîne respiratoire n'a pas encore été élucidée.

Une étude sur la fonction mitochondriale a été effectuée par notre groupe sur des fibroblastes de peau de patients LSFC ([22](#)). Nos travaux montrent que les fibroblastes LSFC

présentent d'importantes anomalies mitochondriales. D'un point de vue morphologique, les mitochondries des cellules LSFC sont plus fragmentées comparativement aux cellules témoins. Ces mitochondries présentent aussi un potentiel de membrane réduit et une diminution de la phosphorylation oxydative. En outre, les fibroblastes LSFC sont plus sensibles à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Finalement, dans les fibroblastes LSFC, on observe une mort cellulaire importante prématurément par rapport aux cellules témoins en présence de concentrations élevées de palmitate (1 mM) et de lactate (10 mM). Fait intéressant, en dépit de la dysfonction mitochondriale, les fibroblastes LSFC exhibent des niveaux d'ATP similaires à ceux retrouvés dans les fibroblastes des témoins en conditions basales (22).

c. Perturbations métaboliques

Une analyse du profil métabolique a été réalisée sur le plasma des patients atteints du LSFC par notre laboratoire (247). Ainsi, comme dans la plupart des maladies mitochondriales, cette analyse révèle notamment des altérations dans le métabolisme énergétique. On observe une accumulation d'acylcarnitines chez les patients LSFC, reflétant une altération de la β -oxydation. De plus, les niveaux de lactate, de pyruvate et d'alanine sont élevés chez les patients LSFC suggérant des changements dans le métabolisme oxydatif du glucose. D'autres altérations métaboliques observées chez les patients LSFC telles que l'augmentation du β -hydroxybutyrate et de l' α -hydroxybutyrate suggère une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ et une perturbation du métabolisme des acides aminés (247). Certaines études associent l' α -hydroxybutyrate à la résistance à l'insuline concordant avec les niveaux élevés d'insuline et une diminution d'adiponectine dans le plasma LSFC (1, 69, 74, 247). Ces perturbations

métaboliques indiquent un haut risque de maladies cardiométaboliques pour les patients LSFC.

I.1.3.3. Prise en charge du LSFC

Comme la majorité des maladies mitochondriales, aucun traitement n'existe pour le LSFC. Certains produits déjà utilisés dans d'autres maladies mitochondriales tels que le Co-Q10 a été testé, mais sans effet bénéfique chez les patients LSFC (217). Le resvératrol et le NAC, connus pour leurs effets antioxydants, seraient hypothétiquement néfastes, car ils augmentent la mortalité des cellules LSFC (22). Plus récemment, la diméthylglycine a été testée chez les patients à l'hôpital Ste-Justine par les docteurs Jacques Lacroix et Grant Mitchell avec des résultats encourageants, mais ce composé demeure encore à l'étude (217). Finalement, le suivi des patients consiste spécifiquement à éviter la survenue des crises d'acidose lactique. La thérapie comprend donc une meilleure hygiène de vie pour éviter notamment les infections et une surcharge de nutriments. Ainsi, les vaccinations et un apport énergétique réparti sur plusieurs repas sont recommandés (217). Des études sur la recherche d'autres traitements sont en cours présentement. Au niveau cellulaire, une étude de notre laboratoire a dernièrement démontré qu'une combinaison de L-carnitine, du propionate et du bleu de méthylène améliorent la survie des cellules LSFC exposées à un stress nutritionnel (palmitate/lactate) (22). La L-carnitine et le propionate, en formant le propionyl-carnitine qui est un substrat anaplérotique, maintiennent la fonction du cycle de Krebs (17) et le bleu de méthylène est un accepteur d'électrons du NADH favorisant l'OXPPOS (10). Ce dernier inhibe également les caspases pro-apoptotiques pour stimuler la survie cellulaire (196). Le bleu de méthylène seul à faible concentration améliore ainsi la survie des fibroblastes LSFC (140).

Alors que la plupart des agents énumérés ci-haut ont été testés cliniquement dans d'autres maladies, l'hétérogénéité étiologique des maladies mitochondriales rend impossible le simple transfert de traitements d'une maladie à une autre. Le plus grand défi dans la recherche des thérapies demeure donc de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques. Autrement dit, il faut comprendre les causes pour traiter les conséquences. Dans la présente étude, nous visons à examiner les voies de signalisation énergétiques qui pourraient être altérées dans la maladie du LSFC afin d'identifier de meilleures cibles thérapeutiques. Nous avons étudié l'effet de la mutation du gène *LRPPRC* sur les principales voies régulatrices du métabolisme énergétique, lesquelles sont décrites ci-après.

I.2- LES MÉCANISMES D'ADAPTATION DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE : RÉGULATION MOLÉCULAIRE

L'ATP, formé à 95% dans les mitochondries, constitue l'unité monétaire universelle d'énergie libre dans l'organisme ([17](#), [259](#)). L'équilibre entre la régénération d'ATP et les besoins énergétiques est une condition vitale pour la survie cellulaire et par conséquent, plusieurs mécanismes d'adaptation existent pour faire face à un éventuel déséquilibre énergétique. Il existe dans les cellules eucaryotes une enzyme très active, l'adénylate kinase qui catalyse la réaction suivante : $2ADP \rightarrow ATP + AMP$. Ainsi, le statut énergétique de l'organisme est fonction des ratios ADP/ATP et AMP/ATP. Lorsque l'ATP est consommée plus rapidement qu'elle n'est synthétisée, la balance énergétique devient négative. Cela conduit à une augmentation des ratios AMP/ATP et ADP/ATP et à l'activation des mécanismes d'adaptation visant à rétablir l'homéostasie énergétique ([17](#), [259](#)).

Au niveau cellulaire, la régulation du métabolisme énergétique est sous contrôle des enzymes impliquées dans les voies métaboliques essentielles. Il s'agit notamment d'enzymes qui catalysent des réactions irréversibles de la glycolyse ou de la β -oxydation ([17](#), [259](#)). L'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK) constituent des points de contrôle de la glycolyse. Dans le métabolisme des acides gras, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la CPT1 sont les principaux régulateurs. Bien que ces sites soient les principaux points de régulation du métabolisme énergétique, ils ne sont pas exclusifs. Les enzymes du cycle de Krebs et les complexes mitochondriaux sont aussi des cibles de régulation. Selon les conditions, ces cibles peuvent être régulées en modifiant leur activité ou

en modulant leur expression. L'activité d'une protéine est modifiée par la liaison d'effecteurs allostériques comme l'AMP ou l'ADP, ou par modification covalente telle que la phosphorylation. Quant à la quantité de l'enzyme, elle peut être modifiée via un contrôle transcriptionnel ou traductionnel ([17](#), [259](#)). Les principales voies de signalisation énergétiques, soient AMPK et mTOR, régulent le métabolisme énergétique en agissant au niveau de ces différents sites de contrôle ([29](#), [88](#), [240](#)).

La voie AMPK. La voie de signalisation de la « protéine kinase activée par l'AMP » ou AMPK est l'une des principales voies régulatrices du métabolisme énergétique. Cette protéine a été caractérisée pour la première fois en 1973 et depuis elle est définie comme un senseur métabolique. L'AMPK comme son nom l'indique, est une kinase extrêmement sensible aux variations des ratios AMP/ATP et ADP/ATP. Elle est connue pour rétablir l'homéostasie énergétique en favorisant l'oxydation du glucose et des acides gras libres et en inhibant la synthèse des protéines ([29](#), [240](#)). L'activation de l'AMPK a été rapportée bénéfique dans différents modèles de maladies mitochondriales incluant des modèles de souris déficientes en COX ([257](#)) et les fibroblastes des patients atteints du syndrome de MERRF ([272](#)).

La voie mTOR. Depuis un peu plus de 10 ans, un autre mécanisme d'adaptation a aussi été observé. Découverte en 1994, la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) joue un rôle décisif dans la régulation de la synthèse des protéines et des lipides, entre autres ([136](#)). L'activité de mTOR est sensible au statut nutritionnel et énergétique de la cellule ([88](#)). La dérégulation de cette protéine est associée à plusieurs maladies métaboliques incluant le cancer et le diabète ([136](#), [147](#)). L'augmentation de l'activité de mTOR, observée dans le syndrome de Leigh, alimente un nouveau champ d'études dans les maladies mitochondriales ([117](#)).

Considérant le rôle important que jouent ces deux enzymes dans la régulation du métabolisme énergétique, il nous semblait pertinent de caractériser ces voies dans les cellules de patients LSFC pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie. La régulation de l'activité et les rôles de l'AMPK et de mTOR dans l'organisme sont discutés dans les sections ci-après.

I.2.1- La protéine kinase activée par AMP : AMPK

I.2.1.1. Structure et régulation de l'AMPK

a. Structure de l'AMPK

L'AMPK est un hétérotrimère composé de trois sous-unités (α , β , γ) présentes en plusieurs isoformes codées par des gènes différents (Figure 8, p. 45). Plus de 12 combinaisons hétérotrimériques $\alpha\beta\gamma$ de l'AMPK existent dans l'organisme humain. L'expression des différentes sous-unités et la formation des hétérotrimères sont tissus spécifiques et permettent à l'AMPK de jouer des rôles différents dépendamment des isoformes présents dans l'hétérotrimère ([29](#), [240](#)).

La sous-unité α constitue la sous-unité catalytique de la protéine. Elle comporte un domaine kinase N-terminal qui est activé lorsque la thréonine 172 (Thr172) est phosphorylée, un domaine d'auto-inhibition actif uniquement en absence d'AMP, ainsi qu'un domaine C-terminal d'interaction avec les sous-unités β et γ . La sous-unité α existe sous 2 isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ codées par les gènes PRKAA1 et PRKAA2, respectivement. Les hétérotrimères contenant l'isoforme $\alpha 1$ sont exclusivement cytoplasmiques alors que ceux contenant l'isoforme $\alpha 2$ ont une localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire ([29](#), [90](#), [240](#)).

Les sous-unités β et γ forment les sous-unités régulatrices de l'AMPK. La sous-unité β est représentée par deux isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ codées par les gènes PRKAB1 et PRKAB2, respectivement. Elle contient deux domaines : un domaine central appelé CBM (Carbohydrate-Binding Module) capable de lier les glucides tel que le glycogène et dont le rôle reste encore inconnu, et un domaine C-terminal responsable de l'interaction avec les sous-unités α et γ . La sous-unité γ existe en 3 isoformes ($\gamma 1$, $\gamma 2$, et $\gamma 3$) codées, de manière respective, par les gènes PRKAG1, PRKAG2, et PRKAG3. Elle contient un domaine constitué de 4 motifs CBS (Cystathionine- β -Synthase) répétés en tandem par paires (S1, S2, S3 et S4). Une paire de séquence CBS forme ce qu'on appelle le domaine Bateman. Il existe, au niveau de chaque motif CBS, un site de liaison hydrophobe capable de lier l'adénosine, l'AMP, l'ADP ou l'ATP. Sur ces quatre sites de liaison potentiels, seuls trois sites CBS (S1, S3 et S4) sont occupés par les nucléotides. Les sites S1 et S3 lient l'AMP, l'ADP et l'ATP de façon compétitive, alors que le site S4 semble lier l'AMP très étroitement en l'absence de toute compétition avec l'ADP ou l'ATP ([29](#), [90](#), [240](#)).

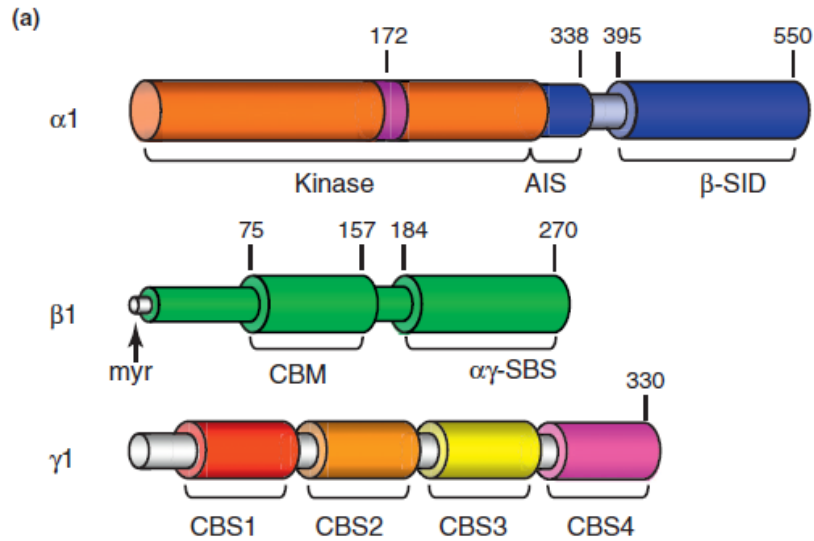


Figure 8. Structure de l'AMPK.

Figure tirée d'Oakhill J.S. et al, *Trends Endocrinol Metab*, 23, 125-32, 2013 ([188](#)). La figure représente l'organisation des domaines des sous-unités de l'AMPK. « Kinase » représente le domaine N-terminal kinase, AIS : la séquence d'autoinhibition, β -Sid : le domaine de liaison de la sous-unité β , myr : la myristoylation de la sous-unité β , CBM : domaine de liaison aux glucides, $\alpha\gamma$ -SBS : domaine de liaison des sous-unités α et γ , CBS : cystathionine- β -synthase.

b. Régulation de l'AMPK

AMPK, protéine régulée par la charge adénylate. La régulation de l'activité de l'AMPK est complexe et implique 3 mécanismes indépendants : la phosphorylation, l'inhibition de la déphosphorylation et l'activation allostérique. La liaison de l'AMP et de l'ADP favorise la phosphorylation de l'AMPK. Parallèlement, ces deux nucléotides inhibent la déphosphorylation et l'inactivation de l'AMPK par les phosphatases. Une fois

phosphorylée, l'AMPK subit une activation allostérique par l'AMP. En présence de niveaux d'ATP élevés, ces 3 mécanismes sont inhibés ([29](#), [212](#), [240](#), [276](#)).

La phosphorylation. La phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité α est un mécanisme clé à l'activation de l'AMPK. La séquence qui comprend la Thr172 est d'ailleurs très conservée et sa phosphorylation demeure importante pour l'activité de l'enzyme dans toutes les espèces. Les deux principales protéines kinases qui phosphorylent l'AMPK sont la protéine suppresseur de tumeurs (LKB1) et de la protéine kinase « calcium/calmodulindependent kinase kinase » (CaMKK) ([90](#), [95](#), [240](#)).

La LKB1 est la principale kinase phosphorylant l'AMPK. Son nom de suppresseur de tumeurs est lié à sa découverte dans le syndrome de Peutz–Jeghers où les malades déficients en LKB1 développent plusieurs tumeurs bénignes ([99](#)). Cette kinase existe sous forme d'un complexe comprenant LKB1/ STRAD/ MO25. STRAD (Ste20-Related Adaptor Protein) et MO25 (Mouse Protein 25- α) existent chacune sous deux isoformes (α et β) dans l'organisme humain. STRAD est une pseudokinase apparentée à la famille des kinases Ste20 (Sterile 20 Group Kinases). Le domaine pseudokinase de STRAD α se lie au niveau du domaine catalytique de LKB1. MO25 α se lie au domaine C-terminal de STRAD α et joue le rôle d'échafaudage stabilisant le complexe LKB1/STRAD ([94](#)). Cette liaison favorise la localisation cytoplasmique de LKB1 et augmente son activité catalytique ([12](#), [20](#)). Le complexe LKB1 est constitutivement actif. La liaison de l'AMP et de l'ADP sur la sous-unité γ de l'AMPK induit des changements conformationnels permettant la phosphorylation de l'AMPK par la LKB1. Selon certaines études, la myristoylation de la sous-unité β serait aussi indispensable à la phosphorylation de l'AMPK par la LKB1. Cependant, le mécanisme par lequel la myristoylation participe à la phosphorylation de la sous-unité α n'est pas encore bien

défini ([94](#), [187](#), [189](#)). L'activation de l'AMPK par LKB1 via la myristoylation nécessite le complexe LAMTOR1 (late endosomal/lysosomal adaptor and mitogen-activated protein kinase and mTOR activator 1) ([289](#)). LAMTOR1 est une protéine du complexe Ragulator. Elle est attachée à la membrane lysosomale par myristoylation et palmitoylation sur son site N-Terminal. Celle-ci est impliquée dans l'activation Rag-dépendant de mTOR ([283](#)). LAMTOR1 forme également un complexe avec axin et LKB1. Ainsi, il a été suggéré que LKB1 active l'AMPK au niveau du lysosome par un mécanisme semblable à celui de mTOR ([90](#), [289](#)).

Les CaMKKs (CaMKK α et CaMKK β) sont des protéines kinases activatrices des protéines de liaison à la calmoduline (CaM), les CaM kinases ([102](#)). Différentes études démontrent que la CaMKK β phosphoryle l'AMPK ([95](#), [189](#), [234](#), [270](#)). Selon Anderson et al, en réponse à des niveaux élevés de Ca²⁺ intracellulaire, le complexe Ca²⁺/CaM se lie à la CaMKK β induisant un changement conformationnel ce qui permettrait la liaison de la CaMKK β et de l'AMPK via leurs domaines kinases pour former le complexe actif Ca²⁺/CaM/CaMKK β /AMPK et permettant ainsi la phosphorylation de l'AMPK par la CaMKK ([7](#)). Comme la CaMKK β a une distribution tissulaire restreinte, l'activation de l'AMPK par cette dernière est observée particulièrement dans les neurones, les muscles, les cellules endothéliales et les lymphocytes T ([102](#), [240](#)). La régulation de l'activité de l'AMPK par la CaMKK β est indépendante de la myristoylation et de LAMTOR1 ([289](#)). Elle peut également se produire en l'absence de variation détectable en AMP, ADP ou ATP. Par contre, en raison de l'action de l'AMP et de l'ADP sur la déphosphorylation de l'AMPK, il a été suggéré que CaMKK β agirait en synergie avec ces derniers ([95](#), [270](#)).

L'inhibition de la déphosphorylation. L'activité de l'AMPK résulte d'un rapport entre la phosphorylation par des kinases et la déphosphorylation par les phosphatases (240). Des études *in vitro* suggèrent que la déphosphorylation de l'AMPK est régulée par plusieurs phosphatases de la famille PPM (PP2C) et de la famille PPP (PP1 et PP2A) (188). La déphosphorylation constitue le moyen le plus efficace d'inactiver l'AMPK. Ainsi pour que l'AMPK demeure active, l'inhibition de la déphosphorylation est indispensable. La déphosphorylation de l'AMPK est stimulée par l'ATP et inhibée par l'AMP et l'ADP (82, 188, 277). En concentrations élevées, l'AMP et l'ADP se fixent sur le site S1 de l'AMPK. Cette liaison favorise la liaison de l'ADP/AMP sur le site S3 de la sous-unité γ . Cela entraîne un changement de conformation qui protège le résidu Thr172 des protéines phosphatases, et maintient l'AMPK dans un état de phosphorylation. En concentration élevée, l'ATP peut se lier au site S3 et déstabiliser la liaison entre les sous-unités α et γ , ce qui rend le résidu Thr172 accessible aux phosphatases (220, 277).

La modification allostérique. La modification allostérique de l'AMPK est promue par la liaison de l'AMP à la sous-unité γ , ce qui augmente l'activité de l'AMPK. Comme décrit plus haut, la sous-unité γ comporte 3 sites de liaison S1, S3 et S4; le site 2 étant vacant. Or, le site S4 est en permanence lié à une molécule d'AMP. Ainsi, seuls les sites S1 et S3 sont impliqués dans l'activation allostérique. Le degré d'activation allostérique est fonction de la composition du complexe AMPK et des niveaux d'ATP. La réponse allostérique varie donc et peut multiplier par 2 à 10 fois l'activité de la protéine AMPK (29, 212, 240, 276).

AMPK, protéine activée par différents types de stress. Concrètement, l'activation de l'AMPK survient en réponse à différents stress, où on considère comme stress toute situation qui altère l'homéostasie métabolique au niveau de la cellule. Toutefois, il existe également une régulation de l'AMPK au niveau de l'organisme par l'intermédiaire de certaines cytokines et hormones ([122](#)).

Activation en réponse à une déplétion des niveaux d'ATP. L'AMPK est activée en réponse à des situations qui soit augmentent la consommation d'ATP comme l'exercice physique ([178](#), [213](#)) ou soit interfèrent avec la production d'ATP comme l'hypoxie ([159](#)), l'ischémie ([103](#), [133](#)), la privation de glucose ([135](#), [246](#), [287](#)), les défauts de la chaîne respiratoire mitochondriale ([272](#)), de même que les inhibiteurs de la glycolyse (2-déoxyglucose) ([263](#)), ou du cycle de Krebs (arsénite) ([34](#)). En outre, des découplants de la chaîne respiratoire mitochondriale comme le 2,4-dinitrophénol (DNP) activent également l'AMPK ([233](#), [267](#), [280](#)). Le DNP est capable de transporter des protons à travers la membrane interne mitochondriale, ce qui défait la force protomotrice. En conséquence, l'énergie ne peut être synthétisée sous forme d'ATP. La baisse des niveaux d'ATP provoque alors une accélération de l'oxydation des acides gras, entraînant une consommation accrue de l'oxygène et l'énergie produite est libérée sous forme de chaleur ([17](#)). L'administration du DNP augmente ainsi le ratio AMP/ATP et active subséquemment l'AMPK ([267](#)). Son utilisation en clinique a été bannie, car il provoque la fièvre et dans certains cas le décès ([123](#)), mais le DNP reste très utilisé en recherche pour les études métaboliques et a été utilisé dans la présente étude.

Activation par les nutriments. En plus de répondre aux variations de la glycémie, des études ont, par ailleurs, démontré que l'AMPK était sensible au statut lipidique de la cellule.

Notamment, une exposition aiguë aux acides gras libres active l'AMPK dans le cœur et le muscle par une voie AMP-indépendante (42, 67, 266). Cette découverte a permis de faire un lien entre l'augmentation des acides gras libres et la stimulation de la β -oxydation observée dans les muscles squelettiques (266). D'autres molécules activent aussi l'AMPK, notamment, l'apolipoprotéine ApoAI du HDL cholestérol. Ce dernier active l'AMPK dans les cellules endothéliales et stimule la phosphorylation et l'activation des NO synthétases endothéliales (64, 89). Les mécanismes par lesquels l'ApoAI agit sur AMPK n'ont pas encore été élucidés.

Activation pharmacologique. L'AMPK peut être activée par plusieurs médicaments et xénobiotiques. De nombreuses études ont démontré que l'AMPK constitue une cible privilégiée de deux grandes classes de médicaments antidiabétiques soit les biguanides (metformine et phenformine) et les thiazolidinediones (rosiglitazone, troglitazone et pioglitazone) (137, 181, 182). Selon ces études, une bonne partie des effets bénéfiques de ces médicaments comme la diminution de la néoglucogenèse, et l'augmentation de l'oxydation des acides gras passeraient par la voie LKB1/AMPK (181). D'autres composants naturels comme le resvératrol ou l'épigallocatechine gallate que l'on retrouve dans le vin rouge et le thé vert respectivement activent aussi l'AMPK (197, 288). Une étude de Hawley et coll. suggère que la plupart de ces composants stimuleraient l'activité de l'AMPK en augmentant les niveaux cellulaires de l'AMP et/ou de l'ADP (96). L'AMPK peut être aussi stimulée par le 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR) (47, 66, 242). L'AICAR est un analogue de l'adénosine. Dans la cellule, il est phosphorylé en position 5' pour donner le 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate (ZMP) (47). Le ZMP mime les effets de l'AMP sur l'AMPK *in vitro* et a été également utilisé dans notre étude.

I.2.1.2. AMPK, un senseur énergétique

Jusqu'à présent, toutes les études sur l'AMPK s'accordent pour dire que cette enzyme est un senseur du métabolisme énergétique et que son activation vise à rétablir l'homéostasie énergétique. Globalement, l'AMPK stimule les voies cataboliques productrices d'ATP (par exemple la glycolyse ou la β -oxydation) et inhibe les voies anaboliques consommatrices d'ATP (par exemple la néoglucogenèse hépatique ou la synthèse des protéines). Elle agit à court terme en contrôlant l'activité de certaines enzymes par phosphorylation et à long terme, en contrôlant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (240).

a. Régulation du métabolisme des glucides

L'AMPK régule le métabolisme glucidique en jouant principalement sur 3 processus à savoir la captation du glucose, la glycolyse et la néoglucogenèse. L'AMPK contrôle la captation du glucose au cours d'un exercice physique de manière indépendante à l'insuline. Dans le muscle squelettique, elle augmente le transport du glucose par deux mécanismes soit par l'augmentation de l'expression génique des transporteurs GLUT1 et GLUT4, et par la translocation du GLUT4 au niveau de la membrane plasmatique (37, 166, 200). Par ailleurs, l'AMPK favorise l'utilisation du glucose en inhibant la synthèse de glycogène et en stimulant la glycolyse via l'inhibition de la glycogène synthétase (30) et l'activation de la PFK2 respectivement (158, 159). Enfin, l'AMPK inhibe la production hépatique du glucose en réprimant l'expression des gènes codant pour les principales enzymes de la néoglucogenèse telles que la PK, la PEPCCK et la G6P (53, 151, 269). Des études subséquentes ont démontré que l'AMPK joue un rôle prépondérant dans ce processus et les souris déficientes pour la sous-unité AMPK α 2 développent une hyperglycémie et une intolérance au glucose associées à une augmentation de la production hépatique du glucose (8).

b. Régulation du métabolisme des lipides

L'AMPK régule le métabolisme des acides gras en inhibant la synthèse des lipides dans le foie et le tissu adipeux, alors qu'elle stimule la β -oxydation dans les muscles squelettiques et le cœur. L'AMPK favorise l'entrée des acides gras dans la cellule en stimulant la translocation du transporteur CD36 vers la membrane plasmique (254). À l'intérieur de la cellule, l'AMPK agit principalement en phosphorylant et en inactivant l'ACC (179). Cette enzyme catalyse la première réaction de synthèse des lipides, soit la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (17, 259). Le malonyl-CoA est aussi un inhibiteur allostérique de la CPT1 (164, 165). Ainsi, l'inhibition de l'ACC par l'AMPK induit, d'une part, l'inhibition de la synthèse des acides gras et augmente parallèlement l'entrée de ces derniers dans la mitochondrie pour leur oxydation. Dans les tissus lipogéniques comme le foie et le tissu adipeux, l'AMPK inhibe également l'activité du facteur de transcription SERBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) qui régule la transcription de plusieurs gènes lipogéniques tels que l'ACC, FAS (Fatty Acid Synthase), GPAT (Glycérol-3-phosphate acyltransférase) et HSL (lipase hormonosensible) (91, 104). Dans les hépatocytes, l'AMPK diminue aussi la synthèse du cholestérol via la phosphorylation et l'inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase, l'enzyme limitant la synthèse de ce dernier (91, 240, 282).

c. Régulation du métabolisme des protéines

L'AMPK inhibe la synthèse des protéines, un processus très coûteux en énergie, par l'inhibition de la voie Akt/mTOR. mTOR est un complexe multiprotéique dont la structure est détaillée dans la section II du chapitre (page 57).

mTOR phosphoryle la protéine de liaison au facteur d'initiation 4E (4EBP1), ce qui libère le facteur d'initiation à la traduction 4E et promeut la synthèse des protéines (136). L'AMPK inhibe la voie Akt/mTOR par plusieurs mécanismes. Elle phosphoryle et active la protéine TSC2 (45). Cette dernière convertit la protéine Rheb GTPase en une forme inactive incapable de stimuler l'activité d'un des complexes de mTOR, le mTORC1 (218). L'AMPK phosphoryle aussi directement mTORC1 (85). La phosphorylation de ce dernier favorise son recrutement par les protéines 14-3-3, rendant mTOR inactif (108, 136).

d. Régulation de la fonction mitochondriale

À plus long terme, l'AMPK régule le métabolisme énergétique en favorisant la biogenèse mitochondriale (121, 156). L'AMPK active PGC-1 α , un régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale par deux mécanismes. Premièrement, l'AMPK phosphoryle PGC-1 α sur la Thr-177 et la Ser-538. Cette phosphorylation favorise le recrutement de PGC-1 α à son promoteur et donc sa transcription (113). Deuxièmement, l'AMPK favorise la déacétylation de PGC-1 α par la sirtuine 1 (SIRT1). Ces deux mécanismes sont complémentaires et sont nécessaires à l'activité de PGC-1 α (24). La SIRT1 est une déacétylase dont l'activité est régulée par les niveaux de NAD⁺. Le mécanisme par lequel AMPK active SIRT1 n'est pas encore clair (26). Cependant, il a été rapporté que l'activation de l'AMPK augmente le ratio NAD⁺/NADH ce qui favorise l'activité de SIRT1 (25).

e. Autres rôles

L'équilibre entre la croissance cellulaire, la prolifération et l'apoptose est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme; et un déséquilibre conduit notamment au cancer (27). Le rôle de l'AMPK dans la régulation de ces trois processus n'est pas surprenant puisque ce

dernier est principalement activé par la protéine suppresseur de tumeurs LKB1 ([99](#), [240](#)). La croissance cellulaire et la prolifération sont des processus qui impliquent la synthèse des protéines et celle des lipides ([27](#)). Ainsi, en inhibant la synthèse des protéines (via mTOR) et des lipides (via ACC), entre autres, l'AMPK inhibe aussi la croissance cellulaire et la prolifération ([108](#)). Par ailleurs, lors d'un stress énergétique, l'AMPK phosphoryle le suppresseur de tumeurs p53 entraînant son accumulation et son activation. L'activation de p53 augmente la synthèse des inhibiteurs p21 et p27 du cycle cellulaire et provoque l'arrêt du cycle au niveau de la phase G1/S. En outre, p53 agit aussi comme un facteur de transcription qui stimule les gènes pro-apoptotiques comme Bax et inhibe les gènes anti apoptotiques comme Bcl2. Par conséquent, l'AMPK en activant p53 peut dans certaines conditions favoriser l'apoptose ([107](#), [118](#), [191](#), [207](#)).

L'AMPK régule aussi l'autophagie. Ce processus consiste en un englobement des composants cellulaires par des autophagosomes puis leur fusion avec des lysosomes pour leur dégradation ([170](#)). C'est un processus de recyclage des composantes cytoplasmiques dysfonctionnelles ou en surplus dans le but de fournir des nutriments essentiels à la survie cellulaire durant un stress énergétique. L'autophagie permet notamment de recycler les acides aminés ou les mitochondries ([170](#)). Dans ce dernier cas, on parle alors de mitophagie. L'AMPK favorise l'autophagie via l'inhibition de mTOR ou en phosphorylant et activant ULK1 (Unc-51-Like Kinase 1), une protéine kinase impliquée dans l'initiation de l'autophagie ([108](#)).

En résumé, l'AMPK est une enzyme activée principalement par l'augmentation du ratio AMP/ATP. La régulation de son activité implique plusieurs mécanismes tels que la phosphorylation/déphosphorylation ainsi qu'un contrôle allostérique notamment par des

nutriments comme les acides gras. L'AMPK maintient l'équilibre énergétique en régulant différentes voies métaboliques impliquées dans la synthèse de l'ATP notamment en stimulant le transport du glucose, la glycolyse, la β -oxydation et la biogenèse mitochondriale et en inhibant les voies coûteuses en énergie telles que la synthèse des lipides et des protéines (Figure 9, p. 55). Son rôle de régulateur du métabolisme énergétique fait de l'AMPK une cible intéressante pour l'étude de la physiopathologie des maladies mitochondriales.

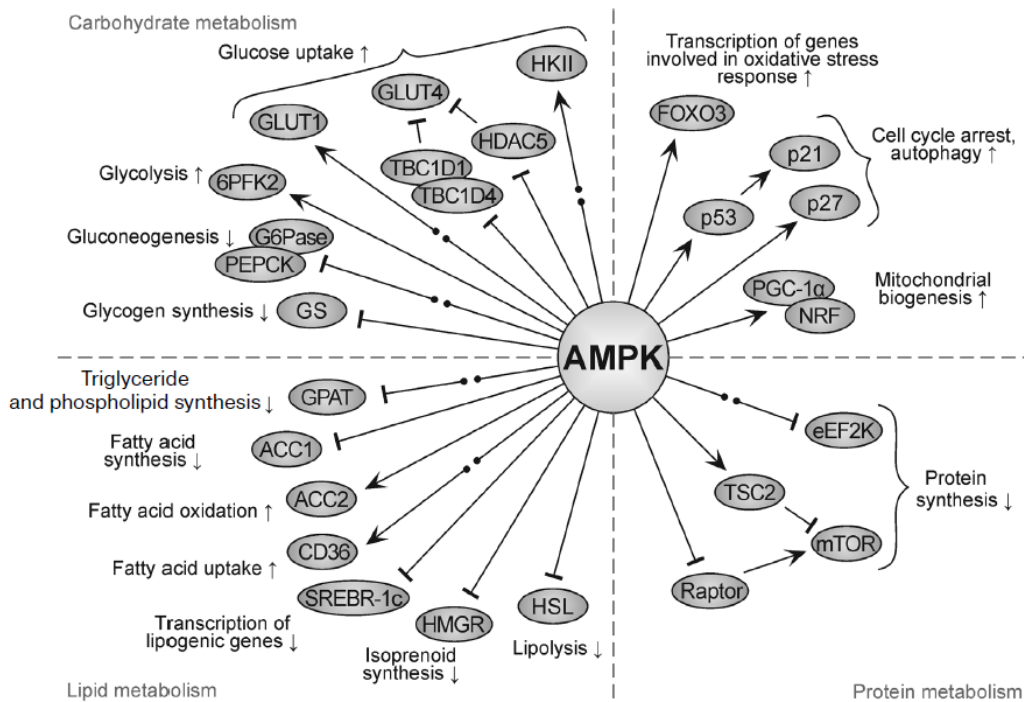


Figure 9. Les rôles de l'AMPK dans la régulation du métabolisme énergétique.

Figure tirée de Novikova D.S. et al. *Biochemistry* (Moscow), 80, 127-144, 2015 ([184](#)).

I.2.2- La « mammalian target of rapamycin » ou mTOR

I.2.2.1. Structure et régulation de mTOR

a. Structure de mTOR

mTOR est une protéine serine/thréonine kinase de 290 kDa qui appartient à la famille des phosphoinositide kinase-related kinase (PIKK). Elle existe sous forme de deux complexes fonctionnels soient mTORC1 (mTOR complex1) et mTORC2 (mTOR complex 2) constitués, respectivement, de six et de sept composantes protéiques (Figure 10, p. 60) ([88](#), [136](#), [147](#)). On retrouve en commun au sein de ces complexes mTOR qui forme la partie catalytique, mLST8 (mammalian lethal with sec-13) qui est essentiel à l'activité de mTORC2, mais dont la fonction au sein de mTORC1 reste inconnue, deptor (DEP domain containing mTOR-interacting protein) qui est un inhibiteur de mTOR, et enfin le complexe Tti1/Tel2 qui sert de stabilisateur. Les deux complexes se distinguent par la présence de Raptor (Regulatory-associated protein of mTOR), et de PRAS40 (Proline Rich Akt Substrate 40 KDa) spécifiques à mTORC1. Quant à mTORC2, il est composé de Rictor (Rapamycin-insensitive companion of TOR), de mSin1 (mammalian Stress-activated MAP Kinase-interacting protein 1), et de Protor 1/2 (Protein observed with Rictor 1 and 2). Raptor joue le rôle de régulateur de mTOR en liant différents substrats et est sensible à la rapamycine. Rictor joue un rôle similaire au sein de mTORC2, mais est insensible à la rapamycine ([88](#), [136](#), [147](#)). Classiquement, on parle donc du complexe sensible à la rapamycine pour mTORC1 et du complexe insensible à la rapamycine pour mTORC2. Toutefois, il faut rester prudent, car certaines études démontrent que mTORC2 peut être sensible à un traitement à long terme avec la rapamycine, surtout à de fortes concentrations ([222](#)). Les autres composantes notamment PRAS40 joue le rôle de

régulateur négatif pour mTORC1 en se liant à Raptor. mSin1 et Protor 1/2 régulent l'interaction de mTORC2 avec ses cibles comme SGK1 (serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1), une kinase qui régule le transport d'ions et la croissance, et augmentent ainsi son activité ([77](#), [88](#), [136](#), [147](#)).

La protéine mTOR est composée de différents domaines ([136](#), [147](#)). Premièrement, on observe un domaine N-terminal d'interactions protéine-protéine composé d'une vingtaine de motifs HEATS (Huntingtin, EF3, PP2A et TOR). Ce domaine est essentiel à la liaison de Raptor et de Rictor. Il est suivi du domaine FAT (FRAP, ATM and TRRAP) qui stabilise la conformation active du site catalytique. Enfin, la structure de mTOR s'achève par le domaine kinase. Celui-ci englobe un domaine FRB de liaison à la rapamycine (FKBP 12-Rapamycin Binding Domain), le site catalytique ainsi que le domaine FATC (FAT-C terminal). Les domaines FRB et FATC contrôlent l'accès des substrats au site catalytique et régulent son activité ([136](#), [147](#)). La rapamycine est le substrat le plus connu de mTOR ayant permis son identification, mais ses effets ne sont pas encore clairement définis. De façon intéressante, la rapamycine forme un complexe avec la protéine FKBP 12 (intracellular 12-kDa FK506-binding protein) qui lie le domaine FRB et inhibe mTOR uniquement au sein du complexe mTORC1 ([40](#), [147](#)). Il a été suggéré que le complexe FKBP 12/Rapamycine séquestre mTOR bloquant l'accessibilité des substrats au site catalytique ([222](#)).

b. Régulation de mTOR

La régulation de l'activité de mTOR diffère entre les deux complexes, mTORC1 et mTORC2. Dans la littérature, on constate un fort déséquilibre dans l'information concernant

mTORC1 et mTORC2 : la régulation de mTORC1 étant bien caractérisée alors que les connaissances sur mTORC2 restent très limitées.

Régulation de mTORC1. L'activité de mTORC1 est régulée par deux principaux mécanismes : la phosphorylation directe sur l'un de ces composants, et/ou l'inhibition de l'hétérodimère TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex) ([136](#)). Le complexe TSC1/TSC2 agit comme une GAP (GTPase Activating Protein) pour la protéine Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain) qui lie une GTP. Rheb-GTP s'associe à mTORC1 et stimule son activité ([109](#)). Une phosphorylation activatrice du complexe TSC1/TSC2 stimule son activité GAP et favorise la conversion de la forme active Rheb-GTP vers une forme inactive Rheb-GDP, ce qui bloque l'activité de mTORC1. À l'opposé, une phosphorylation inhibitrice du complexe TSC favorise la forme Rheb-GTP et l'activité de mTORC1 ([109](#), [144](#)). mTORC1 intègre les signaux des facteurs de croissance, des hormones, des nutriments incluant les acides aminés et le glucose, l'ATP, l'oxygène et le stress cellulaire ([136](#), [147](#)).

Régulation par les facteurs de croissance. Les facteurs de croissance, tel que l'insuline, se lient aux récepteurs tyrosine kinase et activent la voie des phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt et la voie de ERK 1/2 (Extracellular-signal-regulated-kinase) ([110](#), [136](#)). Akt et ERK 1/2 phosphorylent et inhibent TSC2 permettant à la Rheb-GTP d'activer mTORC1 ([136](#), [144](#)). En outre, Akt peut phosphoryler directement raptor causant sa dissociation de PRAS40 et l'activation de mTORC1 ([136](#), [219](#), [255](#)). À noter que l'activité maximale d'Akt nécessite une phosphorylation de la serine 473 par mTORC2 ([281](#)). Indirectement, mTORC2 module donc positivement l'activité de mTORC1.

Régulation par les acides aminés. Les acides aminés, à savoir la leucine et l'arginine, activent mTORC1 (11). Le mécanisme par lequel les acides aminés agissent sur l'activité de mTORC1 reste controversé. Des études suggèrent que les acides aminés stimulent le recrutement de mTORC1 au niveau du lysosome où réside son activateur Rheb. Ce recrutement lysosomal par LAMTOR1 serait indispensable à l'activation de mTORC1 par tous les stimuli (218, 283).

Régulation en réponse au stress cellulaire. En réponse à une hypoxie, une diminution d'ATP ou une diminution des niveaux du glucose; la protéine AMPK est activée (240). Il en résulte une inhibition de mTORC1 par les mécanismes énumérés précédemment soient via TSC2 (111), soit par phosphorylation directe (85).

Régulation de mTORC2. Bien que la compréhension de la régulation de mTORC2 soit limitée, certaines études suggèrent qu'elle répondrait aussi aux facteurs de croissance et donc à la voie PI3K. L'activation de la voie PI3K favoriserait l'interaction entre mTORC2 et les ribosomes, indispensable à l'activation de mTORC2 (293). Le rôle essentiel des ribosomes dans l'activation de mTORC2 est étroitement lié à la croissance cellulaire. En outre la protéine p70-S6K1 (ribosomal protein S6 kinase 1), une cible de mTORC1, est capable de phosphoryler directement certains composants de mTORC2, notamment rictor et mSIN1, et de prévenir leurs activités (150). Ainsi, par un rétrocontrôle, mTORC1 module négativement l'activité de mTORC2.

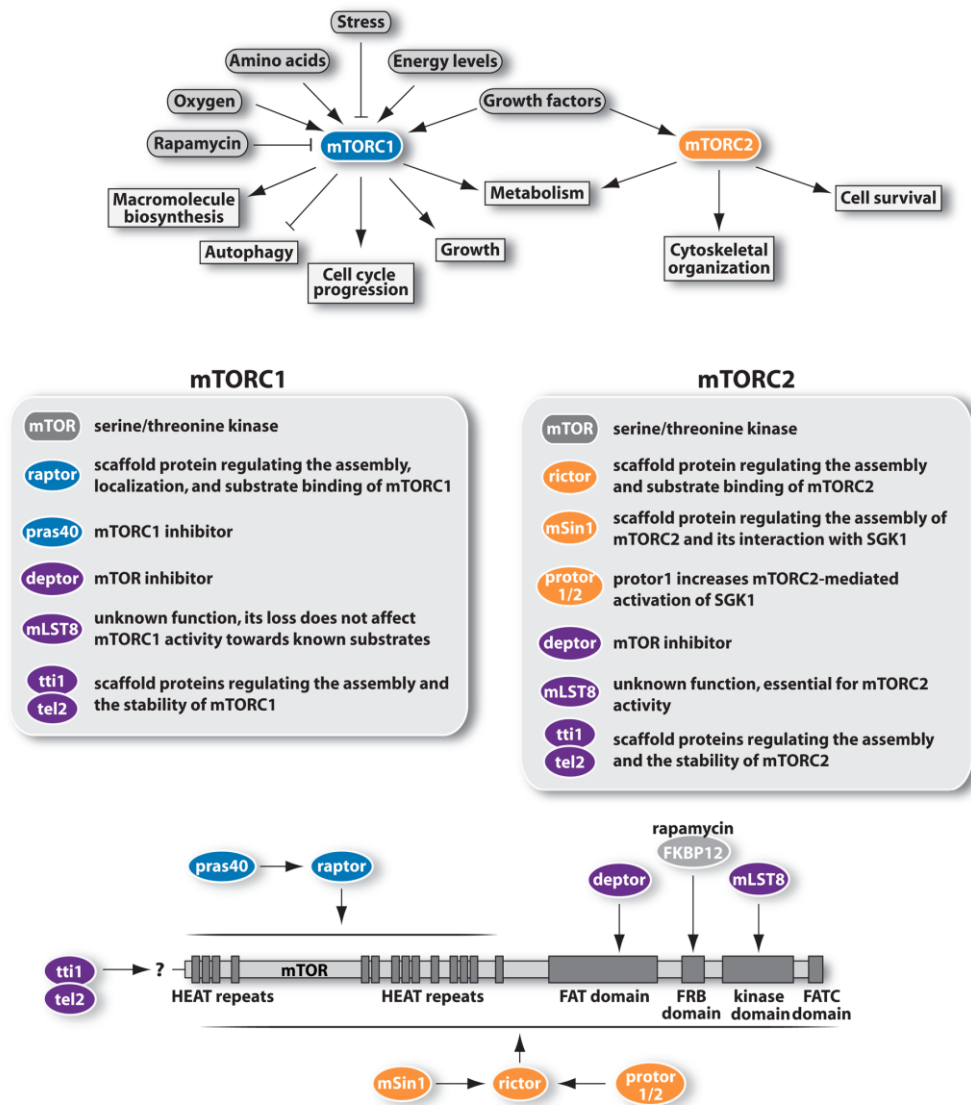


Figure 10. Structure, régulation et rôles de mTOR dans l'organisme.

Figure tirée de Laplante et al. Cell. 2012 April 13; 149(2): 274–293. mTORC1/2 : mammalian target of rapamycin complex 1/2; raptor: regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin; pras40: prolinerich Akt substrate 40kDa; rictor : rapamycin-insensitive companion of mTOR; mSin1: mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1; protor 1/2 : protein observed with rictor 1 and 2; depor: DEP domain containing mTOR-interacting protein; mLST8 : mammalian lethal with sec-13.

I.2.2.2. mTOR, un senseur énergétique

mTOR est une protéine multifonctionnelle dont les rôles diffèrent selon les complexes ([136](#), [147](#)). mTORC1 joue un rôle clé dans la synthèse protéique, la synthèse des lipides, la croissance cellulaire et la prolifération. Quant à mTORC2, il joue un rôle dans la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette de l'actine ([136](#), [147](#)). Globalement, l'activation de mTOR est donc coûteuse en énergie. D'ailleurs, elle est inhibée par l'AMPK lors d'un stress énergétique ([108](#)). Toutefois, dans certaines conditions, l'activation de mTOR favorise la synthèse d'ATP en stimulant le métabolisme du glucose (glycolyse aérobie) et en régulant la fonction mitochondriale (biogenèse mitochondriale, OXPHOS, cycle de Krebs) ([88](#)).

a. Régulation du métabolisme des glucides par mTOR

mTOR contrôle le métabolisme du glucose en jouant un rôle majeur dans la régulation de la glycolyse aérobie ou effet Warburg ([56](#), [88](#), [136](#)). L'effet Warburg est une reprogrammation métabolique qui consiste à synthétiser la majorité de l'énergie cellulaire par la glycolyse plutôt que par l'OXPHOS en dépit des conditions d'aérobie ([152](#), [256](#)). Ce phénomène a été décrit pour la première fois dans les cellules tumorales ([130](#)). Ultérieurement, il a aussi été rapporté dans les cellules immunitaires ([73](#), [75](#), [292](#)). Le taux d'ATP produit par glycolyse est généralement très faible comparativement à celui de l'OXPHOS, soit respectivement 2 molécules versus 32 molécules d'ATP (Figure 11, p. 62) ([17](#), [259](#)). Pour pallier à ce déficit, les cellules en reprogrammation augmentent leur consommation de glucose de même que leur flux glycolytique pour produire une quantité d'ATP qui peut être supérieure à celle issue de l'OXPHOS. De plus, le glucose sera converti à

plus de 85% en lactate, régénérant le NAD^+ nécessaire pour maintenir le flux glycolytique (143, 152, 252). Ainsi, comme mentionnée plus haut, la glycolyse aérobie constitue un moyen important pour les cellules de produire rapidement l'ATP indépendamment de la mitochondrie.

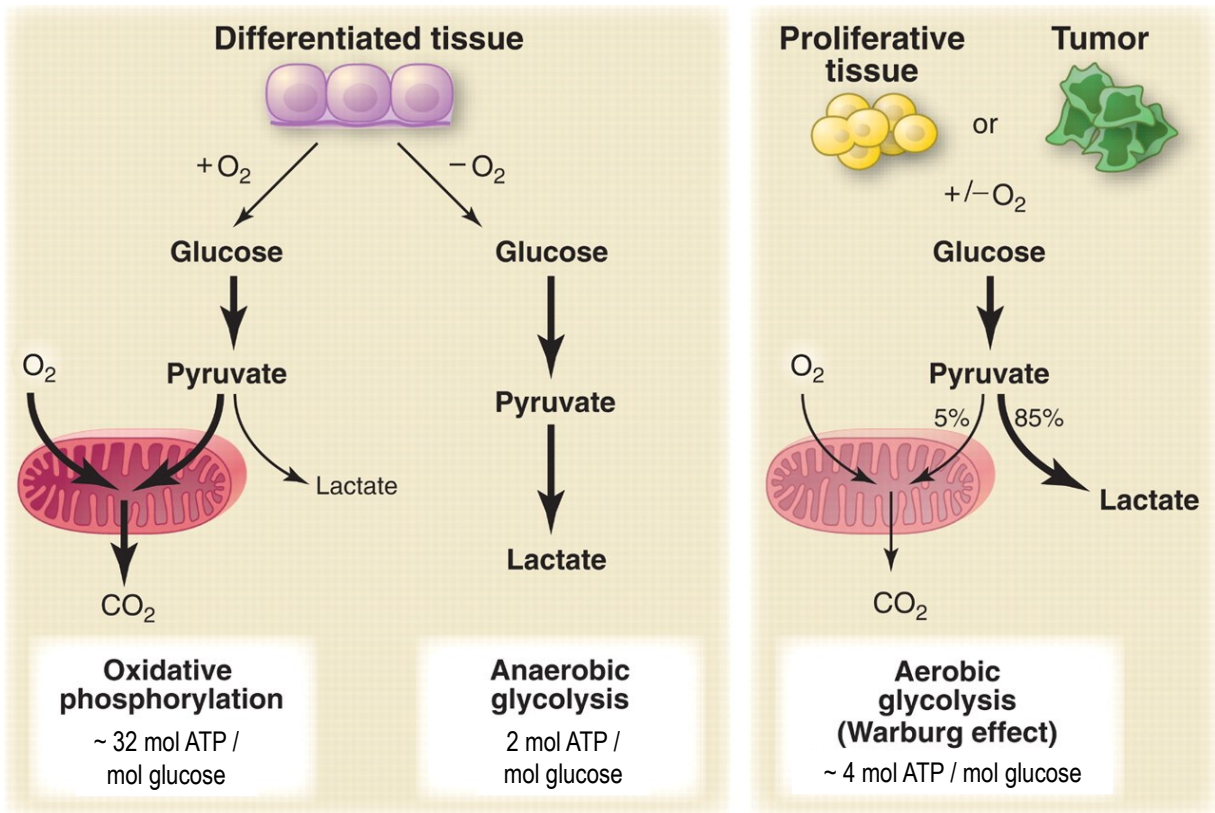


Figure 11. Taux d'ATP produit par glycolyse versus phosphorylation oxydative.

Figure adaptée de Vander Heiden et al. Science, 324, 1029-1033, 2009 (256).

Les deux complexes de mTOR participent à la régulation de la glycolyse aérobie (88, 136, 147). mTORC1 phosphoryle p70-S6K et 4E-BP1 favorisant la synthèse du facteur de

transcription HIF-1 α ([38](#), [48](#), [71](#), [100](#), [153](#)). Dans les conditions normoxiques, HIF-1 α est un facteur de transcription qui favorise l'expression, entre autres, des enzymes glycolytiques PFK et PK ([157](#), [160](#)). Il stimule aussi l'expression du transporteur du glucose GLUT1 ([36](#)), et l'expression de la LDHA qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate ([231](#), [284](#)). De plus, HIF-1 α favorise l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDHK1) ([71](#), [153](#)), un inhibiteur de la PDH1, résultant en une augmentation de la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative ([65](#), [93](#), [101](#)).

Le rôle de mTORC2 dans la glycolyse aérobie est moins bien défini. Toutefois, des recherches récentes démontrent que mTORC2, en collaboration avec mTORC1, joue un rôle central dans ce métabolisme. mTORC2 active Akt et stimule l'acétylation de FoxO ([161](#), [223](#)). Cela se traduit par une augmentation de c-Myc et donc l'augmentation des gènes codant pour les protéines qui régulent la glycolyse aérobie tels que GLUT1, HK, LDHA et PDHK1 ([56](#), [161](#), [162](#)).

La figure 12 ci-après (p. 64) illustre la régulation du métabolisme du glucose par les deux complexes de mTOR. Celle-ci tient compte principalement des cibles communes entre mTORC1 et mTORC2.

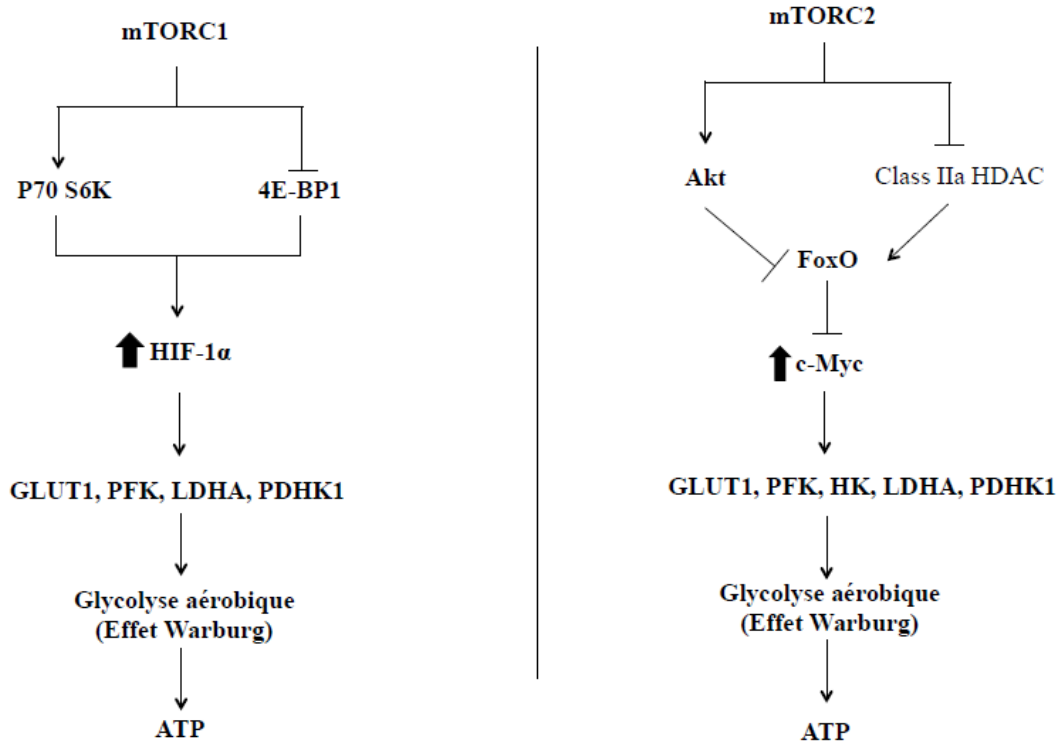


Figure 12. Schéma résumant les principales voies de régulation du métabolisme du glucose par mTOR abordées dans cette thèse.

mTORC1/2 : mammalian target of rapamycin complex 1/2; P70 S6K : Ribosomal protein S6 kinase beta-1; 4E-BP1 : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 ; HIF-1 α : Hypoxia inducible factor 1 alpha; GLUT1 : glucose transporter 1; PFK : phosphofruktokinase; LDHA : lactate déshydrogénase; PDHK : pyruvate déshydrogénase kinase 1; Akt ou protéine Protéine Kinase B; HDAC : histones désacétylase; FoxO : Forkhead box O; c-Myc : myelocytomatosis oncogene ; ATP : Adénosine triphosphate.

b. Régulation de la fonction mitochondriale par mTOR

Des études qualifient mTOR de régulateur majeur de la fonction mitochondriale, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore entièrement compris (Figure 13, p.66) ([51](#), [174](#), [175](#)). En effet, l'inhibition de mTOR affecte l'activité mitochondriale résultant en une inhibition du cycle de Krebs, une inhibition de la respiration ainsi qu'une réduction des niveaux d'ATP ([174](#)). Ceci peut paraître contradictoire puisqu'auparavant je mentionnais que mTOR favorise le métabolisme glycolytique au dépens de la phosphorylation oxydative. Le groupe de Sonenberg a démontré que mTORC1 contrôle la synthèse protéique de certaines protéines mitochondriales, à savoir le facteur de transcription mitochondrial (TFAM), le Complexe I, et le Complexe V, par l'intermédiaire de 4E-BP1. De plus, au niveau transcriptionnel, mTORC1 régule le facteur de transcription PGC1 α ([174](#), [175](#)). L'effet de mTORC1 sur PGC1 α serait médié par le régulateur transcriptionnel Ying Yang 1 (YY1) ([51](#)). mTORC1 régulerait aussi la transcription des gènes impliqués dans la régulation de l'OXPPOS et du cycle de Krebs, via le contrôle de l'expression et de l'activité du facteur de transcription ERR α (estrogen-related receptor alpha) ([35](#)).

Parallèlement à mTORC1, mTORC2 régule également la fonction mitochondriale en contrôlant le transfert des lipides et l'entrée du calcium dans cette organelle. mTORC2 est localisé au niveau du MAM, le « mitochondrial-associated ER membrane » où il joue un rôle dans le maintien de son intégrité par une voie Akt dépendante ([19](#)). Une suppression de mTORC2 cause une malformation du MAM, entraînant une augmentation du potentiel membranaire, une dérégulation de l'entrée du calcium et un défaut de production d'ATP ([19](#)).

Enfin, les deux complexes réguleraient le cycle de Krebs en stimulant l'anaplérose via leurs cibles respectives HIF-1 α et c-Myc. En effet, la stabilisation de HIF-1 α favorise

l'inhibition de l'oxydation du pyruvate qui devient ainsi disponible pour une conversion en OAA. Quant à c-Myc, celui-ci joue un rôle important dans le métabolisme de la glutamine. Il stimule la captation de la glutamine et sa transformation en glutamate en contrôlant la transcription de la GLS (76). c-Myc favorise donc l'utilisation de la glutamine comme principal substrat anaplerotique pour le maintien du flux du cycle de Krebs et pour la survie cellulaire (86, 87).

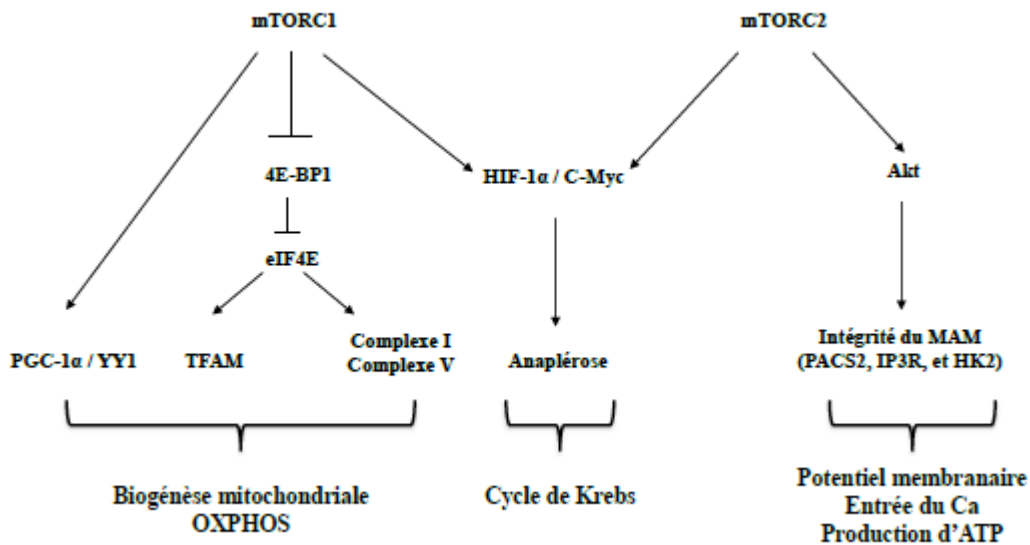


Figure 13. Schéma résumant les principales voies de régulation de la fonction mitochondriale par mTOR et abordées dans cette thèse.

mTORC1/2 : mammalian target of rapamycin complex 1/2; 4E-BP1 : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 ; HIF-1 α : Hypoxia inducible factor 1 alpha; Akt ou protéine kinase B; c-Myc : myelocytomatosis oncogene ; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha ; YY1 : Ying Yang 1; TFAM : Mitochondrial transcription factor A; MAM : mitochondrial-associated ER membrane; PACS2 :

Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein 2; IP3R : Inositol trisphosphate receptor ; HK2 : Hexokinase; ATP : Adénosine triphosphate.

En résumé, mTOR est une protéine kinase existant sous deux formes : mTORC1 et mTORC2, et sensible, entre autres, aux nutriments et à la variation des niveaux d'ATP. Son activité est régulée par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation ainsi qu'un contrôle allostérique. mTOR est un senseur énergétique qui joue un rôle primordial dans le métabolisme du glucose et la régulation de la fonction mitochondriale. Son rôle de régulateur de la reprogrammation métabolique fait de mTOR une cible intéressante pour l'étude de la physiopathologie des maladies mitochondriales.

CHAPITRE II - QUESTIONS DE RECHERCHE, HYPOTHÈSES ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE

II.1- Questions de recherche et objectif

Le LSFC est une maladie infantile avec un taux de mortalité très élevé. Il n'existe aucun traitement et malheureusement, très peu d'études portent sur cette maladie. Pourtant, comprendre la physiopathologie de celle-ci est fondamental afin de pouvoir développer des traitements. Quelles sont les conséquences de la déficience en LRPPRC sur le métabolisme énergétique ? Qu'en est-il des mécanismes d'adaptation du métabolisme énergétique lors d'un stress. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires permettra éventuellement de comprendre la physiopathologie du LSFC.

Nous avons déjà rapporté que les fibroblastes des patients LSFC ont des niveaux d'ATP inchangés malgré une dysfonction mitochondriale sévère. Toutefois, ces fibroblastes sont plus susceptibles à la mort cellulaire en réponse à une surcharge de nutriments (22). Ces données suggèrent deux hypothèses. Premièrement, en conditions basales, les cellules LSFC auraient des mécanismes de compensation leur permettant de maintenir les concentrations d'ATP en dépit de la dysfonction mitochondriale. Deuxièmement, la capacité des cellules LSFC de faire face à un excès d'acide gras est diminuée, ce qui suggère que les mécanismes de compensation pourraient régresser plus rapidement dans une situation de stress. Ainsi, **l'objectif général de mon étude est de mieux comprendre l'effet d'une mutation de LRPPRC sur le métabolisme énergétique en investiguant les mécanismes d'adaptation. On s'intéresse, en particulier, aux voies de signalisation clé régulant l'homéostasie énergétique à savoir les voies AMPK et mTOR connues pour favoriser l'OXPPOS et la glycolyse aérobie.** Ces deux voies sont de plus en plus des cibles thérapeutiques privilégiées dans les maladies mitochondriales. Quelques effets bénéfiques ont été rapportés.

En l'occurrence, l'activation de l'AMPK en réponse au stress oxydatif dans les fibroblastes de patients atteints du syndrome de MERRF augmente la glycolyse favorisant la survie cellulaire (275). En outre, l'activation de la voie AMPK/PGC-1 α a été associée à une correction de la déficience en COX, à une augmentation la biogenèse mitochondriale et une amélioration de la fonction mitochondriale dans différents modèles murins de maladies mitochondriales caractérisées par un déficit du complexe IV incluant la myopathie mitochondriale (202, 257). Quant à mTOR, son inhibition par la rapamycine dans un modèle murin du syndrome de Leigh améliore les symptômes neurologiques et augmente la survie (117).

Durant mon projet, j'ai donc voulu répondre aux questions spécifiques suivantes : La voie mTOR interviendrait-elle dans la régulation du métabolisme énergétique des cellules LSFC? L'utilisation de la rapamycine serait-elle bénéfique pour les cellules LSFC ? Existe-t-il une reprogrammation métabolique liée à la voie mTOR permettant d'assurer la survie des cellules LSFC ? L'incapacité à stimuler les mécanismes d'adaptation en réponse à un stress, comme l'activation de l'AMPK, serait-il à l'origine de la mort prématurée observée dans les fibroblastes LSFC? Le but ultime de ce projet de recherche étant d'identifier des cibles thérapeutiques chez les patients LSFC et de tester différents agents pharmacologiques existant déjà sur le marché.

II.2- Hypothèses

- 1) L'activation de la voie mTOR est essentielle au maintien des niveaux d'ATP des fibroblastes LSFC.

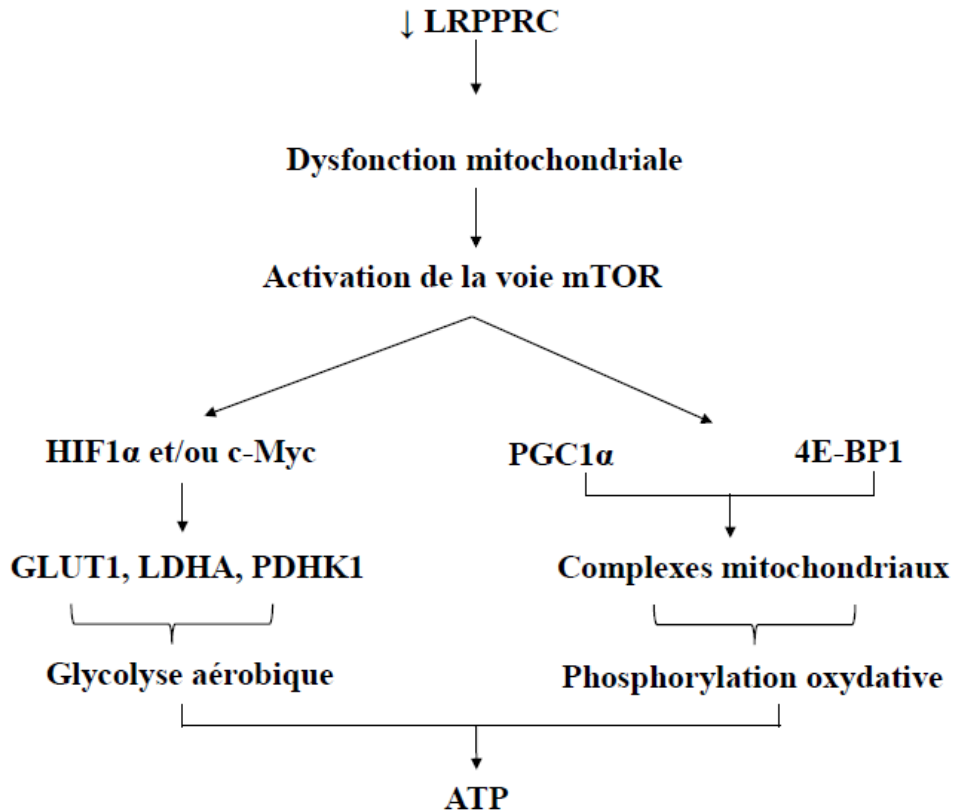


Figure 14. Schéma illustrant la première hypothèse.

La dysfonction mitochondriale associée à la déficience de LRPPRC devrait entraîner des mécanismes d'adaptation incluant l'activation de mTOR. En favorisant la glycolyse aérobie et la fonction mitochondriale, l'activation de mTOR favoriserait le maintien des niveaux

d'ATP des fibroblastes LSFC. LRPPRC : Leucine-Rich PPR-motif Containing Protein; mTOR: mamalian target of rapamycin ; HIF1 α : hypoxia inducible factor 1 alpha ; c-Myc : myelocytomatosis oncogene ; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; 4E-BP1 : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 ; GLUT1 : glucose transporteur 1; LDHA : lactate déshydrogénase; PDHK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1; ATP : Adénosine triphosphate.

2) Un défaut d'activation de la protéine AMPK contribue à la plus grande susceptibilité des fibroblastes LSFC au stress nutritionnel Palmitate/Lactate.

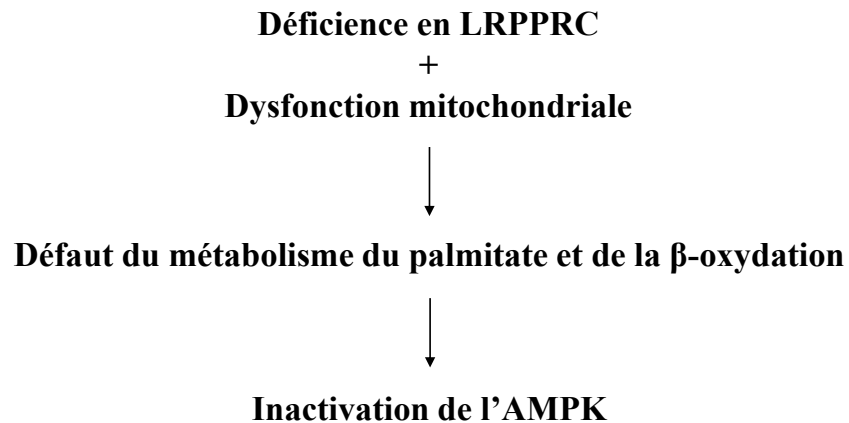


Figure 15. Schéma illustrant la deuxième hypothèse.

La dysfonction mitochondriale engendrerait un défaut du métabolisme du palmitate prévenant l'activation de l'AMPK et augmentant ainsi la susceptibilité de ces cellules au Palmitate/Lactate. LRPPRC : Leucine-Rich PPR-motif Containing Protein; AMPK : protéine kinase activée par l'AMP.

II.3- Approche expérimentale

II.3.1- Étude du rôle de mTOR dans le maintien des niveaux d'ATP

mTOR contribue à la synthèse d'ATP via son rôle dans la régulation de la glycolyse aérobie ou effet Warburg. mTORC1 et mTORC2 favorisent respectivement la synthèse de HIF-1 α et de c-Myc, deux facteurs de transcription qui stimulent l'expression des gènes glycolytiques ([136](#), [204](#)). Nous avons déterminé le rôle de mTOR en évaluant l'expression et l'activité des protéines cibles impliquées dans la glycolyse et présentées dans la Figure 16 (p. 75). La quantité de ces protéines peut être modulée de plusieurs manières notamment via une augmentation de la transcription ou de la traduction ou encore en modulant leur activité i.e. par phosphorylation. Ainsi dans cette étude, les niveaux d'expression (génique et/ou protéique) et de phosphorylation ont été utilisés.

L'expression génique et/ou protéique de HIF-1 α et c-Myc ont été évaluées. L'expression génique et/ou protéique de GLUT1, LDHA et PDHK1, des cibles glycolytiques de HIF-1 α et de c-Myc ont été aussi mesurées. Au cours de l'effet Warburg, PDHK1 inhibe l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA en phosphorylant et inhibant PDH1, l'enzyme qui catalyse cette conversion. La phosphorylation de PDH1 a donc été évaluée.

Par ailleurs, l'effet Warburg se caractérise par une importante conversion du pyruvate, issue du catabolisme du glucose, en lactate. Ainsi, celle-ci a été évaluée par l'étude de flux métaboliques. Ces flux sont mesurés grâce à l'utilisation des substrats marqués avec des isotopes stables. Dans la présente étude, nous avons utilisé le glucose marqué à l'isotope ^{13}C et sa contribution (ou l'enrichissement isotopique) à la formation du pyruvate, du lactate et de l'alanine, a été mesurée par chromatographie de gaz couplée au spectromètre de masse

(GCMS). L'enrichissement isotopique d'une molécule correspond à la proportion de molécules marquées par rapport à la somme totale des molécules. On l'exprime en pourcentage d'enrichissement molaire ou MPE selon l'équation suivante : $MPE (M_i) = \% \frac{AM_i}{AM + \sum AM_i}$. M_i : isotopomère de masse contenant i atomes marqués au ^{13}C ; $i=1,2,3,\dots, n$ atomes marqués. AM_i et AM : aires sous la courbe du pic de chaque ion d'une molécule. Les aires sous la courbe sont corrigées pour l'abondance naturelle de chacun des isotopes stables. Pour le carbone, l'abondance naturelle de l'isotope stable varie entre 1.01% et 1.15% du carbone total, ce qui reste très faible. La méthode utilisée pour nos mesures de flux a été préalablement développée pour l'étude du cœur ex vivo et adaptée par la suite pour les cellules ([208](#), [214](#)).

Dans un deuxième temps, pour valider le rôle de mTOR dans la régulation de la glycolyse; son activité a été inhibée en utilisant d'une part la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTORC1, et d'autre part le KU0063794, un inhibiteur qui cible les deux complexes ([78](#), [136](#), [243](#)). En effet, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique pour mTORC2. Une courbe dose-réponse nous a permis de définir la concentration pour la rapamycine à 100 nM. La concentration pour le KU0063794 a été déterminée en se basant sur la littérature ([78](#)). Toutes les protéines de la glycolyse évaluées en conditions basales ont été mesurées en réponse à l'inhibition de mTOR. Les niveaux d'ATP ont été également déterminés en réponse à l'inhibition de mTOR.

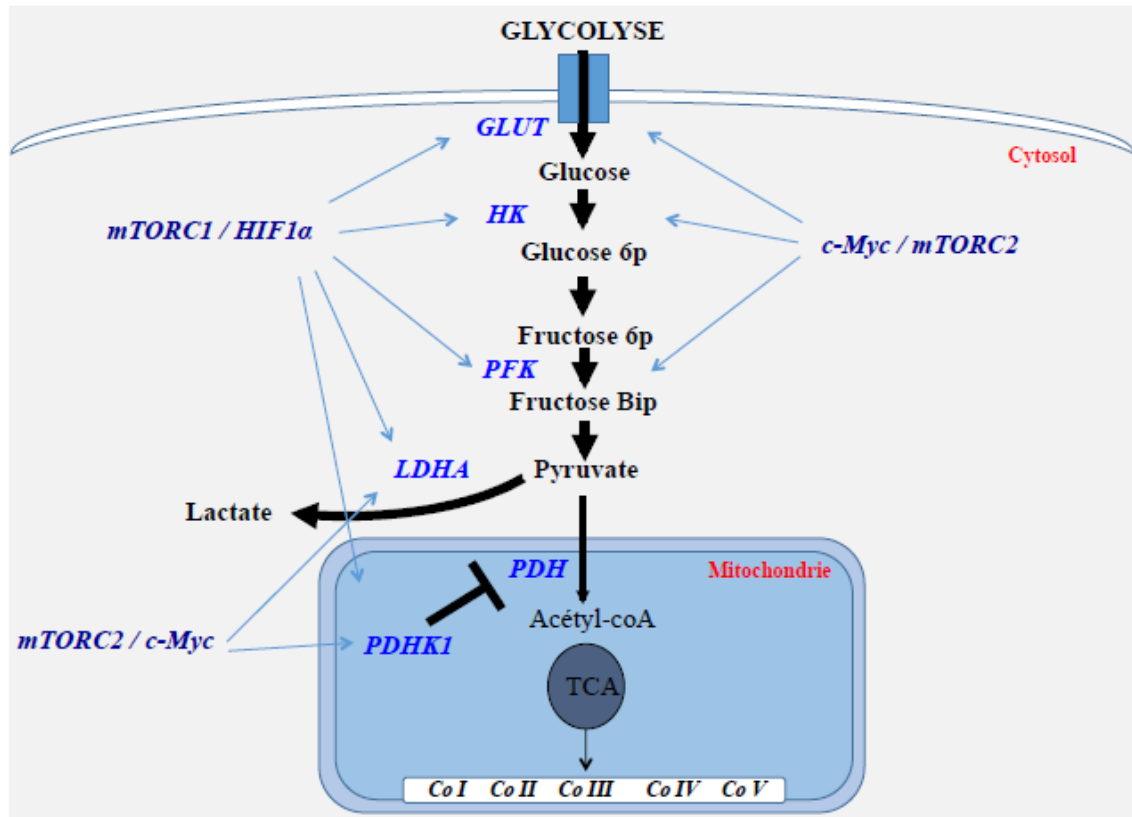


Figure 16. Protéines impliquées dans la régulation de la glycolyse aérobie évaluées dans l'étude.

mTOR C1/C2 : mammalian target of rapamycin complex 1/2; HIF1 α : hypoxia inducible factor 1 alpha ; c-Myc : myelocytomatosis oncogene ; HK : hexokinase; PFK : phosphofructokinase; GLUT1 : glucose transporter 1; LDHA : lactate déshydrogénase; PDHK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1; PDH : pyruvate déshydrogénase 1.

II.3.2- Étude des mécanismes d'activation de la protéine AMPK par le palmitate/lactate

Les patients atteints du LSFC sont très susceptibles à une perturbation de l'homéostasie énergétique. Selon les parents, les infections, l'activité physique, des repas hyper énergétiques conduisent à l'apparition des crises métaboliques ([22](#), [217](#)). Nous avons donc étudié les mécanismes d'adaptation au stress. Nous avons évalué la phosphorylation de l'AMPK et de ses cibles en réponse à différents types de stress énergétique (Figure 17, p. 78).

1- Activation de l'AMPK en réponse à différents types de stress

Incubation avec le palmitate et le lactate. Une diète riche en lipides a souvent été associée à l'apparition des crises chez les patients LSFC et celles-ci sont caractérisées par des taux élevés de lactate ([22](#), [217](#)). Dans la présente étude, les fibroblastes de témoins et de patients LSFC ont ainsi été traités avec une combinaison de 1 mM de palmitate et de 10 mM de lactate pour induire un stress nutritionnel mimant les effets d'un état de crise. Une exposition chronique (20 h et plus) au Palmitate/Lactate induit une mort précoce des cellules LSFC ([22](#)). Nous avons choisi un traitement de 4 h pour pouvoir déceler les altérations des mécanismes adaptatifs précédant la mort cellulaire.

Incubation avec le ZMP. Le ZMP est un analogue de l'AMP qui active l'AMPK. De façon intéressante, l'utilisation du ZMP mime l'augmentation des niveaux de l'AMP dans la cellule indépendamment d'une diminution des niveaux de l'ATP ([47](#), [132](#)). Cet aspect est important dans le cadre des maladies mitochondriales où la synthèse de l'ATP est déjà limitée. L'activation chronique de l'AMPK est connue pour induire la biogenèse mitochondriale ([113](#), [119](#), [120](#)). Notamment, une incubation de 48h avec 0,5 mM de ZMP est suffisante pour induire la biogenèse mitochondriale dans des cellules saines (résultats non publiés). Nous

avons donc voulu vérifier si l'activation de cette voie par le ZMP pouvait avoir des effets bénéfiques dans les cellules LSFC en réponse à un stress nutritionnel. Dans notre étude une partie des cellules a donc été traitée pendant 48h avec 0,5 mM de ZMP, préalablement à l'incubation avec la combinaison de Palmitate/lactate.

Incubation avec le 2,4-Dinitrophénol (DNP). Le DNP est un découplant classique de la chaîne respiratoire entraînant une diminution de la synthèse d'ATP ([17](#), [83](#)). Une courbe dose-réponse a été réalisée afin de déterminer la concentration optimale permettant l'activation de l'AMPK en l'absence de mort cellulaire. Suite aux expériences préliminaires, nous avons choisi une concentration de 0,1 mM de DNP avec un temps de stimulation de 10 min. Le traitement avec le DNP nous permettait de vérifier si l'AMPK est activable en réponse à une diminution d'ATP.

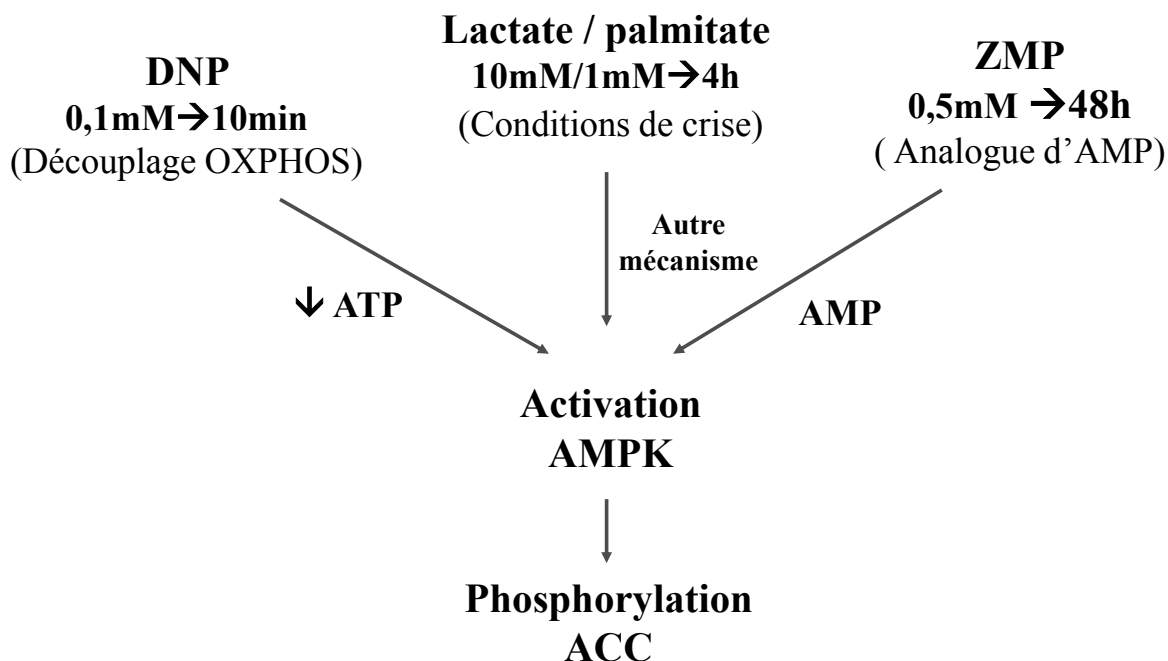


Figure 17. Activation de l'AMPK en réponse à différents types de stress.

Différentes approches ont été utilisées dans cette thèse pour activer l'AMPK. Le DNP active l'AMPK via une augmentation des niveaux de l'AMP. Le ZMP active l'AMPK en mimant les effets de l'AMP sur cette dernière. Le lactate/palmitate activerait l'AMPK par un mécanisme encore inconnu. DNP ; 2,4 dinitrophénol, ZMP : 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate, AMP : adénosine monophosphate, AMPK : protéine kinase activée par l'AMP, ACC : acétyl CoA carboxylase.

2- Mécanismes d'activation de l'AMPK en réponse au Palmitate/Lactate

Il est important de noter que le lactate seul n'induit pas de mortalité dans les cellules LSFC (22). Par conséquent, nous pensons que les effets du traitement palmitate/lactate sont principalement attribuables au palmitate. Des études démontrent qu'un traitement chronique avec le palmitate inhibe l'AMPK notamment via une induction de l'inflammation et du stress du réticulum endoplasmique (154, 163). Par contre à court terme, le palmitate active l'AMPK (67, 98, 138, 264). Cependant, les mécanismes par lesquels le palmitate active l'AMPK demeurent inconnus. Il a été proposé que le métabolisme du palmitate soit indispensable pour son action sur l'activité de l'AMPK (6, 28, 183). Par ailleurs, il est aussi proposé que l'activation du palmitate en palmitoyl-CoA engendre une consommation d'ATP qui induirait l'activation de l'AMPK (125). Pour évaluer ces deux mécanismes, nous avons procédé aux expériences suivantes :

- Incubation avec le 2-Bromopalmitate/Lactate (1mM-10mM). Le 2-bromopalmitate est un analogue du palmitate non métabolisable par la β oxydation (185). L'incubation de celui-ci avec nos cellules permet de savoir si le métabolisme intracellulaire du palmitate est requis pour l'activation de l'AMPK.

- Incubation avec du Palmitate/Lactate (1mM-10mM) : Nous avons mesuré les niveaux d'ATP en réponse au traitement palmitate/lactate.

CHAPITRE III - RÉSULTATS

III.1- Rôle de mTOR dans le métabolisme énergétique

Premier manuscrit

mTORC1 is required for expression of LRPPRC and cytochrome c oxidase but not HIF-1 α in Leigh Syndrome French Canadian Type Patient Fibroblasts

Yvette Mukaneza, Aaron Cohen, Marie-Ève Rivard, Jessica Tardif, Matthieu Ruiz, LSFC Consortium, Catherine Laprise, Christine Des Rosiers, and Lise Coderre

Manuscrit en révision:

American Journal of Physiology – Cell physiology

Contributions des auteurs: Yvette Mukaneza a contribué à l'élaboration du projet (de l'hypothèse à la mise au point des techniques), a conduit toutes les expériences moléculaires et participé aux expériences d'analyse au GCMS, interprété les données et écrit le manuscrit. Aaron Cohen, stagiaire d'été, a participé aux expériences d'immunobuvardage. Marie-Ève Rivard a conduit les expériences d'analyse au GCMS. Matthieu Ruiz a révisé le manuscrit et contribué à l'interprétation des résultats. Jessica Tardif et Catherine Laprise étaient responsables de la production de lignées cellulaires à la biobanque. Christine Des Rosiers a révisé le manuscrit et co-supervisé le projet. Lise Coderre a élaboré et supervisé tout le projet, en plus de contribuer à toutes les étapes de la réalisation de ce manuscrit.

**mTORC1 is required for expression of LRPPRC and cytochrome
c oxidase but not HIF-1 α in Leigh Syndrome French Canadian
Type Patient Fibroblasts**

Yvette Mukaneza^{1,3}, Aaron Cohen^{3,&}, Marie-Ève Rivard³, Matthieu Ruiz³, Jessica Tardif⁴,
LSFC Consortium, Catherine Laprise⁴, Christine Des Rosiers^{1,3}, and Lise Coderre^{2,3*}

¹Department of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

²Department of Medecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

³Research Centre, Montreal Heart Institute, Montréal, QC H1T 1C8, Canada

⁴Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi,
QC G7H 2B1, Canada

[&]Present address: The Alexander Grass Center for Bioengineering, The Hebrew University of
Jerusalem, Silberman 3-512, Jerusalem 91904, Israel

^{*}Corresponding author: Research Centre, Montreal Heart Institute, Montreal, QC H1T 1C8,
Canada. E-mail: lise.coderre@umontreal.ca

Running head: mTOR signaling in LSFC fibroblasts

ABSTRACT

Leigh syndrome French Canadian type (LSFC) is a mitochondrial disease caused by mutations in the LRPPRC gene leading to a reduction of cytochrome c oxidase (COX) expression reaching 50% in skin fibroblasts. We have shown that, under basal conditions, LSFC and control cells display similar ATP levels. We hypothesized that this occurs through upregulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR)-mediated metabolic reprogramming. Our results showed that, compared to controls, LSFC cells exhibited an upregulation of the mTORC1 pathway, higher levels of the hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and its downstream target, pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDHK1), a regulator of mitochondrial pyruvate dehydrogenase 1 (PDH1). Consistent with these signaling alterations, LSFC cells displayed a 40-61% increase in [U-¹³C₆]glucose contribution to pyruvate, lactate and alanine formation, as well as higher levels of the phosphorylated and inactive form of PDH1. Interestingly, inhibition of mTOR with rapamycin did not alter HIF-1 α or PDHK1 protein levels in LSFC fibroblasts. However, this treatment increased PDH1 phosphorylation in control and LSFC cells and reduced ATP levels in control cells. Rapamycin also decreased LRPPRC expression by 41% and 11% in LSFC and control cells, respectively, and selectively reduced COXIV expression in LSFC fibroblasts. Taken together, our data demonstrate the importance of mTORC1, independently of the HIF-1 α /PDHK1 axis, in maintaining LRPPRC and COX expression in LSFC cells.

KEYWORDS

Mitochondrial diseases, LSFC, LRPPRC, COX, mTORC1, rapamycin

ABBREVIATIONS

LSFC, Leigh Syndrome French Canadian type; COX, Cytochrome c Oxidase; mTOR, mechanistic Target of Rapamycin; HIF-1 α , Hypoxia Inducible Factor-1 alpha; PDHK1, Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1; PDH1, Pyruvate dehydrogenase 1; OXPHOS, Oxidative phosphorylation; LRPPRC, Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Containing; AMPK, AMP Activated Protein Kinase; ACC, Acetyl CoA Carboxylase

INTRODUCTION

Mitochondrial diseases, also known as oxidative phosphorylation (OXPHOS) disorders, are the most frequent inherited metabolic diseases globally with a prevalence rate of 1/5000 (15, 25, 27). This includes Leigh syndrome French Canadian type (LSFC), a recessive neurodegenerative infantile mitochondrial disease with an incidence of 1/2000 in the Saguenay Lac-St-Jean region of Quebec (22). LSFC is caused by mutations in the nuclear gene Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Containing (LRPPRC) (21). Most Quebec LSFC patients are homozygous for an A354V substitution causing a decrease in LRPPRC protein (21, 41). Recently, novel mutations in this gene have also been reported outside the French-Canadian population (26).

LRPPRC is a multifunctional protein that plays an important role in mRNA metabolism including post-transcriptional processes and translation (30, 32). Its deficiency produces a tissue-specific mitochondrial defect which, in fibroblasts, is characterized by an isolated respiratory chain complex IV or cytochrome c oxidase (COX) defect (32, 33, 41). LSFC fibroblasts present several mitochondrial functional abnormalities including reduced mitochondrial membrane potential, fragmentation of the mitochondrial network and impaired OXPHOS capacity (2). However, and despite these abnormalities, LSFC fibroblasts have preserved ATP levels in basal conditions suggesting the activation of a compensatory mechanism (2). For instance, upregulation of glycolysis and the concomitant production of lactate could potentially overcome the decrease in mitochondrial respiration.

Numerous signaling pathways participate in the regulation of glycolysis. Among these, the mechanistic target of rapamycin (mTOR) is a key regulator of energy metabolism. mTOR

exists as two functional complexes distinguished by their composition: mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) (19). The best characterized complex, mTORC1, is sensitive to rapamycin, regulated positively by Akt/protein kinase B (PKB), and negatively by AMP activated protein kinase (AMPK) in response to multiple signals as well as the cellular AMP/ATP ratio (17, 37). In immune and cancer cells, mTORC1 regulates aerobic glycolysis through increased expression of several proteins including the transcription factor hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and its target pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDHK1) (4, 11, 16, 34). PDHK1 phosphorylates and inhibits pyruvate dehydrogenase 1 (PDH1), the gatekeeper of glucose oxidative metabolism leading to a metabolic switch away from mitochondria and toward glycolysis (reviewed in 8, 34, 39).

Based on these findings, we hypothesize that activation of the mTORC1 pathway and its downstream targets HIF-1 α /PDHK1 could be a compensatory mechanism in LSFC fibroblasts, enabling them to maintain their ATP levels. Our data demonstrated that, contrary to our hypothesis, inhibition of mTORC1 does not alter the HIF-1 α /PDHK1 signaling pathway or ATP levels in LSFC fibroblasts. However, our study has uncovered a potential role for mTORC1 in LRPPRC and COX expression in LSFC fibroblasts.

METHODS

Cell culture Skin fibroblasts from one LSFC female patient (8 years old) homozygous for the common A354V mutation and one paired female control (5 years old) were provided by the LSFC Consortium Biobank (Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, QC, Canada). The protocol was approved by the Research Ethics Committee of the “Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSS) du Saguenay Lac-Saint-Jean” and the Montreal Heart Institute. Unless stated, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St-

Louis, MO, USA). Primary fibroblasts were grown (up to passage 18) at 37°C and 5% CO₂, in high glucose (4.5 g/L) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Mediatech, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1% MEM vitamin and non-essential amino acid solutions from Mediatech. For the labeling experiments, which require a larger number of cells, we used fibroblasts that were immortalized by transduction with a retroviral vector expressing the HPV-16 E7 gene and the catalytic component of human telomerase as described (42).

Cell treatment To examine mTORC1 function, cells were treated for 16 h with 100 nM rapamycin or vehicle (DMSO) in supplemented DMEM. On the day of the study, cells were cultured in a serum-free non-supplemented DMEM with inhibitor or vehicle, as specified, for an additional 4 h.

Gel electrophoresis and Immunoblotting Cells were washed twice with ice-cold PBS. They were then lysed in buffer containing 25 mM Tris·HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1.5% dodecyl-maltoside and protease inhibitors. Lysates were kept on ice for 30 min, and then centrifuged at 20 000 g for 30 min at 4°C to remove insoluble material. An equal amount of protein was resolved on 8% or 12% SDS-PAGE gels, as appropriate, and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1 h at 4°C. Membranes were blocked for 1 h with 5% (w/v) nonfat dry milk in TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) and then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: AMPK, phospho-AMPK (Thr 172), ACC, phospho-ACC (Ser 79), mTOR,

phospho-mTOR (Ser 2448), Akt, phospho-Akt (Ser 473), p70S6K, phospho-p70S6K (Thr 389), 4EBP1, phospho-4EBP1 (Thr 37/46), HIF-1 α , PDHK1, COXIV, and NDUFS2 from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); β -actin from Santa Cruz biotechnology (Dallas, TX, USA); PDH1, phospho-PDH1 (Ser 293) and an OXPHOS cocktail from Abcam (Toronto, ON, Canada); and a polyclonal rabbit anti-LRPPRC antibody raised against a 22 amino acid peptide having the sequence CEPPEFSEFYAQQLRKLRKLRNSS (antibody 295-313; Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA). Membranes were then incubated at room temperature for 1.5 h with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody from Cell Signaling Technology. Immunoreactive bands were then visualized using chemiluminescence and quantified using ImageJ software (<http://imagej.net/Downloads>). All protein levels were expressed in arbitrary units and normalized to β -actin, which was used as loading control. For treatment conditions, results were presented as a fold change over basal.

ATP levels ATP levels were measured with the ATPlite luminescence ATP detection assay system from Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Fibroblasts were seeded in opaque 96-well plates at a density of 10 000 cells per well. Determinations were performed in triplicate. Luminescence was quantified using a Synergy 2 Alpha Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

Cell treatments and [U - ^{13}C]*glucose labeling* The relative contribution of exogenous glucose to the formation of intracellular pyruvate, lactate and alanine was assessed using modifications of previously published methods (18, 28). For these studies, confluent immortalized fibroblasts were cultured in supplemented DMEM with the following modifications: 5 mM glucose, 0.2 mM pyruvate and 0.5 mM glutamine. On the day of the study, cells were washed with PBS and then incubated in a serum-free non-supplemented DMEM containing 5 mM [U -

$^{13}\text{C}_6$]glucose, 0.2 mM pyruvate, and 0.5 mM glutamine for 4 h. Cells were washed again with PBS and recovered in a 70% methanol buffer. Hydroxylamine was added to the supernatants to a final concentration of 25 mM. Labeled metabolites (pyruvate, lactate and alanine) were extracted with 100% methanol, sonicated (1 min), incubated at 70°C for 15 min, and then centrifuged at 14 000 rpm at 4°C for 15 min. The resulting supernatants were dried, taken up in 25 μl pyridine, incubated at 45°C for 90 min, derivatized in 100 μl of N-methyl-N-tert-butyl dimethylsilyl trifluoroacetamide (MtBSTFA) and then incubated at 90°C for 4 h. Metabolites were then measured by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Details for the measurement of ^{13}C -enrichment of lactate, pyruvate and alanine by GC-MS, as well as the equations used to calculate the relative contribution of exogenous glucose to the formation of these metabolites have been previously described (28, 29).

Statistical analysis Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software. Significant differences were determined using a paired two-tailed Student's t-test. Data were log transformed (base 10) for analysis when necessary. The results are expressed as mean \pm standard error (SEM) and significance was accepted at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Increased contribution of exogenous glucose to the formation of pyruvate lactate and alanine in LSFC fibroblasts

As previously reported (32), and compared to controls, LSFC fibroblasts displayed a reduction of LRPPRC and COXIV expression by 72% and 50% respectively (Figure 1A and 1B). Despite mitochondrial dysfunction and COX deficiency, control and LSFC fibroblasts presented similar ATP levels under basal conditions (2). We hypothesized that this was the result of increased glycolytic flux. As a first step to address this question, we evaluated the

relative contribution of exogenous glucose to pyruvate, lactate and alanine using [U-¹³C₆]glucose (Figure 1C) as described in the method section. In control fibroblasts, 32% of labeled pyruvate derives from [U-¹³C₆]glucose while the remaining comes from unlabeled substrates, most likely extracellular pyruvate (Figure 1D). Furthermore, the formation of ¹³C-labeled pyruvate, lactate and alanine from [U-¹³C₆]glucose was increased by 41%, 61%, and 52% respectively, in LSFC cells compared to control cells (p≤0.05).

Up-regulation of the Akt/ mTORC1 signaling pathway in LSFC fibroblasts

We examined the AMPK and Akt/mTORC1 signaling pathways, two master regulators of cellular energy homeostasis (4, 7, 38). As shown in Figure 2A, we did not detect any changes in the phosphorylation levels of AMPK α or of its downstream target acetyl-CoA carboxylase (ACC) in LSFC fibroblasts, which is consistent with their unchanged ATP levels levels under basal conditions. Next, we determined the activity of the Akt/mTOR signaling pathway and found an increase of total (27%; p≤0.05) and phospho-Akt (136%; p≤0.01) as well as total mTOR protein (53%; p≤0.05), but not of phospho-mTOR (Figure 2B). These changes were parallel with enhanced phosphorylation of mTORC1 downstream targets p70 S6K and 4EBP1 by 105% (p≤0.05) and 49% (p≤0.001), respectively (Figures 2C).

Pyruvate dehydrogenase 1 is inhibited in LSFC fibroblasts

In cancer cells, mTORC1-mediated metabolic remodeling has been shown to occur, in part, through activation the HIF-1 α /PDHK1 axis (8, 11). Thus, we examined whether this pathway was upregulated in LSFC cells. As illustrated in Figure 3A, the expression of HIF-1 α and PDHK1 was increased by 200% (p≤0.01) and 155% (p≤0.05), respectively, in LSFC fibroblasts. Consistent with this result, the phosphorylated and inhibited form of PDH1

(phospho-PDH1) was increased by 95% ($p \leq 0.01$) in LSFC fibroblasts compared to controls, while total PDH1 protein levels remained unchanged (Figure 3B).

Suppression of mTORC1 activity does not alter HIF-1 α and PDHK1 levels

To further our understanding of mTORC1's role, cells were treated with 100 nM rapamycin for 20 h. As anticipated, rapamycin reduced mTOR phosphorylation by 63% and 65% ($p \leq 0.01$) in LSFC and control fibroblasts, respectively (Figure 4A). This resulted in an 86% and 88% reduction ($p \leq 0.001$) of phospho-p70 S6K in control and LSFC fibroblasts (Figure 4A). It has been shown that inhibition of p70 S6K prevents its negative feedback on phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) leading to mTORC2 activation and phosphorylation of its downstream target Akt (31, 47). Consistent with this, rapamycin treatment was associated with an increase of phospho-Akt by 91% and 57% ($p \leq 0.01$) in control and LSFC fibroblasts (Figures 4A). However and contrary to our hypothesis, rapamycin did not affect HIF-1 α and PDHK1 levels either in LSFC or in control fibroblasts (Figure 4B). Furthermore, PDH1 phosphorylation increased by 41% ($p \leq 0.01$) and 42% ($p \leq 0.01$) in control and LSFC fibroblasts respectively, in response to rapamycin (Figure 4C). This occurs in the absence of any change in total PDH1 protein levels (Figures 4C). In light of these results, we determined whether mTOR inhibition alters ATP levels. As illustrated in Figure 4D, rapamycin reduced ATP levels by 15% ($p \leq 0.05$) in control cells but did not provoke any significant changes in LSFC cells. Thus, in rapamycin-treated cells ATP levels were higher in LSFC fibroblasts compared to controls ($p \leq 0.05$).

Suppression of mTORC1 activity decreases LRPPRC and COXIV expression in LSFC fibroblasts

Since mTORC1 also regulates mitochondrial protein expression (23, 24), we next investigated rapamycin effect on the expression of OXPHOS complexes. While no effects on OXPHOS complexes I, II, III and V were observed in control or LSFC fibroblasts (Figure 5A), there was a selective reduction of COXIV expression by 32% ($p \leq 0.01$) in LSFC fibroblasts (Figure 5B). Given the link between COX and LRPPRC, we examined the effect of mTORC1 inhibition on the latter. Rapamycin decreased LRPPRC expression by 11% ($p \leq 0.05$) in control fibroblasts, but by 41% ($p \leq 0.01$) in LSFC fibroblasts (Figures 5B). This supports a potential role for mTORC1 in the regulation of LRPPRC and COX expression.

DISCUSSION

LSFC is a metabolic disease characterized by decreased COX activity and mitochondrial dysfunction, in the absence of any changes in ATP levels in basal conditions (2). This suggests that activation of compensatory pathways can maintain ATP production. Our aim was to examine the remodeling of signaling pathways in LSFC fibroblasts. Our data demonstrated that LSFC fibroblasts present a series of adaptations including; increased conversion of glucose into lactate, upregulation of the mTORC1/HIF-1 α /PDHK1 signaling pathway and increased PDH1 phosphorylation. However, and contrary to expectation, inhibition of mTORC1 with rapamycin was associated with increased phospho-PDH1 in the absence of any changes in HIF-1 α /PDHK1 levels. Importantly, rapamycin treatment further decreased LRPPRC and COXIV expression in LSFC fibroblasts. To our knowledge, this is the first time that LSFC metabolic signaling alterations are reported and that mTORC1 regulation of LRPPRC levels is revealed.

Our results demonstrate that the relative contribution of exogenous glucose to intracellular pyruvate, lactate and alanine formation is enhanced in LSFC fibroblasts. This is consistent with the clinical phenotype of LSFC patients which shows elevated plasma levels of these metabolites (40). A redirection of intracellular pyruvate towards the formation of cytosolic lactate and alanine, at the expense of its mitochondrial metabolism could be due to reduced pyruvate entry into the mitochondria due to PDH1 inactivation as well as reduced COXIV levels. Another possibility is enhanced glycolysis. Interestingly, an increase in basal extra-cellular acidification rate has been reported in fibroblasts of patients with novel LRPPRC mutations (not either of the French-Canadian mutations) (26). Increased glycolysis in other models of mitochondrial diseases is also supported by indirect measurements such as higher levels of tissue glycolytic intermediates or use of inhibitors (6, 14, 26). In cancer cells, glycolysis can be upregulated as much as 200-fold allowing for rapid cell proliferation (reviewed in 7). A metabolic shift including enhanced glycolysis would enable greater cytosolic ATP production and could possibly explain the maintenance of ATP levels in LSFC fibroblasts.

Two major signaling pathways regulate glucose homeostasis, namely AMPK and mTORC1. While we did not observe any changes in AMPK activity, we found that LSFC fibroblasts display an upregulation of the mTORC1 signaling cascade. mTORC1 activation has also been reported in *Ndufs4* knockout mice, a model of Leigh Syndrome (14), as well as in cell lines from patients with primary respiratory chain diseases such as MELAS, Leigh syndrome and mitochondrial myopathy (13, 46). Thus, mTORC1 activation may represent an adaptive response to electron transport chain defects.

Our data show that LSFC cells overexpressed HIF-1 α , an important regulator of both glycolysis and glucose oxidation. Consistent with results obtained in other cells, upregulation of HIF-1 α was found to be associated with increased PDHK1 expression and phosphorylation (i.e. inactivation) of PDH1 (16, 34). Increased HIF-1 α expression may be a compensatory mechanism to palliate the mitochondrial deficit of LSFC cells. Indeed, HIF-1 α stabilization improved survival of zebrafish embryos exposed to the complex III inhibitor antimycin (12). The latter study also showed that Ndufs4 knockout mice appeared healthier after chronic hypoxia (12). In cancer cells, HIF-1 α impairs fatty acid oxidation through decreased medium and long chain acyl-CoA dehydrogenase levels (10). Interestingly, LSFC patients display elevated plasma levels of medium and long chain acyl-carnitines. The latter may be due to electron chain defect which reduces the mitochondrial capacity to metabolize acetyl-CoA produced by β -oxidation leading to increased acyl-carnitine levels (40). A reduction of both glucose and fatty oxidation (3, 16, 36) in LSFC cells may be protective in view of the reduced mitochondrial oxidative capacity (2, 26). However, while these mechanisms may compensate for mitochondrial dysfunction under basal conditions, we have previously shown that LSFC fibroblasts are more susceptible to cell death when exposed to high levels of palmitate (2) suggesting that these adaptive mechanisms may not be sufficient in cells exposed to nutrient overload.

While the mechanism underlying HIF-1 α expression in LSFC cells is unknown at present, numerous mechanisms have been shown to contribute to increased HIF-1 α levels including lactate production, activation of the mTORC1 pathway or reduction of succinate dehydrogenase activity (35, 44). Furthermore, HIF-1 α expression can be regulated at multiple levels including transcription, translation, or degradation (reviewed in 44). It is unlikely that

the increase in HIF-1 α levels is due to increased transcription since we did not observe any change in HIF-1 α mRNA levels in LSFC fibroblasts compared to controls (data not shown). Numerous studies have highlighted the role of mTORC1 in HIF-1 α activation (9, 11, 43). Surprisingly, inhibition of mTORC1 did not affect the expression of HIF-1 α or its downstream target PDHK1 in LSFC cells, suggesting that upregulation of HIF-1 α is independent of this pathway. Potentially, HIF-1 α upregulation may result from inhibition of its degradation or increased translation. It should be noted that HIF-1 α protein can be stabilized by end products of glycolysis, such as lactate and pyruvate, both of which are increased in LSFC fibroblasts (20). Further studies should explore the mechanisms underlying HIF-1 α expression in LSFC cells.

Our results demonstrated that rapamycin increased PDH1 phosphorylation both in LSFC and control cells. A similar response to mTOR inhibition has also been observed in head and neck squamous cell carcinoma cells (3); however, this effect was attributed to Akt inhibition. In contrast, we observed an increase in phospho-Akt in rapamycin-treated cells, which probably occurs through activation of its upstream kinase, mTORC2 (31, 47). Since we did not observe any change in PDHK1 expression, rapamycin treatment may lead to overexpression of another PDHK isoenzyme (45) or, alternatively, modulate the expression or activity of phosphatases (reviewed in 1).

An important finding of our study is that mTORC1 inhibition resulted in a reduction of COXIV expression in LSFC cells. Morita et al. demonstrated that mTORC1 regulates the translation of a subset of mitochondrial proteins including complexes I and V (23). Since COXIV expression is dependent on LRPPRC, we hypothesized that mTORC1 may modulate COXIV expression through changed LRPPRC levels. Consistent with our hypothesis,

rapamycin reduced LRPPRC levels in both controls and LSFC cells. To our knowledge, this is the first report of LRPPRC regulation by mTORC1. Data on the regulation of LRPPRC expression are scarce. Cooper et al. have shown reduced LRPPRC levels in PGC-1 α and PGC-1 β double-deficient cells, suggesting that LRPPRC is downstream of these proteins (5). Future studies should investigate the underlying mechanism leading to the reduction of LRPPRC and COXIV in response to rapamycin. Interestingly, rapamycin treatment also resulted in reduction of ATP levels in control but not in LSFC cells. Furthermore, and despite reduced COXIV expression, ATP levels of LSFC fibroblasts remained elevated compared to controls in rapamycin-treated cells. This strengthens the hypothesis that LSFC fibroblasts depend on extra-mitochondrial metabolism to maintain ATP levels.

Although patient fibroblasts are commonly used as a research model when studying mitochondrial diseases, the consequences of reduced LRPPRC expression is tissue-specific (33). Thus, while our data cannot be extrapolated to tissues such as brain and liver which have different energetic metabolism, they provide a better understanding of the adaptive molecular mechanisms for energy homeostasis that should be considered in future studies of mitochondrial diseases as well as important new information related to the potential role of mTORC1 in regulating LRPPRC expression.

CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated that LSFC fibroblasts display molecular adaptation, including an mTORC1-independent upregulation of the HIF-1 α /PDHK1 axis. However, mTORC1 upregulation appears to be required for LRPPRC and COXIV expression in LSFC fibroblasts. Further studies should examine in detail the effect of mTOR inhibition on LRPPRC and mitochondrial function in brain and liver, the two primary tissues affected by the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a CIHR emerging team grant on LSFC (CPG 102168), by the Fondation du Grand Défi Pierre Lavoie. YM was supported by a studentship from the Université de Montréal and Corporation de recherche et d'action sur les maladies héréditaires (COR-AMH). The funders had no role in study design, data collection and analysis, and preparation of the manuscript. We thank N. El Zir for glycolytic flux measurements. The authors are very grateful to the Association de l'Acidose Lactique, the patients and their family for their support and tissue samples.

The LSFC Consortium is a group of basic and clinical researchers dedicated to investigating the causes and developing treatments for LSFC. At the time of this study, the members were, in alphabetical order: Bruce G. Allen, Claudine Beauchamp, Chantal Bemeur, Yan Burelle, Guy Charron, Lise Coderre, Christine Des Rosiers, Sonia Deschênes, François Labarthe, Jeannine Landry, Catherine Laprise, Geneviève Lavallée, Pierre Lavoie, Sylvie Lesage, Bruno Maranda, Charles Morin, Yvette Mukaneza, John D. Rioux, Marie-Eve Rivard, Matthieu Ruiz, Eric A. Shoubridge, Jessica Tardif, Julie Thompson Legault, Nancy Tremblay, Vanessa Tremblay-Vaillancourt, Luc Vachon and Josée Villeneuve.

REFERENCES

1. **Alessi DR, Pearce LR, and Garcia-Martinez JM.** New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science signaling* 2: pe27, 2009.
2. **Buelle Y, Bemeur C, Rivard ME, Thompson Legault J, Boucher G, Morin C, Coderre L, and Des Rosiers C.** Mitochondrial vulnerability and increased susceptibility to nutrient-induced cytotoxicity in fibroblasts from leigh syndrome French canadian patients. *PLoS One* 10: e0120767, 2015.
3. **Cerniglia GJ, Dey S, Gallagher-Colombo SM, Daurio NA, Tuttle S, Busch TM, Lin A, Sun R, Esipova TV, Vinogradov SA, Denko N, Koumenis C, and Maity A.** The PI3K/Akt Pathway Regulates Oxygen Metabolism via Pyruvate Dehydrogenase (PDH)-E1alpha Phosphorylation. *Mol Cancer Ther* 14: 1928-1938, 2015.
4. **Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Martens JH, Rao NA, Aghajani-refah A, Manjeri GR, Li Y, Ifrim DC, Arts RJ, van der Veer BM, Deen PM, Logie C, O'Neill LA, Willems P, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Ng A, Joosten LA, Wijmenga C, Stunnenberg HG, Xavier RJ, and Netea MG.** mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 345: 1250684, 2014.
5. **Cooper MP, Uldry M, Kajimura S, Arany Z, and Spiegelman BM.** Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130. *J Biol Chem* 283: 31960-31967, 2008.

6. **de Andrade PB, Rubi B, Frigerio F, van den Ouweland JM, Maassen JA, and Maechler P.** Diabetes-associated mitochondrial DNA mutation A3243G impairs cellular metabolic pathways necessary for beta cell function. *Diabetologia* 49: 1816-1826, 2006.
7. **DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, and Thompson CB.** The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20, 2008.
8. **Dupuy F, Tabaries S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, Omeroglu A, Gao D, Leung S, Amir E, Clemons M, Aguilar-Mahecha A, Basik M, Vincent EE, St-Pierre J, Jones RG, and Siegel PM.** PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab* 22: 577-589, 2015.
9. **Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, and Hiraoka M.** The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J Biol Chem* 284: 5332-5342, 2009.
10. **Huang D, Li T, Li X, Zhang L, Sun L, He X, Zhong X, Jia D, Song L, Semenza GL, Gao P, and Zhang H.** HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression. *Cell reports* 8: 1930-1942, 2014.
11. **Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, and Abraham RT.** Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22: 7004-7014, 2002.
12. **Jain IH, Zazzeron L, Goli R, Alexa K, Schatzman-Bone S, Dhillon H, Goldberger O, Peng J, Shalem O, Sanjana NE, Zhang F, Goessling W, Zapol WM, and Mootha VK.** Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science* 352: 54-61, 2016.

13. **Ji K, Zheng J, Lv J, Xu J, Ji X, Luo YB, Li W, Zhao Y, and Yan C.** Skeletal muscle increases FGF21 expression in mitochondrial disorders to compensate for energy metabolic insufficiency by activating the mTOR-YY1-PGC1alpha pathway. *Free Radic Biol Med* 84: 161-170, 2015.
14. **Johnson SC, Yanos ME, Kayser EB, Quintana A, Sangesland M, Castanza A, Uhde L, Hui J, Wall VZ, Gagnidze A, Oh K, Wasko BM, Ramos FJ, Palmiter RD, Rabinovitch PS, Morgan PG, Sedensky MM, and Kaeberlein M.** mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* 342: 1524-1528, 2013.
15. **Khan NA, Govindaraj P, Meena AK, and Thangaraj K.** Mitochondrial disorders: challenges in diagnosis & treatment. *Indian J Med Res* 141: 13-26, 2015.
16. **Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, and Dang CV.** HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3: 177-185, 2006.
17. **Laplane M, and Sabatini DM.** mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293, 2012.
18. **Lauzier B, Vaillant F, Merlen C, Gelinat R, Bouchard B, Rivard ME, Labarthe F, Dolinsky VW, Dyck JR, Allen BG, Chatham JC, and Des Rosiers C.** Metabolic effects of glutamine on the heart: anaplerosis versus the hexosamine biosynthetic pathway. *J Mol Cell Cardiol* 55: 92-100, 2013.
19. **Liko D, and Hall MN.** mTOR in health and in sickness. *J Mol Med (Berl)* 93: 1061-1073, 2015.

20. **Lu H, Forbes RA, and Verma A.** Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277: 23111-23115, 2002.
21. **Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu F, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, and Lander ES.** Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 605-610, 2003.
22. **Morin C, Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, and De Braekeleer M.** Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet* 53: 488-496, 1993.
23. **Morita M, Gravel SP, Chenard V, Sikstrom K, Zheng L, Alain T, Gandin V, Avizonis D, Arguello M, Zakaria C, McLaughlan S, Nouet Y, Pause A, Pollak M, Gottlieb E, Larsson O, St-Pierre J, Topisirovic I, and Sonenberg N.** mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab* 18: 698-711, 2013.
24. **Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, and Topisirovic I.** mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 14: 473-480, 2015.
25. **Nunnari J, and Suomalainen A.** Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148: 1145-1159, 2012.
26. **Olahova M, Hardy SA, Hall J, Yarham JW, Haack TB, Wilson WC, Alston CL, He L, Aznauryan E, Brown RM, Brown GK, Morris AA, Mundy H, Broomfield A,**

- Barbosa IA, Simpson MA, Deshpande C, Moeslinger D, Koch J, Stettner GM, Bonnen PE, Prokisch H, Lightowlers RN, McFarland R, Chrzanowska-Lightowlers ZM, and Taylor RW.** LRPPRC mutations cause early-onset multisystem mitochondrial disease outside of the French-Canadian population. *Brain* 138: 3503-3519, 2015.
27. **Picard M, Wallace DC, and Burelle Y.** The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion* 30: 105-116, 2016.
28. **Riazi R, Khairallah M, Cameron JM, Pencharz PB, Des Rosiers C, and Robinson BH.** Probing pyruvate metabolism in normal and mutant fibroblast cell lines using ¹³C-labeled mass isotopomer analysis and mass spectrometry. *Mol Genet Metab* 98: 349-355, 2009.
29. **Ruiz M, Gelinis R, Vaillant F, Lauzier B, and Des Rosiers C.** Metabolic Tracing Using Stable Isotope-Labeled Substrates and Mass Spectrometry in the Perfused Mouse Heart. *Methods Enzymol* 561: 107-147, 2015.
30. **Ruzzenente B, Metodiev MD, Wredenberg A, Bratic A, Park CB, Camara Y, Milenkovic D, Zickermann V, Wibom R, Hultenby K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Brandt U, Stewart JB, Gustafsson CM, and Larsson NG.** LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J* 31: 443-456, 2012.
31. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, and Sabatini DM.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101, 2005.

32. **Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, and Shoubridge EA.** LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell* 21: 1315-1323, 2010.
33. **Sasarman F, Nishimura T, Antonicka H, Weraarpachai W, and Shoubridge EA.** Tissue-specific responses to the LRPPRC founder mutation in French Canadian Leigh Syndrome. *Hum Mol Genet* 24: 480-491, 2015.
34. **Saunier E, Benelli C, and Bortoli S.** The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents. *Int J Cancer* 138: 809-817, 2016.
35. **Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, and Gottlieb E.** Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7: 77-85, 2005.
36. **Semenza GL.** HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20: 51-56, 2010.
37. **Sengupta S, Peterson TR, and Sabatini DM.** Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40: 310-322, 2010.
38. **Steinberg GR, and Kemp BE.** AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89: 1025-1078, 2009.
39. **Tan Z, Xie N, Cui H, Moellering DR, Abraham E, Thannickal VJ, and Liu G.** Pyruvate dehydrogenase kinase 1 participates in macrophage polarization via regulating glucose metabolism. *J Immunol* 194: 6082-6089, 2015.

40. **Thompson Legault J, Strittmatter L, Tardif J, Sharma R, Tremblay-Vaillancourt V, Aubut C, Boucher G, Clish CB, Cyr D, Daneault C, Waters PJ, Vachon L, Morin C, Laprise C, Rioux JD, Mootha VK, and Des Rosiers C.** A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell reports* 13: 981-989, 2015.
41. **Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, and Robinson BH.** The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochem J* 382: 331-336, 2004.
42. **Yao J, and Shoubridge EA.** Expression and functional analysis of SURF1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 8: 2541-2549, 1999.
43. **Yasinska IM, Gibbs BF, Lall GS, and Sumbayev VV.** The HIF-1 transcription complex is essential for translational control of myeloid hematopoietic cell function by maintaining mTOR phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 71: 699-710, 2014.
44. **Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, and Powis G.** HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 33: 526-534, 2008.
45. **Yoo H, Kang JW, Lee DW, Oh SH, Lee YS, Lee EJ, and Cho J.** Pyruvate metabolism: A therapeutic opportunity in radiation-induced skin injury. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 504-510, 2015.
46. **Zhang Z, Tsukikawa M, Peng M, Polyak E, Nakamaru-Ogiso E, Ostrovsky J, McCormack S, Place E, Clarke C, Reiner G, McCormick E, Rappaport E, Haas R,**

Baur JA, and Falk MJ. Primary respiratory chain disease causes tissue-specific dysregulation of the global transcriptome and nutrient-sensing signaling network. *PLoS One* 8: e69282, 2013.

47. **Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, and Hall MN.** Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144: 757-768, 2011.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 Higher contribution of exogenous glucose to pyruvate formation in LSFC fibroblasts.

Immunoblot and densitometric analysis of **(A)** LRPPRC (n=12) **and B** COXIV (n=9) protein levels in primary fibroblasts from LSFC and control donors **(C, D)** Immortalized control and LSFC fibroblasts were incubated with 5 mM [U-¹³C₆]glucose, 0.2 mM pyruvate and 0.5 mM glutamine for 4 h in serum-free DMEM and the relative contribution of glucose to the formation of pyruvate, lactate and alanine was analyzed by GC-MS (n=7). Results represent the mean ± SEM of n independent experiments. Difference between control and LSFC cells was assessed with a paired Student's *t*-test. *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001.

Figure 2 Up-regulation of the Akt/mTORC1 signaling pathway in LSFC fibroblasts.

(A) AMPK activity of primary fibroblasts from control and LSFC donors was assessed by immunoblot and densitometric analysis of total and/or phosphorylated levels of AMPK (n=7) and its downstream target ACC (n=6). **(B and C)** Activity of the mTORC1 signaling pathway in control and LSFC primary fibroblasts was assessed by immunoblot and densitometric analysis of total and phosphorylated levels of Akt (n=5), mTOR (n=9), and their downstream targets p70 S6K (n=5) and 4E-BP1 (n=8). Results represent the mean ± SEM of n independent experiments. Difference between control and LSFC cells was assessed with a paired Student's *t*-test. *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001.

Figure 3 Pyruvate dehydrogenase 1 is inhibited in LSFC fibroblasts.

Immunoblot and densitometric analysis of total and/or phosphorylated levels of (A) HIF-1 α (n=5), PDHK1 (n=5), and (B) PDH1 (n=4) in primary fibroblasts from control and LSFC donors. Results represent the mean \pm SEM of n independent experiments. Difference between control and LSFC cells was assessed with a paired Student's *t*-test. *p \leq 0.05; **p \leq 0.01.

Figure 4 Suppression of mTORC1 activity does not alter HIF-1 α and PDHK1 levels

Primary fibroblasts from control and LSFC donors were treated for 16 h with 100 nM rapamycin or vehicle (DMSO) in supplemented DMEM. On the day of the study, cells were cultured in a serum-free non-supplemented DMEM, with inhibitor or vehicle as indicated, for an additional 4 h. (A) Suppression of mTORC1 activity was confirmed by immunoblot and densitometric analysis of phosphorylated levels of mTOR (n=10), p70 S6K (n=10), and Akt (n=4). (B) Immunoblot and densitometric analysis of total levels of HIF-1 α (n=7) and PDHK1 (n=8), and (C) phosphorylated PDH1 (n=7) in response to rapamycin treatment. (D) Primary fibroblasts were cultured with inhibitor or vehicle, as indicated, in opaque 96 well plates at a density of 10 000 cells per well in triplicate. Cellular ATP levels were measured with the ATPlite luminescence ATP detection assay system (n=4). Results represent the mean \pm SEM of n independent experiments. Difference between baseline and rapamycin treatment was assessed with a paired Student's *t*-test. *p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001.

Figure 5 Suppression of mTORC1 activity decreases LRPPRC and COX expression in LSFC fibroblasts.

Primary fibroblasts from control and LSFC donors were treated for 16 h with 100 nM rapamycin, or vehicle (DMSO) in supplemented DMEM. On the day of the study, cells were

cultured in a serum-free non-supplemented DMEM, with inhibitor or vehicle as indicated for an additional 4 h. **(A)** Immunoblot and densitometric analysis of mitochondrial complex levels (NDFUS2 (n=5), SDHB (n=3), UQCRC2 (n=4), and ATP5A (n=5) in response to rapamycin treatment. **(B)** Immunoblot and densitometric analysis of LRPPRC (n=8) and COXIV (n=11) content in response to rapamycin treatment. Results represent the mean \pm SEM of n independent experiments. Difference between baseline and rapamycin treatment was assessed with a paired Student's *t*-test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

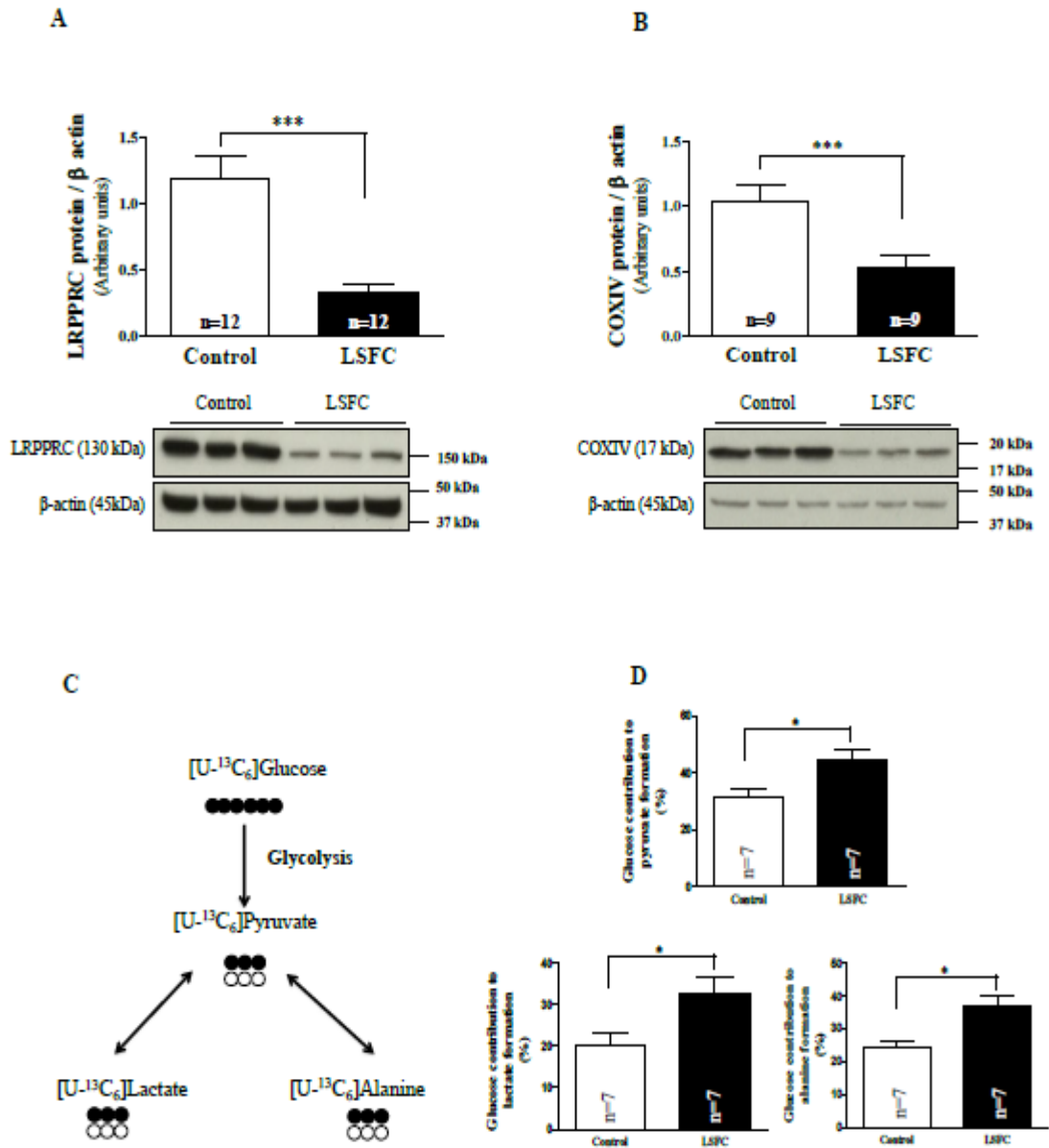


Figure 1

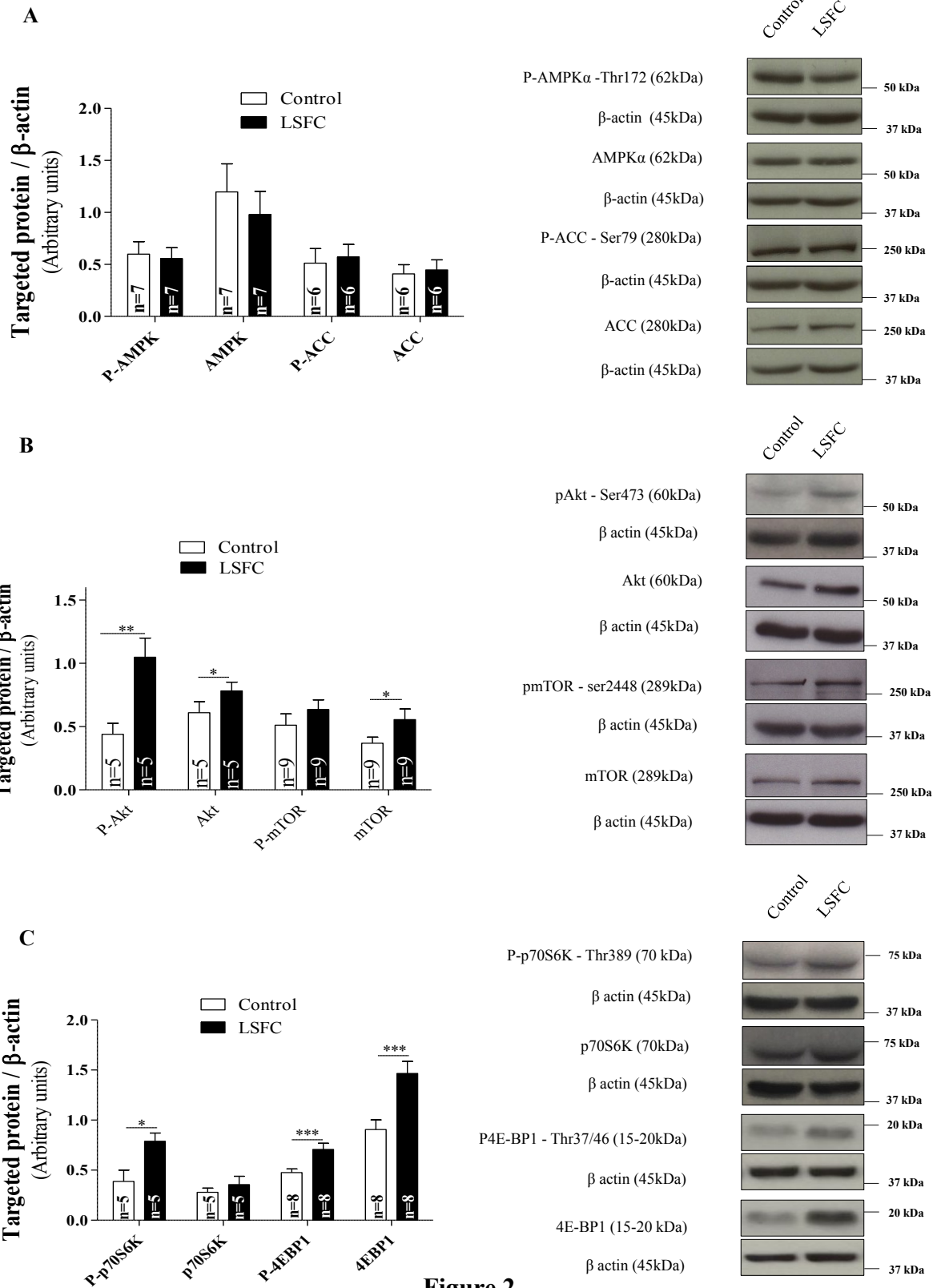


Figure 2

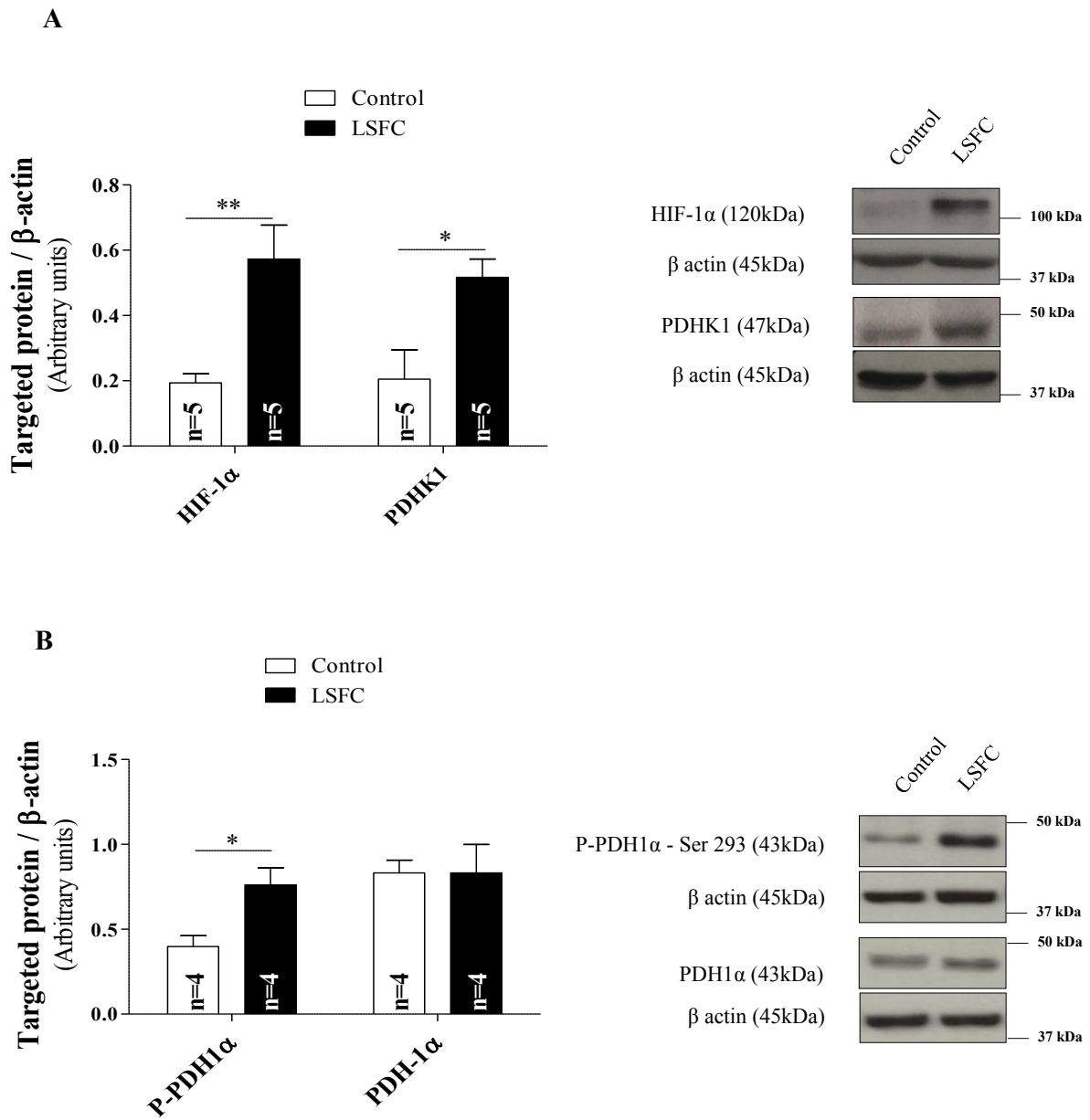
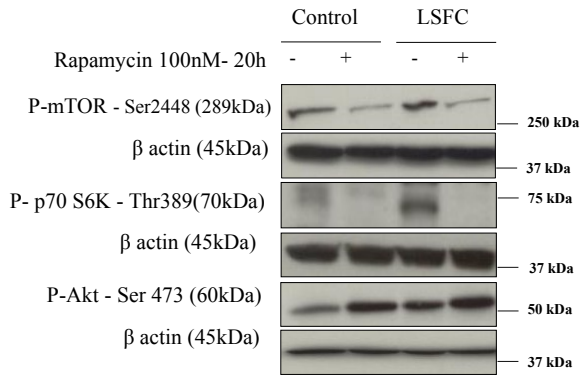
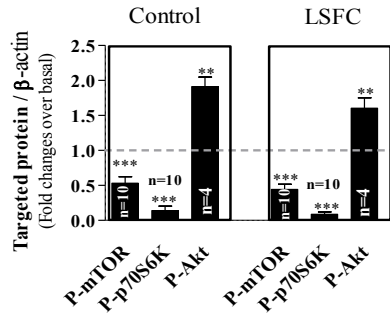
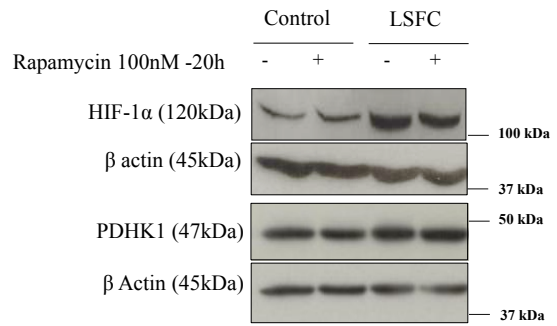
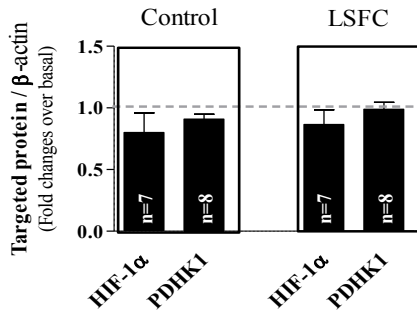


Figure 3

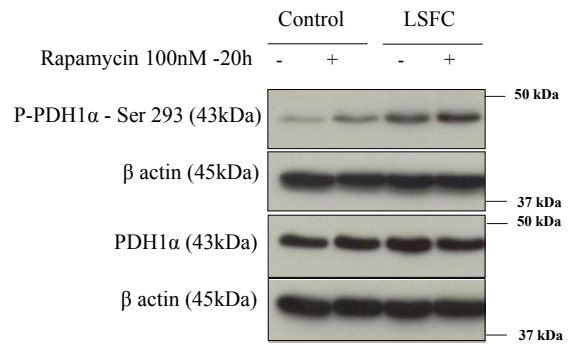
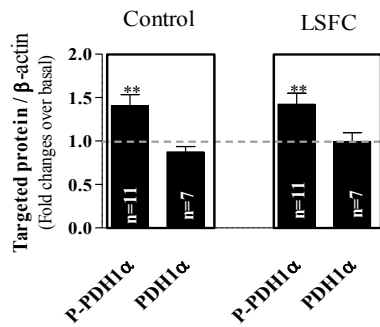
A



B



C



D

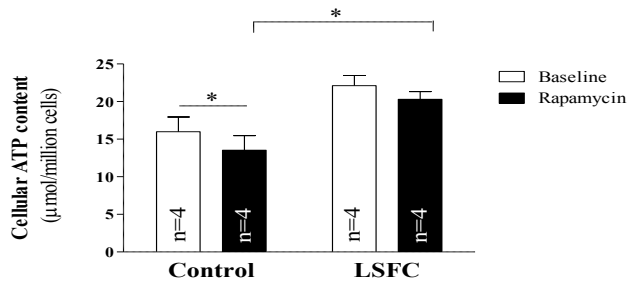
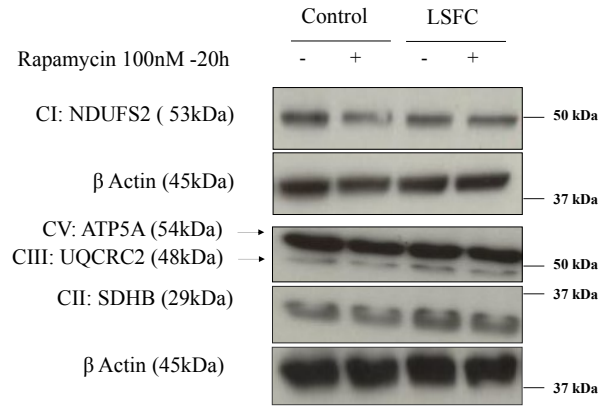
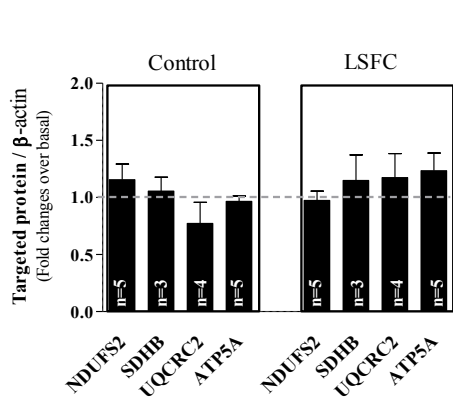


Figure 4

A



B

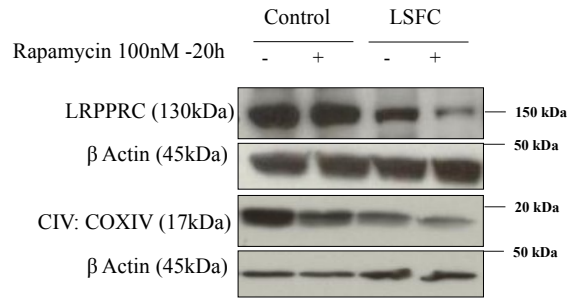
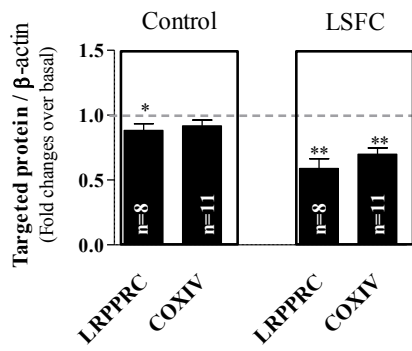


Figure 5

III.2- Étude de la voie de l'AMPK en réponse au stress nutritionnel

Deuxième manuscrit

Mutation of leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein (LRPPRC) leads to impaired AMPK regulation in Leigh Syndrome French Canadian type (LSFC) fibroblasts

Yvette Mukaneza, Christine Des Rosiers, and Lise Coderre

Manuscrit en préparation

Contributions des auteurs: Yvette Mukaneza a contribué à l'élaboration du projet (de l'hypothèse à la mise au point des techniques), a conduit toutes les expériences, interprété les données et écrit le manuscrit. Christine Des Rosiers a révisé le manuscrit et co-supervisé le projet. Lise Coderre a élaboré et supervisé tout le projet, en plus de contribuer à toutes les étapes de la réalisation de ce manuscrit.

Mutation of leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein (LRPPRC) leads to impaired AMPK regulation in Leigh Syndrome French Canadian type (LSFC) fibroblasts

Yvette Mukaneza^{1,3}, LSFC Consortium, Christine Des Rosiers^{1,3}, and Lise Coderre^{2,3*}

¹Departement of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

²Departement of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

³Research Centre, Montreal Heart Institute, Montréal, QC H1T 1C8, Canada

*Corresponding author: Research Centre, Montreal Heart Institute, Montreal, QC H1T 1C8, Canada. E-mail: lise.coderre@umontreal.ca

Keywords: LRPPRC, LSFC, mitochondrial dysfunction, AMPK, Palmitate

Abbreviations: OXPHOS, Oxidative phosphorylation; LSFC, Leigh Syndrome French Canadian type; LRPPRC, Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Containing; COX, Cytochrome c Oxidase; AMPK, AMP Activated Protein Kinase; ACC, Acetyl CoA Carboxylase; SIRT1, sirtuin 1

Abstract

LSFC is a rare infantile mitochondrial disease caused by mutations in the *LRPPRC* gene. This leads to a decrease in the LRPPRC protein and the mitochondrial respiratory chain enzyme cytochrome c oxidase (COX). We previously demonstrated that LSFC skin fibroblasts are more susceptible to cell death in response to 1 mM palmitate and 10 mM lactate (palmitate/lactate). We hypothesized that this might be due to alterations in energy- and nutrient- signaling pathways. Thus, we investigate the response of LSFC fibroblasts to various stresses. Our data show that, in control cells, 4h exposure to palmitate/lactate increases AMPK phosphorylation as well as the expression of SIRT1, LRPPRC and COXIV. To further explore AMPK regulation, cells were pretreated with 0.5 mM ZMP, an AMP analog, for 48h before palmitate/lactate treatment. Our results show that, in control cells, pretreatment with ZMP further increased AMPK activation and SIRT1, LRPPRC and COXIV expression in control cells. All these effects were abolished in LSFC cells. Further studies demonstrated that palmitate/lactate did not affect total ATP levels, while AMPK is activated in response to 2,4-dinitrophenol, an uncoupler of oxidative phosphorylation, in both control and LSFC fibroblasts. Moreover, using a non-metabolizable analogue of palmitate, 2-bromopalmitate/lactate failed to activate AMPK both in control and LSFC cells. In conclusion, LSFC cells showed impaired AMPK activation which is specific to palmitate/lactate and palmitate metabolism is probably required for AMPK activation.

Introduction

LRPPRC, also called LRP130, is a leucine-rich protein belonging to the pentatricopeptide repeat family and encoded by the nuclear LRPPRC gene. This family of protein plays key roles in RNA stability, editing, splicing, processing and translation [1-4]. Mutations in LRPPRC have been associated with mitochondrial disorders [5, 6]. The A354V mutation causes Leigh syndrome French Canadian type (LSFC), and was isolated in Saguenay Lac-Saint-Jean, a northern region of Quebec, Canada [5, 7]. LSFC is an infantile neurodegenerative disease characterized by a decrease of LRPPRC protein and a tissue-specific reduction of the cytochrome c oxidase (COX) in brain and liver (80-90%), and to a lesser extent in skeletal muscle and skin fibroblasts (50%) [4, 7-12]. In Quebec, the mortality rate of LSFC patients is about 80% due to metabolic «lactic acidosis» crisis that occur, according to parents, during stressful situations such as infections or high fat diet [7, 8, 13]. We hypothesized that the decrease in mitochondrial function may limit the ability of LSFC cells to respond to various stresses including nutrient overload. Supporting this hypothesis, we have shown that LSFC fibroblasts are more susceptible to cell death when exposed to high levels of palmitate/lactate (1 mM/10 mM) compared to control [10]. Together this suggests that the activation/ regulation of energy related signaling pathways may be defective in LSFC cells.

AMPK is considered as an energy sensor and its activation occurs in response to stresses that either interfere with ATP production such as hypoxia, ischemia, glucose deprivation or defects in the mitochondrial respiratory chain; or processes that increases ATP consumption such as physical exercise [14-17]. AMPK is a heterotrimeric serine/threonine kinase composed of $\alpha\beta\gamma$ subunits. It is activated by the protein kinase LKB1 which

phosphorylates the Thr172 site of the α catalytic subunit in response to increased AMP/ATP and ADP/ATP ratios [15-17]. Activation of AMPK stimulates catabolic, ATP producing pathways (glycolysis, β -oxidation, etc.) and inhibits anabolic, ATP consuming pathways (protein synthesis, lipogenesis, etc.) [14,17]. While chronic exposure to elevated levels of long chain non-esterified fatty acids, e.g. palmitate, inhibits AMPK activity [18-21], acutely, palmitate increases AMPK activity and β -oxidation [22-27]. In addition to AMPK, FAs also activate sirtuin 1 (SIRT1), a NAD-dependent deacetylase, which plays important roles in energy metabolism and mitochondrial adaptations [28-33]. In the present study, we examined early adaptive mechanisms in response to various stresses and hypothesized that LSFC cells vulnerability may be associated to alterations in nutrient-signaling pathways. Our study revealed that basal AMPK activity was similar in control and LSFC cells; while SIRT1 phosphorylation and expression were upregulated in LSFC cells suggesting a compensatory mechanism. We also showed that in control cells, palmitate/lactate treatment increased AMPK phosphorylation, as well as expression of SIRT1, COXIV and LRPPRC. All these effects were abrogated in LSFC cells.

Methods

Cell culture

Skin fibroblasts from one LSFC female patient homozygous for the A354V mutation (8 years old) and one paired female control (5 years old) were provided by the LSFC Consortium Biobank (Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, QC, Canada). The protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi and the Montreal Heart Institute. Unless stated, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Primary fibroblasts were grown (up to passage 18) at

37°C and 5% CO₂, in high glucose (4.5 g/L) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Mediatech, Manassa, VA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1% MEM vitamins and non-essential amino acid solutions from Mediatech.

Cell treatments

2,4 dinitrophenol (DNP): The day of the study, confluent cells were incubated in serum free non-supplemented DMEM for 4 h before stimulation with 0.1 mM DNP or vehicle (95% ethanol) for 10 min.

Palmitate or 2-bromopalmitate plus lactate: Cells incubated in non-supplemented FBS free media, were treated with 10 mM lactate and either 1.3% bovine serum albumin (BSA)-conjugated 1 mM palmitate or 1 mM 2-bromopalmitate or with vehicle (mannitol 10 mM / 1.3% BSA) for 4 h.

ZMP pre-treatment: Cells were grown for 48h in supplemented DMEM with 0.5 mM ZMP or vehicle (DMSO). ZMP was then removed and cells were incubated with palmitate/lactate or vehicle for 4h as described.

Gel electrophoresis and Immunoblotting

Cells were washed twice with ice-cold PBS to stop the reaction. They were then lysed in buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1.5% dodecyl-maltoside and protease inhibitors. Lysates were left on ice for 30 min, and then centrifuged at 20 000 g for 30 min at 4°C to remove insoluble material. An equal amount of protein was loaded on 8% or 12% SDS-PAGE gel as appropriate, and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-

Rad, Saint-Laurent, Qc, Canada). They were then blocked for 1 h with 5% (wt/vol) nonfat dry milk in TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20), and incubated overnight with the following primary antibodies at 4°C: AMPK, p-AMPK (Thr 172), ACC, p-ACC (Ser 79), SIRT1, p-SIRT1 (ser27), COXIV from Cell Signalling; β -actin, used as loading control, from Santa Cruz; and a LRPPRC polyclonal raised in rabbit against a 22 amino acid peptide having the sequence CEPPESEFEFYAQQLRKLRENS (antibody 295-313; Zymed Laboratories, San Francisco). They were then incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to peroxidase at room temperature for 1.5 h. The signals were then visualized using chemiluminescence and quantified using ImageJ software (<http://imagej.net/Downloads>).

ATP levels

ATP levels were measured with the ATPlite luminescence ATP detection assay system from Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Fibroblasts were cultivated in opaque 96 well plates at a density of 10 000 cells per well in triplicate. Luminescence was quantified by a Synergy 2 Alpha Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

Statistical analysis.

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 5 software. The analysis of two-way variance (Two-way ANOVA) followed by Bonferroni test was used for multiple comparisons and a student t test was used for comparisons between two groups. The results are expressed as mean \pm standard error (SEM) and considered significantly different for $p < 0.05$.

Results

Characterization of the LSFC phenotypes

As demonstrated previously, LSFC cells are characterized by a 76% ($p < 0.001$) and 43 % ($p < 0.001$) decrease of LRPPRC and COXIV expression respectively (Figure 2C). This is associated with mitochondrial alterations, including impaired oxidative phosphorylation capacity [10]. Despite these changes, the level of phosphorylated AMPK and its downstream target ACC was similar in control and LSFC cells (Figure 2A) which concurs with the absence of any alteration in ATP levels in LSFC cells [10]. Thus, other compensatory mechanisms must be activated allowing LSFC fibroblasts to maintain their ATP levels.

SIRT1 is another regulator of energy metabolism which plays an important role into mitochondrial adaptations [34]. We examined SIRT1 content and its phosphorylation on ser27, an event associated with increased enzyme activity [28]. As illustrated in Figure 2C, in the basal state, LSFC fibroblasts displayed increased SIRT1 phosphorylation (166%; $p < 0.05$) and a trend toward higher total protein level (160%; $p = 0.06$).

Palmitate/Lactate doesn't activate AMPK in LSFC fibroblasts

We have previously shown that chronic exposure to palmitate/lactate induced premature cell death in LSFC fibroblast compared to control cells [10]. This suggests decreased capacity of LSFC fibroblasts to respond to nutrient stress. To examine potential alteration and to address this question, we examined AMPK and SIRT1 response after 4 h exposure to palmitate/lactate, i.e. before any cell death could be detected. Study by Viscomi et al showed that AMPK activation lead to partial recovery of COX activity in muscle with a COX15 specific deletion [38]. Therefore, we also tested the therapeutic potential of chronic activation of AMPK on improving COX levels. The cells were treated with 0.5 mM ZMP, an AMP analogue and

specific activator of AMPK [39-41], for 48 h after which the ZMP was removed and the fibroblast were exposed to palmitate/lactate for 4 h.

As shown in Figure 2A, in control cells, exposure to palmitate/lactate for 4 h increased AMPK phosphorylation by 90% ($p < 0.01$) and SIRT1 expression by 57% ($p < 0.05$). We also observed a trend for increased SIRT1 phosphorylation (79%; $p = 0.07$) (Figure 2B). Interestingly, these changes were associated with a concomitant increased in the level of both LRPPRC (23%; $p = 0.045$) and COXIV (19%; $p < 0.05$) (Figure 2C). Pretreatment with ZMP increased the effect of palmitate/lactate on the phosphorylation of ACC (364%, $p < 0.001$) and SIRT1 (120%, $p < 0.05$), as well as on the expression level of SIRT1 (75%, $p < 0.01$), LRPPRC (63%, $p < 0.001$) and COXIV (38%, $p < 0.001$) (Figure 2). In contrast to control cells, palmitate/lactate was unable to activate AMPK in LSFC fibroblasts. In addition, we did not detect any further increase in either SIRT1 phosphorylation nor in the levels of SIRT1, LRPPRC and COXIV (Figure 2A, B, C).

2,4-Dinitrophenol activates AMPK in LSFC fibroblasts

As a first step to determine whether AMPK can be activated in LSFC cells, fibroblasts were stimulated with 0.1 mM DNP, a known activator of the enzyme [42, 43]. DNP is a chemical uncoupler of oxidative phosphorylation that prevents mitochondrial ATP production and stimulates energy production as heat [44]. As shown in Figure 3, DNP increased AMPK phosphorylation by 81% and 89% in control ($p < 0.05$) and LSFC ($p < 0.01$) cells, respectively. This was associated with increase of ACC phosphorylation by 74% and 60% in control and LSFC cells ($p < 0.05$).

Palmitate metabolism is required for AMPK activation in response to Palmitate/Lactate

The mechanism implicated in palmitate-mediated AMPK activation remains unclear. It has been suggested that palmitate metabolism induces ATP depletion resulting in AMPK activation [25]. However, and as shown in Figure 4A, palmitate/lactate didn't alter total ATP levels in control and LSFC fibroblasts (Figure 4A). We next examined whether palmitate metabolism may be required for AMPK activation. Cells were treated with 2-Bromopalmitate, a non-metabolizable analogue of palmitate [45]. As shown in Figure 4B, treatment with Bromopalmitate/Lactate failed to activate AMPK both in control and LSFC cells. These results suggest that palmitate metabolism is necessary for AMPK activation and that reduced oxidative capacity of LSFC cells may potentially play a role in impaired enzyme activity in LSFC cells.

Discussion

The aim of this study was to characterize the regulation of AMPK and SIRT1 activities under basal conditions and in response to various stresses. Our results revealed that, in basal conditions, while AMPK activity was similar in control and LSFC cells; SIRT1 phosphorylation and expression was upregulated in LSFC cells relative to control cells. We also observed difference between control and LSFC cells in response to palmitate/lactate treatment (4h). Thus, in control cells, palmitate/lactate increased AMPK phosphorylation, as well as the expression of SIRT1, LRPPRC and COXIV protein levels. Pretreatment with ZMP enhanced these effects. In contrast, all these effects were abolished in LSFC cells. These results highlight the significant alteration in the regulation of energy metabolism in LSFC cells. To our knowledge, this is the first time that impaired AMPK activation in response to palmitate/lactate is observed in these cells.

AMPK is a key enzyme of energy homeostasis. Studies have shown that AMPK activation arbitrates adaptive responses to mitochondrial dysfunction through increased mitochondrial biogenesis, β -oxidation, and glycolysis [14, 17]. AMPK activation has been observed in skin fibroblast of MERRF syndrome [46, 47] and those with a complex I deficiency [48]. In contrast, our results showed that basal AMPK activity in LSFC-COX deficient cells was not changed suggesting that other compensatory mechanism may be activated and participate in metabolic regulation. Consistent with this, SIRT1, a NAD-dependent deacetylase that plays a key role in mitochondrial adaptations [31-34] is upregulated in LSFC cells. Studies have shown that SIRT1 stimulates mitochondrial biogenesis through PGC-1 α deacetylation leading to normalization of ATP levels [31-33]. In contrast, Phil et al showed that mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis were not impaired in a muscle-specific SIRT1 knockout mouse [49]. Concordant with the latter study, we did not observe any change in markers of mitochondrial biogenesis in LSFC fibroblasts in spite of increased SIRT1 levels (see Supplements). Alternatively, activated SIRT1 could contribute to the turnover of defective mitochondria. For instance, resveratrol, a SIRT1 activator, stimulates mitophagy and protects the heart [34, 50]. Further studies should examine the role play by SIRT1 in LSFC cells.

LSFC patient fibroblasts are characterized by mitochondrial dysfunction, unchanged basal ATP levels, but increased vulnerability to nutrient overload (1mM Palmitate/ 10mM Lactate [10]. Our data showed that 4h exposure to palmitate/lactate increases AMPK phosphorylation as well as SIRT1, COXIV and LRPPRC expression in control cells. Since LRPPRC is required for COXIV expression [11, 12], any change in COX levels is probably due to changes in LRPPRC expression. Few studies have investigated the mechanism underlying

LRPPRC expression. Cooper et al. demonstrated that LRPPRC lies downstream of PGC-1 α , a target of AMPK and SIRT1 [31, 33, 35, 36]. AMPK and SIRT1 modulate PGC-1 α activity through phosphorylation and deacetylation respectively. Studies have demonstrated that in muscle, PGC-1 α overexpression leads to increased expression of lipid related genes and fatty acid oxidation [51, 52]. Interestingly, overexpression of LRPPRC also activates fatty acids transport and β -oxidation in hepatocytes promoting the reduction of circulating triglycerides and cholesterol [35, 36, 53]. Of note, the role of PGC-1 α in fatty acid metabolism requires LRPPRC [35, 36]. Together, these data suggest that AMPK/SIRT1/PGC-1 α axis plays an important role in energy homeostasis in part through LRPPRC. Further study should clarify the mechanism by which nutrients regulate LRPPRC and COXIV expression.

We also investigated the therapeutic potential of chronic AMPK activation in LSFC cells. Previous study by Viscomi et al reported that AMPK activation leads to partial COX correction in complex IV deficient mice [38]. In addition, Fillimore et al observed an additive effect of chronic AMPK activation and high fat diet markers of mitochondria content in skeletal muscle [54]. Consistent with these results, our data demonstrated that in control cells, ZMP pretreatment induce a further increase in AMPK activity, as well as SIRT1, COXIV, and LRPPRC expression in response to palmitate/lactate. It has been suggested that FAs and AMPK activators have additive effect because they work through two independent mechanisms [54]. Thus, while AMPK can stimulate transcription, FAs modulates translation. The latter may explain that changes in LRPPRC and COXIV expression could be detected after only 4h exposure to palmitate/lactate. In contrast to control cells, palmitate/lactate with or without ZMP failed to activate AMPK in LSFC cells and SIRT1, COXIV, LRPPRC levels remained unchanged compared to basal conditions.

To gain further insight into potential mechanisms, and to determine whether palmitate metabolism was required for AMPK activation, we treated our cells with 2-Bromopalmitate, a palmitate analogue which doesn't go under β oxidation [45, 55]. Our results showed that Bromopalmitate/lactate failed to activate AMPK in control cells suggesting that palmitate metabolism is required for AMPK activation. Interestingly, DNP activated AMPK similarly in LSFC and control cells. DNP uncouples the mitochondrial respiratory chain resulting in decreased ATP levels [57]. Thus, it appears that AMPK could be activated by a decrease of ATP levels in LSFC cells.

Conclusion

In conclusion, LSFC present numerous alterations in nutrient sensing including increase levels of SIRT1, impaired AMPK activation and its downstream targets in response to palmitate/lactate and ZMP in LSFC cells. Together, these changes may contribute to LSFC fibroblasts vulnerability to stress.

Acknowledgements

This work was supported by a CIHR emerging team grant on LSFC (CPG 102168), by the Fondation du Grand Défi Pierre Lavoie. YM was supported by a studentship from the Université de Montréal and Corporation de recherche et d'action sur les maladies héréditaires (COR-AMH). The funders had no role in study design, data collection and analysis, and preparation of the manuscript. The authors are very grateful to the Association de l'Acidose Lactique, the patients and their family for their support and tissue samples.

The LSFC Consortium is a group of basic and clinical researchers dedicated to investigating the causes and developing treatments for LSFC. At the time of this study, the members were, in alphabetical order: Bruce G. Allen, Claudine Beauchamp, Chantal Bemeur, Yan Burelle, Guy Charron, Lise Coderre, Christine Des Rosiers, Sonia Deschênes, François Labarthe, Jeannine Landry, Catherine Laprise, Geneviève Lavallée, Pierre Lavoie, Sylvie Lesage, Bruno Maranda, Charles Morin, Yvette Mukaneza, John D. Rioux, Marie-Eve Rivard, Matthieu Ruiz, Eric A. Shoubridge, Jessica Tardif, Julie Thompson Legault, Nancy Tremblay, Vanessa Tremblay-Vaillancourt, Luc Vachon and Josée Villeneuve.

References

1. Lightowers, R.N. and Z.M. Chrzanowska-Lightowers, PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression. *Biochem J*, 2008. 416(1): p. e5-6.
2. Lightowers, R.N. and Z.M. Chrzanowska-Lightowers, Human pentatricopeptide proteins: only a few and what do they do? *RNA Biol*, 2013. 10(9): p. 1433-8.
3. Ruzzenente, B., et al., LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *Embo j*, 2012. 31(2): p. 443-56.
4. Sasarman, F., et al., LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(8): p. 1315-23.
5. 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.
6. Olahova, M., et al., LRPPRC mutations cause early-onset multisystem mitochondrial disease outside of the French-Canadian population. *Brain*, 2015. 138(Pt 12): p. 3503-19.
7. 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.
8. Morin, C., et al., Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet*, 1993. 53(2): p. 488-96.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. Xu, F., et al., 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(Pt 1): p. 331-6.
13. Saguenay-Lac-Saint-Jean, A.d.l.a.l.d. *Trouse d'information sur l'acidose lactique*. 2005.
14. Carling, D., AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 2017. 45: p. 31-37.
15. Gowans, G.J. and D.G. Hardie, AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP. *Biochem Soc Trans*, 2014. 42(1): p. 71-5.
16. Oakhill, J.S., J.W. Scott, and B.E. Kemp, AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab*, 2012. 23(3): p. 125-32.
17. Steinberg, G.R. and B.E. Kemp, AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*, 2009. 89(3): p. 1025-78.
18. Lu, J., et al., Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: prevention by AMPK activator. *Endocrinology*, 2012. 153(11): p. 5275-84.
19. Mayer, C.M. and D.D. Belsham, Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of

- resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 2010. 151(2): p. 576-85.
20. Roden, M., How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci*, 2004. 19: p. 92-6.
 21. Wu, Y., et al., Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2007. 282(13): p. 9777-88.
 22. Clark, H., D. Carling, and D. Saggerson, Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *Eur J Biochem*, 2004. 271(11): p. 2215-24.
 23. Fediuc, S., M.P. Gaidhu, and R.B. Ceddia, Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J Lipid Res*, 2006. 47(2): p. 412-20.
 24. Hebbachi, A. and D. Saggerson, Acute regulation of 5'-AMP-activated protein kinase by long-chain fatty acid, glucose and insulin in rat primary adipocytes. *Biosci Rep*, 2012. 33(1): p. 71-82.
 25. Kawaguchi, T., et al., Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2002. 277(6): p. 3829-35.
 26. Wang, X., et al., Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 352(2): p. 463-8.
 27. Watt, M.J., et al., Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J Physiol*, 2006. 574(Pt 1): p. 139-47.

28. Nasrin, N., et al., JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One*, 2009. 4(12): p. e8414.
29. Sasaki, T., et al., Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One*, 2008. 3(12): p. e4020.
30. Komiya, K., et al., Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic beta-cells via JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 401(4): p. 561-7.
31. Canto, C. and J. Auwerx, PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*, 2009. 20(2): p. 98-105.
32. Canto, C., et al., AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 2009. 458(7241): p. 1056-60.
33. Canto, C., et al., Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab*, 2010. 11(3): p. 213-9.
34. Tang, B.L., Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells*, 2016. 39(2): p. 87-95.
35. 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.
36. Cooper, M.P., et al., Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130. *J Biol Chem*, 2008. 283(46): p. 31960-7.
37. Cuillerier, A., et al., Loss of hepatic LRPPRC alters mitochondrial bioenergetics, regulation of permeability transition and trans-membrane ROS diffusion. *Hum Mol Genet*, 2017. 26(16): p. 3186-3201.
38. Viscomi, C., et al., In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1alpha axis. *Cell Metab*, 2011. 14(1): p. 80-90.

39. Corton, J.M., et al., 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, 1995. 229(2): p. 558-65.
40. Egawa, T., et al., AICAR-induced activation of AMPK negatively regulates myotube hypertrophy through the HSP72-mediated pathway in C2C12 skeletal muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014. 306(3): p. E344-54.
41. Scudiero, O., et al., New synthetic AICAR derivatives with enhanced AMPK and ACC activation. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015: p. 1-6.
42. Habegger, K.M., et al., AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol. *Endocrinology*, 2012. 153(5): p. 2130-41.
43. Yamaguchi, S., et al., Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. 289(4): p. E643-9.
44. Grundlingh, J., et al., 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol*, 2011. 7(3): p. 205-12.
45. Oakes, N.D. and S.M. Furler, Evaluation of free fatty acid metabolism in vivo. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 967: p. 158-75.
46. Wu, S.B. and Y.H. Wei, AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1822(2): p. 233-47.
47. Wu, S.B., et al., Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1840(4): p. 1331-44.

48. Distelmaier, F., et al., The antioxidant Trolox restores mitochondrial membrane potential and Ca²⁺ -stimulated ATP production in human complex I deficiency. *J Mol Med (Berl)*, 2009. 87(5): p. 515-22.
49. Philp, A., et al., Sirtuin 1 (SIRT1) deacetylase activity is not required for mitochondrial biogenesis or peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation following endurance exercise. *J Biol Chem*, 2011. 286(35): p. 30561-70.
50. Dasgupta, B. and J. Milbrandt, Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(17): p. 7217-22.
51. Li, X., SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013. 45(1): p. 51-60.
52. Purushotham, A., et al., Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*, 2009. 9(4): p. 327-38.
53. Liu, L., et al., LRP130 protein remodels mitochondria and stimulates fatty acid oxidation. *J Biol Chem*, 2011. 286(48): p. 41253-64.
54. Fillmore, N., et al., Chronic AMP-activated protein kinase activation and a high-fat diet have an additive effect on mitochondria in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 2010. 109(2): p. 511-20.
55. Oakes, N.D., et al., Development and initial evaluation of a novel method for assessing tissue-specific plasma free fatty acid utilization in vivo using (R)-2-bromopalmitate tracer. *J Lipid Res*, 1999. 40(6): p. 1155-69.

56. Thompson Legault, J., et al., A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell Rep*, 2015. 13(5): p. 981-9.
57. Berg JM, T.J., Stryer L., *Biochemistry*. 5th edition. 2002, New York: W H Freeman.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Stress conditions used in the study to activate AMPK.

DNP: 2,4-dinitrophenol; ZMP: ZMP : 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide monophosphate, LP: lactate+ palmitate; AMP : adenosine monophosphate, ATP: adenosine triphosphate; AMPK : AMP activated protein kinase, ACC : acetyl CoA carboxylase.

Figure 2. Palmitate/lactate doesn't activate AMPK in LSFC fibroblasts.

Primary fibroblasts from control and LSFC donors were grown in supplemented DMEM. For certain experiences, cells were incubated with 0.5mM ZMP for 48h. On the day of the study, cells were cultured in a serum-free non-supplemented DMEM, with 1mM palmitate/ 10mM lactate or vehicle as indicated, for 4 h. **(A)** AMPK activity was assessed by immunoblot and densitometric analysis of total and/or phosphorylated levels of AMPK (n=5) and its downstream target ACC (n=5). **(B)** Immunoblot and densitometric analysis of total and/or phosphorylated levels of SIRT1 (n=5). **(C)** Immunoblot and densitometric analysis of LRPPRC (n=5) and COXIV (n=4) content. Results represent the average \pm SEM of n independent experiments. Difference between control and LSFC cells was assessed with a paired t-test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Figure 3. 2,4-Dinitrophenol activates AMPK in LSFC fibroblasts.

Primary fibroblasts from control and LSFC donors were grown in supplemented DMEM. On the day of the study, cells were cultured in a serum-free non-supplemented DMEM for 4 h, then incubated with 0.1mM DNP for 10 min. AMPK activity was assessed by immunoblot and densitometric analysis of total and/or phosphorylated levels of AMPK (n=5) and its

downstream target ACC (n=5). Results represent the average \pm SEM of n independent experiments. Difference between control and LSFC cells was assessed with a paired t-test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

Figure 4. Palmitate metabolism is required for AMPK activation in response to palmitate/lactate.

(A) Primary fibroblasts from control and LSFC donors were grown in supplemented DMEM in opaque 96 well plates at a density of 10 000 cells per well in triplicate. On the day of the study, cells were cultured in a serum-free non-supplemented DMEM, with 1mM palmitate/ 10mM lactate or vehicle as indicated, for 4 h. Cellular ATP levels were measured with the ATPlite luminescence ATP detection assay system (n=4). **(B)** Primary fibroblasts from control and LSFC donors were grown in supplemented DMEM. On the day of the study, cells were cultured in a serum-free non-supplemented DMEM, with 1mM 2-Bromopalmitate/ 10mM lactate or vehicle as indicated, for 4 h. AMPK activity was assessed by immunoblot and densitometric analysis of phosphorylated levels of AMPK (n=5) and its downstream target ACC (n=5). Results represent the average \pm SEM of n independent experiments. Difference between baseline and rapamycin treatment was assessed with a paired t-test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

FIGURE 1

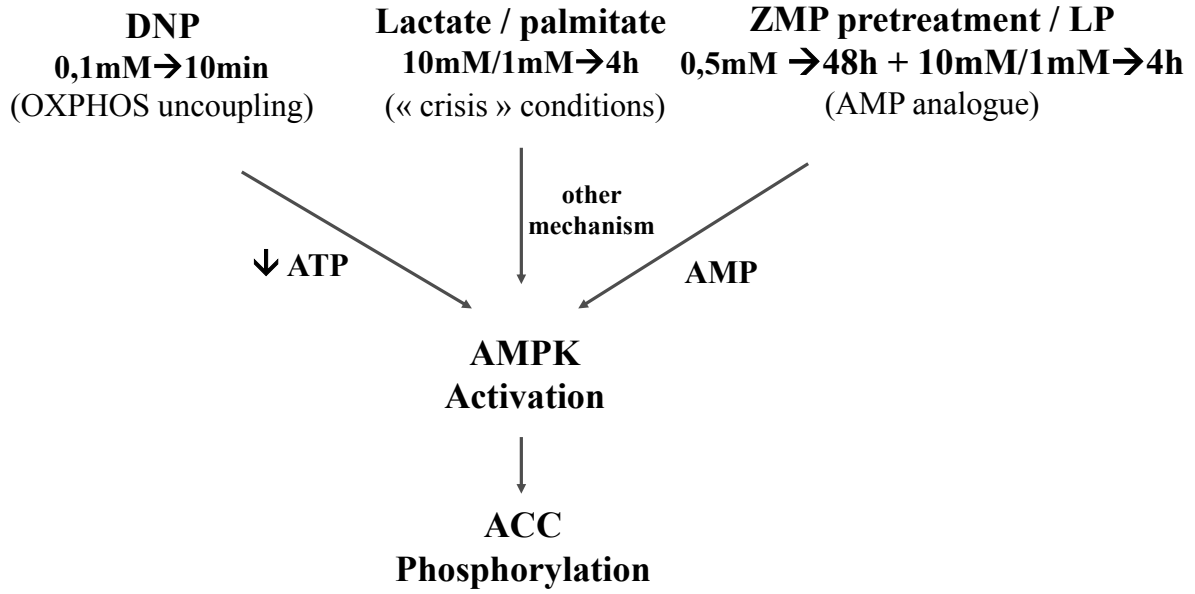
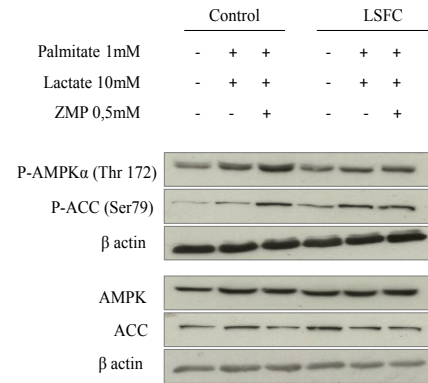
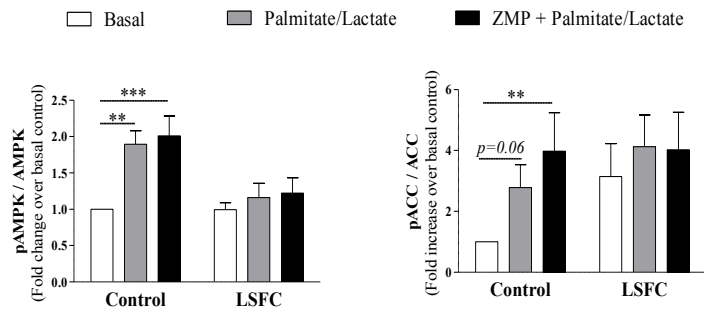
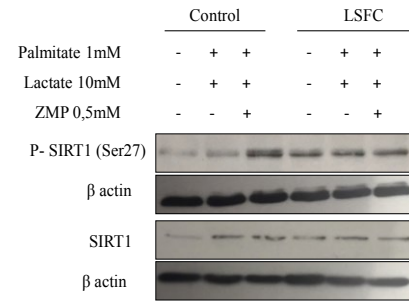
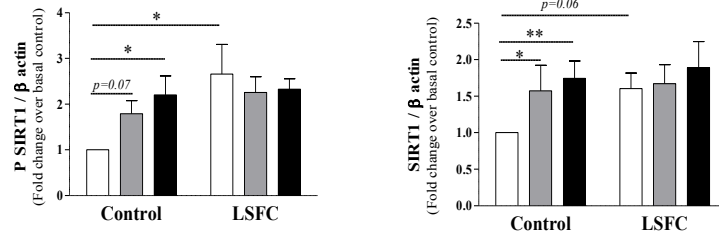


FIGURE 2

A



B



C

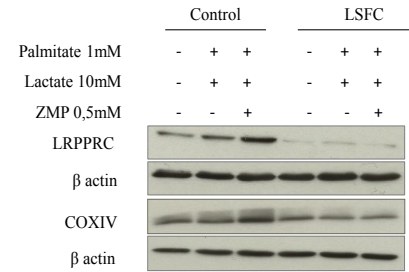
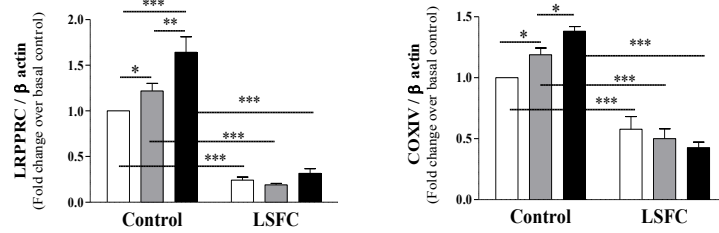


FIGURE 3

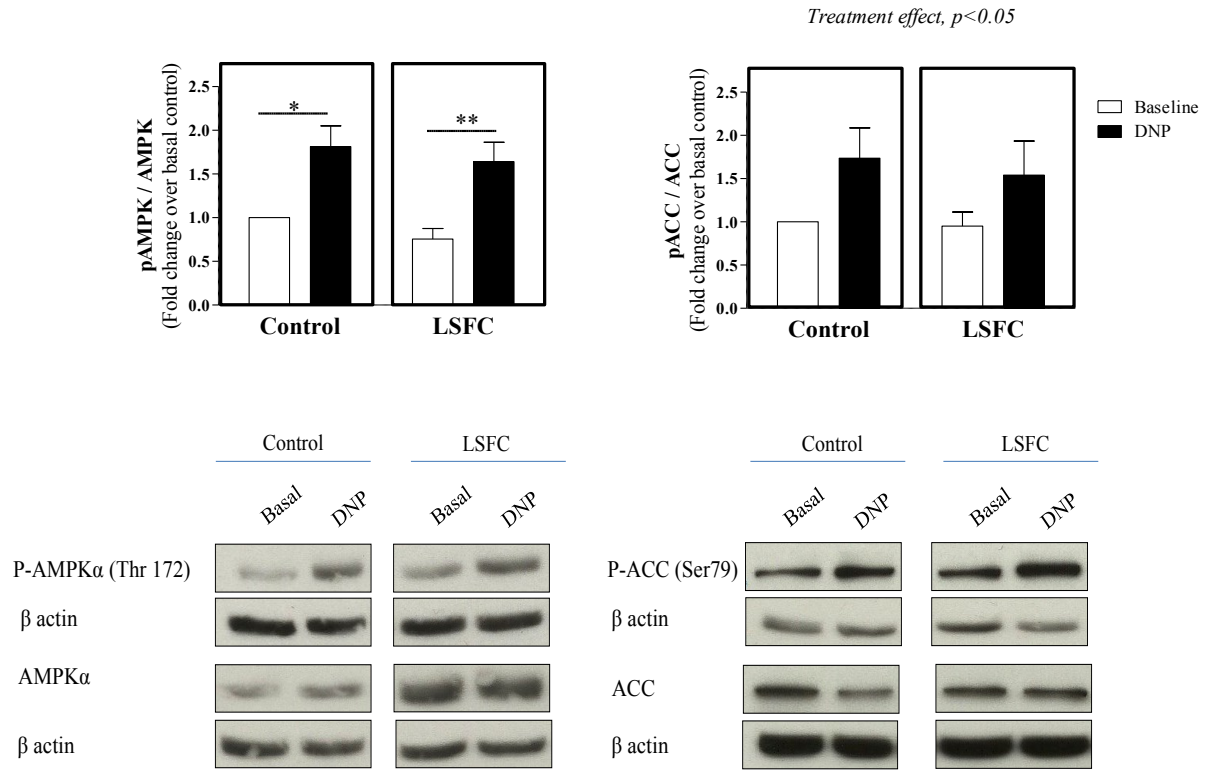
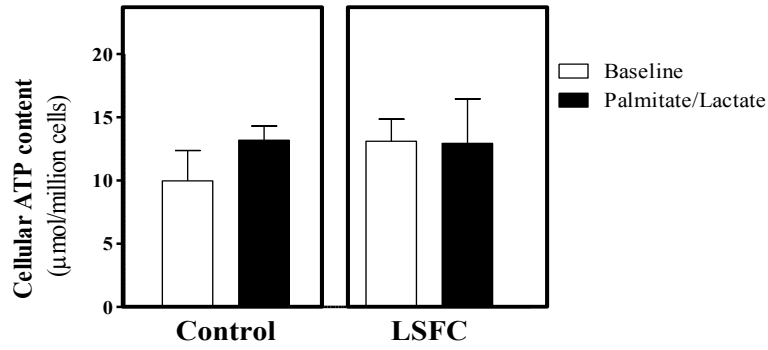
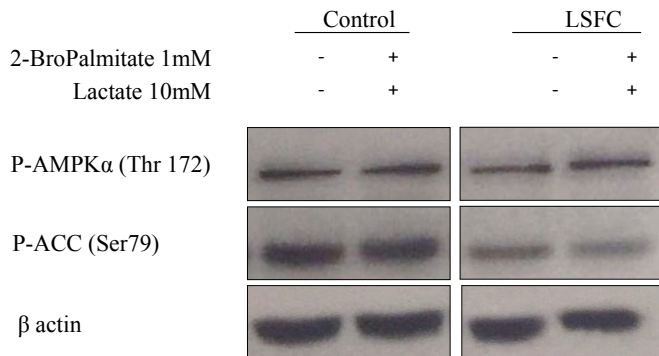
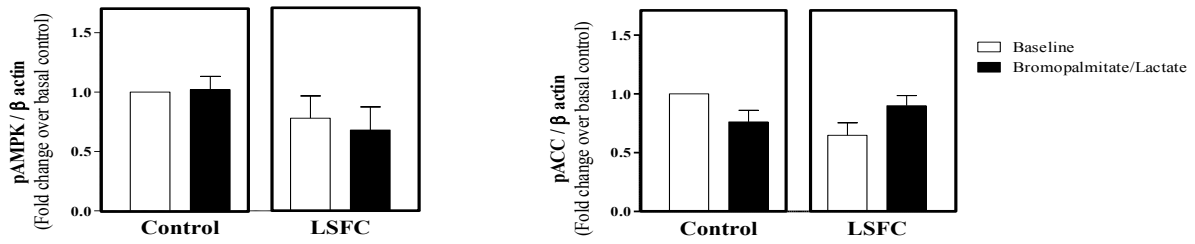


FIGURE 4

A



B



SUPPLEMENTS

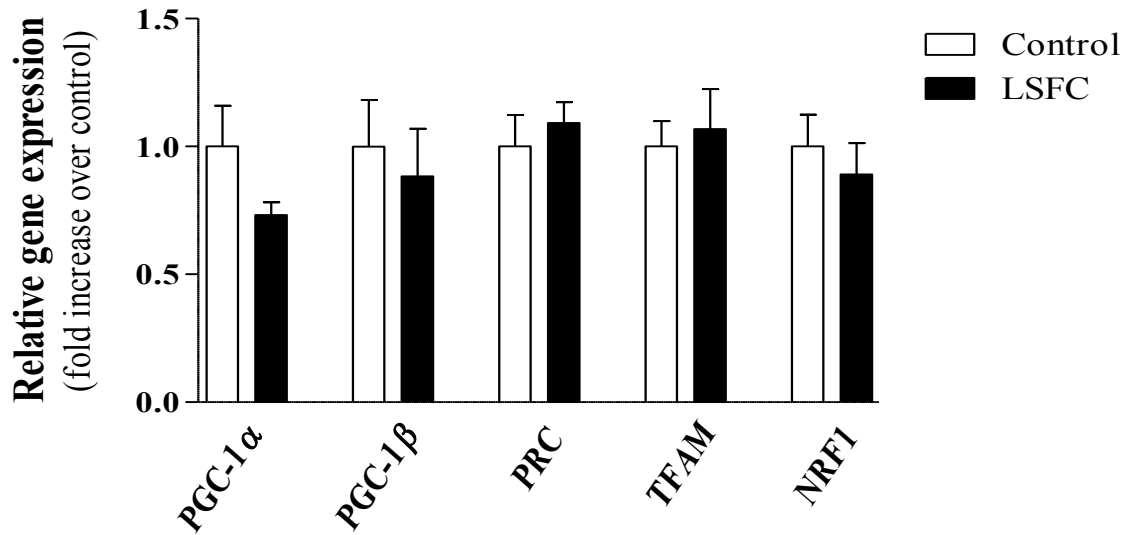


Figure S1. Mitochondrial biogenesis markers under basal conditions. Fibroblasts from one LSFC patient and one control patient were grown in DMEM medium. PGC-1 α , PGC-1 β , PRC, TFAM, and NRF1 mRNAs levels were determined by RT-PCR. Results represent the average \pm SEM of 6 independent experiments.

CHAPITRE IV - DISCUSSION

IV- Discussion

Le LSFC fait partie des maladies mitochondriales rares à travers le monde, mais en réalité celui-ci est très fréquent au Québec et plus particulièrement au Saguenay-Lac-Saint-Jean. Dans cette région, compte tenu du taux de mortalité élevé associé à cette maladie, la recherche de thérapies est devenue une priorité. Pour cela, une meilleure compréhension de la physiopathologie est requise. Nous avons récemment rapporté que les fibroblastes des patients atteints du LSFC présentent plusieurs anomalies de la fonction mitochondriale incluant entre autres l'altération de l'O₂PHOS ([22](#), [225](#)). Classiquement, une telle perturbation engendre des mécanismes de défense, lesquels pourraient servir de cibles thérapeutiques. Ainsi dans notre quête de thérapie, il nous semblait pertinent d'étudier les mécanismes adaptatifs du métabolisme énergétique dans les fibroblastes de patients atteints du LSFC. En utilisant un modèle cellulaire combiné à des mesures basées sur des outils de biologie moléculaire et d'investigations métaboliques par le biais de substrats marqués aux isotopes stables, nous avons démontré que les fibroblastes LSFC exhibent une série d'adaptations incluant une augmentation de la conversion du pyruvate en lactate et alanine. Ces altérations étaient associées à une surexpression de la voie Akt/mTOR, de HIF-1 α , de PDHK1 associée à l'inhibition de PDH1. D'un point de vue thérapeutique, l'incubation de nos cellules avec la rapamycine a résulté en une déficience plus importante de LRPPRC et de COXIV. Nous avons aussi examiné la réponse des cellules LSFC à différents stress. En conditions de stress nutritionnel, nos résultats démontrent que certains mécanismes d'activation de l'AMPK sont défectueux dans les cellules LSFC. De plus, la stimulation de l'AMPK par le ZMP n'a eu aucun effet sur la réponse au stress nutritionnel des cellules LSFC. À la lumière de ces résultats, nos travaux suggèrent : (i) les cellules LSFC exhiberaient une reprogrammation

métabolique importante (ii) l'activation de l'AMPK est déficiente en réponse au stress nutritionnel.

Tel que mentionné au début de cette thèse, les fibroblastes de peau des patients étaient le seul modèle pertinent disponible au moment de l'étude. Nous sommes conscients des limites que représente ce modèle notamment à ce qui a trait à l'étude du métabolisme énergétique. Toutefois, nous croyons que les résultats qui émanent de ce projet nous éclairent sur la physiopathologie et donnent notamment des pistes mécanistiques intéressantes qui pourront servir de base pour une étude approfondie de la régulation du métabolisme énergétique chez les patients LSFC. D'ailleurs la revue de Saada A. (216) souligne l'utilité et l'importance des fibroblastes de peau des patients dans l'étude des mécanismes pathologiques. Dans la présente discussion, nous allons énumérer ces pistes mécanistiques à savoir les évidences d'une reprogrammation métabolique d'une part, et les mécanismes potentiels d'activation de l'AMPK d'autre part. Nos résultats vont être intégrés et extrapolés dans un contexte plus général de dysfonction mitochondriale. Des travaux en perspective seront proposés pour une meilleure compréhension du métabolisme énergétique des patients LSFC.

i. Une reprogrammation métabolique dans les cellules LSFC ?

Nous sommes partis de l'hypothèse que l'augmentation de la glycolyse contribue à une synthèse d'ATP extra-mitochondriale dans les cellules LSFC. En effet, ces cellules présentent des niveaux d'ATP similaires aux contrôles, malgré un déficit de 50% de l'activité du complexe IV et de la réduction de la capacité de l'OXPHOS (22, 225, 279). Physiologiquement, dans la plupart de types cellulaires, près de la totalité de l'ATP cellulaire est formé à partir de deux processus à savoir la phosphorylation oxydative au niveau de la

mitochondrie (95% de l'ATP) et la glycolyse au niveau du cytosol (5% d'ATP) ([17](#), [259](#)). Ainsi, les niveaux d'ATP inchangés dans les fibroblastes LSFC suggèrent fortement un mécanisme compensatoire. Certains mécanismes incluant l'activation de l'AMPK et une augmentation de la biogenèse mitochondriale ont été rapportés dans les maladies mitochondriales telles que le syndrome de MELAS et le syndrome de MERRF ([79](#), [272](#), [275](#)). Or, on n'observe aucune augmentation de l'activité de la protéine AMPK, ni une augmentation de la biogenèse mitochondriale dans les fibroblastes LSFC. De ce fait, cela suggère qu'il existe une reprogrammation métabolique dans les cellules LSFC leur permettant d'assurer une synthèse d'ATP est extra mitochondriale.

La reprogrammation métabolique a été décrite et observée pour la première fois dans les cellules cancéreuses par Otto Warburg en 1920 ([130](#), [252](#)). Depuis, celle-ci a été rapportée dans différents processus physiologiques incluant la prolifération et la différenciation cellulaires ; et elle est de plus en plus étudiée dans le système immunitaire ([75](#), [252](#), [292](#)). Par contre, elle est encore très peu étudiée dans les maladies mitochondriales. Pourtant, le rôle de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique et la survie cellulaire suggère qu'une dysfonction mitochondriale puisse conduire à une reprogrammation métabolique ([17](#), [33](#)). Concrètement, lors d'une reprogrammation, la cellule subit un changement métabolique favorisant la glycolyse par rapport à l'OXPPOS. Ceci s'accompagne d'une conversion préférentielle du pyruvate, formé à partir du glucose, en lactate plutôt que de son transfert vers la mitochondrie, parlant ainsi de l'effet Warburg. Cette synthèse de lactate génère le NAD^+ nécessaire au maintien du flux glycolytique et à la synthèse d'ATP ([130](#), [152](#), [252](#)). Pour répondre à ses besoins de biosynthèse, la cellule subit également des changements au niveau du cycle de Krebs. Ainsi, dans certaines cellules, les intermédiaires du cycle sont

détournés vers la biosynthèse: le citrate vers la lipogenèse et l'OAA vers la néoglucogenèse (4, 27, 57). Pour pallier à l'utilisation des intermédiaires du cycle de Krebs, il a été suggéré que l'anaplérose puisse augmenter en conséquence pour maintenir le flux du cycle. On observe donc, entre autres, d'une part une augmentation de l'entrée de la glutamine et sa conversion en α -KG, et d'autre part la carboxylation du pyruvate en OAA (56, 190).

Dans les sections ci-après, je discuterai des évidences d'une reprogrammation métabolique, à savoir la glycolyse aérobie ou effet Warburg et l'anaplérose, dans les maladies mitochondriales et en particulier dans les cellules LSFC. Par la suite, le rôle de mTOR dans le maintien des niveaux d'ATP sera abordé.

a) Effet Warburg dans les cellules LSFC.

L'existence probable de l'effet Warburg, aussi bien dans les cellules LSFC que dans certaines autres maladies mitochondriales, est corroborée par des taux élevés de lactate (209) et une augmentation de la glycolyse (55, 117, 192). En l'occurrence, les résultats métaboliques énoncés dans cette thèse soutiennent une importante contribution du glucose à la formation du pyruvate et du lactate dans les cellules LSFC comparativement aux contrôles. En accord avec cela, l'étude clinique de notre laboratoire rapporte des taux élevés de lactate dans le plasma des patients LSFC (247). D'autres cas d'hyperlactémie ont été observés dans d'autres maladies mitochondriales causées par des mutations du gène LRPPRC (192). Une lactémie élevée a souvent été attribuée principalement à un défaut de détoxification de lactate par le foie (209). Toutefois, il n'est pas exclu qu'un flux glycolytique augmenté puisse parallèlement contribuer à l'augmentation de ces taux de lactate dans les maladies mitochondriales. D'ailleurs, une étude portant sur des fibroblastes de peau de patients atteints du syndrome de

MERRF démontre que ces cellules exhibent des altérations impliquant un changement métabolique en faveur de la glycolyse ([272](#)). D'autres études rapportent également une augmentation de la glycolyse dans les cellules hybrides avec des mutations de l'ADNmt ([272](#), [273](#)).

Par ailleurs, rappelons que le flux glycolytique est principalement régulé par les voies Akt/mTOR et HIF-1 α lesquelles sont surexprimées dans les cellules LSFC comme le démontrent nos résultats ([56](#), [75](#), [143](#)). Bien qu'on ne connaisse pas encore les mécanismes sous-jacents, l'activation de la voie mTOR a été rapportée dans d'autres modèles de désordres mitochondriaux incluant le modèle murin du syndrome de Leigh classique ([117](#), [127](#), [201](#), [290](#)). De même, la stabilisation de HIF-1 α a été observée dans différentes conditions de dysfonction mitochondriale notamment dans les cellules avec une déficience du complexe II ([84](#), [129](#)). De façon intéressante, en dépit de l'augmentation des niveaux de HIF-1 α dans nos cellules LSFC, les ARNm cibles de celui-ci soient GLUT1, LDHA et PDHK1, ne sont pas augmentés. Le niveau d'ARNm de GLUT1 est diminué à 38%, l'expression protéique de GLUT1 et de LDHA est inchangée, alors que celle de PDHK1 est augmentée (Figure 18, p. 149). Ainsi, il semble qu'il y ait une déconnexion entre la régulation de la transcription et celle de la traduction dans les cellules LSFC. Cela concorde avec les observations faites dans les cellules déficientes en LRRPRC par Sasarman et al. ainsi qu'Olahova et al. ([192](#), [224](#)) qui ont montré que les niveaux d'ARNm des complexes mitochondriaux sont globalement réduits alors que les niveaux de protéines sont maintenus sauf pour COX. Je tiens à souligner et à revenir sur le rôle clé de la protéine LRPPRC dans le métabolisme des ARNm ([224](#), [250](#), [278](#), [279](#)). Celle-ci étant déficitaire dans les cellules LSFC, il n'est pas étonnant de voir autant d'altérations dans la régulation transcriptionnelle de différents ARNm. Plus particulièrement,

LRPPRC contrôle le transport des ARNm nucléaires impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaire en formant un complexe avec eIF4E (250). Les protéines GLUT1, LDHA et PDHK1 jouent un rôle dans ces processus via l'effet Warburg (143, 160). Par conséquent, la normalisation des niveaux protéiques de GLUT1 suggérerait des mécanismes compensatoires dans les fibroblastes LSFC au niveau de la traduction ou des mécanismes de dégradation. En accord avec cette hypothèse, alors qu'on observe une surexpression protéique de HIF-1 α , les niveaux d'ARNm de celui-ci ne sont pas changés (voir Figure 18, p. 149). Ainsi, un ratio Protéine/ARNm pourrait être un meilleur indicateur de la régulation de l'expression de certaines protéines dans les cellules LSFC. Toutefois, dans notre cas où la protéine LRPPRC joue un rôle clé dans l'expression des gènes, de l'ADN à la protéine, il serait suggéré de mesurer l'activité enzymatique des protéines glycolytiques dans les cellules LSFC, le flux glycolytique direct du transport du glucose ou encore une mesure de la production de lactate dans les cellules par SeaHorse. Ceci dit, les taux élevés de lactate dans le plasma des patients LSFC ainsi que l'analyse des substrats marqués suggérant un flux glycolytique relatif augmenté soutiennent fortement une augmentation de la glycolyse et un effet Warburg dans les cellules LSFC.

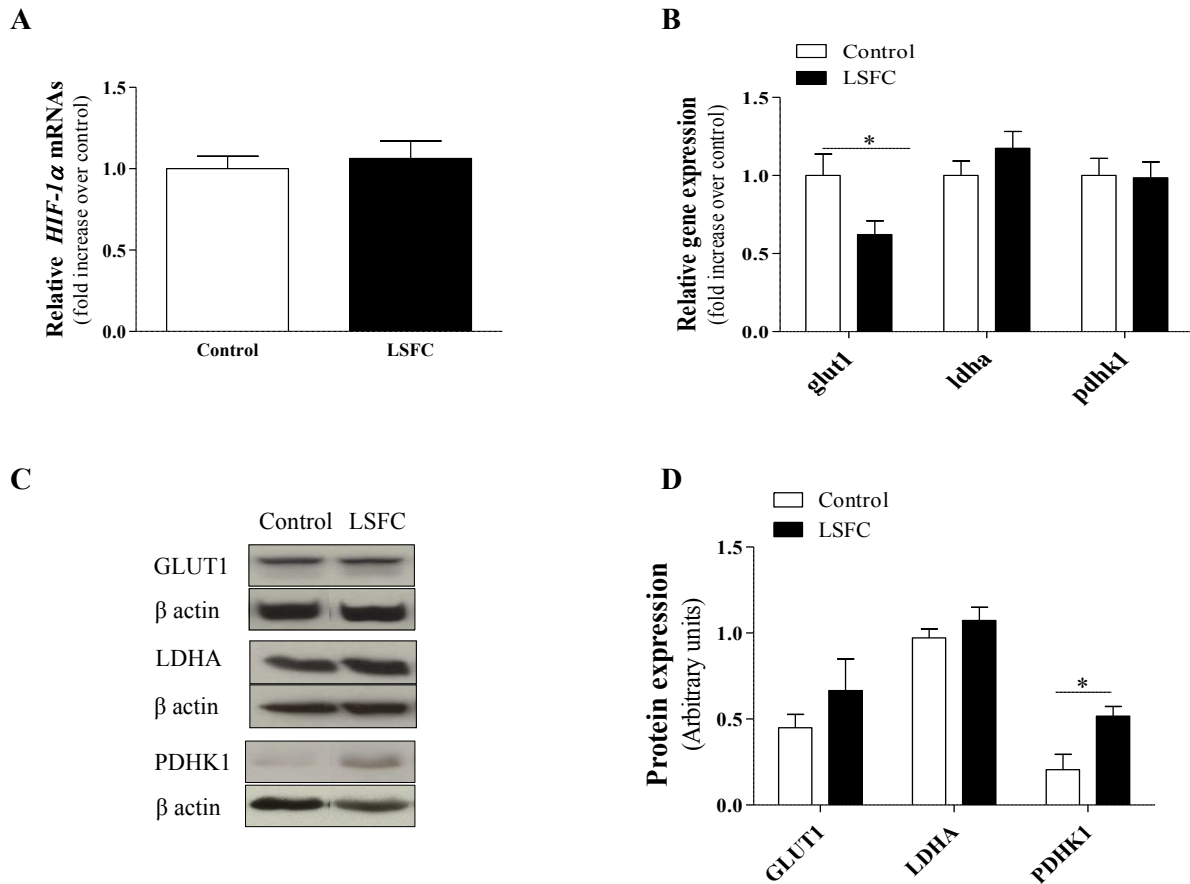


Figure 18. Expression génique et protéique des régulateurs de la glycolyse

Les fibroblastes primaires d'un patient LSFC et un patient témoin ont été cultivés dans un milieu DMEM standard. Les niveaux d'ARNm de GLUT1, LDHA et PDHK1 (n=6) ont été mesurés par RT-PCR (voir annexes). Les niveaux protéiques totaux de ces enzymes ont été déterminés par immunobuvardage. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de différentes expériences indépendantes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

b) Anaplérose dans les cellules LSFC.

Rappelons que LSFC est une maladie caractérisée par un déficit de la protéine LRPPRC qui joue un rôle clé dans la survie cellulaire ([22](#), [59](#), [249](#)). Il apparaît donc que les cellules LSFC devraient compenser pour une augmentation de la mortalité cellulaire. Cela nous a conduit à une deuxième hypothèse soit que les cellules LSFC augmenteraient la biosynthèse et l'anaplérose pour leur prolifération et leur survie. Fait intéressant, les patients LFSC présentent souvent des accumulations lipidiques au niveau du foie et les souris avec une délétion hépato-spécifique de LRPPRC exhibent une importante stéatose ([50](#), [173](#)).

Nous avons observé dans notre étude une augmentation des niveaux de PDHK1 associée à une inhibition de la PDH1. Une inhibition ou réduction de l'oxydation du glucose serait néfaste pour l'équilibre du cycle de Krebs, plaque tournante du métabolisme ([17](#), [259](#)). En réponse à une dysfonction mitochondriale, le maintien du flux du cycle de Krebs par l'anaplérose apparaît par conséquent fondamental pour l'homéostasie cellulaire ([61](#), [194](#)). Le métabolisme anaplérotique est peu documenté dans les maladies mitochondriales. Pourtant, plusieurs facteurs de reprogrammation métabolique favoriseraient l'anaplérose dans celles-ci. D'une part, la stabilisation de HIF-1 α , induite par les ROS notamment, prévient l'oxydation du glucose via PDHK1/PDH1. À noter que, chez la souris, les foies déficients en LRPPRC montrent une augmentation de ROS ([50](#)). D'autre part, lors d'un blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale, on observe une accumulation de métabolites en amont du cycle de Krebs incluant l'acétyl-CoA, le pyruvate et le lactate ([58](#), [209](#), [236](#)). L'acétyl-CoA et le pyruvate sont des inhibiteurs allostériques de la PDH1 et de l'oxydation du glucose ([93](#), [198](#), [199](#)). Dans l'ensemble, l'inhibition de la PDH1 rendrait le pyruvate accessible pour une carboxylation par la PC ([14](#), [284](#)). Plus particulièrement, le processus de carboxylation

deviendrait indispensable pour approvisionner l'OAA du cycle de Krebs. Concordant avec cette hypothèse, on observe une surexpression de l'enzyme PC dans les cellules LSFC (Figure 19, p. 153).

Un autre facteur soutenant un métabolisme anaplérotique dans les maladies mitochondriales est la perturbation du métabolisme des acides aminés, qui a également été rapportée chez les patients LSFC (247). Le métabolisme des acides aminés, notamment la glutamine qui représente l'acide aminé le plus abondant dans le plasma, est étroitement lié à la régulation de la voie mTOR. Le transport de la glutamine dans la cellule stimule l'activité de mTOR ; et réciproquement mTOR active la glutaminolyse via c-Myc qui stimule l'expression des enzymes GLS et GDH (136, 147, 232, 253, 283). Nous avons observé, dans les cellules des patients LSFC, une activation de la voie mTOR. Des résultats complémentaires montrent en plus une augmentation des niveaux d'ARNm de c-Myc (Figure 20, p. 154) et une surexpression des protéines GLS et GDH impliquées dans la synthèse de l' α -KG (Figure 19, p. 153) suggérant une augmentation de la glutaminolyse dans les cellules LSFC. À noter que certaines études soutiennent que la glutaminolyse oxydative puisse participer à l'approvisionnement anaplérotique de l'OAA (56, 57). Dans ce cas précis, le malate issu de la glutaminolyse est exporté dans le cytosol où il est transformé, en présence de NADP^+ , en pyruvate et NADPH par l'enzyme malique qui est augmentée dans les cellules LSFC (voir Figure 19, p.153). Le pyruvate rentre ensuite dans la mitochondrie où il est carboxylé en OAA, lequel pourrait ensuite être converti en malate, permettant ainsi l'oxydation du NADH mitochondriale en NAD^+ . Il faut remarquer que la conversion du malate directement en OAA par la malate déshydrogénase génère du NADH à l'intérieur de la mitochondrie, alors que la conversion indirecte de malate en OAA via le pyruvate favorise le recyclage et l'exportation

des équivalents réduits en dehors de la mitochondrie permettant une meilleure fonction du cycle. De fait, le maintien d'un flux optimal des substrats dans le cycle de Krebs dépend de l'apport en substrat anaplérotique mais aussi de la ré-oxydation du NADH formé par l'oxydation des substrats par la phosphorylation oxydative. Lorsque l'activité de ce dernier processus est altérée, comme c'est le cas dans les cellules LSFC, il y a accumulation du NADH, lequel est un puissant inhibiteur de plusieurs enzymes du cycle de Krebs, soit la citrate synthase, l' α -kétoglutarate déshydrogénase et la PDH1. Selon les conditions, les substrats anaplérotiques deviennent de la sorte essentiels pour la survie cellulaire ([4](#), [39](#), [190](#), [194](#), [230](#)). Des expériences supplémentaires par analyse de substrats marqués permettraient de confirmer l'augmentation de l'anaplérose dans les cellules LSFC. De plus, des siRNA contre l'enzyme PC permettraient d'évaluer l'effet de l'anaplérose sur la survie cellulaire.

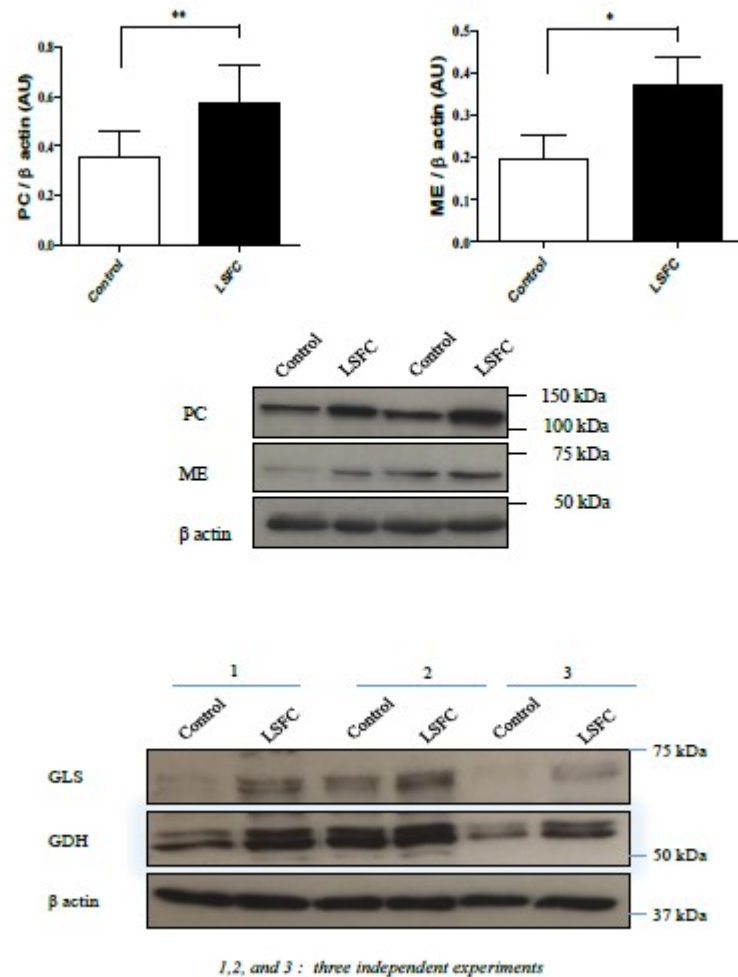


Figure 19. Expression protéique des enzymes anaplerotiques.

Les fibroblastes immortalisés provenant d'un patient LSFC et d'un patient témoin ont été cultivés dans du DMEM standard. L'expression des protéines PC, ME, GLS et GDH a été mesurée par immunobuvardage. Les anticorps proviennent de chez Cell Signaling Technology (Denvers, MA, USA) pour les enzymes ME, GLS et GDH; et chez Abcam (Toronto, ON, Canada) pour l'enzyme PC. PC: pyruvate carboxylase; ME: malic enzyme; GLS, glutaminase; GDH: glutamate déshydrogénase; LSFC: Leigh syndrome French Canadian type. Les résultats

représentent une moyenne de 6 et 5 expériences indépendantes \pm SEM pour PC et ME, respectivement. ** $p < 0.01$

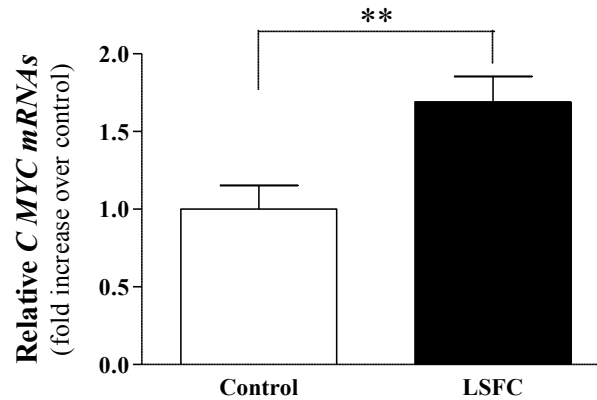


Figure 20. Expression génique de c-Myc en conditions basales.

Les fibroblastes primaires provenant d'un patient LSFC et d'un patient témoin ont été cultivés dans du DMEM standard. Les niveaux d'ARNm de c-Myc ont été déterminés par RT-PCR (voir annexes). Les résultats représentent une moyenne de six expériences indépendantes \pm SEM. ** $p < 0.01$.

c) Synthèse extra mitochondriale d'ATP dans les cellules LSFC.

Tel que mentionné précédemment dans l'introduction de cette thèse, la voie Akt/mTOR joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique. La reprogrammation métabolique, en particulier la glycolyse aérobie, permet une synthèse rapide de l'ATP indépendamment de la mitochondrie. En effet, le flux glycolytique devient 200 fois plus élevé de sorte que la synthèse d'ATP par glycolyse est plus importante que la production mitochondriale (56, 143, 152). Ce mécanisme est classiquement sous le contrôle de la voie mTORC1. Dans la présente étude, nos résultats démontrent que la prévention de l'activité de mTORC1 par la rapamycine n'a pas d'effet significatif sur les niveaux d'ATP

dans les fibroblastes LSFC alors qu'elle réduit de 15% l'ATP des fibroblastes contrôles. Ainsi, il semble que mTORC1 ne jouerait pas un rôle clé dans la synthèse d'ATP dans les cellules LSFC. Une étude récente a démontré que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine dans le modèle murin du syndrome de Leigh avec un déficit du complexe I était associée à plusieurs effets bénéfiques sur la survie ([117](#)). De même, l'inhibition de mTORC1 à la fois par probucol et la rapamycine, améliore la survie de modèles cellulaires déficitaires du complexe I ([201](#)). Bien que, les niveaux d'ATP en réponse à la rapamycine n'aient pas été rapportés dans ces études, le fait que la rapamycine augmente la survie suppose que celle-ci n'a pas d'effet drastique sur la production d'ATP, allant en accord avec nos résultats. Il est important de mentionner que l'inhibition de mTORC1 diminue encore plus les niveaux de LRPPRC et de COXIV dans les cellules LSFC. Les mêmes résultats sont observés lorsqu'on utilise un autre inhibiteur, le KU0063794, qui prévient l'activité des deux complexes, mTORC1 et mTORC2 (voir annexes). Les mécanismes potentiels de régulation de LRPPRC par mTORC1 sont discutés dans le premier manuscrit (p. 95 et p. 96) et sont résumés dans la figure 21 (p. 157). Une plus grande diminution de l'expression de COXIV alors que les niveaux d'ATP demeurent similaires voire plus élevés dans les cellules LSFC, renforce l'idée d'une synthèse d'ATP extra mitochondriale probablement par la glycolyse. Des expériences supplémentaires d'inhibition de la glycolyse par du 2-déoxyglucose permettraient d'évaluer la contribution de la glycolyse à la synthèse d'ATP dans les cellules LSFC. En complément, l'utilisation d'autres substrats comme le galactose, en remplacement au glucose, nous renseignerait également sur l'impact de la glycolyse à la synthèse d'ATP et à la survie des cellules LSFC. Rappelons que l'un des principaux rôles de mTORC1 est la régulation de la synthèse protéique ([136](#), [204](#)). L'étude récente de Peng et al a suggéré que les effets bénéfiques de l'inhibition de mTORC1

seraient médiés par la prévention de la synthèse protéique (201). Selon ces auteurs, l'activation de mTORC1 serait alors associée à une proteotoxicité liée à une synthèse accrue de protéines mutées et dysfonctionnelles. Or dans le cas de la maladie du LSFC, l'inhibition de mTORC1 résultant en une diminution plus importante de LRPPRC et donc de COXIV, cela suggère que la rapamycine puisse exacerber la dysfonction mitochondriale dans les cellules LSFC. Pour cette raison, la rapamycine ne serait probablement pas un traitement approprié pour le LSFC. Des expériences supplémentaires étudiant les effets physiologiques du traitement de la rapamycine *in vivo* seraient essentielles pour confirmer la dangerosité de celle-ci.

En résumé, l'inhibition de mTORC1 dans les cellules LSFC augmente la dysfonction mitochondriale sans altérer les niveaux d'ATP. Cela soutient l'existence d'une synthèse extramitochondriale d'ATP indépendante de mTORC1.

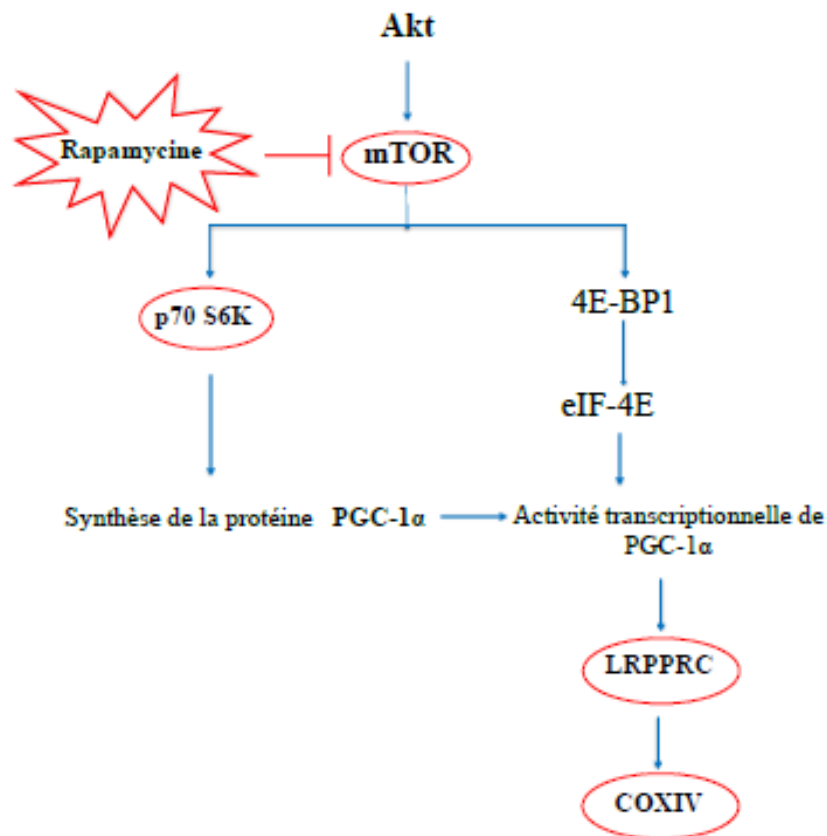


Figure 21. Hypothèse de la régulation de LRPPRC par mTOR.

Akt : protéine PKB ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; p70 S6K: Ribosomal protein S6 kinase beta-1
 PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha;
 4E-BP1 : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 ; eIF4E : facteur d'initiation de la traduction.

Le schéma ci-dessous illustre les protéines mesurées dans notre étude (Figure 22, p. 158). Il résume les changements observés dans les cellules LSFC et qui appuient l'hypothèse d'une reprogrammation métabolique.

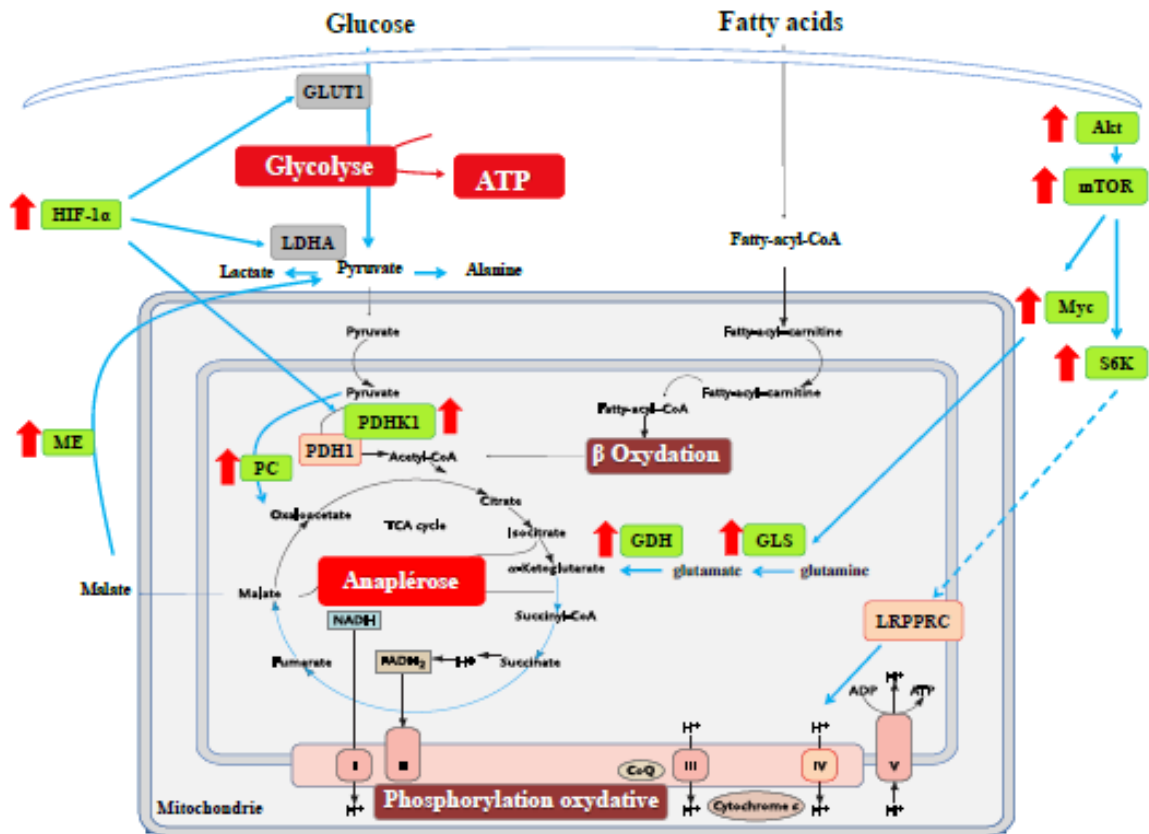


Figure 22. Reprogrammation métabolique des cellules LSFC.

: Enzymes inchangées ;
 : enzymes déficitaires ou inhibées ;
 : enzymes surexprimées ou actives dans les cellules LSFC comparativement au contrôles. Nous avons précédemment rapporté des défauts de l'OXPHOS et de la β -oxydation dans la maladie du LSFC. Dans la présente étude, nous démontrons plusieurs changements moléculaires appuyant une reprogrammation métabolique dans les cellules LSFC pour faire face à ces défauts.

GLUT1 : transporteur du glucose 1; LDHA : lactate déshydrogénase ; HIF-1 α : facteur induit par hypoxie ; Akt ou protéine kinase b ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; cMYC : myelocytomatosis oncogene ; S6K : Ribosomal protein S6 kinase beta-1; GLS1 : glutaminase1 ; GDH : glutamate déshydrogénase ; PDHK1 : pyruvate déshydrogénase ; pPDH1 : phospho- pyruvate déshydrogénase ; PC : pyruvate carboxylase ; ME : malic enzyme ; LRPPRC : Leucine-Rich PPR-motif Containing Protein ; IV : complexe quatre.

(ii) L'AMPK joue-t-il un rôle clé dans la réponse au stress nutritionnel ?

Les « crises d'acidose lactique » responsables de la majorité des décès des patients LSFC surviennent souvent dans des conditions de stress incluant l'infection, l'activité physique ou encore une diète riche en gras (22, 217). Une étude récente de notre laboratoire a évalué différents facteurs de stress et démontré que les fibroblastes LSFC étaient particulièrement susceptibles au stress nutritionnel palmitate/lactate (22). Nous avons donc choisi d'étudier les mécanismes adaptatifs impliqués dans la réponse au stress nutritionnel palmitate/lactate (1mM/10mM) par l'étude de la voie AMPK. La concentration de lactate utilisée dans notre étude avoisine celle retrouvée durant les crises des patients LSFC (12 à 26 mM lactate) (59, 173). Quant au palmitate, celui-ci est retrouvé dans les conditions physiologiques à jeun au repos, à des concentrations entre 100-500 μ M (17, 211). Dans des conditions spécifiques de stress métabolique tels que l'exercice physique, l'obésité et le diabète de type 2, ces concentrations fluctuent entre 600 et 900 μ M (211). La concentration de 1000 μ M utilisée *in vitro* dans la présente étude se rapproche ainsi des concentrations retrouvées dans des situations de dysfonction métabolique. Ce modèle expérimental nous permet de mimer les conditions de « crises ».

L'AMPK est un senseur du métabolisme énergétique. Cette enzyme est principalement activée en réponse à un stress ou une diminution des niveaux d'ATP cellulaire (29, 240). Nous sommes partis de l'hypothèse que la dysfonction mitochondriale induirait des altérations dans les voies de signalisation nutriment-dépendantes comme l'AMPK. Plus spécifiquement, nous avons suggéré qu'un défaut d'activation de la protéine AMPK contribuerait à la plus grande susceptibilité des fibroblastes LSFC au stress nutritionnel palmitate/lactate. Effectivement, comme le montre la Figure 23 ici-bas (p. 160), l'inhibition de l'activité de l'AMPK augmente la susceptibilité au traitement palmitate/lactate spécialement dans les cellules témoins.

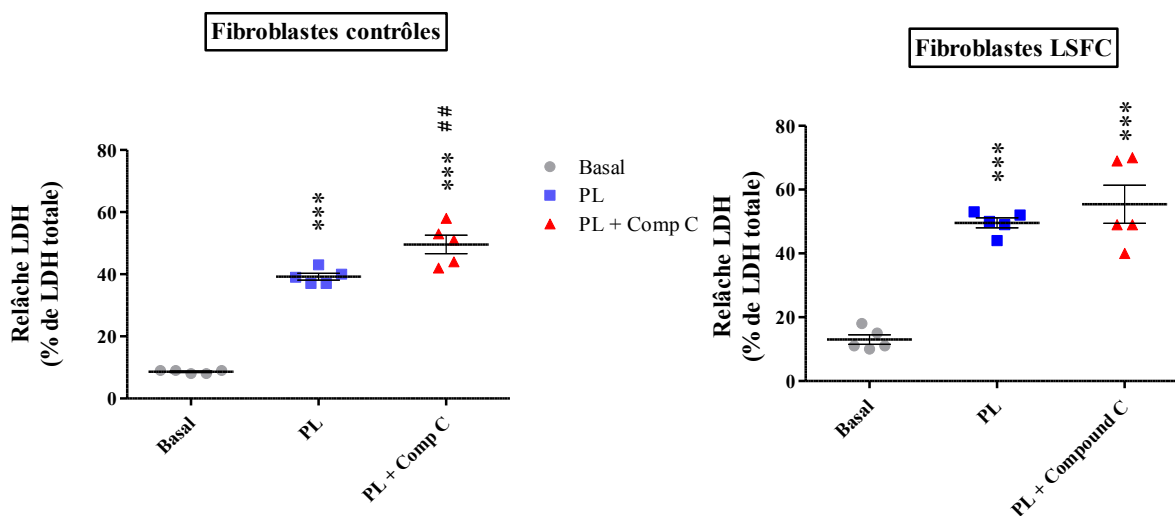


Figure 23. Effet de l'inhibition de l'activité de l'AMPK sur la survie cellulaire en présence de palmitate/lactate

Les fibroblastes immortalisés d'un patient LSFC et d'un patient contrôlé ont été incubés avec 1mM de palmitate et 10 mM de lactate ; en présence ou non de 10 µM de compound C, un inhibiteur de l'activité de l'AMPK. PL : palmitate/lactate ; Comp C : compound C ; LDH : lactate déshydrogénase. Les résultats représentent une moyenne de 4 expériences indépendantes ± SEM. *** p<0.001 vs basal ; ## p<0.01 vs basal.

Il est important de souligner que le lactate à lui seul (10 mM) n'induit pas de mortalité cellulaire (22). En effet, au repos chez un sujet sain, le taux de lactatémie varie de 0,8 à 2 mM, mais celui-ci peut atteindre les 20 mM dans certaines conditions comme l'exercice physique (209, 210). La concentration de 10 mM utilisée dans notre étude n'est donc pas toxique, elle ne fait qu'exacerber les effets du palmitate. En conséquence dans la présente discussion, nous aborderons plus particulièrement des effets du palmitate sur l'activité de l'AMPK.

a) Activation de l'AMPK par le palmitate.

Des études démontrent que l'exposition chronique à un excès de palmitate est associée à l'inactivation de l'AMPK (131, 154, 163), suggérant que cette inhibition contribue aux effets délétères du palmitate. Par contre, une exposition aiguë au palmitate est associée à l'activation de l'AMPK et à une stimulation de la β -oxydation (28, 67, 98, 266). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation de l'AMPK serait un mécanisme compensatoire précoce pour faire face à cet excès du palmitate et éviter l'accumulation de ses métabolites toxiques comme les céramides. En conformité avec cette hypothèse, nos résultats démontrent qu'une incubation de 4h avec le palmitate/lactate est associée à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK, de même que celle de son substrat l'ACC dans les cellules de témoins. Le traitement palmitate/lactate entraîne également l'augmentation de l'expression de SIRT1, LRPPRC et COXIV dans les cellules témoins.

L'augmentation de la phosphorylation de l'ACC et donc de son inhibition suggère une augmentation de la β -oxydation en réponse au palmitate/lactate (17, 259). En effet, l'ACC catalyse la synthèse du malonyl-CoA qui exerce un effet inhibiteur sur le transporteur CPT1 qui régule l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (17, 164, 165). L'inhibition de l'ACC

par l'AMPK, lève cette inhibition favorisant la β -oxydation (29, 240). Ceci est appuyé par l'étude de Watt et al (266) qui a démontré dans les cellules musculaires que l'augmentation de la β -oxydation en réponse à l'excès d'acides gras libres était dépendante de l'AMPK. On retrouve ici l'idée de base de l'hypothèse de Randle qui stipule que l'augmentation de la disponibilité des acides gras libres stimule leur β -oxydation (206). En outre, l'augmentation de SIRT1, en collaboration avec l'AMPK, promeut l'activité de PGC-1 α pour favoriser la β -oxydation. Cette situation est retrouvée particulièrement lors d'un exercice physique où l'activation de l'AMPK et l'augmentation des acides gras libres circulants stimulent l'expression de PGC-1 α (266, 271). Aussi, COXIV et LRPPRC sont tous les deux des cibles de PGC-1 α qui soutiennent indirectement une possible augmentation de celui-ci en réponse au palmitate/lactate (43, 121). Dans l'ensemble, nos données suggèrent une augmentation de la β -oxydation en réponse à un traitement de 4h avec le palmitate/lactate.

De façon intéressante, nos résultats démontrent que le prétraitement chronique des cellules avec le ZMP a un effet additif sur les effets du palmitate/lactate dans les cellules témoins. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Fillimore et al. (70) démontrant qu'une activation chronique de l'AMPK associée à une augmentation des acides gras libres a un effet additif sur plusieurs processus du métabolisme incluant l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la β -oxydation (70, 237, 248). Tous ces effets, dont l'activation de l'AMPK, en réponse au palmitate/lactate sont abolis dans les cellules LSFC, y compris l'effet additif du prétraitement avec le ZMP. La raison pour laquelle l'AMPK n'est pas activée dans les cellules LSFC, en réponse au palmitate/lactate, doit encore être clarifiée mais certaines hypothèses ont été testées et sont discutées ci-après.

b) Mécanismes d'activation de l'AMPK par le palmitate.

Bien que plusieurs études s'accordent pour dire qu'à court terme le palmitate active l'AMPK, les mécanismes par lesquels le palmitate active cette dernière sont encore controversés.

En 2002, Kawaguchi et al. ([125](#)) ont proposé que les acides gras activent l'AMPK via l'augmentation des niveaux de l'AMP. Selon ce concept, l'activation des acides gras libres à longue chaîne consommerait beaucoup d'ATP pour leur entrée dans la mitochondrie, résultant en une augmentation des niveaux d'AMP. Nous avons testé cette hypothèse en traitant d'abord nos cellules avec le DNP qui est connu pour induire une diminution de l'ATP. On se demandait si l'AMPK était activable dans les cellules LSFC en réponse à une diminution de l'ATP. Nos résultats démontrent que le DNP active l'AMPK à la fois dans les cellules LSFC et les cellules témoins. Nous avons également mesuré les niveaux d'ATP en réponse au traitement palmitate/lactate. Nos résultats montrent qu'à 4h, le palmitate/lactate ne cause pas de diminution des niveaux d'ATP aussi bien dans les cellules LSFC que les cellules contrôles. Dans notre étude, on observe donc une activation de l'AMPK indépendamment d'un changement des niveaux d'ATP, concordant avec les conclusions des études de Clark et al ; et de Watt et al. ([42](#), [266](#)). Nous avons émis une autre hypothèse en partant du principe que le métabolisme du palmitate plus spécifiquement la β -oxydation soit requis pour l'activation de l'AMPK. En effet, plusieurs études soutiennent que le 2-bromopalmitate, un analogue du palmitate, n'induit pas la phosphorylation de l'AMPK ([106](#), [274](#)). Le 2-bromopalmitate et le palmitate sont deux molécules présentant la même affinité pour les sites de liaisons, notamment ils se fixent aux mêmes transporteurs d'acides gras ([185](#)). Ils sont donc en compétition pour la plupart des processus métaboliques incluant par exemple la

palmitoylation. Cependant, le 2-bromopalmitate-CoA n'est pas un substrat pour la β -oxydation, il emprunte d'autres voies comme la ω -oxydation ([185](#), [186](#)). Nos résultats démontrent que le traitement au 2-bromopalmitate n'induit pas de phosphorylation de l'AMPK dans les cellules témoins, ni dans les cellules LSFC. On pourrait ainsi en déduire que la β -oxydation est indispensable à l'activation de l'AMPK par le palmitate. En effet, selon différentes études, la β -oxydation du palmitate génère une production de ROS qui activeraient l'AMPK via la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ([6](#), [28](#), [155](#), [183](#)). Également, l' H_2O_2 formé à partir de l'anion superoxyde généré est capable d'activer directement l'AMPK en induisant sa phosphorylation ([294](#)). Les mécanismes potentiels d'activation de l'AMPK par le palmitate sont présentés à la Figure 24 (p.165).

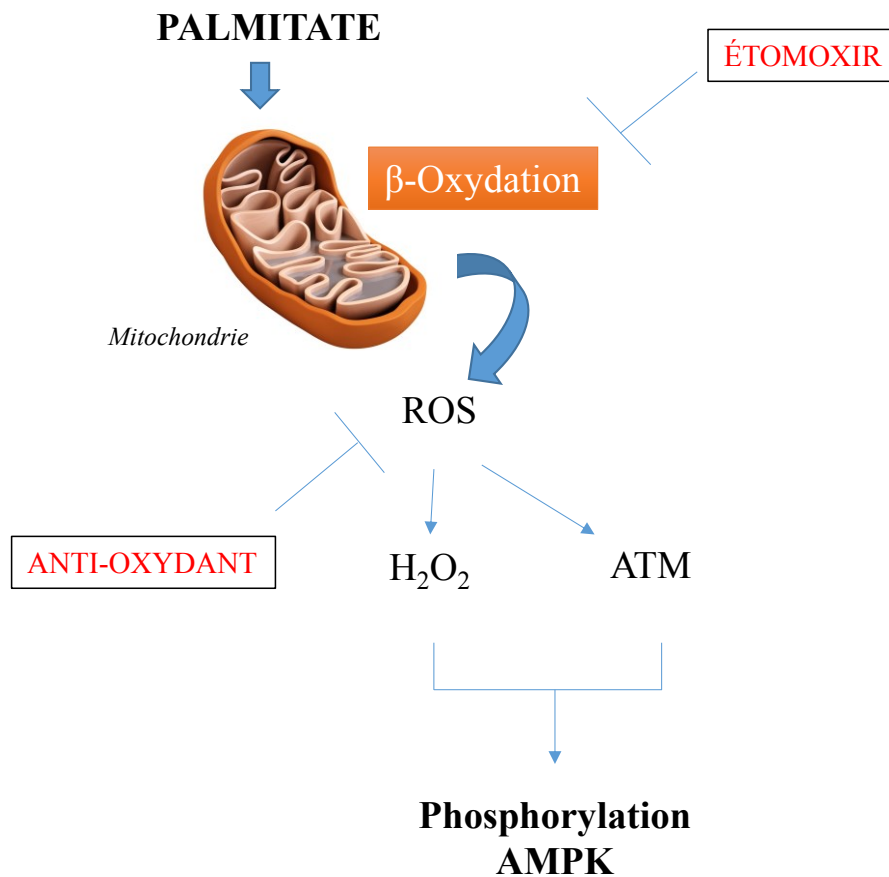


Figure 24. Mécanismes potentiels d'activation de l'AMPK par le palmitate

ROS : espèces réactives oxygénées, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated, AMPK : protéine kinase activée par l'AMP.

Dans l'ensemble, le palmitate serait métabolisé et oxydé dans les cellules témoins alors que cet aspect est réduit dans les cellules LSFC. À noter que des évidences soutiennent un défaut de β -oxydation dans les cellules LSFC. En l'occurrence, il a été rapporté que LRPPRC jouait un rôle dans le métabolisme des lipides en favorisant la β -oxydation via une augmentation de NAD⁺ par OXPHOS. Une déficience de cette protéine dans les cellules LSFC suggère fortement que cette fonction soit altérée ([148](#), [149](#)). De plus, les niveaux élevés d'acylcarnitine dans le plasma des patients atteints du LSFC appuient une altération de la β -

oxydation ([247](#)). Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour répondre à cette hypothèse telle que l'inhibition de la β -oxydation et de la formation de ROS dans les cellules témoins par l'étomoxir et la N-acétylcystéine, respectivement.

En résumé, le palmitate doit être métabolisé à travers la β -oxydation pour stimuler la phosphorylation de l'AMPK. L'altération de la β -oxydation dans les cellules LSFC contribuerait ainsi à l'inactivation de l'AMPK et à la plus grande susceptibilité aux concentrations élevées de palmitate.

CHAPITRE V - CONCLUSION

Conclusion

Le LSFC est une maladie métabolique rare et fatale dans la majorité des cas. Le gène *LRPPRC* responsable de cette maladie est associé à plusieurs rôles dans la fonction mitochondriale et de manière générale dans le métabolisme énergétique (43, 44, 224, 250). En ce sens, notre groupe a précédemment rapporté de sévères altérations métaboliques et une importante dysfonction mitochondriale dans le LSFC (22, 247). Bien que nous constatons une avancée dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques du LSFC, beaucoup reste à faire avant de mettre au point des traitements. Le but du présent projet de doctorat était d'identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques par une étude des mécanismes d'adaptation du métabolisme énergétique.

À partir des fibroblastes de peau de patients LSFC, nos résultats suggèrent, dans l'ensemble, l'existence d'une reprogrammation métabolique comme mécanisme d'adaptation. En l'occurrence, les cellules LSFC arborent une préférence d'un métabolisme glycolytique aux dépens du métabolisme oxydatif tel qu'illustré par un flux glycolytique élevé et une inhibition de la PDH1. Néanmoins, cette reprogrammation apparaît indépendante de mTOR. De façon intéressante, alors que mTOR a été dernièrement une cible thérapeutique prometteuse dans les maladies mitochondriales; l'inhibition de cette protéine par la rapamycine exacerbe les altérations préexistantes dans la cellule LSFC surtout en augmentant la déficience en *LRPPRC* et en *COXIV*. D'autre part, lorsque les cellules LSFC sont soumises au stress mimant les conditions de crises d'acidose lactique, nos résultats révèlent que les mécanismes de compensation médiés par l'AMPK sont défectueux alors qu'elle est

fonctionnelle. Plus particulièrement, il apparaît qu'une altération dans le métabolisme des lipides pourrait favoriser la dysfonction des mécanismes médiés par l'AMPK.

Vers l'identification des cibles thérapeutiques... La reprogrammation métabolique est principalement régulée par les voies Akt/ mTOR et HIF-1 α lesquelles sont surexprimées dans les cellules LSFC. Dans la présente étude, nous avons démontré que la voie Akt/mTOR ne serait pas une cible appropriée dans la maladie du LSFC. Par contre, HIF-1 α pourrait être une cible thérapeutique intéressante. En effet, la stabilisation de HIF-1 α a été récemment rapportée bénéfique et proposée comme thérapie pour les maladies mitochondriales ([114](#)). Nous avons également démontré qu'un prétraitement au ZMP, activateur spécifique de l'AMPK, n'améliore pas les mécanismes de défense des cellules LSFC; suggérant que cibler directement l'AMPK ne soit pas approprié en conditions de stress liées à des taux élevés d'acides gras. Rappelons que nos résultats suggèrent qu'un défaut de la β -oxydation soit à l'origine de l'inactivation de l'AMPK. Ainsi, une alternative serait de cibler les enzymes impliqués dans le transport mitochondrial des acides gras tel que la CPT1 enfin de favoriser la β -oxydation et l'activation de l'AMPK. Effectivement, une combinaison de L-carnitine, propionate et du bleu de méthylène prévient la mort des cellules LSFC en conditions de stress palmitate/ lactate ([22](#)).

En conclusion, cette étude apporte des connaissances nouvelles dans la régulation moléculaire du métabolisme énergétique des cellules LSFC. Notamment, l'absence d'activation de l'AMPK n'a jamais été rapportée dans les cellules LSFC. En outre, nous avons démontré pour la première fois que LRPPRC est régulé, dans des conditions différentes, par l'AMPK et mTOR. Il est important de noter que le LSFC est caractérisé par une atteinte tissu-spécifique ([59](#), [173](#), [225](#)). Il est donc possible que d'autres mécanismes régulateurs soient

présents dans d'autres tissus. Le modèle murin porteur de la mutation A354V est létal. Ainsi, la conception d'un autre modèle animal de LSFC devient un besoin crucial pour la continuité de l'étude du métabolisme des patients LSFC. Les données de la présente étude pourront alors servir de base dans l'étude du métabolisme énergétique dans d'autres tissus.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Adams SH.** Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. *Adv Nutr* 2: 445-456, 2011.
2. **Adeva-Andany M, Lopez-Ojen M, Funcasta-Calderon R, Ameneiros-Rodriguez E, Donapetry-Garcia C, Vila-Altesor M, and Rodriguez-Seijas J.** Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* 17: 76-100, 2014.
3. **Adeva-Andany MM, Calvo-Castro I, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-Garcia C, and Pedre-Pineiro AM.** Significance of l-carnitine for human health. *IUBMB life* 69: 578-594, 2017.
4. **Ahn CS, and Metallo CM.** Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer & metabolism* 3: 1, 2015.
5. **Akie TE, Liu L, Nam M, Lei S, and Cooper MP.** OXPHOS-Mediated Induction of NAD⁺ Promotes Complete Oxidation of Fatty Acids and Interdicts Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One* 10: e0125617, 2015.
6. **Alexander A, and Walker CL.** The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. *FEBS Lett* 585: 952-957, 2011.
7. **Anderson KA, Ribar TJ, Lin F, Noeldner PK, Green MF, Muehlbauer MJ, Witters LA, Kemp BE, and Means AR.** Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab* 7: 377-388, 2008.
8. **Andreelli F, Foretz M, Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Pillot B, Bado A, Tronche F, Mithieux G, Vaulont S, Burcelin R, and Viollet B.** Liver adenosine monophosphate-activated kinase- α 2 catalytic subunit is a key target for the control of

- hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology* 147: 2432-2441, 2006.
9. **Area-Gomez E, and Schon EA.** Mitochondrial genetics and disease. *J Child Neurol* 29: 1208-1215, 2014.
 10. **Atamna H, Mackey J, and Dhabbi JM.** Mitochondrial pharmacology: electron transport chain bypass as strategies to treat mitochondrial dysfunction. *Biofactors* 38: 158-166, 2012.
 11. **Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, and Dai N.** Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E592-602, 2009.
 12. **Baas AF, Boudeau J, Sapkota GP, Smit L, Medema R, Morrice NA, Alessi DR, and Clevers HC.** Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J* 22: 3062-3072, 2003.
 13. **Bachmann-Gagescu R, Merritt JL, 2nd, and Hahn SH.** A cognitively normal PDH-deficient 18-year-old man carrying the R263G mutation in the PDHA1 gene. *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1: 2009.
 14. **Balaban RS, Nemoto S, and Finkel T.** Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483-495, 2005.
 15. **Ballinger SW.** Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 38: 1278-1295, 2005.
 16. **Berardo A, Musumeci O, and Toscano A.** Cardiological manifestations of mitochondrial respiratory chain disorders. *Acta Myol* 30: 9-15, 2011.
 17. **Berg JM TJ, Stryer L.** *Biochemistry. 5th edition.* New York: W H Freeman, 2002.
 18. **Berg JM TJ, Stryer L.** . Section 18.1, Oxidative Phosphorylation in Eukaryotes Takes Place in Mitochondria. In: *Biochemistry 5th edition*, edited by Freeman NYWH2002.

19. **Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C, Frieden M, Demaurex N, and Hall MN.** Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12526-12534, 2013.
20. **Boudeau J, Baas AF, Deak M, Morrice NA, Kieloch A, Schutkowski M, Prescott AR, Clevers HC, and Alessi DR.** MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J* 22: 5102-5114, 2003.
21. **Brunel-Guitton C, Levtova A, and Sasarman F.** Mitochondrial Diseases and Cardiomyopathies. *Can J Cardiol* 31: 1360-1376, 2015.
22. **Burelle Y, Bemeur C, Rivard ME, Thompson Legault J, Boucher G, Morin C, Coderre L, and Des Rosiers C.** Mitochondrial vulnerability and increased susceptibility to nutrient-induced cytotoxicity in fibroblasts from leigh syndrome French canadian patients. *PLoS One* 10: e0120767, 2015.
23. **Camp KM, Krotoski D, Parisi MA, Gwinn KA, Cohen BH, Cox CS, Enns GM, Falk MJ, Goldstein AC, Gopal-Srivastava R, Gorman GS, Hersh SP, Hirano M, Hoffman FA, Karaa A, MacLeod EL, McFarland R, Mohan C, Mulberg AE, Odenkirchen JC, Parikh S, Rutherford PJ, Suggs-Anderson SK, Tang WH, Vockley J, Wolfe LA, Yannicelli S, Yeske PE, and Coates PM.** Nutritional interventions in primary mitochondrial disorders: Developing an evidence base. *Mol Genet Metab* 119: 187-206, 2016.
24. **Canto C, and Auwerx J.** PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20: 98-105, 2009.

25. **Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, and Auwerx J.** AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060, 2009.
26. **Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakci C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, and Auwerx J.** Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* 11: 213-219, 2010.
27. **Cantor JR, and Sabatini DM.** Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov* 2: 881-898, 2012.
28. **Cardaci S, Filomeni G, and Ciriolo MR.** Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *J Cell Sci* 125: 2115-2125, 2012.
29. **Carling D.** AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 45: 31-37, 2017.
30. **Carling D HD.** The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1012: 5, 1989.
31. **Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, and Walker JE.** Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem* 281: 32724-32727, 2006.
32. **Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, and Pfanner N.** Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644, 2009.
33. **Chan DC.** Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125: 1241-1252, 2006.
34. **Chanda D, Kim SJ, Lee IK, Shong M, and Choi HS.** Sodium arsenite induces orphan nuclear receptor SHP gene expression via AMP-activated protein kinase to inhibit

- gluconeogenic enzyme gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E368-379, 2008.
35. **Chaveroux C, Eichner LJ, Dufour CR, Shatnawi A, Khoutorsky A, Bourque G, Sonenberg N, and Giguere V.** Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERRA α are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. *Cell Metab* 17: 586-598, 2013.
36. **Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, and Maity A.** Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276: 9519-9525, 2001.
37. **Chen S MJ, Toth R, Campbell DG, Morrice NA, Mackintosh C.** Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators. *Biochem J* 409: 10, 2008.
38. **Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Martens JH, Rao NA, Aghajani-refah A, Manjeri GR, Li Y, Ifrim DC, Arts RJ, van der Veer BM, Deen PM, Logie C, O'Neill LA, Willems P, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Ng A, Joosten LA, Wijmenga C, Stunnenberg HG, Xavier RJ, and Netea MG.** mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 345: 1250684, 2014.
39. **Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Mates JM, and DeBerardinis RJ.** Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8674-8679, 2011.
40. **Choi J, Chen J, Schreiber SL, and Clardy J.** Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273: 239-242, 1996.

41. **Chung N, Park J, and Lim K.** The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Journal of exercise nutrition & biochemistry* 21: 39-47, 2017.
42. **Clark H, Carling D, and Saggerson D.** Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *Eur J Biochem* 271: 2215-2224, 2004.
43. **Cooper MP, Qu L, Rohas LM, Lin J, Yang W, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Spiegelman BM.** Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex. *Genes Dev* 20: 2996-3009, 2006.
44. **Cooper MP, Uldry M, Kajimura S, Arany Z, and Spiegelman BM.** Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130. *J Biol Chem* 283: 31960-31967, 2008.
45. **Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, and Guan KL.** Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 18: 1533-1538, 2004.
46. **Correa S, Binato R, Du Rocher B, Ferreira G, Cappelletti P, Soares-Lima S, Pinto LF, Mencialha A, and Abdelhay E.** ABCB1 regulation through LRPPRC is influenced by the methylation status of the GC -100 box in its promoter. *Epigenetics* 9: 1172-1183, 2014.
47. **Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, and Hardie DG.** 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229: 558-565, 1995.

48. **Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, and Karagiannis TC.** Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep* 42: 841-851, 2015.
49. **Crofts AR.** The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* 66: 689-733, 2004.
50. **Cuillerier A, Honarmand S, Cadete VJJ, Ruiz M, Forest A, Deschenes S, Beauchamp C, Charron G, Rioux JD, Des Rosiers C, Shoubridge EA, and Burelle Y.** Loss of hepatic LRPPRC alters mitochondrial bioenergetics, regulation of permeability transition and transmembrane ROS diffusion. *Hum Mol Genet* 26: 3186-3201, 2017.
51. **Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, and Puigserver P.** mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450: 736-740, 2007.
52. **da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Ramos MJ, and Antunes A.** The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics* 9: 119, 2008.
53. **da Silva Xavier G, Leclerc I, Salt IP, Doiron B, Hardie DG, Kahn A, and Rutter GA.** Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4023-4028, 2000.
54. **Danhauser K, Smeitink JA, Freisinger P, Sperl W, Sabir H, Hadzik B, Mayatepek E, Morava E, and Distelmaier F.** Treatment options for lactic acidosis and metabolic crisis in children with mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis* 38: 467-475, 2015.
55. **de Andrade PB, Rubi B, Frigerio F, van den Ouweland JM, Maassen JA, and Maechler P.** Diabetes-associated mitochondrial DNA mutation A3243G impairs cellular metabolic pathways necessary for beta cell function. *Diabetologia* 49: 1816-1826, 2006.

56. **DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, and Thompson CB.** The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20, 2008.
57. **DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, and Thompson CB.** Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19345-19350, 2007.
58. **Debray FG, Lambert M, and Mitchell GA.** Disorders of mitochondrial function. *Curr Opin Pediatr* 20: 471-482, 2008.
59. **Debray FG, Morin C, Janvier A, Villeneuve J, Maranda B, Laframboise R, Lacroix J, Decarie JC, Robitaille Y, Lambert M, Robinson BH, and Mitchell GA.** LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet* 48: 183-189, 2011.
60. **Delaney NF, Sharma R, Tadvalkar L, Clish CB, Haller RG, and Mootha VK.** Metabolic profiles of exercise in patients with McArdle disease or mitochondrial myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 8402-8407, 2017.
61. **Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG, and Chatham JC.** Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc Res* 90: 210-219, 2011.
62. **DiMauro S.** Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1658: 80-88, 2004.
63. **Distelmaier F, Visch HJ, Smeitink JA, Mayatepek E, Koopman WJ, and Willems PH.** The antioxidant Trolox restores mitochondrial membrane potential and Ca²⁺-stimulated ATP production in human complex I deficiency. *J Mol Med (Berl)* 87: 515-522, 2009.

64. **Drew BG, Fidge NH, Gallon-Beaumier G, Kemp BE, and Kingwell BA.** High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6999-7004, 2004.
65. **Dupuy F, Tabaries S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, Omeroglu A, Gao D, Leung S, Amir E, Clemons M, Aguilar-Mahecha A, Basik M, Vincent EE, St-Pierre J, Jones RG, and Siegel PM.** PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab* 22: 577-589, 2015.
66. **Egawa T, Ohno Y, Goto A, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Yokoyama S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, and Goto K.** AICAR-induced activation of AMPK negatively regulates myotube hypertrophy through the HSP72-mediated pathway in C2C12 skeletal muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306: E344-354, 2014.
67. **Fediuc S, Gaidhu MP, and Ceddia RB.** Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J Lipid Res* 47: 412-420, 2006.
68. **Fernandez-Vizarra E, Tiranti V, and Zeviani M.** Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* 1793: 200-211, 2009.
69. **Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, and Adams SH.** Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS One* 5: e15234, 2010.
70. **Fillmore N, Jacobs DL, Mills DB, Winder WW, and Hancock CR.** Chronic AMP-activated protein kinase activation and a high-fat diet have an additive effect on mitochondria in rat skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 109: 511-520, 2010.

71. **Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV, Feijoo-Carnero C, Hukelmann JL, Rolf J, Panteleyev AA, Okkenhaug K, and Cantrell DA.** PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 209: 2441-2453, 2012.
72. **Finsterer J, and Bindu PS.** Therapeutic strategies for mitochondrial disorders. *Pediatr Neurol* 52: 302-313, 2015.
73. **Freemerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, Macintyre AN, Goraksha-Hicks P, Rathmell JC, and Makowski L.** Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J Biol Chem* 289: 7884-7896, 2014.
74. **Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam KP, Mitchell MW, Nakhle PJ, Ryals JA, Milburn MV, Nannipieri M, Camastra S, Natali A, and Ferrannini E.** alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One* 5: e10883, 2010.
75. **Galvan-Pena S, and O'Neill LA.** Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* 5: 420, 2014.
76. **Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, and Dang CV.** c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458: 762-765, 2009.
77. **Garcia-Martinez JM, and Alessi DR.** mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416: 375-385, 2008.

78. **Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, and Alessi DR.** Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J* 421: 29-42, 2009.
79. **Garrido-Maraver J, Paz MV, Cordero MD, Bautista-Lorite J, Oropesa-Avila M, de la Mata M, Pavon AD, de Lavera I, Alcocer-Gomez E, Galan F, Ybot Gonzalez P, Cotan D, Jackson S, and Sanchez-Alcazar JA.** Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. *Biochim Biophys Acta* 1852: 2535-2553, 2015.
80. **Gerald D BE, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M, Mehta-Grigoriou F.** JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 118: 13, 2004.
81. **Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Aude SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, and Los MJ.** Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 112: 24-49, 2014.
82. **Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, and Hardie DG.** AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab* 18: 556-566, 2013.
83. **Grundlingh J, Dargan PI, El-Zanfaly M, and Wood DM.** 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol* 7: 205-212, 2011.

84. **Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, and Schumacker PT.** Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 28: 718-731, 2008.
85. **Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, and Shaw RJ.** AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-226, 2008.
86. **Haikala HM, Anttila JM, and Klefstrom J.** MYC and AMPK-Save Energy or Die! *Frontiers in cell and developmental biology* 5: 38, 2017.
87. **Haikala HM, Marques E, Turunen M, and Klefstrom J.** Myc requires RhoA/SRF to reprogram glutamine metabolism. *Small GTPases* 1-9, 2016.
88. **Haissaguerre M, Saucisse N, and Cota D.** Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 397: 67-77, 2014.
89. **Han R LR, Ding Q, Wang Z, Luo X, Zhang Y, Cui G, He J, Liu W, Chen Y.** Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. *Diabetologia* 50: 8, 2007.
90. **Hardie DG.** AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* 20: 939-952, 2014.
91. **Hardie DG.** Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: 2012.
92. **Harmel J, Ruzzenente B, Terzioglu M, Spahr H, Falkenberg M, and Larsson NG.** The leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein (LRPPRC) does not activate transcription in mammalian mitochondria. *J Biol Chem* 288: 15510-15519, 2013.

93. **Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B, and Wu P.** Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv Enzyme Regul* 42: 249-259, 2002.
94. **Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, and Hardie DG.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2: 28, 2003.
95. **Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, and Hardie DG.** Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2: 9-19, 2005.
96. **Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, Towler MC, Brown LJ, Ogunbayo OA, Evans AM, and Hardie DG.** Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 11: 554-565, 2010.
97. **Hayashi G, and Cortopassi G.** Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases. *Free Radic Biol Med* 88: 10-17, 2015.
98. **Hebbachi A, and Saggerson D.** Acute regulation of 5'-AMP-activated protein kinase by long-chain fatty acid, glucose and insulin in rat primary adipocytes. *Biosci Rep* 33: 71-82, 2012.
99. **Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpaa M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, and Aaltonen LA.** A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391: 184-187, 1998.
100. **Hirasawa T, Miyazawa M, Yasuda M, Shida M, Ikeda M, Kajiwara H, Matsui N, Fujita M, Muramatsu T, and Mikami M.** Alterations of hypoxia-induced factor signaling pathway

due to mammalian target of rapamycin (mTOR) suppression in ovarian clear cell adenocarcinoma: in vivo and in vitro explorations for clinical trial. *Int J Gynecol Cancer* 23: 1210-1218, 2013.

101. **Holness MJ, and Sugden MC.** Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 31: 1143-1151, 2003.
102. **Hook SS, and Means AR.** Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 471-505, 2001.
103. **Hopkins TA, Dyck JR, and Lopaschuk GD.** AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem Soc Trans* 31: 207-212, 2003.
104. **Horton JD GJ, Brown MS.** SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 6, 2002.
105. **Hughes SD, Kanabus M, Anderson G, Hargreaves IP, Rutherford T, O'Donnell M, Cross JH, Rahman S, Eaton S, and Heales SJ.** The ketogenic diet component decanoic acid increases mitochondrial citrate synthase and complex I activity in neuronal cells. *J Neurochem* 129: 426-433, 2014.
106. **Iglesias MA, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW, and Ye JM.** AMP-activated protein kinase activation by AICAR increases both muscle fatty acid and glucose uptake in white muscle of insulin-resistant rats in vivo. *Diabetes* 53: 1649-1654, 2004.
107. **Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, Kaminishi M, and Esumi H.** Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 562-567, 2001.

108. **Inoki K, Kim J, and Guan KL.** AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52: 381-400, 2012.
109. **Inoki K, Li Y, Xu T, and Guan KL.** Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17: 1829-1834, 2003.
110. **Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, and Guan KL.** TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 648-657, 2002.
111. **Inoki K, Zhu T, and Guan KL.** TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-590, 2003.
112. **Isohanni PL, T.; Honarmand, S.; Lapatto, R.; Lönnqvist, T.; Shoubridge, E.; Suomalainen Wartiovaara, A.** PP03.4 – 2660: Recurrent metabolic crises and mitochondrial encephalocardiomyopathy due to mutations in LRPPRC. *Eur J Paediatr Neurol* 19: 2015.
113. **Jager S, Handschin C, St-Pierre J, and Spiegelman BM.** AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12017-12022, 2007.
114. **Jain IH, Zazzeron L, Goli R, Alexa K, Schatzman-Bone S, Dhillon H, Goldberger O, Peng J, Shalem O, Sanjana NE, Zhang F, Goessling W, Zapol WM, and Mootha VK.** Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science* 352: 54-61, 2016.
115. **Jeong SY, and Seol DW.** The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports* 41: 11-22, 2008.
116. **Jeppesen TD, Schwartz M, Olsen DB, Wibrand F, Krag T, Duno M, Hauerslev S, and Vissing J.** Aerobic training is safe and improves exercise capacity in patients with mitochondrial myopathy. *Brain* 129: 3402-3412, 2006.

117. **Johnson SC, Yanos ME, Kayser EB, Quintana A, Sangesland M, Castanza A, Uhde L, Hui J, Wall VZ, Gagnidze A, Oh K, Wasko BM, Ramos FJ, Palmiter RD, Rabinovitch PS, Morgan PG, Sedensky MM, and Kaeberlein M.** mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* 342: 1524-1528, 2013.
118. **Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, and Thompson CB.** AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18: 283-293, 2005.
119. **Jorgensen SB, Treebak JT, Viollet B, Schjerling P, Vaulont S, Wojtaszewski JF, and Richter EA.** Role of AMPKalpha2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E331-339, 2007.
120. **Jorgensen SB, Wojtaszewski JF, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, Schjerling P, Vaulont S, Neuffer PD, Richter EA, and Pilegaard H.** Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J* 19: 1146-1148, 2005.
121. **Jornayvaz FR, and Shulman GI.** Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47: 69-84, 2010.
122. **Kahn BB, Alquier T, Carling D, and Hardie DG.** AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25, 2005.
123. **Kamour A, George N, Gwynnette D, Cooper G, Lupton D, Eddleston M, Thompson JP, Vale JA, Thanacoody HK, Hill S, and Thomas SH.** Increasing frequency of severe clinical toxicity after use of 2,4-dinitrophenol in the UK: a report from the National Poisons Information Service. *Emerg Med J* 32: 383-386, 2015.

124. **Kanabus M, Heales SJ, and Rahman S.** Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders. *Br J Pharmacol* 171: 1798-1817, 2014.
125. **Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, and Uyeda K.** Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277: 3829-3835, 2002.
126. **Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, and Dang CV.** HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3: 177-185, 2006.
127. **Kim SH, Scott SA, Bennett MJ, Carson RP, Fessel J, Brown HA, and Ess KC.** Multi-organ abnormalities and mTORC1 activation in zebrafish model of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *PLoS genetics* 9: e1003563, 2013.
128. **Kohler F, Muller-Rischart AK, Conradt B, and Rolland SG.** The loss of LRPPRC function induces the mitochondrial unfolded protein response. *Aging (Albany NY)* 7: 701-717, 2015.
129. **Koivunen P, Hirsila M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, and Myllyharju J.** Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem* 282: 4524-4532, 2007.
130. **Koppenol WH, Bounds PL, and Dang CV.** Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 325-337, 2011.
131. **Koyama T, Kume S, Koya D, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sugimoto T, Haneda M, Sugaya T, Kashiwagi A, Maegawa H, and Uzu T.** SIRT3 attenuates palmitate-induced

- ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med* 51: 1258-1267, 2011.
132. **Kristiansen SB, Solskov L, Jessen N, Lofgren B, Schmitz O, Nielsen-Kudsk JE, Nielsen TT, Botker HE, and Lund S.** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases myocardial glucose uptake during reperfusion and induces late pre-conditioning: potential role of AMP-activated protein kinase. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105: 10-16, 2009.
133. **Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, and Lopaschuk GD.** High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 270: 17513-17520, 1995.
134. **Labialle S, Dayan G, Gayet L, Rigal D, Gambrelle J, and Baggetto LG.** New invMED1 element cis-activates human multidrug-related MDR1 and MVP genes, involving the LRP130 protein. *Nucleic Acids Res* 32: 3864-3876, 2004.
135. **Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M, and Viollet B.** 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* 26: 5336-5347, 2006.
136. **Laplane M, and Sabatini DM.** mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293, 2012.
137. **LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, and Tomas E.** Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E175-181, 2006.

138. **Lee E, Choi J, and Lee HS.** Palmitate induces mitochondrial superoxide generation and activates AMPK in podocytes. *J Cell Physiol* 232: 3209-3217, 2017.
139. **Lee EH, Ahn MS, Hwang JS, Ryu KH, Kim SJ, and Kim SH.** A Korean female patient with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase complex deficiency due to a novel point mutation (Y161C) in the PDHA1 gene. *J Korean Med Sci* 21: 800-804, 2006.
140. **Legault J, Larouche PL, Cote I, Bouchard L, Pichette A, Robinson BH, and Morin C.** Low-concentration methylene blue maintains energy production and strongly improves survival of Leigh syndrome French Canadian skin fibroblasts. *J Pharm Pharm Sci* 14: 438-449, 2011.
141. **Legendre-Guillemain V, Wasiak S, Hussain NK, Angers A, and McPherson PS.** ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci* 117: 9-18, 2004.
142. **Li X, Lv L, Zheng J, Zhou J, Liu B, Chen H, Liang C, Wang R, Su L, Li X, and Fan D.** The significance of LRPPRC overexpression in gastric cancer. *Med Oncol* 31: 818, 2014.
143. **Li XB, Gu JD, and Zhou QH.** Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thoracic cancer* 6: 17-24, 2015.
144. **Li Y, Corradetti MN, Inoki K, and Guan KL.** TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 29: 32-38, 2004.
145. **Lightowers RN, and Chrzanowska-Lightowers ZM.** Human pentatricopeptide proteins: only a few and what do they do? *RNA Biol* 10: 1433-1438, 2013.
146. **Lightowers RN, and Chrzanowska-Lightowers ZM.** PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression. *Biochem J* 416: e5-6, 2008.

147. **Liko D, and Hall MN.** mTOR in health and in sickness. *J Mol Med (Berl)* 93: 1061-1073, 2015.
148. **Liu L, Nam M, Fan W, Akie TE, Hoaglin DC, Gao G, Keaney JF, Jr., and Cooper MP.** Nutrient sensing by the mitochondrial transcription machinery dictates oxidative phosphorylation. *J Clin Invest* 124: 768-784, 2014.
149. **Liu L, Sanosaka M, Lei S, Bestwick ML, Frey JH, Jr., Surovtseva YV, Shadel GS, and Cooper MP.** LRP130 protein remodels mitochondria and stimulates fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 286: 41253-41264, 2011.
150. **Liu P, Guo J, Gan W, and Wei W.** Dual phosphorylation of Sin1 at T86 and T398 negatively regulates mTORC2 complex integrity and activity. *Protein & cell* 5: 171-177, 2014.
151. **Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, and Sutherland C.** 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49: 896-903, 2000.
152. **Lopez-Lazaro M.** The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med Chem* 8: 305-312, 2008.
153. **Lu H, Forbes RA, and Verma A.** Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277: 23111-23115, 2002.
154. **Lu J, Wang Q, Huang L, Dong H, Lin L, Lin N, Zheng F, and Tan J.** Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: prevention by AMPK activator. *Endocrinology* 153: 5275-5284, 2012.

155. **Ly LD, Xu S, Choi SK, Ha CM, Thoudam T, Cha SK, Wiederkehr A, Wollheim CB, Lee IK, and Park KS.** Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med* 49: e291, 2017.
156. **Marcinko K, and Steinberg GR.** The role of AMPK in controlling metabolism and mitochondrial biogenesis during exercise. *Exp Physiol* 99: 1581-1585, 2014.
157. **Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, and Moreno-Sanchez R.** HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 9: 1084-1101, 2009.
158. **Marsin AS BL, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L.** Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 10: 8, 2000.
159. **Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, and Hue L.** The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 277: 30778-30783, 2002.
160. **Masoud GN, and Li W.** HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta pharmaceutica Sinica B* 5: 378-389, 2015.
161. **Masui K, Cavenee WK, and Mischel PS.** mTORC2 in the center of cancer metabolic reprogramming. *Trends Endocrinol Metab* 25: 364-373, 2014.
162. **Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, Iwanami A, Liu F, Villa GR, Gu Y, Campos C, Zhu S, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Mellinghoff IK, Cavenee WK, Shaw RJ, and Mischel PS.** mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metab* 18: 726-739, 2013.

163. **Mayer CM, and Belsham DD.** Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151: 576-585, 2010.
164. **McGarry JD, and Brown NF.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244: 1-14, 1997.
165. **McGarry JD, Mannaerts GP, and Foster DW.** A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 60: 265-270, 1977.
166. **McGee SL vDB, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M.** AMP-Activated Protein Kinase Regulates GLUT4 Transcription by Phosphorylating Histone Deacetylase 5. *Diabetes* 57: 7, 2008.
167. **Merante F, Petrova-Benedict R, MacKay N, Mitchell G, Lambert M, Morin C, De Braekeleer M, Laframboise R, Gagne R, and Robinson BH.** A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *Am J Hum Genet* 53: 481-487, 1993.
168. **Mermigkis C, Bouloukaki I, Mastorodemos V, Plaitakis A, Alogdianakis V, Siafakas N, and Schiza S.** Medical treatment with thiamine, coenzyme Q, vitamins E and C, and carnitine improved obstructive sleep apnea in an adult case of Leigh disease. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung* 17: 1129-1135, 2013.
169. **Michaud M, Barakat S, Magnard S, Rigal D, and Baggetto LG.** Leucine-rich protein 130 contributes to apoptosis resistance of human hepatocarcinoma cells. *Int J Oncol* 38: 169-178, 2011.

170. **Mizushima N.** Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335: 71-84, 2009.
171. **Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu F, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, and Lander ES.** Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 605-610, 2003.
172. **Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, and Groop LC.** PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34: 267-273, 2003.
173. **Morin C, Mitchell G, Larochele J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, and De Braekeleer M.** Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet* 53: 488-496, 1993.
174. **Morita M, Gravel SP, Chenard V, Sikstrom K, Zheng L, Alain T, Gandin V, Avizonis D, Arguello M, Zakaria C, McLaughlan S, Nouet Y, Pause A, Pollak M, Gottlieb E, Larsson O, St-Pierre J, Topisirovic I, and Sonenberg N.** mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab* 18: 698-711, 2013.
175. **Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, and Topisirovic I.** mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 14: 473-480, 2015.

176. **Mounier C, Bouraoui L, and Rassart E.** Lipogenesis in cancer progression (review). *Int J Oncol* 45: 485-492, 2014.
177. **Mowat D KD, Kamath KR, Kan A, Thorburn DR, Christodoulou J.** Respiratory chain complex III [correction of complex] in deficiency with pruritus: a novel vitamin responsive clinical feature. *J Pediatr* 134: 2, 1999.
178. **Mu J, Brozinick JT, Jr., Valladares O, Bucan M, and Birnbaum MJ.** A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7: 1085-1094, 2001.
179. **Munday MR.** Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 30: 1059-1064, 2002.
180. **Murphy JL, Blakely EL, Schaefer AM, He L, Wyrick P, Haller RG, Taylor RW, Turnbull DM, and Taivassalo T.** Resistance training in patients with single, large-scale deletions of mitochondrial DNA. *Brain* 131: 2832-2840, 2008.
181. **Musi N.** AMP-activated protein kinase and type 2 diabetes. *Curr Med Chem* 13: 583-589, 2006.
182. **Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, and Goodyear LJ.** Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2074-2081, 2002.
183. **Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, and Kaneko S.** Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem* 284: 14809-14818, 2009.

184. **Novikova DS, Garabadzhiu AV, Melino G, Barlev NA, and Tribulovich VG.** AMP-activated protein kinase: structure, function, and role in pathological processes. *Biochemistry (Mosc)* 80: 127-144, 2015.
185. **Oakes ND, and Furler SM.** Evaluation of free fatty acid metabolism in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 967: 158-175, 2002.
186. **Oakes ND, Kjellstedt A, Forsberg GB, Clementz T, Camejo G, Furler SM, Kraegen EW, Olwegard-Halvarsson M, Jenkins AB, and Ljung B.** Development and initial evaluation of a novel method for assessing tissue-specific plasma free fatty acid utilization in vivo using (R)-2-bromopalmitate tracer. *J Lipid Res* 40: 1155-1169, 1999.
187. **Oakhill JS, Chen ZP, Scott JW, Steel R, Castelli LA, Ling N, Macaulay SL, and Kemp BE.** beta-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19237-19241, 2010.
188. **Oakhill JS, Scott JW, and Kemp BE.** AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab* 23: 125-132, 2012.
189. **Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, and Kemp BE.** AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332: 1433-1435, 2011.
190. **Ochoa-Ruiz E D-RR.** Anaplerosis in cancer: Another step beyond the Warburg effect. *American Journal of Molecular Biology* 2: 13, 2012.
191. **Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamijo T, Nakagawara A, and Kizaki H.** Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem* 283: 3979-3987, 2008.

192. **Olahova M, Hardy SA, Hall J, Yarham JW, Haack TB, Wilson WC, Alston CL, He L, Aznauryan E, Brown RM, Brown GK, Morris AA, Mundy H, Broomfield A, Barbosa IA, Simpson MA, Deshpande C, Moeslinger D, Koch J, Stettner GM, Bonnen PE, Prokisch H, Lightowlers RN, McFarland R, Chrzanowska-Lightowlers ZM, and Taylor RW.** LRPPRC mutations cause early-onset multisystem mitochondrial disease outside of the French-Canadian population. *Brain* 138: 3503-3519, 2015.
193. **Olson M, and Kornbluth S.** Mitochondria in apoptosis and human disease. *Curr Mol Med* 1: 91-122, 2001.
194. **Owen OE, Kalhan SC, and Hanson RW.** The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277: 30409-30412, 2002.
195. **Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, and Mootha VK.** A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134: 112-123, 2008.
196. **Pakavathkumar P, Sharma G, Kaushal V, Foveau B, and LeBlanc AC.** Methylene Blue Inhibits Caspases by Oxidation of the Catalytic Cysteine. *Sci Rep* 5: 13730, 2015.
197. **Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS, and Ha J.** Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mol Med* 39: 222-229, 2007.
198. **Patel MS, and Korotchkina LG.** Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans* 34: 217-222, 2006.
199. **Patel MS, Nemeria NS, Furey W, and Jordan F.** The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J Biol Chem* 289: 16615-16623, 2014.

200. **Pehmoller C, Treebak JT, Birk JB, Chen S, Mackintosh C, Hardie DG, Richter EA, and Wojtaszewski JF.** Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E665-675, 2009.
201. **Peng M, Ostrovsky J, Kwon YJ, Polyak E, Licata J, Tsukikawa M, Marty E, Thomas J, Felix CA, Xiao R, Zhang Z, Gasser DL, Argon Y, and Falk MJ.** Inhibiting cytosolic translation and autophagy improves health in mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 24: 4829-4847, 2015.
202. **Peralta S, Torraco A, Iommarini L, and Diaz F.** Mitochondrial Diseases Part III: Therapeutic interventions in mouse models of OXPHOS deficiencies. *Mitochondrion* 23: 71-80, 2015.
203. **Pfeffer G, Horvath R, Klopstock T, Mootha VK, Suomalainen A, Koene S, Hirano M, Zeviani M, Bindoff LA, Yu-Wai-Man P, Hanna M, Carelli V, McFarland R, Majamaa K, Turnbull DM, Smeitink J, and Chinnery PF.** New treatments for mitochondrial disease- no time to drop our standards. *Nat Rev Neurol* 9: 474-481, 2013.
204. **Proud CG.** mTOR Signalling in Health and Disease. *Biochem Soc Trans* 39: 431-436, 2011.
205. **Rahman S.** Emerging aspects of treatment in mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis* 38: 641-653, 2015.
206. **Randle PJ.** Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14: 263-283, 1998.
207. **Rattan R, Giri S, Singh AK, and Singh I.** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280: 39582-39593, 2005.

208. **Riazi R, Khairallah M, Cameron JM, Pencharz PB, Des Rosiers C, and Robinson BH.** Probing pyruvate metabolism in normal and mutant fibroblast cell lines using ¹³C-labeled mass isotopomer analysis and mass spectrometry. *Mol Genet Metab* 98: 349-355, 2009.
209. **Robinson BH.** Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 89: 3-13, 2006.
210. **Robinson BH.** Lactic Acidemia: Disorders of Pyruvate Carboxylase and Pyruvate Dehydrogenase. *McGraw-Hill, New York, Toronto* 2001.
211. **Roden M.** How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci* 19: 92-96, 2004.
212. **Ross FA, Jensen TE, and Hardie DG.** Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different gamma subunit isoforms. *Biochem J* 473: 189-199, 2016.
213. **Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, and Saha AK.** AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand* 178: 435-442, 2003.
214. **Ruiz M, Gelinas R, Vaillant F, Lauzier B, and Des Rosiers C.** Metabolic Tracing Using Stable Isotope-Labeled Substrates and Mass Spectrometry in the Perfused Mouse Heart. *Methods Enzymol* 561: 107-147, 2015.
215. **Ruzzenente B, Metodiev MD, Wredenberg A, Bratic A, Park CB, Camara Y, Milenkovic D, Zickermann V, Wibom R, Hultenby K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Brandt U, Stewart JB, Gustafsson CM, and Larsson NG.** LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J* 31: 443-456, 2012.
216. **Saada A.** Mitochondria: mitochondrial OXPHOS (dys) function ex vivo--the use of primary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 48: 60-65, 2014.
217. **Saguenay-Lac-Saint-Jean Adlald.** Trousse d'information sur l'acidose lactique.

218. **Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, and Sabatini DM.** The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320: 1496-1501, 2008.
219. **Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, and Sabatini DM.** PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25: 903-915, 2007.
220. **Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, and Carling D.** Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403: 139-148, 2007.
221. **Saraste M.** Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493, 1999.
222. **Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, and Sabatini DM.** Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22: 159-168, 2006.
223. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, and Sabatini DM.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101, 2005.
224. **Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, and Shoubridge EA.** LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell* 21: 1315-1323, 2010.
225. **Sasarman F, Nishimura T, Antonicka H, Weraarpachai W, and Shoubridge EA.** Tissue-specific responses to the LRPPRC founder mutation in French Canadian Leigh Syndrome. *Hum Mol Genet* 24: 480-491, 2015.

226. **Saunier E, Benelli C, and Bortoli S.** The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents. *Int J Cancer* 138: 809-817, 2016.
227. **Scarpulla RC.** Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88: 611-638, 2008.
228. **Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, and Chinnery PF.** The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 1659: 115-120, 2004.
229. **Schapira AH.** Mitochondrial diseases. *Lancet* 379: 1825-1834, 2012.
230. **Sellers K, Fox MP, Bousamra M, 2nd, Slone SP, Higashi RM, Miller DM, Wang Y, Yan J, Yuneva MO, Deshpande R, Lane AN, and Fan TW.** Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *J Clin Invest* 125: 687-698, 2015.
231. **Semenza GL.** HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20: 51-56, 2010.
232. **Sengupta S, Peterson TR, and Sabatini DM.** Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40: 310-322, 2010.
233. **Shaw A, Jeromson S, Watterson KR, Pediani JD, Gallagher IJ, Whalley T, Dreczkowski G, Brooks N, Galloway SD, and Hamilton DL.** Multiple AMPK activators inhibit l-carnitine uptake in C2C12 skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 312: C689-c696, 2017.
234. **Shen QW, Zhu MJ, Tong J, Ren J, and Du M.** Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by alpha-lipoic acid in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1395-1403, 2007.
235. **Siddiqui N, and Borden KL.** mRNA export and cancer. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 3: 13-25, 2012.

236. **Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, and Jacobs HT.** Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab* 3: 9-13, 2006.
237. **Smith AC, Bruce CR, and Dyck DJ.** AMP kinase activation with AICAR further increases fatty acid oxidation and blunts triacylglycerol hydrolysis in contracting rat soleus muscle. *J Physiol* 565: 547-553, 2005.
238. **Sondheimer N, Fang JK, Polyak E, Falk MJ, and Avadhani NG.** Leucine-rich pentatricopeptide-repeat containing protein regulates mitochondrial transcription. *Biochemistry* 49: 7467-7473, 2010.
239. **Stacpoole PW.** The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging cell* 11: 371-377, 2012.
240. **Steinberg GR, and Kemp BE.** AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89: 1025-1078, 2009.
241. **Sterky FH, Ruzzenente B, Gustafsson CM, Samuelsson T, and Larsson NG.** LRPPRC is a mitochondrial matrix protein that is conserved in metazoans. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 759-764, 2010.
242. **Suski M, Wisniewska A, Stachowicz A, Olszanecki R, Kus K, Bialas M, Madej J, and Korbut R.** The influence of AICAR - direct activator of AMP-activated protein kinase (AMPK) - on liver proteome in apoE-knockout mice. *Eur J Pharm Sci* 104: 406-416, 2017.
243. **Syed F, Sanganee HJ, Singh S, Bahl A, and Bayat A.** Potent dual inhibitors of TORC1 and TORC2 complexes (KU-0063794 and KU-0068650) demonstrate in vitro and ex vivo anti-keloid scar activity. *J Invest Dermatol* 133: 1340-1350, 2013.

244. **Taivassalo T, Gardner JL, Taylor RW, Schaefer AM, Newman J, Barron MJ, Haller RG, and Turnbull DM.** Endurance training and detraining in mitochondrial myopathies due to single large-scale mtDNA deletions. *Brain* 129: 3391-3401, 2006.
245. **Taivassalo T, and Haller RG.** Exercise and training in mitochondrial myopathies. *Med Sci Sports Exerc* 37: 2094-2101, 2005.
246. **Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Inoue H, Sato K, Orime K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Atsumi T, and Terauchi Y.** AMPK is involved in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets under a low glucose concentration. *PLoS One* 8: e64633, 2013.
247. **Thompson Legault J, Strittmatter L, Tardif J, Sharma R, Tremblay-Vaillancourt V, Aubut C, Boucher G, Clish CB, Cyr D, Daneault C, Waters PJ, Vachon L, Morin C, Laprise C, Rioux JD, Mootha VK, and Des Rosiers C.** A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell reports* 13: 981-989, 2015.
248. **Thomson DM, Brown JD, Fillmore N, Condon BM, Kim HJ, Barrow JR, and Winder WW.** LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1572-1579, 2007.
249. **Tian T, Ikeda J, Wang Y, Mamat S, Luo W, Aozasa K, and Morii E.** Role of leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein (LRPPRC) for anti-apoptosis and tumorigenesis in cancers. *Eur J Cancer* 48: 2462-2473, 2012.
250. **Topisirovic I, Siddiqui N, Lapointe VL, Trost M, Thibault P, Bangeranye C, Pinol-Roma S, and Borden KL.** Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J* 28: 1087-1098, 2009.

251. **Turrens JF**. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344, 2003.
252. **Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, and Vivekanandan P**. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther* 137: 318-330, 2013.
253. **van der Vos KE, and Coffey PJ**. Glutamine metabolism links growth factor signaling to the regulation of autophagy. *Autophagy* 8: 1862-1864, 2012.
254. **van Oort MM vDJ, Hasnaoui ME, Glatz JF, Bonen A, van der Horst DJ, Rodenburg KW, P Luiken JJ**. Effects of AMPK activators on the sub-cellular distribution of fatty acid transporters CD36 and FABPpm. *Arch Physiol Biochem* 115: 9, 2009.
255. **Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, and Kim DH**. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9: 316-323, 2007.
256. **Vander Heiden MG, Cantley LC, and Thompson CB**. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033, 2009.
257. **Viscomi C, Bottani E, Civiletto G, Cerutti R, Moggio M, Fagiolari G, Schon EA, Lamperti C, and Zeviani M**. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1alpha axis. *Cell Metab* 14: 80-90, 2011.
258. **Viscomi C, Bottani E, and Zeviani M**. Emerging concepts in the therapy of mitochondrial disease. *Biochim Biophys Acta* 1847: 544-557, 2015.
259. **Voet D VJ**. *Biochemistry*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & sons, 1990.
260. **Wai T, and Langer T**. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* 27: 105-117, 2016.
261. **Wallace DC**. Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev* 46: 208-240, 1982.

262. **Wang H, Bei Y, Lu Y, Sun W, Liu Q, Wang Y, Cao Y, Chen P, Xiao J, and Kong X.** Exercise Prevents Cardiac Injury and Improves Mitochondrial Biogenesis in Advanced Diabetic Cardiomyopathy with PGC-1 α and Akt Activation. *Cell Physiol Biochem* 35: 2159-2168, 2015.
263. **Wang Q, Liang B, Shirwany NA, and Zou MH.** 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One* 6: e17234, 2011.
264. **Wang X, Zhou L, Li G, Luo T, Gu Y, Qian L, Fu X, Li F, Li J, and Luo M.** Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 463-468, 2007.
265. **Wang ZG, White PS, and Ackerman SH.** Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem* 276: 30773-30778, 2001.
266. **Watt MJ, Steinberg GR, Chen ZP, Kemp BE, and Febbraio MA.** Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J Physiol* 574: 139-147, 2006.
267. **Witters LA, Nordlund AC, and Marshall L.** Regulation of intracellular acetyl-CoA carboxylase by ATP depletors mimics the action of the 5'-AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 1486-1492, 1991.
268. **Wong GK, and Crawford MW.** Carnitine deficiency increases susceptibility to bupivacaine-induced cardiotoxicity in rats. *Anesthesiology* 114: 1417-1424, 2011.
269. **Woods A A-MD, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferré P, Foufelle F, Carling D.** Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-

activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 20: 7, 2000.

270. **Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, and Carling D.** Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2: 21-33, 2005.
271. **Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, and Holloszy JO.** Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* 282: 194-199, 2007.
272. **Wu SB, and Wei YH.** AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1822: 233-247, 2012.
273. **Wu SB, Wu YT, Wu TP, and Wei YH.** Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1331-1344, 2014.
274. **Wu Y, Song P, Xu J, Zhang M, and Zou MH.** Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 282: 9777-9788, 2007.
275. **Wu YT, Wu SB, and Wei YH.** Metabolic reprogramming of human cells in response to oxidative stress: implications in the pathophysiology and therapy of mitochondrial diseases. *Curr Pharm Des* 20: 5510-5526, 2014.
276. **Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, Patel BR, Heath RB, Walker PA, Hallen S, Giordanetto F, Martin SR, Carling D, and Gamblin SJ.** Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nature communications* 4: 3017, 2013.

277. **Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, Jing C, Walker PA, Eccleston JF, Haire LF, Saiu P, Howell SA, Aasland R, Martin SR, Carling D, and Gamblin SJ.** Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472: 230-233, 2011.
278. **Xu F, Addis JB, Cameron JM, and Robinson BH.** LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model. *Biochem J* 441: 275-283, 2012.
279. **Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, and Robinson BH.** The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochem J* 382: 331-336, 2004.
280. **Yamaguchi S, Katahira H, Ozawa S, Nakamichi Y, Tanaka T, Shimoyama T, Takahashi K, Yoshimoto K, Imaizumi MO, Nagamatsu S, and Ishida H.** Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E643-649, 2005.
281. **Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, and James DE.** A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell reports* 12: 937-943, 2015.
282. **Yang J, Craddock L, Hong S, and Liu ZM.** AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J Cell Biochem* 106: 414-426, 2009.
283. **Yao Y, Jones E, and Inoki K.** Lysosomal Regulation of mTORC1 by Amino Acids in Mammalian Cells. *Biomolecules* 7: 2017.

284. **Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, and Powis G.** HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 33: 526-534, 2008.
285. **Yiu EM, Tai G, Peverill RE, Lee KJ, Croft KD, Mori TA, Scheiber-Mojdehkar B, Sturm B, Praschberger M, Vogel AP, Rance G, Stephenson SE, Sarsero JP, Stockley C, Lee CY, Churchyard A, Evans-Galea MV, Ryan MM, Lockhart PJ, Corben LA, and Delatycki MB.** An open-label trial in Friedreich ataxia suggests clinical benefit with high-dose resveratrol, without effect on frataxin levels. *J Neurol* 262: 1344-1353, 2015.
286. **Ylikallio E, and Suomalainen A.** Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med* 44: 41-59, 2012.
287. **Yun H, Lee M, Kim SS, and Ha J.** Glucose deprivation increases mRNA stability of vascular endothelial growth factor through activation of AMP-activated protein kinase in DU145 prostate carcinoma. *J Biol Chem* 280: 9963-9972, 2005.
288. **Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, and Cohen RA.** Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55: 2180-2191, 2006.
289. **Zhang CS, Jiang B, Li M, Zhu M, Peng Y, Zhang YL, Wu YQ, Li TY, Liang Y, Lu Z, Lian G, Liu Q, Guo H, Yin Z, Ye Z, Han J, Wu JW, Yin H, Lin SY, and Lin SC.** The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism. *Cell Metab* 20: 526-540, 2014.
290. **Zheng X, Boyer L, Jin M, Kim Y, Fan W, Bardy C, Berggren T, Evans RM, Gage FH, and Hunter T.** Alleviation of neuronal energy deficiency by mTOR inhibition as a treatment for mitochondria-related neurodegeneration. *eLife* 5: 2016.

291. **Zhou J, Zhang F, Hou X, and Zhang N.** Downregulation of LRPPRC induces apoptosis in prostate cancer cells through the mitochondria-mediated pathway. *Cancer Biother Radiopharm* 29: 345-350, 2014.
292. **Zhu L, Zhao Q, Yang T, Ding W, and Zhao Y.** Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol* 34: 82-100, 2015.
293. **Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, and Hall MN.** Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144: 757-768, 2011.
294. **Zmijewski JW, Banerjee S, Bae H, Friggeri A, Lazarowski ER, and Abraham E.** Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 285: 33154-33164, 2010.
295. **Zorov DB, Juhaszova M, and Sollott SJ.** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 94: 909-950, 2014.
296. **Zou J, Li W, Misra A, Yue F, Song K, Chen Q, Guo G, Yi J, Kimata JT, and Liu L.** The viral restriction factor tetherin prevents leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein (LRPPRC) from association with beclin 1 and B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) and enhances autophagy and mitophagy. *J Biol Chem* 290: 7269-7279, 2015.
297. **Zou J, Yue F, Jiang X, Li W, Yi J, and Liu L.** Mitochondrion-associated protein LRPPRC suppresses the initiation of basal levels of autophagy via enhancing Bcl-2 stability. *Biochem J* 454: 447-457, 2013.

ANNEXES

Matériel et méthodes

RT-PCR

Extraction des ARNs totaux. Les cellules sont cultivées et traitées selon différentes conditions décrites dans l'article 1. Sur glace, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid pour arrêter la réaction. Elles sont lysées et homogénéisées dans un tampon de 1% β -mercaptoéthanol. L'ARN total est isolé à l'aide du RNeasy mini-kit de chez Qiagen. Celui-ci est basé sur l'utilisation des membranes silica qui permettent une purification de haute qualité des ARNs. De plus, différents tampons contenant des Dnases, des protéinases et des inhibiteurs de RNases sont ajoutés aux échantillons pour une meilleure isolation des ARNs. Les lysats sont récupérés dans des tubes auxquels on ajoute de l'éthanol 100%, puis sont chargés sur la membrane. L'éthanol permet aux ARNs de mieux se lier à la membrane. In fine, tous les ARNs se lient et les contaminants traversent la membrane, puis sont éliminés. La purification et la quantité des ARN totaux sont évaluées à l'aide du Bioanalyzer 2100. La qualité de l'extraction des ARNs est définie par le ratio A260/A280. Elle est considérée comme pure pour un ratio compris entre 1.8 et 2.

Transcription inverse. La purification des ARNm et la synthèse de l'ADNc sont réalisées à l'aide du kit « High-capacity cDNA Reverse Transcription » de chez Life Technologies. On ajoute aux échantillons d'ARNs une solution contenant tous les réactifs (amorces, une reverse transcriptase, oligonucléotides poly-dT, inhibiteurs d'ARNases) nécessaires pour une transcription. L'utilisation d'oligonucléotides poly-dT permet la sélection des ARNm uniquement. La réaction nécessite 1 à 5 μ g d'ARN pour un volume de 20 μ l et se

déroule en trois étapes. La première étape dure 10min à 25⁰C. Elle permet aux hexamères de se lier et l'enzyme commence à les allonger. La deuxième étape est l'étape d'amplification qui dure 2 heures à 37⁰C. La dernière étape se déroule à 85⁰C pendant 5 sec et consiste à dénaturer l'enzyme. Les échantillons d'ADNc sont conservés à -20⁰C.

qPCR ou PCR quantitative. La quantification des ARNm est possible grâce à la technologie de SYBR Green, un agent fluorescent qui s'intercale entre les bases de l'ADN double brin. La fluorescence est proportionnelle au nombre de molécules d'ADN formées et donc à la quantité d'ARNm. On utilise le kit « miScript SYBR Green PCR » de chez Qiagen. Le kit comprend un tampon contenant les réactifs nécessaires à la réaction de PCR. Ce tampon est ajouté aux amorces d'intérêt ainsi qu'à l'ADNc. La réaction de PCR a été réalisée dans un volume de 25ul pour une quantité de matrice de 1,25 ng avec un appareil de type MX3005p de chez Stratagene. Les amorces à utiliser sont décrites dans le tableau ci-après.

Analyses des données. On quantifie l'ADNc par la méthode de calcul de la différence des Ct (Cycle seuil). Le Ct est le cycle à partir duquel la fluorescence devient détectable. Il est inversement proportionnel au log de la quantité de la matrice initiale. La quantité relative de l'expression normalisée de chaque gène est calculée selon la formule suivante :

$$(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$$

- E (efficacité de la PCR) = 100% → 1

- $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ cible échantillon} - Ct \text{ référence échantillon}) - (Ct \text{ cible contrôle} - Ct \text{ référence contrôle})$

Genes	Left primer Right primer
	Glycolytic genes
HIF-1 α	CAG CTA TTT GCG TGT GAG GA GTC ACC ATC ATC TGT GAG AAC C
GLUT1	GCG GAA TTC AAT GCT GAT GAT CAG TTT CGA GAA GCC CAT GAG
LDHA	AAT ACA GCC CGA ACT GCA AG CGC TTC CAA TAA CAC GGT TT
PDHK1	GGT TAC GGG ACA GAT GCA GT CGT GGT TGG GTT GTA ATG C
	Reference gene
PPi α	CCG ATG ACG AGC CCT TGG GCC GCC AGT GCC ATT ATG

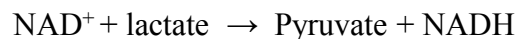
Couples d'amorces utilisées

Mesure de la nécrose

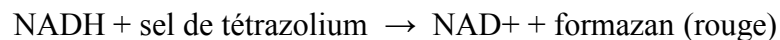
La nécrose est mesurée à l'aide du « Cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay » (Promega, Madison, WI, USA). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM avec ou sans traitement dans une plaque transparente de 96 puits pour 10 000 cellules par puits. Le surnageant et le culot cellulaire sont prélevés puis incubés avec une solution de lyse pendant 1 h. Un mélange de substrats contenant la diaphorase et le sel de tétrazolium est ajouté et les cellules sont laissées dans le noir pendant 30 min à la température de la pièce. La réaction est arrêtée avec 1 M d'acide acétique.

Les cellules nécrotiques libèrent une enzyme lorsque leur membrane se fragmente : la lactate déshydrogénase (LDH). La libération de cette dernière reflète l'état nécrotique de la cellule. Elle catalyse la réaction « $\text{NAD}^+ + \text{lactate} \rightarrow \text{Pyruvate} + \text{NADH}$ », couplée à celle de la diaphorase « $\text{NADH} + \text{sel de tétrazolium} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{formazan (rouge)}$ » permettant de transformer le sel de tétrazolium en formazan de couleur rouge.

LDH



Diaphorase

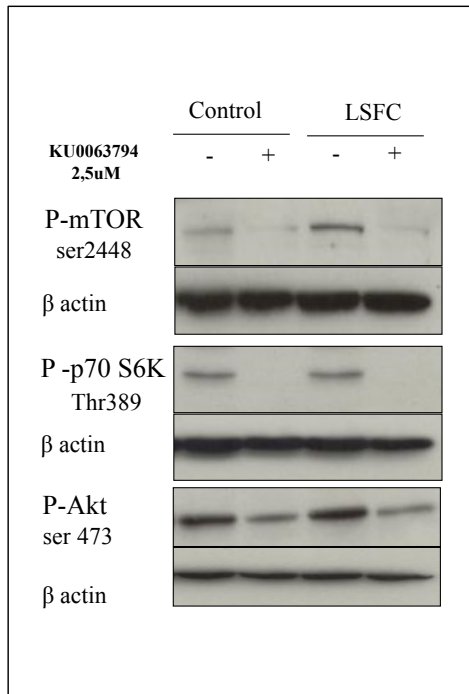
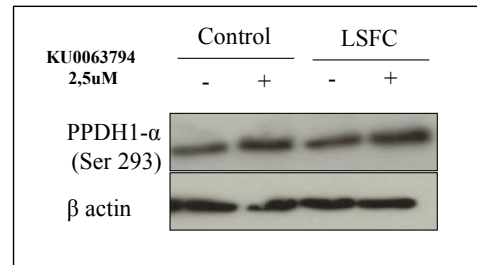
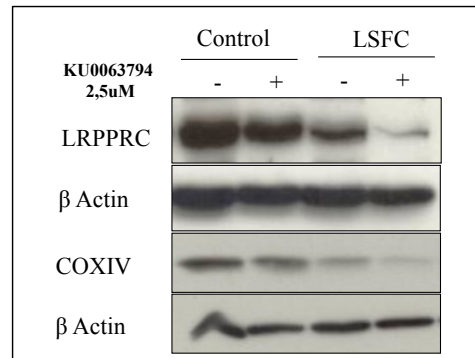


L'intensité de la couleur rouge formée est proportionnelle à la quantité de LDH relâchée et est mesurée par densité optique à 490 nm à l'aide du Synergy 2 de chez Biotek (Winooski, VT, USA). Un puit avec simplement du milieu de culture est utilisé pour mesurer le bruit de fond et sa valeur est enlevée des autres densités optiques (DO).

Effet de KU0063794, inhibiteur des deux complexes mTORC1 et mTORC2

La rapamycine est un inhibiteur spécifique de mTORC1 pouvant dans certains cas d'un traitement prolongé, inhiber mTORC2. Ceci dit, dans notre étude, le traitement à la rapamycine induit une augmentation de la phosphorylation de l'Akt suggérant que mTORC2 est bel est bien active. Ainsi, pour pallier aux effets éventuels de mTORC2, un deuxième inhibiteur a été utilisé soit le KU0063794 qui cible les deux complexes à la fois. En effet, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de mTORC2. Les cellules ont donc été incubées avec le KU0063794 à 2,5 uM pour une durée de 20h similaire à celui de la rapamycine. La concentration pour le KU0063794 a été déterminée en se basant sur la littérature. En réponse au KU0063794, la phosphorylation de mTOR était diminuée de 79% et de 86% dans les cellules contrôles et les cellules LSFC, respectivement. KU0063794 était également associée à une réduction de p-p70 S6K ($p \leq 0.01$) de 95% et de 97% dans les cellules contrôles et les cellules LSFC. L'augmentation de la phosphorylation de l'Akt était abrogée avec KU0063794. Ensemble, ces résultats suggèrent l'inhibition des deux complexes en réponse au KU0063794.

En accord avec les résultats observés avec le traitement à la rapamycine, on a observé, en réponse au KU0063794, une augmentation de la phosphorylation de PDH1 de 59% et de 57% dans les cellules contrôles et les cellules LSFC. En outre, le traitement au KU0063794 a entraîné une diminution de l'expression de LRPPRC et de COXIV aussi bien dans les cellules contrôles que dans les cellules LSFC.

A**B****C**

Effet de KU0063794, inhibiteur des deux complexes mTORC1 et mTORC2

Les fibroblastes primaires provenant d'un patient LSFC et d'un patient témoin ont été traités avec 2,5 µM de KU0063794 pendant 20 h. Les niveaux totaux ou phosphorylés des protéines mTOR, p70 S6K, Akt, PDH1, LRPPRC, and COXIV ont été déterminé par immunobuvardage.