

Université de Montréal

**Impact de la mutation du gène LRPPRC sur la  
vulnérabilité induite par un stress inflammatoire et  
nutritionnel *in vitro* et sur la morphologie cérébrale *ex vivo***

par Rafaela de Melo Almeida

Département de nutrition  
Faculté de médecine

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

Évalué par le jury suivant:

Dre. Guylaine Ferland, Présidente rapporteure

Dre. Chantal Bémour, Directrice de recherche

Dr. Christopher Rose, Codirecteur de recherche

Dre. Stéphanie Fulton, membre du jury

Août, 2017

© Rafaela de Melo Almeida, 2017

## Résumé

Le syndrome de Leigh version canadienne-française (LSFC) est une maladie mitochondriale rare causée par la mutation du gène LRPPRC (*leucine-rich pentatricopeptide repeat motif containing*). Le LSFC est caractérisé principalement par une déficience tissu-spécifique (cerveau et foie) en cytochrome c oxydase (COX), ainsi que par des crises potentiellement fatales d'acidose lactique. Ces crises, qui entraînent la mort de 80% des enfants atteints avant l'âge de 4 ans, peuvent être déclenchées, entre autres, par une infection/inflammation et une surcharge nutritionnelle. À ce jour, aucun traitement existe pour prévenir ces crises. Cette étude vise à caractériser l'impact d'un stress de type inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur la mort cellulaire et la fonction mitochondriale dans des fibroblastes de peau de patients atteints de LSFC, de même que l'aspect cérébral chez la souris déficiente en LRPPRC hépatique (HKO). Nous supposons que la mutation de LRPPRC : 1) Entraîne une susceptibilité accrue à un SIN, laquelle est associée à une dysfonction mitochondriale et une mort cellulaire augmentée; 2) Exerce un impact cérébral chez la souris HKO. *In vitro*, la fonction mitochondriale et la mort cellulaire ont été évaluées 24h après l'exposition à un SIN induit par le facteur de nécrose tumorale alpha (« tumor necrosis factor alpha »; TNF- $\alpha$ ) et le palmitate. Le potentiel membranaire ( $\Delta\Psi_m$ ), la production des espèces réactives oxygénées (ERO), la capacité de rétention calcique (CRC) et la respiration cellulaire ont été mesurées afin de caractériser la fonction mitochondriale. L'impact des acides gras oméga-3 (O3), un composé anti-inflammatoire, sur la mort cellulaire et la fonction mitochondriale a également été étudié. *Ex vivo*, les populations globale, neuronale et astrocytaire ont été évaluées dans les cerveaux des souris HKO et sauvages (« wild type » ; HWT). Nos résultats démontrent que la dysfonction mitochondriale associée à la mutation du gène LRPPRC rend les fibroblastes moins capables de répondre au SIN. En conséquence, des taux plus élevés de mort cellulaire ont été observés chez les fibroblastes LSFC par rapport aux témoins. Aussi, les acides gras O3 exercent un effet bénéfique par rapport à la modulation de la mort cellulaire et au  $\Delta\Psi_m$ . Finalement, l'ablation du gène LRPPRC hépatique cause une perte neuronale dans le tronc cérébral des souris HKO. Notre étude a permis d'identifier certains mécanismes cellulaires impliqués dans la

physiopathologie du LSFC. Le rôle thérapeutique potentiel des acides gras O3 devra être considéré dans les recherches futures entourant la maladie.

**Mots-clés** : Acidose lactique, LRPPRC, mitochondries, cytochrome c oxydase, fibroblastes, palmitate, TNF- $\alpha$ , inflammation, nutrition, oméga-3.

## Abstract

Leigh syndrome French Canadian Type (LSFC) is a rare disease caused by mutations in the LRPPRC gene (*leucine-rich pentatricopeptide repeat motif containing*). LSFC is primarily characterized by a tissue-specific deficiency (brain and liver) in cytochrome c oxidase (COX) and potentially fatal crises of lactic acidosis. These crises, which cause the death of 80% of children affected before the age of 4, are triggered, among others, by infection or inflammation and nutritional overload. To date, no treatment exists to prevent these crises. This study aims to characterize the impact of an inflammatory and nutritional stress (SIN) on cell death and mitochondrial function in skin fibroblasts of patients with LSFC, as well as the cerebral morphology of mouse with a liver specific knockout of LRPPRC (HKO). We assume that the LRPPRC mutations: 1) Leads to increased SIN susceptibility, which is associated with mitochondrial dysfunction and increased cell death; 2) Exerts a cerebral impact in the HKO mouse. *In vitro*, mitochondrial function and cell death were evaluated 24 h after SIN exposure induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and palmitate. Membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), reactive oxygen species (ERO) production, calcium retention capacity (CRC) and cell respiration were measured in order to characterize mitochondrial function. The impact of omega-3 fatty acids (O3), anti-inflammatory compound, on cell death and mitochondrial function was also assessed. *Ex vivo*, the global, neuronal and astrocytic populations were evaluated in the brains of HKO and wild type (HWT) mice. Mitochondrial dysfunction associated with LRPPRC mutations make fibroblasts less able to respond to SIN. As a result, higher rates of cell death were observed in LSFC fibroblasts. Also, O3 fatty acids exert a beneficial effect when modulating cell death and  $\Delta\Psi_m$ . Finally, liver specific knockout of LRPPRC causes neuronal loss in the brainstem of HKO mice. Our study identified cellular mechanisms involved in the pathophysiology of LSFC. The potential therapeutic role of O3 fatty acids should be considered in future research regarding the disease.

**Keywords:** Lactic acidosis, LRPPRC, mitochondria, cytochrome c oxidase, fibroblasts, palmitate, TNF- $\alpha$ , inflammation, nutrition, omega-3.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
1. Le cerveau.....	1
2. Le métabolisme intracellulaire.....	5
3. La mitochondrie .....	8
3.1. La biogenèse mitochondriale .....	10
3.2. La morphologie mitochondriale.....	10
3.3. Les fonctions mitochondriales .....	12
3.3.1. La production d'énergie.....	13
3.3.2. La production des espèces réactives oxygénées (ERO).....	14
3.3.3. L'homéostasie du Ca <sup>2+</sup> et la perméabilité de transition.....	15
3.4. Les facteurs de stress mitochondrial.....	16
4. Les maladies mitochondriales.....	16
4.1. Classification des maladies mitochondriales .....	17
4.2. Maladies mitochondriales .....	19
4.3. Manifestations cliniques des maladies mitochondriales .....	19
4.4. Le syndrome de Leigh (LS).....	20
4.4.1. Étiologies du LS.....	22
4.4.2. Manifestations cliniques du LS.....	22
5. Le syndrome de Leigh version canadienne-française (LSFC).....	24

5.1. Données épidémiologiques .....	25
5.2. Étiologie du LSFC .....	25
5.3. Conséquences de la mutation du gène LRPPRC .....	26
5.3.1. Dysfonctionnement du système OXPHOS .....	26
5.3.2. Altérations métaboliques .....	27
5.3.3. Manifestations cliniques .....	28
6. Les modèles expérimentaux du LSFC .....	31
6.1. Le modèle cellulaire.....	31
6.2. Le modèle animal.....	32
7. Hypothèses, objectifs et approche expérimentale.....	33
Matériel et méthodes.....	35
1. <i>In vitro</i> .....	35
1.1. Culture cellulaire.....	35
1.2. Préparation des conditions expérimentales.....	36
1.3. Spectrofluorométrie .....	37
1.3.1. Résazurine.....	37
1.3.2. Potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	38
1.3.3. MitoSOX Red .....	39
1.3.4. Capacité de rétention calcique (CRC).....	40
1.4. Microscopie à fluorescence.....	41
1.5. Respiration mitochondriale et glycolyse.....	43
1.6. Dosage des protéines.....	45
2. <i>Ex vivo</i> .....	46
2.1. Modèle expérimental .....	46
2.2. Immunohistochimie .....	47
2.3. Traitement et analyse des images .....	48
3. Approche statistique.....	48
Résultats.....	50
1. <i>In vitro</i> .....	50
1.1. Viabilité cellulaire.....	50

1.2.	Mort cellulaire.....	51
1.3.	Fonction mitochondriale .....	55
1.3.1.	Respiration mitochondriale et glycolyse.....	55
1.3.2.	Potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	60
1.3.3.	Capacité de rétention calcique (CRC).....	61
1.3.4.	Espèces réactives oxygénées (ERO).....	63
2.	<i>Ex vivo</i> .....	64
2.1.	Caractérisation morphologique cérébrale .....	64
2.1.1.	Population cellulaire globale.....	64
2.1.2.	Population neuronale .....	68
2.1.3.	Population astrocytaire.....	72
	Discussion.....	76
1.	L'effet de la mutation du gène LRPPRC sur la fonction mitochondriale des fibroblastes... .....	76
2.	Les fibroblastes LSFC sont plus susceptibles au SIN.....	80
2.1.	L'impact du SIN sur la viabilité cellulaire.....	80
2.2.	L'impact du SIN sur la mort cellulaire .....	82
2.2.1.	La nécrose .....	83
2.2.2.	L'apoptose.....	84
2.2.3.	L'impact de SIN sur la nécrose des fibroblastes.....	84
3.	Le SIN aggrave la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC .....	86
4.	Les acides gras oméga-3 préviennent la mort cellulaire et la perte de $\Delta\Psi_m$ des fibroblastes LSFC induites par le SIN .....	88
5.	L'ablation de LRPPRC hépatique cause la perte neuronale dans le tronc cérébral des souris .....	90
	Conclusion et perspectives.....	93
	Bibliographie.....	i

## Liste des tableaux

Tableau I. Mutations dans l'ADNn codant les protéines du système de phosphorylation oxydative (OXPHOS) chez les enfants.....	18
Tableau II. Distribution des lésions génétiques dans la chaîne respiratoire chez les patients atteints de syndrome de Leigh classique.....	21
Tableau III. Fréquence des manifestations cliniques dans le syndrome de Leigh classique ....	24
Tableau IV. Altérations métaboliques majeures chez les patients LSFC .....	27
Tableau V. Fréquence des manifestations cliniques dans le syndrome de Leigh version canadienne-française.....	30
Tableau VI. Particularités des lignées cellulaires utilisées .....	35
Tableau VII. Conditions expérimentales sélectionnées pour l'étude.....	37
Tableau VIII. Quantité moyenne des fibroblastes par condition évaluée en microscopie à fluorescence .....	43
Tableau IX. Composition du milieu XF DMEM (pH 7,4) .....	44
Tableau X. Protocole d'exécution utilisé dans le logiciel XF 24 pendant l'expérience .....	45



## Liste des figures

Figure 1. Cellules du tissu nerveux.....	2
Figure 2. Division anatomique de l'encéphale : cerveau, cervelet et tronc cérébral .....	2
Figure 3. Sections lobulaires du cerveau. ....	3
Figure 4. Les ganglions de la base. ....	3
Figure 5. La glycolyse.....	6
Figure 6. Le cycle de Cori.....	7
Figure 7. La production d'ATP.....	8
Figure 8. Le génome mitochondrial.....	9
Figure 9. La structure mitochondriale et ses composantes .....	11
Figure 10. La dynamique mitochondriale .....	12
Figure 11. Le système de phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondrial .....	13
Figure 12. La dynamique du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP).....	15
Figure 13. Manifestations cliniques des maladies mitochondriales.....	20
Figure 14. Lésions bilatérales et symétriques observées chez les patients LS par résonance magnétique.....	23
Figure 15. LRPPRC et le métabolisme des ARNm mitochondriaux.....	26
Figure 16. Caractéristiques cranio-faciales des patients LSFC .....	29
Figure 17. Viabilité des fibroblastes 48h après l'exposition aux agents inducteurs de stress inflammatoire et/ou nutritionnel (SIN) en spectrofluorométrie.....	51
Figure 18. Mort cellulaire par nécrose 24h après l'exposition aux agents inducteurs de stress inflammatoire et/ou nutritionnel (SIN) en microscopie à fluorescence.....	52
Figure 19. Images représentatives des fibroblastes capturées par « Operetta High-Content Imaging System » en différentes conditions de stress inflammatoire et/ou nutritionnel (SIN).53	
Figure 20. Effet des acides gras oméga 3 (O3) sur la mort des fibroblastes 24h après l'exposition au stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) en microscopie à fluorescence .....	54
Figure 21. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur les taux de consommation d'O <sub>2</sub> « OCR » basal (A) et maximal (B) dans les mitochondries des fibroblastes .....	57
Figure 22. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur les taux d'acidification extracellulaire « ECAR » basal (A) et maximal (B) des mitochondries des fibroblastes.....	59

Figure 23. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	60
Figure 24. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur la capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries .....	62
Figure 25. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur la production des ERO par les mitochondries.....	63
Figure 26. Population cellulaire globale évaluée par DAPI dans le cortex frontal des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	65
Figure 27. Population cellulaire globale évaluée par DAPI dans le tronc cérébral des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	66
Figure 28. Population cellulaire globale évaluée par DAPI dans le cervelet des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	67
Figure 29. Population neuronale évaluée par NeuN dans le cortex frontal des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	69
Figure 30. Population neuronale évaluée par NeuN dans le tronc cérébral des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	70
Figure 31. Population neuronale évaluée par NeuN dans le cervelet des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	71
Figure 32. Population astrocytaire évaluée par GFAP dans le cortex frontal des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	73
Figure 33. Population astrocytaire évaluée par GFAP dans le tronc cérébral des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	74
Figure 34. Population astrocytaire évaluée par GFAP dans le cervelet des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).....	75
Figure 35. La lipogenèse.....	82
Figure 36. Représentation schématique de l'impact de LRPPRC sur la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC dans les différentes conditions évaluées.....	94

## Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$  : Potentiel membranaire mitochondrial  
ADNmt : ADN mitochondrial  
ADNn : ADN nucléaire  
ADP : Adénosine diphosphate  
ALA : Acide  $\alpha$ -linoléique  
AMPK : « AMP-activated protein kinase »  
ATP : Adénosine triphosphate  
AVC : Accident vasculaire cérébral  
BCA : Acide bicinchonique  
BSA : Albumine sérique de bovin  
BHE : Barrière hémato-encéphalique  
 $Ca^{2+}$  : Calcium  
 $CaCl_2$  : Chlorure de calcium  
CCCP : « Carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone »  
COX : Cytochrome c oxydase  
CR : Chaîne respiratoire  
CRC : Capacité de rétention calcique  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DHA : Acide docosahexaénoïque  
DMEM : « Dulbecco's Modification Eagle's Medium »  
DNP : 2,4-dinitrophénol  
ECAR : Taux d'acidification extracellulaire  
EPA : Acide éicosapentaénoïque  
ERO : Espèces réactives oxygénées  
 $FADH_2$  : Flavine adénine dinucléotide  
FBS : Sérum foetal bovin  
GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale  
HIF1: « Hypoxia-inductible factor 1-alpha »  
HKO : Souris déficiente en LRPPRC hépatique

HWT : Souris sauvage  
LCR : Liquide céphalorachidien  
LPS : Lipopolysaccharide  
LRPPRC : « Leucine-rich pentatricopeptide-repeat-motif-containing »  
LS : Syndrome de Leigh  
LSFC : Syndrome de Leigh version canadienne-française  
MAM : « Mitochondria-associated membrane »  
MC : Membrane cellulaire  
MCU : « Mitochondrial calcium uniporter »  
MME : Membrane mitochondriale externe  
MMI : Membrane mitochondriale interne  
MTG : « MitoTracker Green »  
MTPAP : Poly (A) polymérase mitochondriale  
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide  
NeuN : « Neuronal Nuclei »  
NF- $\kappa$ B : « Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »  
O3 : Acides gras oméga-3  
OCR : Taux de consommation d'O<sub>2</sub>  
OXPHOS : Phosphorylation oxydative  
PBS : Solution tamponnée de phosphate  
PI : Iodure de propidium  
PNPase : « Polynucleotide phosphorylase »  
PS : Phosphatidylsérine  
PTP : Pores de transition de perméabilité mitochondriale  
qPCR : « Quantitative polymerase chain reaction »  
RE : Réticulum endoplasmique  
SI : Stress inflammatoire  
SIN : Stress inflammatoire et nutritionnel  
SN : Stress nutritionnel  
SNC : Système nerveux central  
TLR : « Toll-like receptor »

TMRE : Tétraméthylester éthylique de la rhodamine

TNF- $\alpha$  : « Tumor necrosis factor-alpha »

TRAILR : « Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor »

URF : Unités relatives de fluorescence

VDAC : « Voltage-dependent anion channels »

## Remerciements

Je voudrais d'abord exprimer mes sincères remerciements à ma directrice de recherche, Dr Chantal Bémeur, de m'avoir accueillie dans son équipe afin de contribuer à ce beau projet de recherche sur l'acidose lactique. À Dr Bémeur, ainsi qu'à son assistante de recherche Mélanie Tremblay, j'exprime ma gratitude pour toute l'aide, la patience et la disponibilité dont elles ont fait preuve durant mon parcours.

J'aimerais remercier énormément mon co-directeur Dr Christopher Rose et son équipe de m'avoir accueillie et pour tous les précieux conseils qui ont contribué à l'avancement de mon projet.

Je souhaiterais transmettre mes sincères et profonds remerciements à toute l'équipe de Dr Yan Burelle et du Consortium de l'acidose lactique puisqu'ils ont contribué, que ce soit directement ou indirectement, à enrichir mon projet pendant la durée de mon travail de recherche.

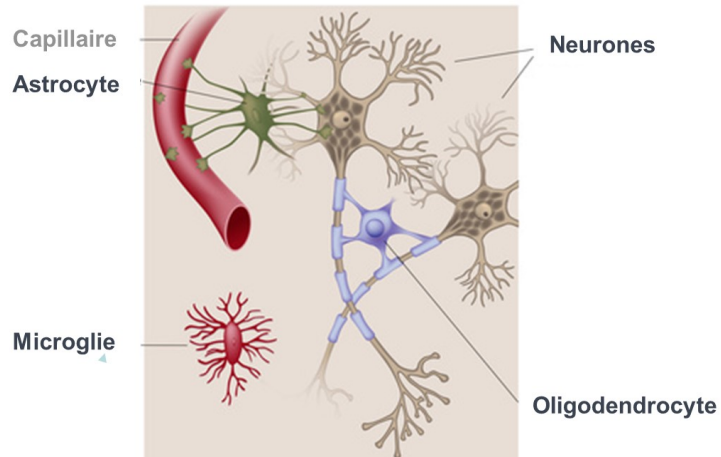
Je terminerai en adressant un remerciement spécial à toute ma famille, mon conjoint (Breno Magalhães) et mes 3 enfants (Matheus, Lucas et Malu Magalhães) qui m'ont soutenue psychologiquement tout au long de mes études. Leurs patience et encouragements ont été cruciaux pour ma réussite.

# Introduction

Le syndrome de Leigh version canadienne-française (LSFC) est une maladie mitochondriale rare. Elle se manifeste, principalement, par des crises potentiellement fatales d'acidose lactique et des atteintes neurologiques progressives et irréversibles. Chez les individus LSFC, trois régions cérébrales sont particulièrement affectées par la maladie : le tronc cérébral, le cervelet et la région des ganglions de la base. Une meilleure compréhension de ses mécanismes physiopathologiques s'avère essentielle au développement de stratégies thérapeutiques. Avant d'élaborer sur les maladies mitochondriales en général et le LSFC en particulier, les aspects relatifs au cerveau, au métabolisme intracellulaire et à la mitochondrie seront détaillés.

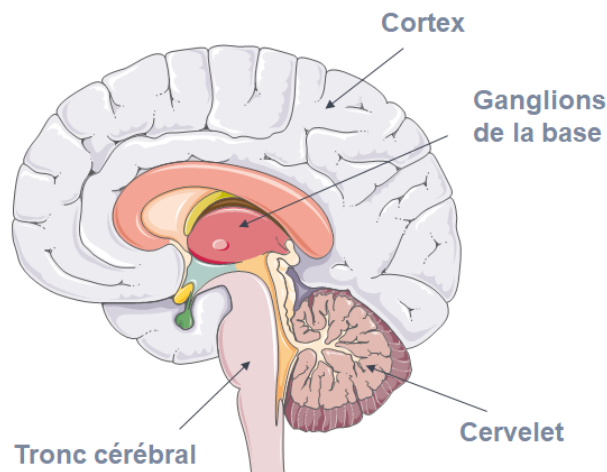
## 1. Le cerveau

Le cerveau est un organe central du corps humain. Bien qu'il ne représente que 2% du poids du corps humain, le cerveau consomme environ 20% de l'énergie de l'organisme. Le tissu nerveux est composé de deux types cellulaires : les neurones et les cellules gliales (Figure 1). Grâce à ces cellules, le cerveau est capable de transformer les informations générées par différentes sources de stimuli, internes ou externes, en réponse adaptative, soit de nature physiologique ou comportementale (McEwen et al., 2015). De cette façon, le cerveau contrôle, directement ou indirectement, la plupart des fonctions de l'organisme.



**Figure 1. Cellules du tissu nerveux.** Neurones et cellules gliales (astrocyte, microglie et oligodendrocyte). Adapté de (Alila Medical Media).

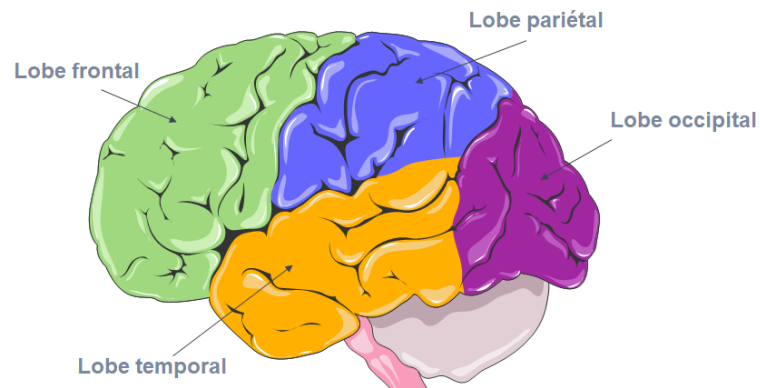
Le cerveau constitue la composante principale du système nerveux central (SNC), conjointement avec le cervelet et le tronc cérébral (Figure 2). Ensemble, ces structures, fonctionnellement distinctes, forment l'encéphale. Ce dernier est divisé en deux hémisphères, droit et gauche, à l'intérieur desquels se trouve des ventricules où loge le liquide céphalorachidien (LCR), liquide du SNC jouant les rôles de maintien mécanique et de fonctions biologique et d'élimination des molécules et déchets cérébraux.



**Figure 2. Division anatomique de l'encéphale : cerveau, cervelet et tronc cérébral.** Créé à partir de (Servier Medical Art).

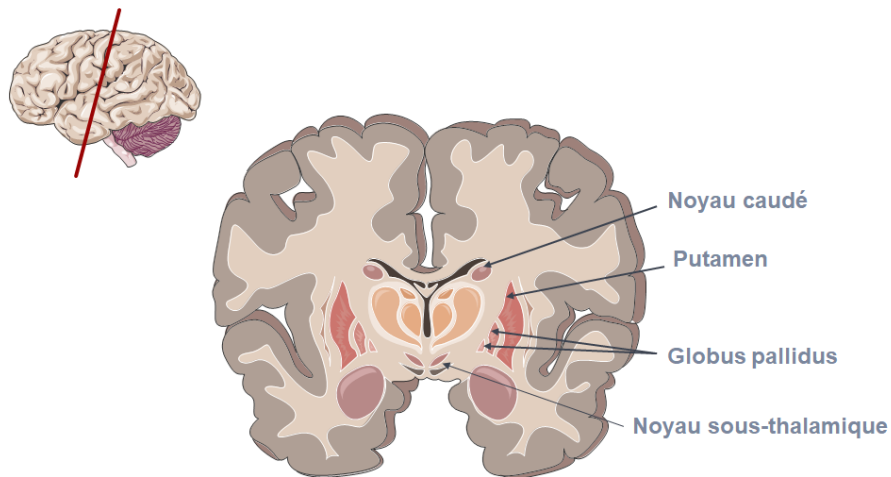


Le cerveau comprend les régions du cortex cérébral et des ganglions de la base (Figure 2). Le cortex est subdivisé en 4 régions lobulaires : les lobes frontal, temporal, pariétal et occipital (Figure 3). De façon générale, ces régions sont impliquées, entre autres, dans le développement des fonctions motrices, cognitives et sensorielles.



**Figure 3. Sections lobulaires du cerveau.** Créé à partir de (Servier Medical Art).

Les ganglions de la base sont des regroupements de corps neuronaux situés au centre du cerveau. Ils sont impliqués dans le contrôle et l'apprentissage de mouvements volontaires. Cette région englobe les noyaux : caudé, putamen, globus pallidus, sous-thalamique et substance noire (Lanciego et al., 2012) (Figure 4).



**Figure 4. Les ganglions de la base.** Créé à partir de (Servier Medical Art).

Le cervelet est situé dans la partie postérieure du cerveau. Il assure, entre autres, la coordination des mouvements, l'équilibre et la tonicité musculaire (Bostan et al., 2013). En ce qui concerne le tronc cérébral, il est essentiel au contrôle de fonctions vitales, y compris, la respiration, les battements cardiaques, les sens et les mouvements réflexes (Abadie et al., 1999).

Les neurones sont des cellules excitables, c'est-à-dire, capables de répondre aux stimuli par le changement dans le potentiel électrique des membranes. Également, les neurones jouent des rôles moteurs ou sensoriels complexes variables selon leur morphologie et leur localisation dans l'organisme. Morphologiquement, les neurones sont divisés en corps (soma), axone et dendrites. Ces deux dernières parties sont des prolongements du neurone. Dans l'encéphale, les corps neuronaux prédominent dans la substance grise, tandis que les axones neuronaux sont abondants dans la substance blanche. Cette distinction dans la coloration du tissu nerveux est due à la présence de myéline autour des axones (Bilston & SpringerLink, 2011). La myéline est une membrane plasmique, essentiellement composée de lipides, ayant pour fonction de favoriser une bonne conduction de l'influx nerveux tout en protégeant les fibres nerveuses.

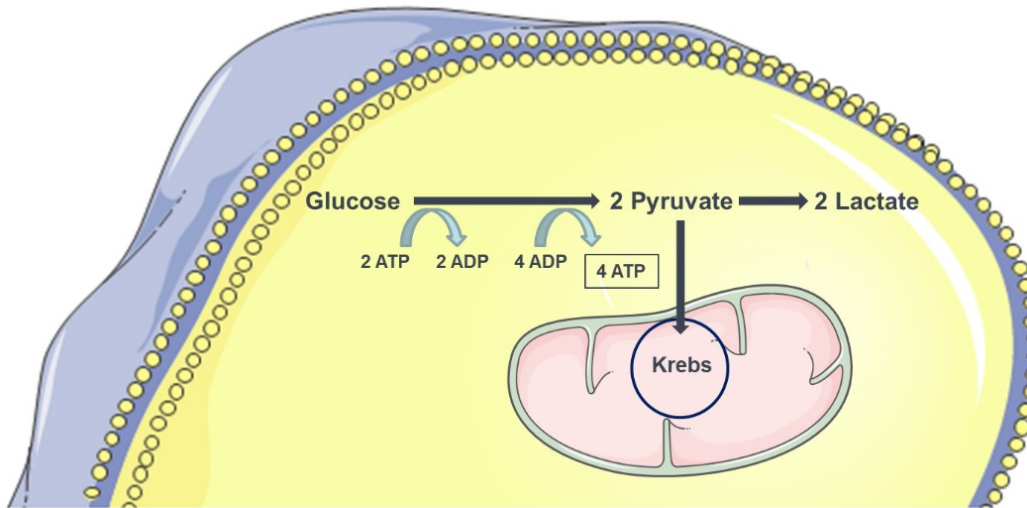
Les cellules gliales, quant à elles, jouent un rôle clé dans le maintien d'un microenvironnement optimal pour les neurones. En effet, elles assurent, entre autres, l'apport en nutriments, l'oxygénation et la protection du tissu nerveux. Parmi les cellules gliales, les astrocytes sont les plus nombreux et sont distribués dans les substances grise et blanche. Possédant une morphologie étoilée avec des prolongements, les astrocytes sont dotés d'une grande diversité fonctionnelle. Ils participent, entre autres, au maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), de l'homéostasie ionique du milieu extracellulaire et du métabolisme énergétique des neurones (Parpura et al., 2009). La microglie est une population de cellules gliales responsables de la défense immunitaire et de la réparation tissulaire du SNC. Ces cellules sont capables de changer leur morphologie lorsqu'elles deviennent activées par des lésions. Ainsi, les cellules microgliales sont capables de déclencher des réactions immunitaires telles que la phagocytose, la présentation des antigènes et la sécrétion de cytokines. Finalement, les oligodendrocytes sont des cellules gliales assurant la production de la myéline essentielle à la protection des neurones (Bilston & SpringerLink, 2011).

## 2. Le métabolisme intracellulaire

La production d'énergie à partir de l'oxydation des nutriments, tels que glucides, lipides et protéines, est une fonction essentielle de l'organisme. En effet, l'énergie est nécessaire, entre autres, au développement de structures cellulaires, à la différenciation et à la croissance cellulaire. De plus, les réactions de biosynthèse, l'assemblage des protéines et le trafic de molécules sont aussi des processus dépendants de l'énergie.

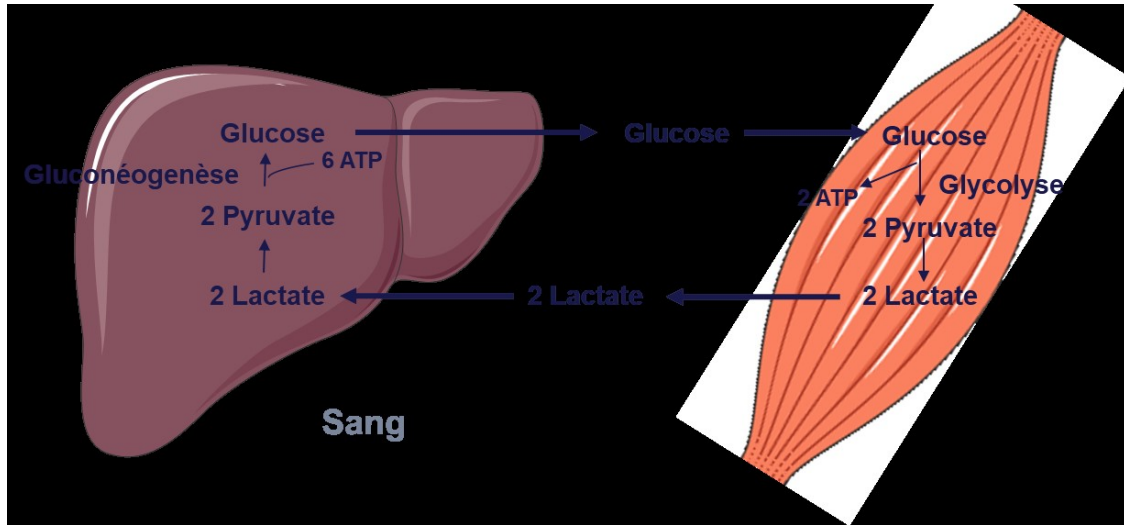
La production d'énergie, sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP), englobe une série de réactions métaboliques qui peuvent être réalisées en présence ou en absence d'oxygène ( $O_2$ ). En effet, deux mécanismes cellulaires entraînent la synthèse d'ATP : la glycolyse et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (Da Poin et al., 2010). Cette dernière, la principale voie de production d'énergie, a lieu à l'intérieur des mitochondries en présence d' $O_2$  et sera discutée en détail dans le chapitre 3 « La mitochondrie » (sous-section 3.3).

La glycolyse est réalisée dans le cytosol cellulaire en absence d' $O_2$  et consiste en la dégradation de glucose en pyruvate, ou encore, la conversion de glucose en lactate (Stark et al., 2015) (Figure 5). Ce dernier est le principal produit de la glycolyse et représente une source d'échange d'énergie entre les organes. En effet, les carbones issus de la glycolyse sont oxydés et utilisés dans la production de glucose via la gluconéogenèse. De plus, le lactate constitue un important substrat énergétique du cerveau (Bergersen, 2015).



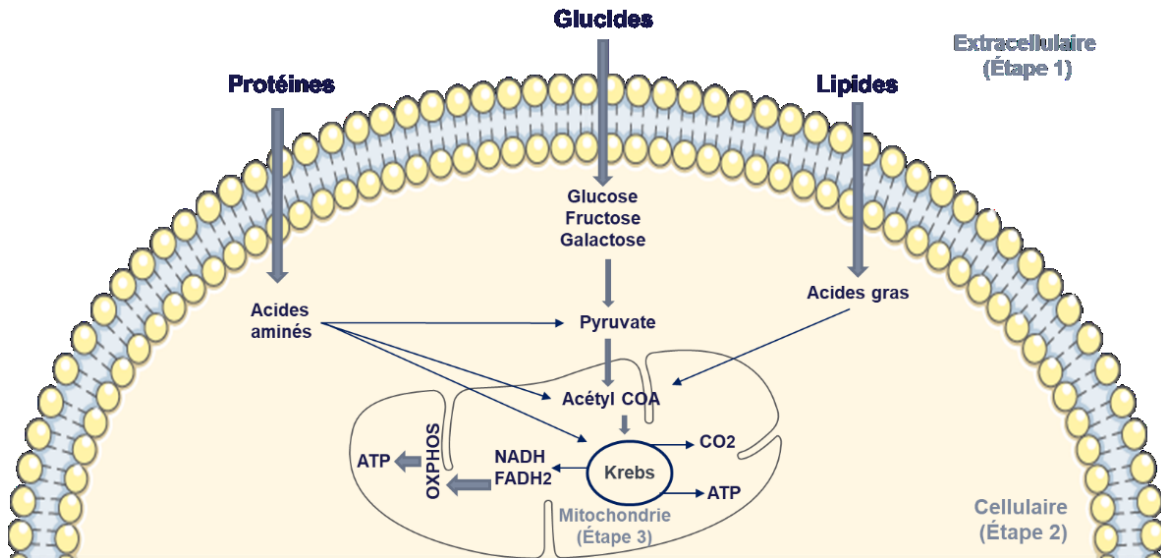
**Figure 5. La glycolyse.** Créé à partir de (Servier Medical Art).

Certaines conditions peuvent favoriser le changement de mécanisme de production d'énergie, c'est-à-dire de l'OXPLOS à la glycolyse. L'infection, l'inflammation, l'exercice physique intense et les perturbations mitochondriales sont des exemples de situations où les cellules vont augmenter le taux de glycolyse afin de compenser la déplétion d'ATP. La surexpression de la glycolyse favorise l'accumulation de pyruvate lequel est converti en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase. De plus, ce processus entraîne l'accumulation de protons, ce qui acidifie le milieu intracellulaire (Stark et al., 2015). En conditions physiologiques, l'homéostasie du lactate dans le sang est maintenue par le cycle de Cori dans les muscles et le foie (Figure 6). Le cycle de Cori est une voie métabolique regroupant la glycolyse (dégradation du glucose en acide lactique) dans le muscle et la réaction inverse dans le foie, c'est-à-dire la gluconéogenèse (synthèse de glucose à partir d'acides aminés glucoformateurs tel le lactate). En présence d'atteintes hépatiques, le métabolisme du lactate est compromis ce qui peut favoriser son accumulation dans le sang (hyperlactatémie) et, en conséquence, l'acidose lactique (Berg et al., 2002).



**Figure 6. Le cycle de Cori.** Créé à partir de (Servier Medical Art).

Le métabolisme énergétique est régulé par l'« *AMP-activated protein kinase* » (AMPK). Celle-ci est une molécule de signalisation qui agit comme un capteur d'énergie corporelle capable d'intégrer plusieurs voies métaboliques pour adapter le métabolisme aux différentes demandes énergétiques. La voie de signalisation AMPK est activée en situation de stress métabolique qui peut altérer la production d'énergie ou accélérer sa consommation (Hardie, 2015). Ainsi, lorsque la voie AMPK est activée par la molécule de signalisation AMP, la captation et la dégradation de glucose (glycolyse) ainsi que l'oxydation des acides gras ( $\beta$ -oxydation) sont stimulées afin de favoriser la production d'énergie. À l'inverse, la voie AMPK est inhibée par la présence d'ATP ce qui bloque la consommation d'énergie dans les processus de synthèse de protéines, de glycogène et d'acides gras (Angin et al., 2016). La Figure 7 résume les principales voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie.



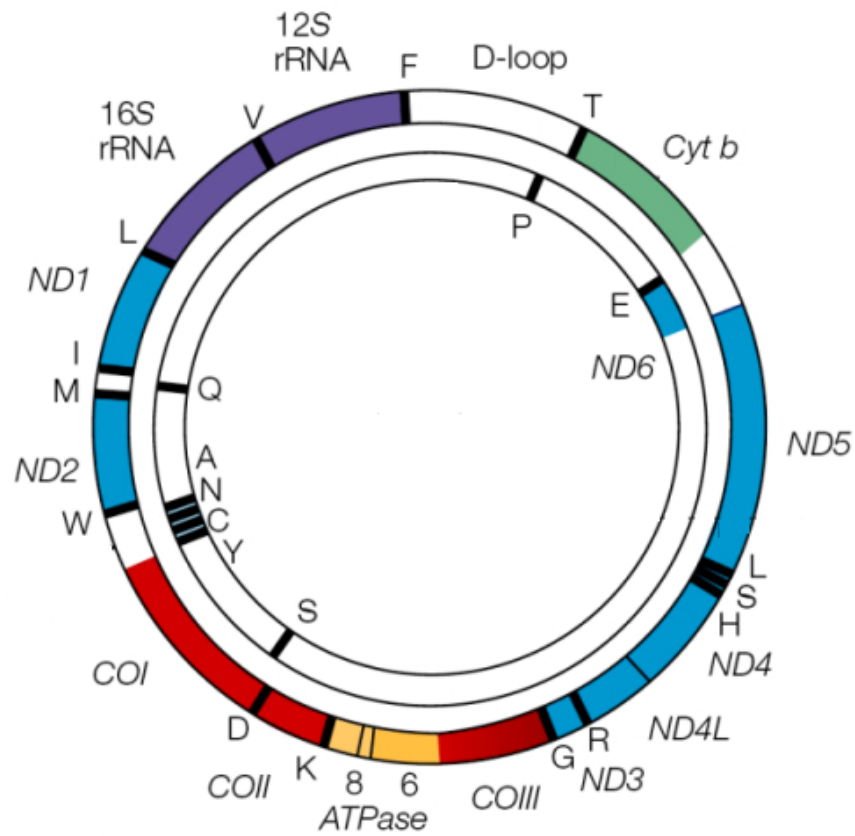
**Figure 7. La production d'ATP.** Étape 1 : L'hydrolyse de macronutriments (extracellulaire). Étape 2 : la dégradation et l'oxydation partielle de molécules (niveau cellulaire). Étape 3 : l'oxydation complète de molécules et synthèse d'ATP par le système OXPHOS (niveau mitochondrial). Créé à partir de (Servier Medical Art).

### 3. La mitochondrie

Les mitochondries sont des organites cellulaires présents dans toutes les cellules de l'organisme, sauf dans les érythrocytes (globules rouges). Elles représentent environ 25% du volume cytoplasmique (Yusoff et al., 2015). Ses fonctions sont essentielles à plusieurs aspects du métabolisme, dont la production d'énergie et la signalisation cellulaire (Ballinger, 2013; Picard et al., 2014). Dans le cerveau, les mitochondries jouent un rôle clé dans les fonctions cérébrales et cognitives. Situées dans les cytoplasmes neuronaux, les mitochondries modulent, entre autres, la transmission synaptique, la synthèse de neurotransmetteurs, la signalisation cellulaire et la production d'énergie nécessaire au tissu nerveux (Picard & McEwen, 2014).

De façon générale, les mitochondries sont reconnues comme un vaste réseau d'organites capables de changer leur structure en fonction des besoins énergétiques de chaque cellule (Suliman & Piantadosi, 2016). Cette plasticité mitochondriale est principalement contrôlée par

l'ADN nucléaire (ADNn). Ce dernier est responsable du codage de la majorité des protéines mitochondriales impliquées, entre autres, dans la biogenèse mitochondriale, l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire (CR), la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt), la transcription et la biosynthèse des protéines mitochondriales (Balaban, 2012; Wong, 2012). Également, le génome mitochondrial est composé de gènes impliqués dans la production d'énergie et dans le métabolisme des ARNmt (Wallace & Chalkia, 2013) (Figure 8).



**Figure 8. Le génome mitochondrial.** Gènes codant les sous-unités des complexes I (en bleu), III (en vert), IV (en rouge) et V (en jaune). Les ARN ribosomiaux (en mauve) et de transfert (en noir). Adapté de (Taylor & Turnbull, 2005).

### 3.1. La biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est un processus dans lequel les cellules remplacent leurs mitochondries endommagées. Pour ce faire, les cellules comptent sur un système de contrôle de qualité très rigoureux qui dépend d'une interaction étroite entre l'ADNn et l'ADNmt (Suliman & Piantadosi, 2016). Ce cycle se termine par le processus de mitophagie dans lequel les organites altérés ou excédentaires sont dégradés (Westermann, 2010). La perturbation de l'équilibre biogenèse-mitophagie rend les cellules plus susceptibles à la perte de régulation énergétique, aux dommages oxydatifs et à l'apoptose par la voie intrinsèque (mitochondriale) (Murphy & Smith, 2007; Suliman & Piantadosi, 2016).

### 3.2. La morphologie mitochondriale

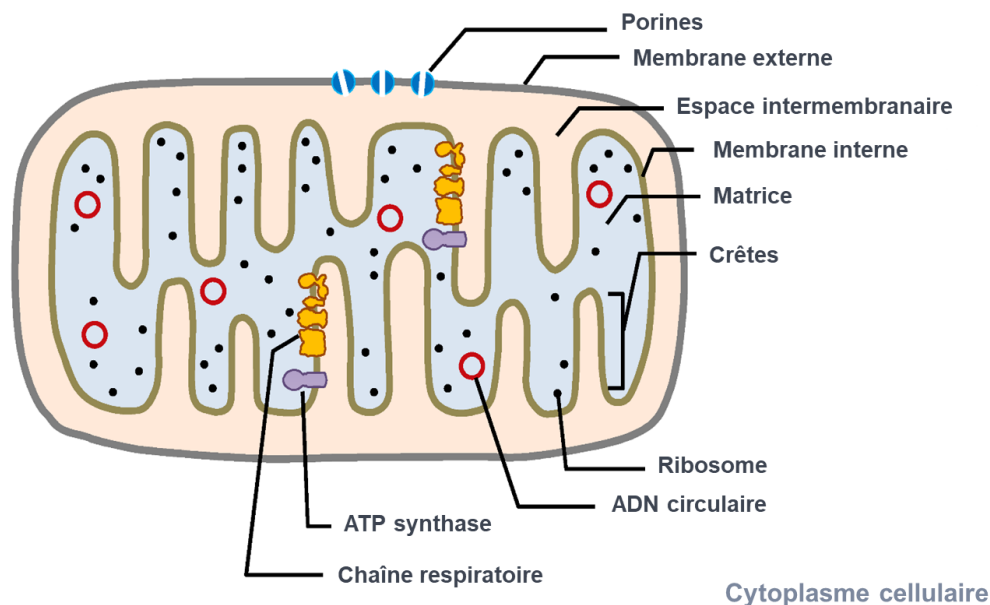
Structurellement, les mitochondries sont formées par deux membranes fonctionnellement distinctes : la membrane mitochondriale externe (MME) et la membrane mitochondriale interne (MMI). Ensemble, ces membranes délimitent l'espace intermembranaire (Nunnari & Suomalainen, 2012).

La MME délimite le milieu extra-mitochondrial, c'est-à-dire le cytoplasme cellulaire. Elle est composée de lipides et de protéines dans une proportion de 1:1. De plus, la MME est dotée de protéines membranaires organisées sous forme de canaux aqueux appelées porines. Les canaux « *voltage-dependent anion channels* » (VDAC) sont des exemples de porines. Ils permettent le passage de molécules hydrophiles à travers la bicouche lipidique (Yusoff et al., 2015). Également, la MME contient des enzymes impliquées, entre autres, dans la biosynthèse des acides gras. En plus, la MME peut communiquer avec d'autres organites à travers une structure appelée « *mitochondria-associated membrane* » (MAM) pour partager certaines de ses fonctions. Par exemple, la mitochondrie peut s'associer au réticulum endoplasmique (RE) afin de favoriser certaines voies de signalisation du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et le transfert de lipides entre eux (Nunnari & Suomalainen, 2012; Picard et al., 2013). De façon générale, la rupture de la MME conduit à la mort cellulaire.



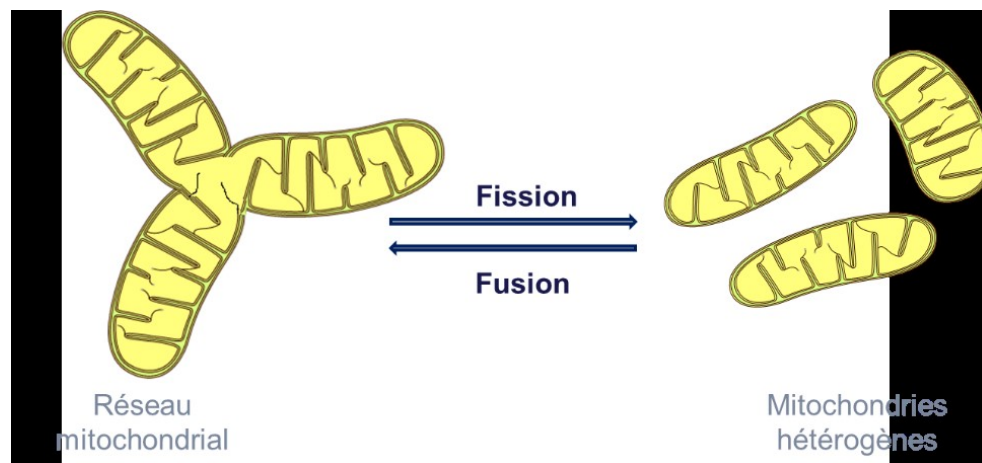
La MMI délimite la matrice mitochondriale. Elle est composée d'environ 70% de protéines, incluant les protéines de transport du système OXPHOS. La MMI est organisée sous forme de crêtes. Celles-ci sont des invaginations qui pénètrent dans la matrice et accueillent les complexes de la CR (Yusoff et al., 2015). En plus de jouer un rôle important dans l'assemblage des complexes respiratoires, la MMI facilite le transport de lipides et l'importation de protéines mitochondriales. Aussi, la MMI contrôle la diffusion ionique, un mécanisme essentiel à la génération d'un gradient de protons nécessaire aux réactions de phosphorylation de l'ATP synthase (Nunnari & Suomalainen, 2012).

La matrice mitochondriale est riche en protéines. En effet, deux tiers des protéines mitochondriales sont localisées dans cette région. En plus, la matrice héberge le génome mitochondrial et les deux principales voies métaboliques mitochondriales: le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation. Ces voies sont responsables de la dégradation du pyruvate et des acides gras, respectivement. Ensemble, elles jouent un rôle essentiel dans la production d'énergie (Nunnari & Suomalainen, 2012). La mitochondrie et ses composantes structurales sont illustrées à la figure 9.



**Figure 9. La structure mitochondriale et ses composantes.** Adapté de (Yusoff et al., 2015).

La morphologie mitochondriale est maintenue par l'équilibre entre les événements de fusion et de fission (Figure 10). La perturbation de cet équilibre résulte en l'extension ou la fragmentation du réseau mitochondrial et peut entraîner des conséquences fonctionnelles et bioénergétiques importantes (Chen et al., 2005; Dimmer & Scorrano, 2006). La sensibilité des mitochondries à la transition de perméabilité et à la signalisation apoptotique sont parmi les conséquences les plus documentées (Dimmer & Scorrano, 2006).



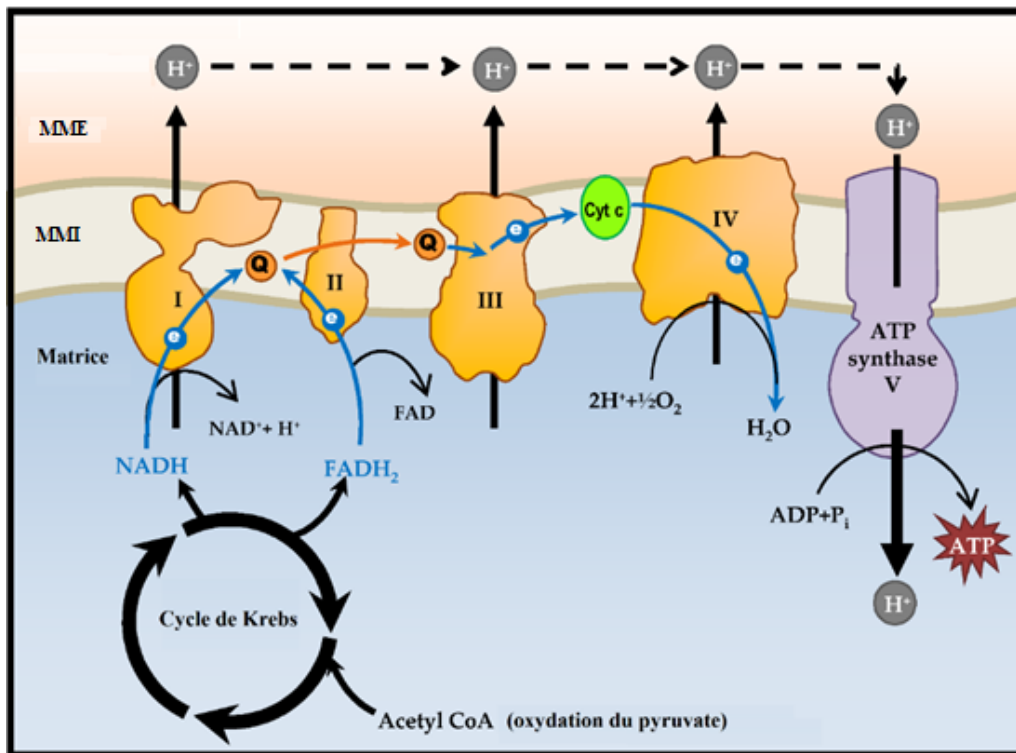
**Figure 10. La dynamique mitochondriale.** Créé à partir de (Servier Medical Art).

### 3.3. Les fonctions mitochondriales

En plus de la production d'énergie, les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire. Elles sont capables de décoder une variété de stimuli extracellulaires et de les traduire dans des mécanismes intracellulaires (Giorgi et al., 2012). Ces derniers incluent l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ , l'équilibre redox, la régulation du métabolisme et la mort cellulaire (Galluzzi et al., 2012; Wallace, 2012). Les fonctions mitochondriales associées à la production d'énergie et des espèces réactives oxygénées (ERO) ainsi qu'à l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  et à la perméabilité de transition sont discutées dans les sous-sections suivantes.

### 3.3.1. La production d'énergie

La production d'énergie, sous forme d'ATP, constitue l'une des principales fonctions des mitochondries. La synthèse d'ATP est réalisée via le système OXPHOS, en présence d' $O_2$  (Yusoff et al., 2015). Ce système comprend une série de réactions redox qui catalysent le transfert d'électrons le long de la CR. Il est composé de cinq complexes protéiques transmembranaires: le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH)-ubiquinone (complexe I), le succinate-ubiquinone oxydoréductase (complexe II), l'ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase (complexe III), le cytochrome c oxydase (complexe IV ou cytochrome C oxydase; COX), et l'ATP synthase (complexe V) (Saneto & Sedensky, 2013; Yusoff et al., 2015) (Figure 11).



**Figure 11. Le système de phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondrial.** MME : membrane mitochondriale externe. MMI : membrane mitochondriale interne. Adapté de (Yusoff et al., 2015).

En condition physiologique, la CR est alimentée par le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation. Ces voies métaboliques sont responsables de l'approvisionnement de molécules donneuses d'électrons, comme le NADH et la flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>). Les électrons, transportés à travers les complexes I à IV, libèrent de l'énergie couplée au flux de protons (H<sup>+</sup>) qui sont ensuite libérés dans l'espace intermembranaire. Ce flux de protons transmembranaire génère un gradient qui est utilisé pour entreposer l'énergie sous forme de potentiel membranaire ( $\Delta\Psi_m$ ). Ce dernier est ensuite utilisé par l'ATP synthase dans le processus de phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP (Saneto & Sedensky, 2013).

### **3.3.2. La production des espèces réactives oxygénées (ERO)**

Les ERO sont naturellement générés durant le transfert d'électrons le long de la CR, plus spécifiquement au niveau des complexes I et III. Les principaux ERO sont le radical anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le radical hydroxyle (OH<sup>-</sup>) (Yusoff et al., 2015). La production physiologique d'ERO (relativement en faible quantité) est importante dans certaines voies de signalisation cellulaire. En effet, les ERO sont impliqués dans la réponse adaptative au stress, incluant la prolifération et la différenciation cellulaire (Hamanaka & Chandel, 2010). Au contraire, la surproduction d'ERO peut endommager plusieurs macromolécules, telles que les lipides, les acides nucléiques et les protéines (Hayashi & Cortopassi, 2015).

En situation physiologique, les cellules sont dotées de systèmes antioxydants capables de les protéger contre les effets potentiellement toxiques des ERO; le glutathion, la thiorédoxine et les protéines thiols sont des exemples de molécules antioxydantes (Vafai & Mootha, 2012). En général, des perturbations dans la CR peuvent compromettre l'équilibre entre la production d'ERO et le système de protection antioxydant donnant lieu au stress oxydant (Hayashi & Cortopassi, 2015).

### 3.3.3. L'homéostasie du $\text{Ca}^{2+}$ et la perméabilité de transition

Les mitochondries jouent un rôle clé dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, ces organites contrôlent les concentrations cytoplasmiques de  $\text{Ca}^{2+}$  conjointement avec le RE. De plus, la majorité des fonctions mitochondriales sont  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes, tels, le cycle de Krebs, le déclenchement de la mort cellulaire (apoptose/nécrose), la transmission synaptique neuronale et la contraction des cellules musculaires lisses (Picard et al., 2013).

En conditions physiologiques, le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique entre dans la matrice mitochondriale à travers les canaux VDAC et « *mitochondrial calcium uniporter* » (MCU). Ce dernier se trouve dans la MMI et permet le passage de  $\text{Ca}^{2+}$  via un processus dépendant du  $\Delta\Psi_m$  généré durant l'activité de la CR. En sens inverse, le  $\text{Ca}^{2+}$  sort de la matrice mitochondriale à l'aide des échangeurs  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Ce trafic de  $\text{Ca}^{2+}$  indique que la perméabilité de la MMI est un processus hautement complexe médié par des canaux à haute conductivité et dépendants du voltage (Bakthavachalam & Shanmugam, 2017).

En conditions pathologiques, l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice entraîne le changement de perméabilité de la MMI et ainsi la formation de pores de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) (Giorgi et al., 2012) (Figure 12). Ces derniers sont des complexes multiprotéiques qui permettent le passage de molécules de poids moléculaire inférieur à 1.5 kDa à travers la MMI (Ascah, 2011) et dont l'ouverture est un élément clé du déclenchement de la mort cellulaire par apoptose.



**Figure 12. La dynamique du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP).**  
Adapté de (Bernardi et al., 2015).

Les conséquences de la transition de perméabilité mitochondriale dépendent du nombre de PTP formés et du temps d'ouverture de chaque pore. En effet, l'ouverture transitoire de PTP permet le passage d'ions à travers la MMI, ce qui peut contribuer à la régulation des concentrations du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial. À l'inverse, l'ouverture irréversible de PTP induit la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol et le découplage de la respiration mitochondriale. Ensemble, ces facteurs entraînent une déplétion des réserves d'ATP et ainsi la mort cellulaire (Picard et al., 2013).

### **3.4. Les facteurs de stress mitochondrial**

Les mitochondries jouent un rôle clé dans le processus d'adaptation au stress (Manoli et al., 2007). À cet effet, elles envoient des signaux vers le cytoplasme et le noyau pour déclencher des réponses cellulaires adaptatives modulées par l'expression des gènes (Butow & Avadhani, 2004). La production d'énergie, la génération des molécules de signalisation et les changements morphologiques (fusion et fission) sont parmi les mécanismes utilisés par les mitochondries pour répondre au stress (Manoli et al., 2007; Westermann, 2010). Ces réponses sont essentielles afin de maintenir les fonctions mitochondriales et pour ajuster leur phénotype aux changements dans le microenvironnement et ainsi éviter la mort cellulaire. La réponse mitochondriale au stress peut être activée, entre autres, par la présence d'ERO, l'inflammation, la surcharge nutritionnelle, les agents cytotoxiques et les désordres mitochondriaux (Suliman & Piantadosi, 2016).

## **4. Les maladies mitochondriales**

Les maladies mitochondriales sont les atteintes héréditaires du métabolisme les plus fréquentes. Les données épidémiologiques les plus récentes estiment qu'environ 1 individu sur 5000 est atteint d'un désordre mitochondrial d'origine génétique (Parikh et al., 2015). Néanmoins, cette prévalence est parfois sous-estimée due à l'hétérogénéité phénotypique, biochimique et génétique de ce groupe de maladies, ce qui rend également difficile le diagnostic (Poole et al., 2015).

## 4.1. Classification des maladies mitochondriales

De façon générale, les maladies mitochondriales sont classées en 2 types, selon leur origine : primaire et secondaire (Suliman & Piantadosi, 2016).

Les maladies mitochondriales primaires sont issues des mutations transmises dans l'ADNn ou l'ADNmt et, dans la majorité des cas, de façon autosomique récessive, ce qui signifie que ces maladies peuvent affecter autant les filles que les garçons (Chinnery, 2015). Elles sont diagnostiquées durant la petite enfance et, puisque les options thérapeutiques sont limitées ou inexistantes, les taux de morbidité et mortalité sont habituellement élevés (Suliman & Piantadosi, 2016). Chez les enfants, la plupart des maladies mitochondriales proviennent de mutations de gènes nucléaires (Saneto & Sedensky, 2013) (Tableau I). Elles se manifestent plus précocement et plus sévèrement que celles issues des mutations dans l'ADNmt (Debray et al., 2007; Gibson et al., 2008). Le syndrome de Leigh (LS) est une maladie mitochondriale de nature hétérogène car elle est causée par des mutations dans les deux génomes, nucléaire et mitochondrial. Il s'agit d'une des maladies mitochondriales héritées les plus fréquentes et sera discuté en détail dans la section 4.4 (Saneto & Sedensky, 2013).

**Tableau I. Mutations dans l'ADNn codant les protéines du système de phosphorylation oxydative (OXPHOS) chez les enfants.** Adapté de (Koopman et al., 2016).

<b>OXPHOS</b>	<b>Mutations dans l'ADNn</b>			
<b>Complexes respiratoires</b>	<b>Protéines d'assemblage</b>		<b>Protéines structurales</b>	
<b>I</b>	NDUFAF1	NDUFAF2	NDUFA1	NDUFA2
	NDUFAF3	NDUFAF4	NDUFA9	NDUFA10
	C8orf38	C20orf7	NDUFA11	NDUFA12
	ACAD9	FOXRED1	NDUFA13	NDUFB3
			NDUFB9	NDUFB11
			NDUFS1	NDUFS2
			NDUFS3	NDUFS4
			NDUFS6	NDUFS7
			NDUFS8	NDUFV1
			NDUFV2	
<b>II</b>	SDHAF1	SDHAF2	SDHA	SDHC
			SDHD	
<b>III</b>	BCS1L	LYRM7	CYC1	UQCRB
	TTC19	UQCC2	UQCRC2	UQCRQ
	UQCC3			
<b>IV</b>	CEP89	COA3	COX4I2	COX6A1
	COA5	COA6	COX6B1	COX7B
	COX10	COX14	NDUFA4	
	COX15	COX20		
	FASTKD2	PET100		
	SCO1	SCO2		
	SURF1			
<b>V</b>	ATPAF2	TMEM70	ATP5A1	ATP5E



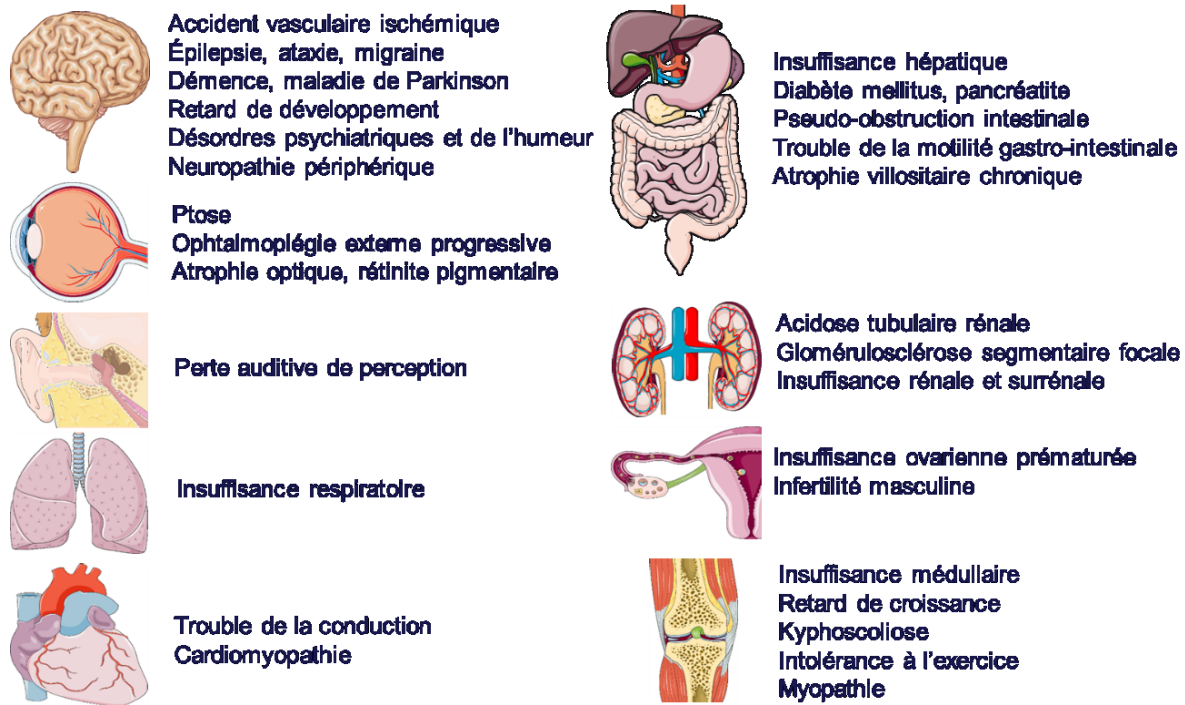
Au contraire, les maladies mitochondriales secondaires surviennent suite à des évènements non-génétiques comme l'exposition à certaines toxines, l'ischémie, des infections, l'inflammation et le vieillissement. Ces facteurs sont responsables de l'accumulation de délétions et de mutations pathogéniques ponctuelles, surtout, dans l'ADNmt. Ces maladies sont normalement diagnostiquées chez les adultes atteints d'un état inflammatoire chronique (Suliman & Piantadosi, 2016). Les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, inflammatoires, métaboliques et certains types de cancer sont parmi les exemples de désordre mitochondrial secondaire (Lin & Beal, 2006; Nasrallah & Horvath, 2014; Wallace, 2012).

## **4.2. Maladies mitochondriales**

En général, les maladies mitochondriales présentent un défaut dans le processus de biogenèse mitochondriale (Suliman & Piantadosi, 2016). Des mutations peuvent favoriser la génération de mitochondries défectueuses et dysfonctionnelles compromettant, entre autres, le système OXPHOS, la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$ , la production d'ERO et les mécanismes de mort cellulaire programmée (apoptose) (Murphy & Smith, 2007).

## **4.3. Manifestations cliniques des maladies mitochondriales**

Les perturbations dans le système OXPHOS compromettent la production d'énergie. En conséquence, les organes demandant plus d'énergie pour fonctionner de façon optimale sont ceux les plus touchés par la maladie, par exemple, le SNC et le système musculo-squelettique (Saneto & Sedensky, 2013). La plupart des protéines mitochondriales sont exprimées de façon tissu-spécifique; ainsi, selon l'organe affecté par la mutation, les répercussions cliniques sont variables incluant des anomalies gastro-intestinales, cardiovasculaires, psychomotrices et neurologiques (Chinnery, 2015) (Figure 13).



**Figure 13. Manifestations cliniques des maladies mitochondriales.** Créé à partir de (Servier Medical Art).

Les progrès scientifiques récents dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis une meilleure compréhension des facteurs entourant la pathophysiologie mitochondriale. Par exemple, grâce au séquençage de l'ADNmt, il a été possible de distinguer les différents groupes de maladies mitochondriales par l'association entre les manifestations cliniques et les profils génotypiques des individus (Chinnery, 2015). Le LS est un exemple de maladie mitochondriale.

#### 4.4. Le syndrome de Leigh (LS)

Le LS, également appelé « encéphalopathie subaiguë nécrosante » (SNE) (Leigh et al., 2015), est une maladie neurodégénérative rare caractérisée par des mutations hétérogènes dans l'ADNn ou l'ADNmt (DiMauro et al., 2013). Il s'agit du désordre mitochondrial le plus fréquent, touchant 1 nouveau-né sur 40 000 aux États-Unis (Darin et al., 2001). Sa transmission se fait principalement de façon autosomique récessive. Néanmoins, le LS peut également être

hérité maternellement (mitochondrial) ou de manière récessive liée au chromosome sexuel X (Leigh et al., 2015) (Tableau II).

**Tableau II. Distribution des lésions génétiques dans la chaîne respiratoire chez les patients atteints de syndrome de Leigh classique.**

Transmission autosomique récessive (AR). Transmission maternelle (M). Coenzyme Q10 (CoQ10). Pyruvate déshydrogénase (PDHC). Transmission récessive liée au chromosome X (XR). Adapté de (P. N. Leigh et al., 2015).

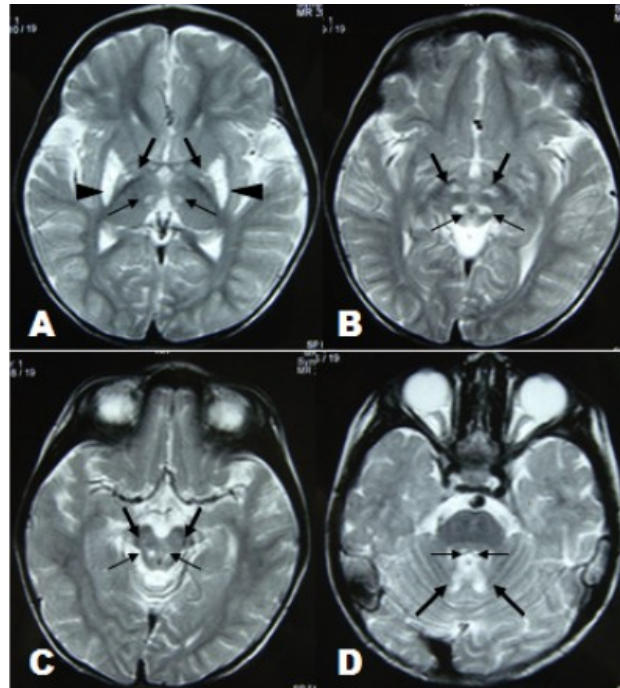
Défaut	Transmission	Fréquence
Complexe I	AR, M	++++
Complexe II	AR	+
Complexe IV	AR	+++
Complexe V	M, AR	++
ARN <sup>t</sup> <sub>Leu</sub> (UUR)	M	+
ARN <sup>t</sup> <sub>Lys</sub>	M	+
CoQ10	AR	+
PDHC	XR, AR	+++

#### **4.4.1. Étiologies du LS**

Dû à l'hétérogénéité génétique, le LS peut causer un déficit isolé ou combiné de différents complexes de la CR (Leigh et al., 2015) (Tableau II). Les gènes les plus affectés sont principalement ceux d'origine nucléaire impliqués dans l'assemblage ou la biogenèse des protéines du système OXPHOS codant, principalement, les sous-unités du COX : SURF1, SCO1, SCO2, COX10 ET COX15 (Mourier et al., 2014). Une étude multicentrique rétrospective réalisée en Europe a toutefois rapporté qu'environ 70% des individus atteints de LS présentaient des anomalies de la CR attribuable à une déficience du complexe I (Sofou et al., 2014).

#### **4.4.2. Manifestations cliniques du LS**

Le LS est un désordre caractérisé par un vaste spectre de phénotypes présentant des manifestations cliniques variables (Sofou et al., 2014). De façon générale, les patients présentent une réduction de la capacité à synthétiser l'ATP (Wong, 2012). De plus, des lésions bilatérales nécrotiques subaiguës sont observées au niveau du SNC, plus spécifiquement, dans les régions du thalamus au tronc cérébral et aux colonnes postérieures de la moelle épinière (Leigh, 1951). La figure 14 illustre les lésions cérébrales d'un jeune garçon atteint de LS classique causé par des mutations dans le gène SURF1. Le patient présentait une réduction sévère dans l'activité de COX dans les fibroblastes et une acidose métabolique persistante (Kartikasalwah & Ngu, 2010).



**Figure 14. Lésions bilatérales et symétriques observées chez les patients LS par résonance magnétique.** Régions cérébrales évaluées : Ganglions de la base (A). Tronc cérébral (B). Substance noire (C). Cervelet (D). Adapté de (Kartikasalwah & Ngu, 2010).

Les atteintes neurodégénératives se manifestent cliniquement en très bas âge, entre 3 et 12 mois de vie. En général, les individus atteints de LS présentent des retards psychomoteurs et cognitifs importants. Selon une étude européenne récente réalisée chez 130 patients atteints de LS, les anomalies motrices, suivies des anomalies oculaires sont les manifestations les plus fréquentes de la maladie (Tableau III). L’hypotonie est l’anomalie motrice la plus fréquente, touchant environ 75% des patients. Dans la majorité des cas, il s’agit d’une maladie à progression rapide dont le décès survient au cours des deux ans suivant le diagnostic, principalement, par des complications respiratoires (Sofou et al., 2014).

**Tableau III. Fréquence des manifestations cliniques dans le syndrome de Leigh classique.**

Adapté de (Sofou et al., 2014).

<b>Organes/systèmes affectés</b>	<b>% des cas</b>
Anomalies motrices	99,2
Anomalies oculaires	60,8
Difficultés pour s'alimenter	45,4
Épisodes épileptiques	39,2
Troubles respiratoires	37,7
Retard mental	36,9
Troubles de succion	24,6
Troubles de l'ouïe	19,2
Troubles cardiaques	17,7
Retard de croissance	16,2
Troubles hépatiques	12,3
Microcéphalie	11,5
Neuropathie périphérique	6,9
Troubles rénaux	5,4
Troubles hématologiques	1,5

## **5. Le syndrome de Leigh version canadienne-française (LSFC)**

Le LSFC, aussi appelé « acidose lactique » est une maladie mitochondriale rare, de transmission autosomique récessive, caractérisée par une déficience tissu-spécifique en certains complexes de la CR, principalement, le COX (Legault et al., 2011; Mourier et al., 2014; Sasarman et al., 2015). Il s'agit donc d'une variante monogénique du LS classique où le seul gène impliqué est le « *leucine-rich pentatricopeptide-repeat-motif-containing* » (LRPPRC) (Mootha et al., 2003). Les principaux tissus atteints sont le cerveau et le foie (Merante et al., 1993) tandis que l'évolution clinique est particulière se manifestant, entre autres, par des crises aiguës et potentiellement fatales d'acidose lactique. Aussi, le phénotype des patients atteints du

LSFC est fortement influencé par l'interaction entre le génotype et les facteurs environnementaux (Debray et al., 2011; Legault et al., 2011; Thompson Legault et al., 2015).

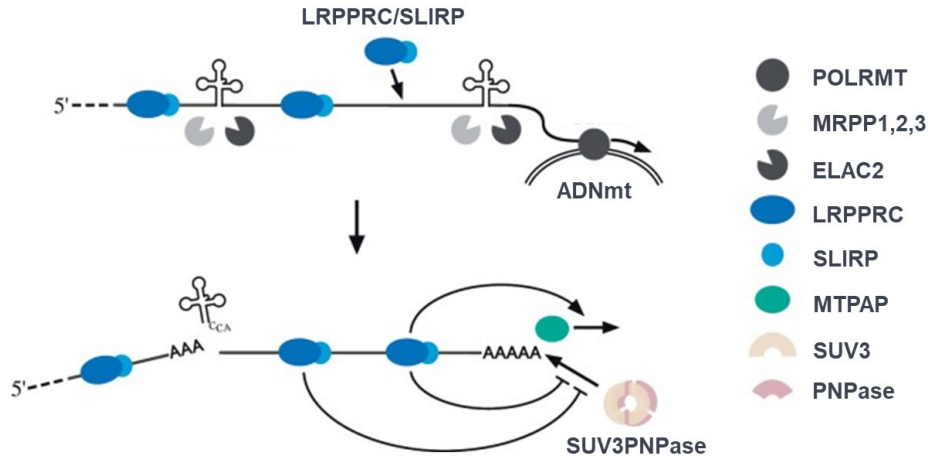
## 5.1. Données épidémiologiques

Le LSFC est une maladie prévalente dans le nord-est du Québec, plus spécifiquement, dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean où l'incidence est d'environ 1 sur 2000 naissances. Il est estimé que 1 individu sur 23 est porteur de la mutation à cause d'un effet fondateur (Morin et al., 1993). Dû à la sévérité de la maladie et l'absence de traitement pour prévenir les crises d'acidose lactique, environ 80% des enfants atteints décèdent avant l'âge de 4 ans suite à ces crises (Debray et al., 2011; Legault et al., 2011).

## 5.2. Étiologie du LSFC

Les mutations dans le gène nucléaire LRPPRC sont à l'origine du LSFC. Il s'agit, dans 95% des cas, des mutations ponctuelles de type « faux sens » A354V au niveau du chromosome 2p16-21. Des délétions de type C1277STOP ont été également identifiées chez les patients hétérozygotes (Mootha et al., 2003).

Le gène LRPPRC est responsable de l'encodage de la protéine LRPPRC localisée dans les mitochondries. Cette protéine joue un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux. Précisément, la protéine LRPPRC est impliquée dans la stabilisation des ARNm mitochondriaux pendant le processus de transcription de l'ADNmt. Pour ce faire, LRPPRC forme un complexe avec la protéine « *SRA stem-loop interacting RNA binding protein* » (SLIRP) qui se lie aux séquences d'ARNm. Le complexe LRPPRC/SLIRP favorise la polyadénylation de l'ARNm par la poly (A) polymérase mitochondriale (MTPAP) et prévient sa dégradation par les enzymes « *polynucleotide phosphorylase* » (PNPase) et « *suppressor of Var1* » (SUV3; ARN hélicase) (Figure 15) (Chujo et al., 2012).



**Figure 15. LRPPRC et le métabolisme des ARNm mitochondriaux.** POLRMT : ARN polymérase mitochondriale. MRPP1,2,3 : « *RNAse MRP* » et ELAC2 : « *Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2* » favorisent la liaison du complexe LRPPRC/SLIRP à l'ARNm. Adapté de (Chujo et al., 2012).

En général, les ARNm stabilisés par LRPPRC sont ceux impliqués dans l'assemblage des protéines du système OXPHOS, surtout au niveau de COX (Mourier et al., 2014; Ruzzenente et al., 2012).

### 5.3. Conséquences de la mutation du gène LRPPRC

#### 5.3.1. Dysfonctionnement du système OXPHOS

Les mutations de LRPPRC ont un impact significatif sur la production d'ATP dû, principalement, à la réduction de l'activité de COX dans les tissus, et ce, à différents degrés. En effet, les tissus présentant les plus bas taux de l'activité de COX sont le cerveau et le foie (10%), alors que pour la peau (fibroblastes) et le muscle squelettique la perte est de 50%. Par contre, l'activité de COX dans le cœur et les reins est pratiquement intacte chez les patients atteints du LSFC (Merante et al., 1993).



### 5.3.2. Altérations métaboliques

Les individus atteints de LSFC présentent une signature métabolique distincte. Une récente étude québécoise, visant à établir le profil métabolique des patients LSFC, a identifié 45 marqueurs du dysfonctionnement mitochondrial (Thompson Legault et al., 2015). À cet effet, les chercheurs ont utilisé l'approche métabolomique pour analyser l'ensemble de métabolites présents dans les échantillons de plasma et d'urine issus de 9 individus LSFC. Le tableau IV résume les altérations métaboliques observées chez les patients atteints du LSFC tant au niveau cytosolique que mitochondrial. Il s'agit des perturbations impliquant l'accumulation de NADH, le cycle de Krebs, la  $\beta$ -oxydation des acides gras et le métabolisme des acides aminés, surtout ceux liés à la formation de  $\alpha$ -hydroxybutyrate, comme la méthionine et la thréonine (Thompson Legault et al., 2015).

**Tableau IV. Altérations métaboliques majeures chez les patients LSFC.**

Localisation	Métabolites intracellulaires	
	Diminués	Augmentés
<b>Cytosol</b>	Kynurénine 3-hydroxy-anthranilate	Créatine Glucose Pyruvate Lactate $\alpha$ -hydroxybutyrate N-acétyl-aspartate Acétyl-carnitine Alanine Acylcarnitines Indoxylsulfate
<b>Mitochondrie</b>	Asparagine Méthylmalonate Succinate	Malate Isocitrate Propionate Propionylcarnitine $\beta$ -hydroxybutyrate

Parmi les marqueurs métaboliques, des altérations dans les concentrations plasmatiques de lactate et d'acylcarnitine ont été observées chez les patients LSFC. De façon inattendue, des altérations dans les concentrations du cholestérol, d'insuline et d'adiponectine ont été également trouvées, suggérant ainsi une augmentation globale du risque cardiovasculaire relié à la maladie. De plus, des perturbations dans le métabolisme des lipides et des acides aminés, affectant le ratio NADH/NAD<sup>+</sup> et, par conséquent, l'état redox mitochondrial, ont également été observées chez les patients LSFC sans toutefois augmenter le stress oxydant (Thompson Legault et al., 2015).

### **5.3.3. Manifestations cliniques**

De façon générale, le LSFC se manifeste cliniquement autour du cinquième mois de vie et il est caractérisé par un historique de retard psychomoteur, de développement et de croissance et d'une hypotonie (Debray et al., 2011). Les hospitalisations des enfants atteints du LSFC sont souvent reliées à une détresse néonatale accompagnée de crises d'acidose métabolique aiguë. Ces dernières représentent la principale cause de mortalité des patients atteints du LSFC. Cliniquement, elles sont caractérisées par une dyspnée de Kussmaul, une acidose lactique marquée et une hyperglycémie; celle-ci étant un prédicteur majeur de mortalité par LSFC. En effet, le risque de mortalité augmente de 30 fois chez les enfants ayant une glycémie supérieure ou égale à 10 mmol/l (Debray et al., 2011). De plus, les observations cliniques rapportent que les crises acidotiques peuvent être déclenchées durant ou immédiatement après les épisodes infectieux/inflammatoires, les surcharges nutritionnelles, les efforts physiques intenses, ou même, le stress émotionnel. En général, les enfants âgés de moins de 7 ans sont plus vulnérables au déclenchement de ces crises (Debray et al., 2011).

Les lésions neurologiques chez les patients souffrant de LSFC sont surtout observées au niveau du tronc cérébral. Néanmoins, le cervelet et la région des ganglions de la base sont occasionnellement affectés. Une accumulation de lactate est également observée dans les régions affectées. Dans certains cas, les crises neurologiques ressemblent à des épisodes d'accident vasculaire cérébral (AVC) (Debray et al., 2011). Les patients LSFC

asymptomatiques présentent une altération dans l'équilibre acido-basique, telle qu'une alcalose respiratoire associée à des concentrations d'acide lactique sanguin légèrement élevées. Également, la concentration de lactate se trouve augmentée dans le LCR (Debray et al., 2011). De plus, les individus souffrant du LSFC présentent des caractéristiques cranio-faciales distinctes tel une hypoplasie médio-faciale, un pont nasal large et un front proéminent (Figure 16) (Debray et al., 2011).



**Figure 16. Caractéristiques cranio-faciales des patients LSFC.** Garçon, 9 ans (en haut à gauche). Garçon, 5 ans (en bas à gauche). Femme, 20 ans (à droite). Tiré de (Debray et al., 2011).

Le tableau V rassemble les principales manifestations cliniques du LSFC.

**Tableau V. Fréquence des manifestations cliniques dans le syndrome de Leigh version canadienne-française.** Adapté de (Debray et al., 2011).

<b>Système</b>	<b>Signes/symptômes</b>	<b>Total de patients</b>	<b>% des cas</b>
Croissance	Retard de croissance	44	52
Cranio-facial	Hypoplasie médio-faciale	39	90
	Pont nasal large	38	87
	Hypertélorisme	32	56
	Fontanelle antérieure large	24	58
	Front proéminent	40	88
	Sourcils arquées	40	58
	Hirsutisme	39	54
	Synophridie	38	26
Neurologique	Retard de développement	43	100
	Hypotonie	43	100
	Ataxie	33	48
	Tremblement	35	54
	Strabisme	40	35
	Crise épileptique	44	13

## 6. Les modèles expérimentaux du LSFC

### 6.1. Le modèle cellulaire

Les fibroblastes, obtenus à partir d'une biopsie de peau des patients LSFC, est, pour le moment, le modèle le plus accessible et le plus utilisé pour étudier la maladie au niveau fondamental. Les fibroblastes des patients atteints de LSFC présentent des niveaux réduits de la protéine LRPPRC (< 30%) ce qui entraîne un défaut dans l'assemblage de COX (Sasarman et al., 2015; Xu et al., 2004), dont l'activité est réduite de 50% (Merante et al., 1993). Les fibroblastes LSFC présentent des perturbations mitochondriales importantes qui limitent, entre autres, leur capacité à répondre à un stress nutritionnel induit par une surcharge de palmitate, seul ou combiné avec le lactate. En conditions basales, ces cellules présentent une fragmentation du réseau mitochondrial et des réductions dans certaines fonctions mitochondriales comme la capacité de phosphorylation oxydative, le potentiel membranaire mitochondrial et la capacité de rétention calcique (Burelle et al., 2015). Malgré ces altérations, les fibroblastes sont capables de maintenir la production d'ATP sans influencer la production d'ERO. Néanmoins, en conditions de stress, ils sont plus susceptibles à la mort cellulaire par nécrose induite par le palmitate, seul ou combiné au lactate (Burelle et al., 2015; Rivard, 2011). De plus, des altérations importantes dans la régulation du métabolisme énergétique ont été démontrées chez les fibroblastes LSFC. Plus spécifiquement, ils présentent une surexpression des voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie énergétique (Akt/mTOR et SIRT1/PGC1 $\alpha$ ) en conditions basales. Par contre, en conditions de stress, mimant une « crise » induite par le palmitate et le lactate, les fibroblastes LSFC ne sont pas capables d'activer la protéine kinase activée par l'AMPK. Celle-ci est néanmoins activée en réponse à un découplage de la respiration cellulaire induite par le 2,4-dinitrophénol (DNP) (Mukaneza, 2014).

## 6.2. Le modèle animal

Bien qu'il existe d'autres modèles murins de délétion (« *knockout* ») du gène LRPPRC (ubiquitaire et cardiaque) pour étudier l'impact tissu-spécifique de cette mutation (Mourier et al., 2014; Ruzzenente et al., 2012), la souris déficiente en LRPPRC spécifiquement au niveau hépatique (HKO) est le seul modèle viable pour étudier la maladie. Ce modèle a été créé en utilisant le système de recombinaison Cre/loxP (Wachsman & Heidstra, 2010).

Les souris HKO sont caractérisées par une ablation incomplète de la protéine LRPPRC au niveau du foie (*H-Lrpprc*<sup>-/-</sup>) (Cuillierier et al., 2017). En conséquence, ces souris présentent une déficience sévère et combinée de COX et de l'ATP synthase. Dans ce modèle, le COX présente un défaut d'assemblage et son activité enzymatique est diminuée de 80% (Cuillierier et al., 2017). Phénotypiquement, les souris HKO ne présentent aucun comportement particulier, et ce même après une situation de stress métabolique comme le jeûne (Cuillierier et al., 2017). Globalement, le modèle est caractérisé par un retard de croissance (pondéral) et par des atteintes tissulaires et des hépatopathies mitochondriales : inflammation péri-portale et centro-lobulaire, cholestase biliaire, présence de plaques de nécrose et de nombreux corps apoptotiques et stéatose microvésiculaire (Cuillierier et al., 2017). Au niveau cellulaire, les hépatocytes des souris HKO présentent une prolifération aberrante des mitochondries qui se traduit par une incapacité à oxyder les acides gras à longue chaîne comme le palmitoyl-CoA (Cuillierier et al., 2017). Ce dernier est dérivé de l'acide palmitique, un acide gras saturé abondant dans la diète. Finalement, le modèle HKO reproduit en partie certains aspects du phénotype général des patients LSFC et d'autres maladies mitochondriales avec des atteintes hépatiques. Ainsi, il constitue un modèle intéressant et pertinent pour explorer certains aspects de la maladie (Cuillierier et al., 2017).

## 7. Hypothèses, objectifs et approche expérimentale

Il est connu que le LSFC est une maladie mitochondriale rare dépourvue de traitement pour prévenir les crises mortelles d'acidose lactique. De plus, ces crises peuvent être déclenchées par certains facteurs de stress tels que l'infection/inflammation et la surcharge nutritionnelle. Également, le cerveau et le foie sont les tissus les plus sévèrement affectés par la maladie. Néanmoins, les mécanismes reliant les atteintes neurologiques aux crises acidotiques n'ont pas été établis.

Le seul modèle *in vitro* disponible pour étudier la maladie sont les fibroblastes de peau issus de patients LSFC. Ce modèle, déjà caractérisé en conditions basales, présente des mitochondries dysfonctionnelles et est plus susceptible aux effets néfastes d'un stress nutritionnel (SN) ou inflammatoire (SI). Aussi, les souris HKO constitue le seul modèle animal viable pour caractériser la maladie *in vivo* et *ex vivo*. Néanmoins, à ce jour, seulement le phénotype et la caractérisation morpho-fonctionnelle du foie ont été étudiés chez la souris HKO.

Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse que **la mutation du gène LRPPRC entraîne une susceptibilité accrue à une combinaison des facteurs déclencheurs de crises acidotiques, tels que l'inflammation et la surcharge nutritionnelle**. Également, nous spéculons que **des agents thérapeutiques, ayant un impact sur ces facteurs déclencheurs, tels que les acides gras oméga-3 (O3), diminuent cette vulnérabilité**. Enfin, puisqu'il existe un lien métabolique étroit entre le foie et le cerveau, nous supposons que **la mutation du gène LRPPRC au niveau hépatique exerce un impact au niveau cérébral**. Plus spécifiquement, l'ablation de LRPPRC hépatique des souris HKO affecterait la population des cellules fonctionnellement importantes au métabolisme cérébral telles que les neurones et les cellules gliales.

Ainsi, les travaux de ce mémoire de maîtrise visent les objectifs suivants :

1. Caractériser l'impact d'un stress de type inflammatoire et nutritionnel (SIN), induit par le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ) et le palmitate, sur la mort cellulaire et la fonction mitochondriale de fibroblastes de patients atteints de LSFC;
2. Étudier l'effet des O3 sur la mort cellulaire et la fonction mitochondriale de fibroblastes de patients atteints de LSFC en condition de SIN;
3. Initier la caractérisation immunohistochimique des régions du cortex, cervelet et tronc cérébral des souris HKO en conditions basales.

Les objectifs 1 et 2 seront réalisés en utilisant des lignées cellulaires (fibroblastes) issues d'un patient et d'un témoin soumises à différentes conditions de SIN. Préalablement, une étape de criblage des facteurs inducteurs de stress sera effectuée, en spectrofluorométrie, afin de sélectionner les conditions de stress induisant une mort cellulaire significative et modulable entre les lignées. Ensuite, la mort cellulaire par nécrose, les paramètres d'évaluation de la fonction mitochondriale (respiration mitochondriale,  $\Delta\Psi_m$ , capacité de rétention calcique (CRC) et production d'ERO) et la glycolyse seront mesurés dans la condition et période de temps choisis suite aux expériences de criblage. L'impact des O3 (acide éicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA)) sur certains paramètres sera également vérifié. L'objectif 3 sera réalisé en utilisant des coupes de cerveaux des souris HKO et témoins (HWT) et des expériences d'immunohistochimie suivies d'analyse par microscopie à fluorescence.



# Matériel et méthodes

## 1. *In vitro*

### 1.1. Culture cellulaire

Des fibroblastes primaires immortalisés d'un sujet témoin (EBS4F) et d'un patient atteint d'acidose lactique (AL006) ont été utilisés au cours de cette étude. Ces lignées ont été choisies en fonction des études précédentes puisqu'elles sont représentatives de l'ensemble des lignées disponibles pour étudier la maladie (Burelle et al., 2015). Les fibroblastes ont été obtenus par biopsie de peau des filles âgées de 5 et 8 ans, respectivement (Tableau VI). Le processus d'immortalisation cellulaire par transfection avec le gène E7 du HPV-16 et la télomérase humaine (Yao & Shoubridge, 1999) a permis l'utilisation jusqu'à 20 passages pour la réalisation des expériences sans compromettre les caractéristiques biologiques des fibroblastes.

**Tableau VI. Particularités des lignées cellulaires utilisées.** Adapté de (Rivard 2011).

Lignées	Sexe	Âge au prélèvement (ans)	Origine	Caractéristiques
EBS4F	F	5	Française	Témoin
AL006	F	8	Québécoise	Patient LSFC Homozygote A354V (LRPPRC)

En conditions basales, les fibroblastes ont été cultivés dans un milieu « Dulbecco's Modification Eagle's Medium » (DMEM) riche en glucose (4,5 g/L), supplémenté de sérum fœtal bovin (FBS; 10%), d'une solution de pénicilline (100 UI), streptomycine (100 µg/ml) et L-glutamine (4 mM). Tous les produits ont été obtenus auprès de la compagnie Wisent

Bioproducts. Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère humide et contrôlée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

## **1.2. Préparation des conditions expérimentales**

En premier lieu, une étape de criblage des agents inducteurs de SIN, utilisés seuls ou en combinaison, a été réalisée pour déterminer les conditions expérimentales. À cet effet, les fibroblastes (témoin et patient) ont été exposés pendant 24 et 48h aux traitements suivants : lipopolysaccharide (LPS; 2 µg/ml, Sigma), TNF-α (100 ng/ml, Bio Basic Inc.) et palmitate (1 mM, Sigma) complexé à l'albumine (1,33%, Millipore). La concentration de LPS a été préalablement choisie suite à la réalisation d'une courbe dose-réponse, allant de 0,05 µg/ml à 2 µg/ml, tandis que celle de TNF-α et de palmitate ont été déterminées en fonction des études précédentes sur les mêmes lignées cellulaires (Rivard 2011).

Ensuite, pour l'étape de modulation de la réponse cellulaire par des agents thérapeutiques prévue dans notre étude, les fibroblastes ont été prétraités pendant 2 ou 4h avec une solution composée des acides gras polyinsaturés EPA (50 µM) et DHA (50 µM) de la série des O3. Les acides gras O3 ont été maintenus dans le milieu tout au long de la période d'exposition aux agents inducteurs de SIN. Les deux produits ont été obtenus auprès de la compagnie Cayman Chemical.

Finalement, tous les tests ont été effectués dans les conditions expérimentales décrites dans le tableau VII. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM pour 4h) a été utilisé comme contrôle positif pour la mort cellulaire.

**Tableau VII. Conditions expérimentales sélectionnées pour l'étude.**

<b>Groupes de traitement</b>	Basal (DMEM seulement) SIN (TNF- $\alpha$ + palmitate) SIN + O3 (TNF- $\alpha$ + palmitate + acides gras oméga 3)
<b>Temps d'exposition</b>	24h
<b>Conditions d'incubation</b>	37°C, 5% CO <sub>2</sub>

### 1.3. Spectrofluorométrie

Dans notre étude, la spectroscopie de fluorescence a été largement utilisée non seulement pour mesurer la mort cellulaire dans les lignées cellulaires, mais aussi pour évaluer certains aspects de la fonction mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ , CRC et production des ERO). À l'aide d'un spectrophotomètre, cette méthode permet de mesurer la fluorescence émise par certaines molécules présentes dans l'échantillon dans des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques.

#### 1.3.1. Résazurine

- Principe

Le sel de résazurine (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour évaluer la viabilité des fibroblastes à l'étape de criblage. Il s'agit d'un réactif bleu perméable aux cellules qui devient rose fluorescent (résorufine) lorsqu'il est métabolisé par les réductases mitochondriales et cytoplasmiques des cellules viables. En conséquence, la production de résorufine est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement actives.

- Protocole

Les fibroblastes ont été incubés dans des plaques transparentes de 96 puits (Compagnie?) avec une densité de 3000 cellules par puits ( $n = 8$  pour chaque condition). Après une période d'adhérence d'une nuit, les fibroblastes ont été exposés aux différentes conditions de SIN pour 24 et 48h. Finalement, 10  $\mu$ l de la solution de résazurine (400  $\mu$ M) a été ajouté au milieu 3h avant la lecture finale. Les intensités de fluorescence ont été lues à l'aide du spectrophotomètre Synergy HT et du logiciel Gen5 (BioTeK) aux longueurs d'onde suivantes (excitation/émission) : 530/590nm.

### 1.3.2. Potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

- Principe

La sonde tétraméthylester éthylique de la rhodamine (TMRE; Invitrogen) a été utilisée pour mesurer le  $\Delta\Psi_m$ . Le TMRE est accumulé dans les mitochondries actives grâce à ses propriétés cationiques dans un processus dépendant de l'intégrité du  $\Delta\Psi_m$ . Ainsi, la fluorescence rouge-orangée résultante est proportionnelle au  $\Delta\Psi_m$ . Aussi, pour assurer que les changements des intensités de fluorescence du TMRE étaient spécifiquement dus aux changements du  $\Delta\Psi_m$ , la sonde MitoTracker Green (MTG; Invitrogen) a été utilisée pour la quantification des mitochondries. Le MTG est un sel vert fluorescent, non-dépendant du  $\Delta\Psi_m$ , qui se lie aux mitochondries.

- Protocole

Les fibroblastes ont été cultivés dans des plaques noires de 96 puits (Perkin Elmer) avec une densité de  $1,5 \times 10^4$  cellules par puits ( $n = 3$  pour chaque condition). Après 4h d'adhérence, les fibroblastes ont été exposés aux différentes conditions de SIN. Suite à 24h d'incubation, le milieu a été aspiré et remplacé par 100  $\mu$ l d'une solution contenant le TMRE (200 nM), le MTG (200  $\mu$ M) et le colorant nucléaire Hoechst 33342 (H; 5  $\mu$ g/ml, Sigma). De plus, le carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone (découpleur mitochondrial, CCCP; 50  $\mu$ M, Sigma) et l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase, 5  $\mu$ M, Sigma) ont été également ajoutés dans les

puits réservés au contrôle positif de la dépolarisation membranaire mitochondriale. Après 20 minutes de réaction à 37°C, protégés de la lumière, les puits ont été lavés une fois avec une solution tamponnée de phosphate (PBS; Life technologies) et de 0.2% d'albumine sérique de bovin (BSA). Ensuite, la plaque a été lue à l'aide du spectrophotomètre Safire et du logiciel Magelan, version 7.2 (Tecan) aux longueurs d'onde suivantes (excitation/émission) : TMRE (549/575nm); MTG (490/516nm); et Hoechst 33342 (354/442nm). Finalement, 3 expériences indépendantes ont été réalisées en triplicata. Les données ont été exprimées en ratio des intensités de fluorescence de TMRE et MTG normalisées par les intensités de Hoechst 33342, selon l'équation suivante :

$$\Delta\Psi_m = [(TMRE/Hoechst) / (MTG/Hoechst)]$$

### 1.3.3. MitoSOX Red

- Principe

La production des ERO a été mesurée en utilisant la sonde MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific). Celle-ci est un colorant perméable aux cellules facilement oxydé par l'anion superoxyde présent dans les mitochondries. En conséquence, la sonde oxydée émet une fluorescence rouge proportionnelle à la quantité d'ERO.

- Protocole

Les fibroblastes ont été cultivés dans des plaques noires de 96 puits (Compagnie?) avec une densité de  $1,5 \times 10^4$  cellules par puits ( $n = 3$  pour chaque condition) pendant 4h avant de recevoir les solutions de traitement. Après 24h d'incubation, le milieu a été aspiré et remplacé par 100  $\mu$ l d'une solution contenant le mitoSOX Red (25  $\mu$ M). De plus, l'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la CR, 100  $\mu$ M; Sigma) a été ajouté aux puits réservés au contrôle positif de la production des ERO. Certains puits ont été aussi réservés pour le contrôle négatif où les cellules sont exposées uniquement au colorant nucléaire Hoechst 33342 (5  $\mu$ g/ml). Après

40 minutes de réaction à 37°C, protégés de la lumière, les puits ont été lavés une fois avec une solution tampon de phosphate contenant 0,2% de BSA. Ensuite, la plaque a été lue à l'aide du spectrophotomètre Safire et du logiciel Magelan aux longueurs d'onde suivantes (excitation/émission) : MitoSOX Red (510/580nm) et Hoechst 33342 (354/442nm). Finalement, 3 expériences indépendantes ont été réalisées en triplicata. Toutes les données ont été normalisées par la moyenne des intensités de fluorescence obtenues avec Hoechst 33342.

### 1.3.4. Capacité de rétention calcique (CRC)

- Principe

La mesure de CRC est basée sur la capacité maximale des mitochondries à retenir le  $\text{Ca}^{2+}$  ajouté régulièrement au milieu extracellulaire par des injections de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) jusqu'à l'ouverture du PTP. Les changements des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ont été mesurés à l'aide de la sonde calcium-green 5N (ThermoFisher), un colorant imperméable aux cellules qui émet une fluorescence verte proportionnelle à la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- Protocole

Dans un premier temps, les fibroblastes ont été cultivés dans des flacons T75 jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 80%. Ensuite, la solution des acides gras O3 a été introduite dans le milieu 4h avant de recevoir les solutions de traitement. Après 24h d'exposition, les cellules ont été trypsinisées, comptées et lavées dans 3 ml de tampon CRC (Tris-MOPS, 10 mM; pH 7,4; sucrose, 250 mM; EGTA, 0,005 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM) avant de commencer les mesures.

Ensuite, de 3 à  $5 \times 10^6$  fibroblastes ont été incubés à 25°C dans une cuvette contenant 850  $\mu\text{l}$  de tampon CRC supplémenté avec les substrats suivants : succinate (substrat donneur d'électrons au complexe II de la CR, 5 mM), glucose (substrat du métabolisme cellulaire, 5 mM), ADP (substrat de l'ATP synthase, 0,1 mM), hexokinase (phosphotransférase responsable de la conversion du glucose en glucose-6-phosphate, 1 U/ml) et thapsigargin

(inhibiteur de la captation de  $\text{Ca}^{2+}$  par le sarcoplasme et le RE, 1  $\mu\text{M}$ ). La digitonine (0,05 mg/ml) a été également ajoutée afin de perméabiliser les fibroblastes pendant 5 minutes avant de recevoir les injections pulsées de  $\text{Ca}^{2+}$  (5 nmoles/injection). Celles-ci ont été administrées aux 2 minutes jusqu'à la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extra-mitochondrial, correspondant à l'ouverture du PTP.

Les pics des intensités de fluorescence de calcium-green 5N (1  $\mu\text{M}$ ), générés après l'administration des injections pulsées de  $\text{Ca}^{2+}$ , ont été enregistrés tout au long de l'expérience par le spectrophotomètre F-4500 et le logiciel LF solutions (Hitachi High-Technologies) aux longueurs d'onde d'excitation de 505nm et d'émission de 535nm. À la fin de l'expérience, 100  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon a été prélevé et lysé par 3 cycles de congélation avec l'azote liquide et décongélation dans l'eau bouillante. Ensuite, les cellules ont été traitées aux ultrasons (pulse de 50%; 30 secondes) et centrifugées (14000 x g; 15 minutes) afin de récupérer le surnageant pour le dosage de protéines (section 1.6). Le nombre d'expériences réalisées par chaque condition a été le suivant : Témoin [Basal (n = 6); SIN (n = 6); SIN+O3 (n = 9)] et Patient [Basal (n = 10); SIN (n = 5); SIN+O3 (n = 7)]. Finalement, la CRC a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{CRC} = \text{quantité de } \text{Ca}^{2+} \text{ (nmoles)} / \text{quantité de protéines (mg)}$$

## 1.4. Microscopie à fluorescence

- Principe

Dans notre étude, la mort cellulaire a été évaluée à l'aide de l'imageur «Operetta High Content Imaging System», une plateforme de microscopie à fluorescence automatisée capable d'identifier et de quantifier les cellules en fonction de leurs phénotypes (Perkin Elmer). Pour ce faire, les fluorochromes Hoechst 33342 (Life technologies) et iodure de propidium (PI; Sigma) ont été utilisés pour détecter les cellules viables et nécrotiques, respectivement. Ici, seulement les cellules dont les intensités de fluorescence de PI se situaient  $\geq 500$  ont été considérées comme

PI+. Le marqueur nucléaire Hoechst 33342 a été utilisé pour déterminer le nombre total de cellules.

- Protocole

Les fibroblastes ont été cultivés dans des plaques noires de 96 puits (Compagnie?) avec une densité de  $1 \times 10^4$  cellules par puits ( $n = 3$  pour chaque condition) pendant 4h avant de recevoir les solutions de traitement. Après 24h d'incubation, le milieu a été délicatement aspiré et les cellules ont été lavées une fois avec du PBS. Ensuite, 40  $\mu$ l d'une solution de fluorochromes, composée de Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/ml) et PI (2,5  $\mu$ g/ml) a été ajouté dans chaque puits. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et protégé de la lumière, 160  $\mu$ l d'une solution de formaline 2% a été directement ajoutée dans chaque puits pendant 5 minutes afin d'arrêter la réaction.

Ensuite, les images ont été capturées par l'imageur «Operetta High Content Imaging System», à un grossissement de 20X et mode d'acquisition non-confocale, en utilisant une illumination épifluorescente des longueurs d'onde suivantes (excitation/émission) : Hoechst 33342 (364/450-65nm) et PI (488/635-55nm). Ces images ont été analysées directement par le logiciel Harmony PhenoLOGIC 3.5.2 (Perkin Elmer). Le pourcentage des cellules PI+ dans chaque puits a été obtenu à partir de la moyenne des intensités de 5 régions. Finalement, 3 expériences indépendantes ont été réalisées en triplicata. La moyenne du nombre de fibroblastes analysés dans chaque condition pour les 3 expériences est décrite dans le tableau VIII.



**Tableau VIII. Quantité moyenne des fibroblastes par condition évaluée en microscopie à fluorescence.**

<b>Conditions</b>	<b>Témoin</b>	<b>Patient</b>
Basal	604 ± 29	450 ± 65
TNF- $\alpha$	640 ± 16	501 ± 75
Palmitate	452 ± 36	324 ± 58
TNF- $\alpha$ + Palmitate	381 ± 48	297 ± 24
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	492 ± 32	318 ± 20

## 1.5. Respiration mitochondriale et glycolyse

- Principe

La respiration mitochondriale et le flux glycolytique ont été évalués selon les taux de consommation d'O<sub>2</sub> (« oxygen consumption rate »; OCR) et d'acidification extracellulaire (« extracellular acidification rate »; ECAR), respectivement. Ces deux paramètres ont été mesurés grâce à la technologie du «Seahorse XF<sup>e</sup> 24 Extracellular Flux Analyzer» (Seahorse Bioscience) qui permet de mesurer simultanément plusieurs paramètres du métabolisme cellulaire en temps réel.

- Protocole

D'abord, les fibroblastes ont été cultivés dans des plaques transparentes de 24 puits (Seahorse Bioscience) avec une densité de 3,5x10<sup>4</sup> cellules par puits (n = 3 pour chaque condition) pendant 2h avant de recevoir les solutions de traitement. Après 24h d'exposition, chaque puits a été lavé avec 1 ml d'un milieu de culture sans bicarbonate de sodium, le XF DMEM (Tableau IX) et puis, remplacé par 675  $\mu$ l de ce même milieu. Ensuite, la plaque a été mise en incubation dans une atmosphère sans CO<sub>2</sub> pendant 1h afin de rétablir l'équilibre entre les cellules et le nouveau milieu.

**Tableau IX. Composition du milieu XF DMEM (pH 7,4).** Adapté de (Seahorse Bioscience Inc., 2013).

<b>Produits</b>	<b>Concentration finale</b>
DMEM(Sigma )	8,3 g/L
GlutaMax-1 (Gibco)	4 mM
Pyruvate de sodium (Sigma)	2 mM
Glucose (Sigma)	25 mM
NaCl (Sigma)	3,7 g/L
Rouge de phénol (Sigma)	0,03 g/L

En parallèle, la plaque de calibration «XF 24 Sensor Cartridge» a été hydratée durant la nuit avec 1 ml/puits de XF PBS (pH 7,4; Seahorse Bioscience) à 37°C dans une atmosphère sans CO<sub>2</sub>. Une fois l’algorithme ajusté dans le logiciel XF 24, le test a été initié selon le protocole décrit dans le tableau X. Une courbe dose-réponse pour le CCCP, allant de 0,9 µM à 1,2 µM, a été préalablement réalisée pour identifier la concentration capable d’induire une plus grande différence entre la capacité de consommation d’O<sub>2</sub> basale et maximale dans les fibroblastes.

**Tableau X. Protocole d'exécution utilisé dans le logiciel XF 24 pendant l'expérience.**

<b>Étapes</b>	<b>Temps d'exécution (minutes)</b>
Calibration	30
Mesure (3 reprises/puits)	20
Porte d'injection A : 75 µl d'oligomycine (0,5 µg/ml) (inhibiteur de l'ATP synthétase)	
Mesure (3 reprises/puits)	20
Porte d'injection B : 75 µl de CCCP (1,1 µM) (découpleur mitochondrial)	
Mesure (3 reprises/puits)	20
Porte d'injection C : 75 µl d'antimycine A (10 µM) (inhibiteur du complexe III de la CR)	
Mesure (3 reprises/puits)	20
Expérience complète	175*

\*Toutes les étapes (y compris les temps de mélange des solutions et d'attente des réactions)

## **1.6. Dosage des protéines**

- Principe

Les dosages de protéines, permettant la normalisation des données obtenues à partir des mesures OCR, ECAR et CRC, ont été mesurés avec le kit «Pierce BCA Protein Assay Kit» (Thermo Scientific). Ce dernier est composé d'un mélange de réactifs contenant 98% d'acide

bicinchonique (BCA) et de 2% de sulfate de cuivre. Dans cette méthode, l'ion cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  est réduit en  $\text{Cu}^+$  par les protéines en milieu alcalin. En conséquence, le cuivre réduit forme un complexe violet, mesurable en absorbance, lors de sa chélation avec deux molécules de BCA.

- Protocole

Des dilutions standards ont été d'abord préparées à partir d'une solution stock de la protéine BSA à 2 mg/ml pour les concentrations finales suivantes en mg/ml : 0; 0,25; 0,50; 0,75; et 1. Ensuite, 25  $\mu\text{l}$  des standards (n=3, chaque concentration) et des échantillons de cellules, préalablement lysées, ont été déposés dans une plaque transparente de 96 puits (Compagnie?). Après l'ajout de 200  $\mu\text{l}$  de la solution de réactifs BCA, la plaque a été mise en incubation pour 30 minutes à 37°C. Finalement, la lecture de l'absorbance a été réalisée à 565nm, en utilisant le spectrophotomètre Safire et le logiciel Magelan, version 7.2 (Tecan), et les concentrations de protéines des échantillons ont été calculées à partir de la courbe standard de BSA par une régression linéaire.

## 2. *Ex vivo*

### 2.1. Modèle expérimental

Les souris, HWT et HKO, utilisées dans notre étude ont été développées par le Consortium de l'acidose lactique. Les colonies des souris HKO ont été obtenues à partir des accouplements des souris LRPPRC KO conditionnelle. Il s'agit d'une génération de souris qui a été soumise à une ablation de la protéine LRPPRC au niveau du foie par le système de recombinaison Cre/lox. Dans ce processus, la recombinase Cre catalyse la recombinaison du gène LRPPRC entre deux séquences du « locus of X-over P1 » (loxP) à l'aide du promoteur spécifique albumine (gène exprimé exclusivement au foie). Une fois isolé par les sites loxP, le gène LRPPRC est supprimé du chromosome (Wachsman & Heidstra, 2010).

Finalement, les génotypes des souris ont été confirmés par des analyses de « *quantitative polymerase chain reaction* » (qPCR) avant d'être utilisées pour les expérimentations. Ainsi, les souris portant deux allèles LRPPRC ont été considérées HWT, tandis que celles dont LRPPRC est absent dans les 2 allèles ont été considérées HKO.

## 2.2. Immunohistochimie

- Principe

La caractérisation de la densité ou du nombre des cellules cérébrales des souris HWT et HKO âgés de 5 semaines, a été réalisée en microscopie à fluorescence. À cet effet, les immunomarqueurs 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), NeuN et la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) ont été utilisés pour détecter l'ADN, les neurones et les astrocytes, respectivement.

- Protocole

Premièrement, les cerveaux de souris HWT et HKO ont été fixés avec une solution de formaline 10% pendant 24h afin de préserver tous les composants cellulaires. Des coupes sagittales de 40 µm des régions du cortex, cervelet et tronc cérébral ont été réalisées à l'aide d'un vibratome.

Par la suite, les coupes ont été immergées dans 100 µl d'un tampon de blocage composé de PBS [NaCl (13,7 mM), KCl (0,27 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 mM), pH 7.4], Triton X-100 (0,5%) et sérum d'âne (10%, Sigma). Après 30 minutes de blocage, le tampon a été remplacé par la solution de blocage contenant les anticorps primaires NeuN (1:200, Sigma) ou GFAP (1:200, Dako). Suite à deux heures d'incubation, les coupes ont été lavées à 3 reprises avec un tampon de lavage de PBS et contenant 0.5% de Triton X-100 pendant 5 minutes. Ensuite, les coupes ont été incubées en présence des anticorps secondaires suivants, en fonction des anticorps primaires ciblés : α-souris IgG/DyLight 488 (1:500; Jackson Immuno) ou α-lapin

IgG/ DyLight 594 (1:500; Jackson Immuno). Après 30 minutes d'incubation dans la noirceur, les coupes ont été soumises à une nouvelle étape de lavage avant l'application du colorant nucléaire DAPI (10 µg/ml; Biotium) pendant 5 minutes. Toutes les étapes ont été réalisées à la température ambiante. Finalement, les coupes ont été placées et séchées sur les lames avant d'être recouvertes par le médium de montage [Mowiol (0,1 g/ml, Sigma), glycérol (25%) et diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO; 2,5%, Sigma)] et les lamelles.

Finalement, la prise d'images a été réalisée à l'aveugle à l'aide d'un microscope à fluorescence aux grossissements 10X, 20X et 40X, selon la région évaluée. Toutes les images ont été capturées en duplicata en respectant le même temps d'exposition.

### **2.3. Traitement et analyse des images**

Les images ont été traitées et analysées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health). Afin de mesurer le nombre de neurones (NeuN) et la population cellulaire totale (DAPI) dans les régions du cortex et tronc cérébral, les images ont été d'abord transformées en échelle de gris (16-bit), binarisées et segmentées, en utilisant la fonction «Watershed». Concernant la région du cervelet, la moyenne de 5 mesures sur une même image, en utilisant une surface rectangulaire standard (15 mm<sup>2</sup>), a été considérée pour déterminer les intensités de fluorescence de GFAP, DAPI et NeuN. La moyenne des intensités de fluorescence de GFAP a été également mesurée sur chaque image pour les régions du cortex et tronc cérébral. Toutes les images ont été soumises au même niveau de soustraction du bruit de fond et d'application de filtre.

## **3. Approche statistique**

Les résultats obtenus *in vitro*, visant la comparaison de la moyenne de trois groupes ou plus, ont été évalués par des analyses de la variance de type one-way et two-way ANOVA suivi de test «post-hoc» Bonferroni pour l'ajustement de l'erreur. Concernant les expériences *ex vivo*,

un test t de Student, bilatéral et non apparié, a été réalisé pour comparer les moyennes de chaque groupe de souris, soit HWT versus HKO.

Finalement, l'ensemble des données a été analysé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.05 et exprimé sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur type de la moyenne. Les valeurs de  $p \leq 0,05$  ont été considérées statistiquement significatives.

# Résultats

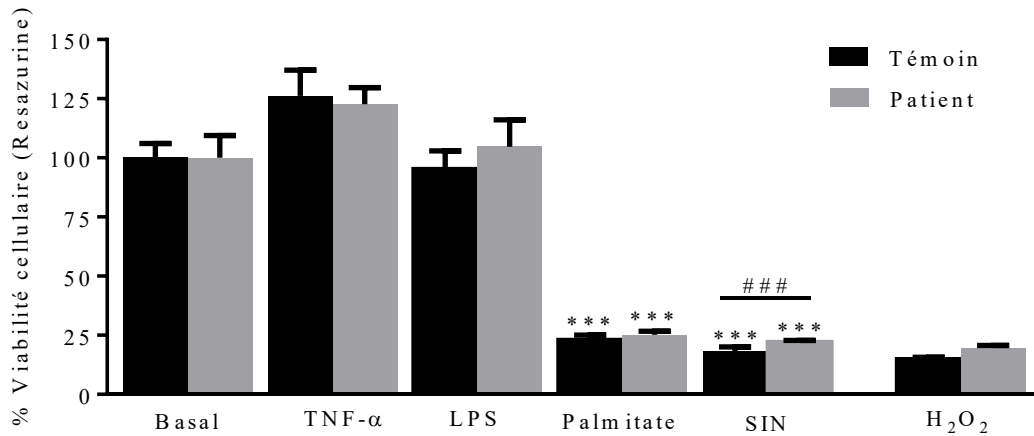
## 1. *In vitro*

### 1.1. Viabilité cellulaire

En premier lieu, étant donné qu'il a été rapporté que les crises d'acidose lactique peuvent être déclenchées suite à une infection (inflammation) et/ou à une surcharge nutritionnelle, la viabilité des fibroblastes issus d'un témoin et d'un patient LSFC a été mesurée par l'oxydation du sel de résazurine en spectrofluorométrie en présence de différents agents inducteurs de SIN durant 48h (Figure 17).

Parmi les conditions évaluées, aucun changement dans la viabilité cellulaire a été observé lors de l'exposition des fibroblastes au TNF- $\alpha$  seul, par rapport à la condition basale, que ce soit pour les témoins ( $126,2 \pm 4,4\%$ ;  $p > 0,05$ ) ou les patients ( $122,7 \pm 2,8\%$ ;  $p > 0,05$ ). De plus, aucun effet a été observé pour le LPS, et ce dans les 2 lignées : témoins ( $95,4 \pm 3,1\%$ ;  $p > 0,05$ ) et patients ( $104,7 \pm 4,6\%$ ;  $p > 0,05$ ). En contrepartie, le palmitate seul a diminué significativement ( $p < 0,001$ ) la viabilité des fibroblastes par rapport à la condition basale; chez les témoins, on observe une viabilité de  $23,2 \pm 0,8\%$  et chez les patients de  $25,1 \pm 0,6\%$ . Toujours par rapport à la condition basale, la combinaison avec le TNF- $\alpha$  a aussi diminué significativement ( $p < 0,001$ ) la viabilité des fibroblastes, à  $18,3 \pm 0,7\%$  et à  $22,4 \pm 0,2\%$ , pour les témoins et patients, respectivement. Finalement, une différence significative a été observée entre les fibroblastes témoins et patients uniquement lors de la co-incubation avec le TNF- $\alpha$  et le palmitate ( $p < 0,001$ ) (Figure 17).





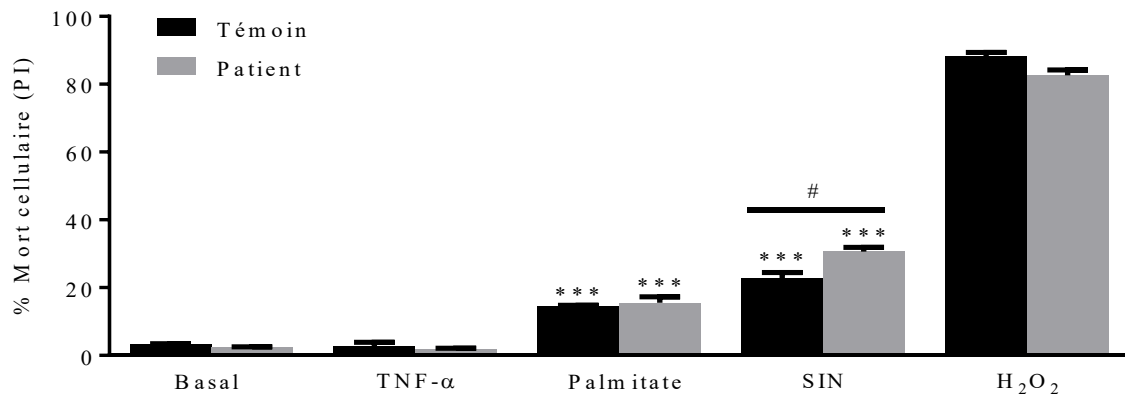
**Figure 17. Viabilité des fibroblastes 48h après l'exposition aux agents inducteurs de stress inflammatoire et/ou nutritionnel (SIN) en spectrofluorométrie.** Les valeurs en pourcentage, normalisées par rapport à la condition *Basal* de chaque lignée, représentent la moyenne ( $\pm$  SEM) d'une expérience réalisée avec un  $n=6$  par condition. Le  $H_2O_2$  a servi de contrôle pour la diminution de la viabilité cellulaire. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Basal; ###  $p < 0,001$  vs Témoin.

## 1.2. Mort cellulaire

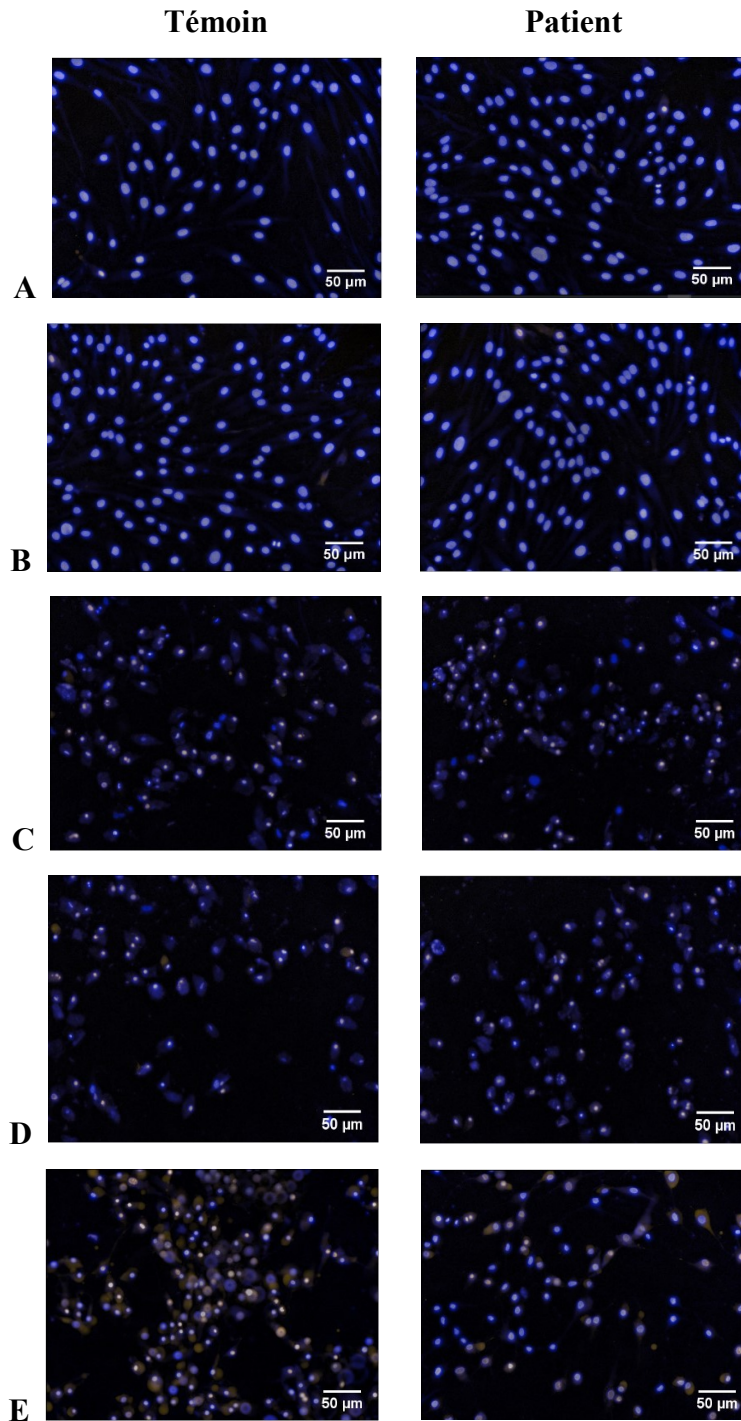
Afin de poursuivre notre investigation, nous avons utilisé une méthode de détection de la mort cellulaire ayant une plus grande sensibilité, la microscopie à fluorescence. Cette méthode nous a permis d'évaluer l'impact de l'exposition pendant 24h à un SIN sur la mort par nécrose des fibroblastes.

D'abord, les résultats démontrent que le SI induit par  $TNF-\alpha$  seul n'entraîne pas la nécrose des fibroblastes témoins ( $2,8 \pm 0,8\%$ ) et patients ( $1,9 \pm 0,1\%$ ), comparativement à la condition basale. Au contraire, par rapport à la condition basale, le palmitate seul a induit significativement ( $p < 0,001$ ) la mort des fibroblastes par nécrose. En fait, on observe une mort de  $14,6 \pm 0,1\%$  et de  $15,6 \pm 1,2\%$  chez les fibroblastes témoins et patients, respectivement. Également, la combinaison des deux types de stress, le SIN, a induit significativement ( $p < 0,001$ ) la mort des fibroblastes ( $22,8 \pm 1,2\%$  chez les témoins et  $30,7 \pm 0,8\%$  chez les patients,

comparativement à la condition basale). Enfin, une différence significative ( $p < 0,05$ ) dans la mort cellulaire a été observée entre les lignées lors de l'exposition au SIN seulement (Figure 18). Ces résultats peuvent être observés en images, où les cellules viables sont plus grandes, présentent un noyau intègre et coloré en bleu par Hoechst 33342, alors que les cellules plus petites et colorées en brun par PI sont nécrotiques (Figure 19).



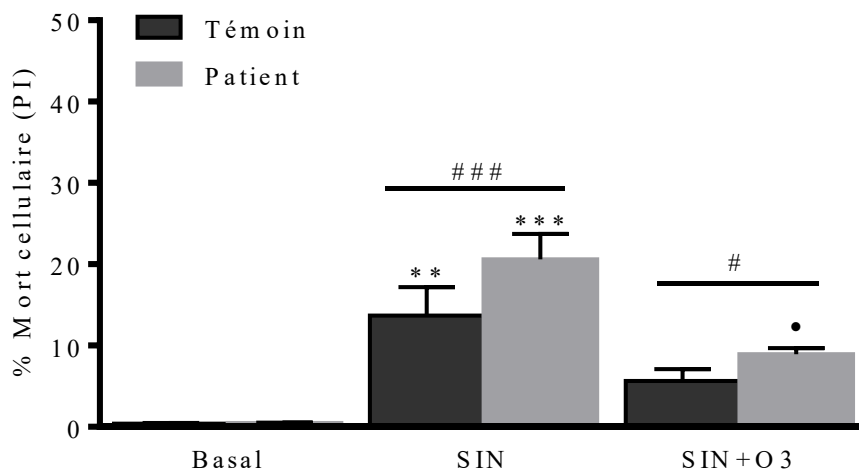
**Figure 18. Mort cellulaire par nécrose 24h après l'exposition aux agents inducteurs de stress inflammatoire et/ou nutritionnel (SIN) en microscopie à fluorescence.** Les valeurs en pourcentage représentent la moyenne ( $\pm$  SEM) de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Basal; #  $p < 0,05$  vs Témoin.



**Figure 19. Images représentatives des fibroblastes capturées par « Operetta High-Content Imaging System » en différentes conditions de stress inflammatoire et/ou nutritionnel (SIN). A) Basal; B) TNF- $\alpha$ ; C) Palmitate; D) SIN; E) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les cellules viables et nécrotiques**

ont un noyau coloré en bleu (Hoechst 33342) et en brun (PI), respectivement. Images observées au grossissement 20X, acquisition non-confocale et illumination épi-fluorescente.

Ensuite, nous avons investigué l'effet d'un prétraitement des fibroblastes avec les acides gras O3 sur la mort cellulaire, puisqu'il a été démontré que ceux-ci possèdent, entre autre, des propriétés anti-inflammatoires (Xue et al., 2012). Comparativement à la condition de SIN, nos résultats révèlent que les acides gras O3 ont diminué la nécrose de 41,3% et 43,4% des fibroblastes témoins et patients, respectivement. Néanmoins, cette prévention a été significative seulement chez les fibroblastes patients ( $p < 0,05$ ). Finalement, une différence significative ( $p < 0,05$ ) a été observée entre les lignées concernant la réponse au prétraitement avec les acides gras O3 en présence du SIN (Figure 20).



**Figure 20. Effet des acides gras oméga 3 (O3) sur la mort des fibroblastes 24h après l'exposition au stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) en microscopie à fluorescence.** Les valeurs en pourcentage représentent la moyenne ( $\pm$  SEM) de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs Basal; #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$  vs Témoin; •  $p < 0,05$  vs SIN.

### 1.3. Fonction mitochondriale

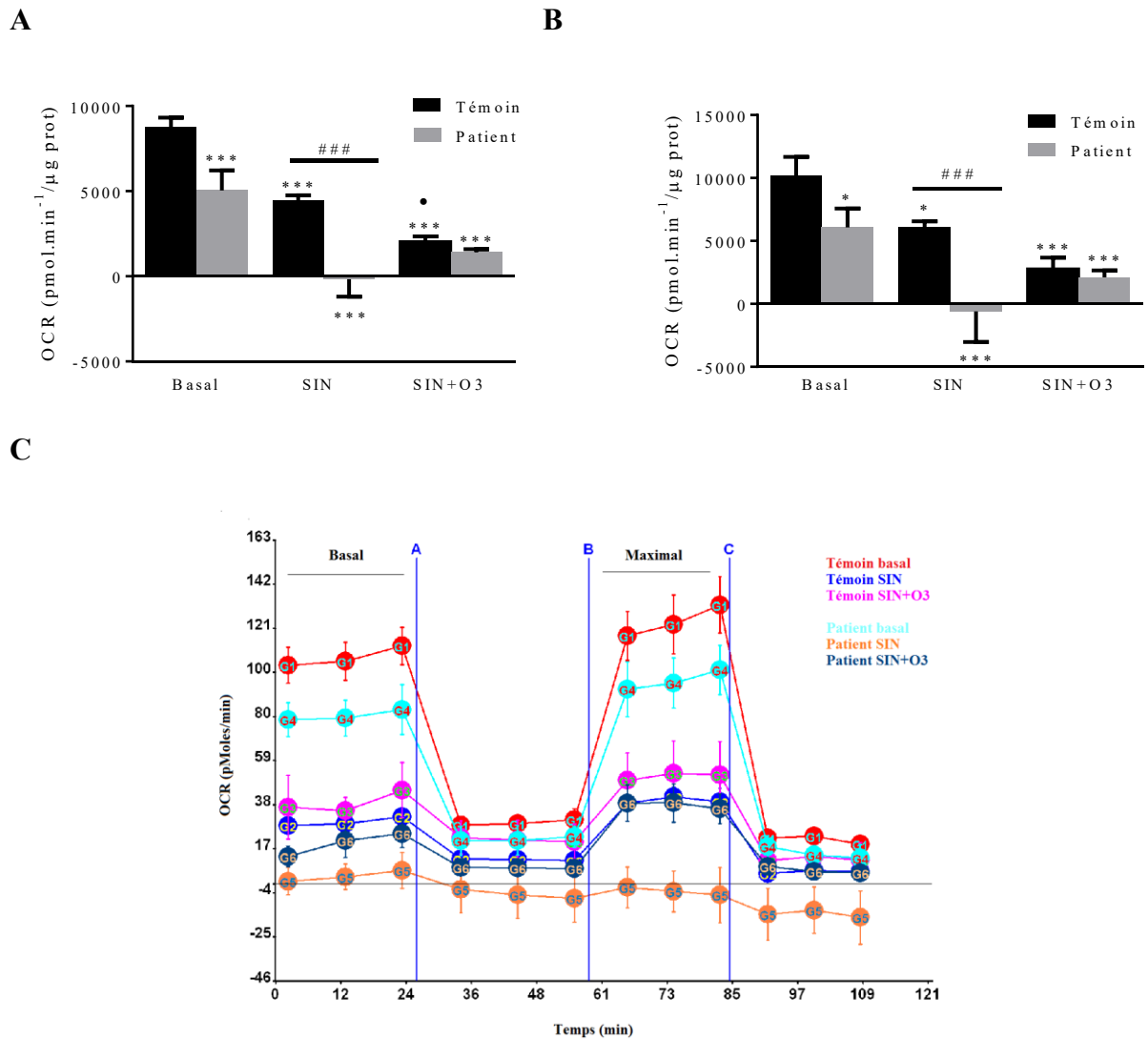
Dans le but d'évaluer les mécanismes de mort cellulaire en conditions de SIN, ainsi que le rôle des acides gras O3, nous avons caractérisé la fonction mitochondriale en évaluant les paramètres suivants : OCR; ECAR ou glycolyse;  $\Delta\Psi_m$ ; CRC; et production des ERO.

#### 1.3.1. Respiration mitochondriale et glycolyse

La respiration mitochondriale et la glycolyse des lignées cellulaires ont été évaluées à partir des mesures OCR et ECAR, respectivement, obtenues en temps réel par le système « Seahorse XF<sup>e</sup> 24 Extracellular Flux Analyzer ». Ces mesures ont été prélevées lors de deux conditions distinctes : basal (sans agents inhibiteurs de la CR) et maximal (en présence de CCCP). Les résultats ont été exprimés en « pmol.min<sup>-1</sup>/μg de protéines » pour l'OCR et en « (mPH/min)/μg de protéines » pour l'ECAR.

Concernant la respiration mitochondriale, les résultats révèlent d'abord que la mutation du gène LRPPRC présente dans les fibroblastes de patients, réduit significativement ( $p < 0,001$ ) sa capacité de consommation d'O<sub>2</sub> en conditions basales (Figure 21A). En effet, on observe un OCR plus faible chez les fibroblastes patients ( $5038,7 \pm 590,3$ ) que chez les témoins ( $8753,0 \pm 328,9$ ). En conséquence, une plus grande susceptibilité aux effets néfastes d'un SIN sur la respiration mitochondriale a été observée chez les fibroblastes patients comparativement aux fibroblastes témoins ( $p < 0,001$ ). En fait, par rapport la condition basale, le SIN a réduit significativement ( $p < 0,001$ ) la consommation d'O<sub>2</sub> des fibroblastes; on observe un OCR de  $4468,5 \pm 166,1$  et de  $-170,3 \pm 593,7$  chez les témoins et les patients, respectivement. Enfin, les acides gras O3 n'ont pas prévenu la détérioration de la respiration mitochondriale des fibroblastes témoins et patients induite par le SIN. Dans ce contexte, par rapport à la condition basale, les fibroblastes témoins et patients ont présenté des faibles OCR de  $2039,4 \pm 179,3$  et  $1400,4 \pm 140,0$ , respectivement. Au contraire, une aggravation dans la capacité de consommation d'O<sub>2</sub> a été observée seulement chez les fibroblastes témoins ( $p < 0,05$ ).

Également, la capacité de consommation d'O<sub>2</sub> des fibroblastes patients est significativement ( $p < 0,05$ ) réduite dans un contexte de découplage de la respiration mitochondriale induite par le CCCP (Figure 21B). Ainsi, les fibroblastes des patients présentent un OCR maximal plus faible ( $6075,0 \pm 750,1$ ) que celui des fibroblastes des témoins ( $10195,0 \pm 851,2$ ) en conditions basales. De même, les fibroblastes des patients ont démontré une plus grande susceptibilité au SIN ( $p < 0,001$ ), présentant un OCR maximal de  $587,0 \pm 1216,0$  comparativement à celui des fibroblastes des témoins de  $6081,0 \pm 276,4$ . Finalement, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) a été observée dans les OCR maximaux des fibroblastes soumis au prétraitement avec les acides gras O3. En effet, les acides gras O3 n'ont pas prévenu la détérioration de la capacité de consommation d'O<sub>2</sub> maximale induite par le SIN : témoins ( $2785,0 \pm 513,9$ ) et patients ( $2101,0 \pm 320,9$ ). La respiration mitochondriale (OCR basal et maximal) des fibroblastes témoins et patients, dans les différentes conditions étudiées, est illustrée dans la figure 21C.

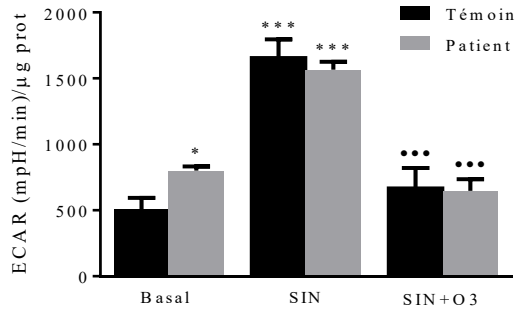
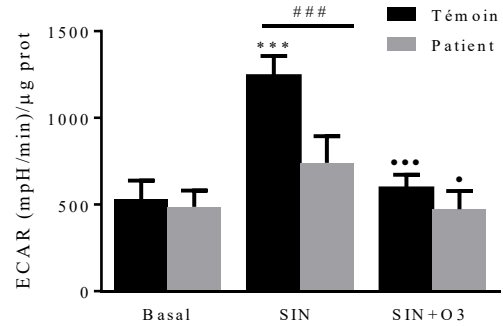
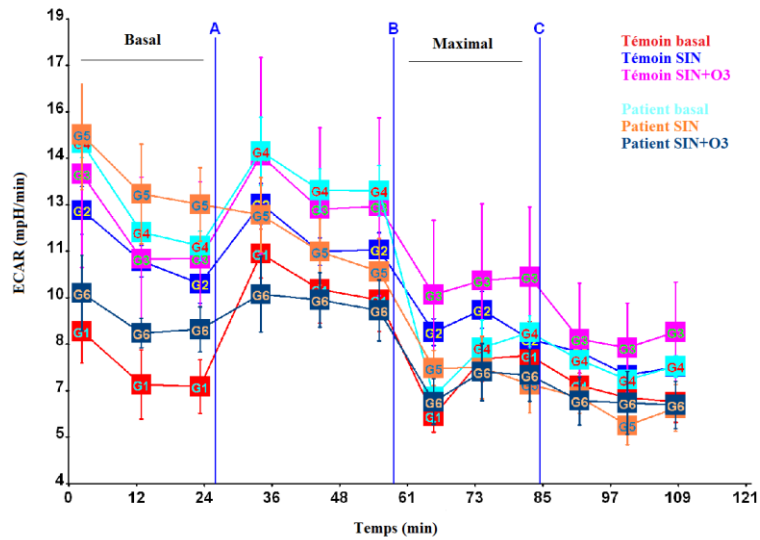


**Figure 21.** Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur les taux de consommation d'O<sub>2</sub> « OCR » basal (A) et maximal (B) dans les mitochondries des fibroblastes. Tracé représentatif généré par Seahorse XFe (C). Portes d'injection : **A** (oligomycine), **B** (CCCP) et **C** (antimycine A). Les valeurs représentent la moyenne (±SEM) d'une expérience réalisée avec un n=4 par condition. \* p<0,05, \*\*\* p<0,001 vs Basal; ### p<0,001 vs Témoin; • p<0,05 vs SIN.

En parallèle, les données révèlent que la mutation du gène LRPPRC augmente significativement ( $p < 0,05$ ) le déclenchement de la glycolyse chez les fibroblastes patients en conditions basales (Figure 22A). Ainsi, on observe un ECAR plus élevé chez les fibroblastes patients ( $800,5 \pm 15,7$ ) comparativement aux témoins ( $506,0 \pm 50,6$ ). De plus, une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du ECAR induite par le SIN a été observée chez les fibroblastes témoins ( $1658,0 \pm 79,8$ ) et patients ( $1566,0 \pm 34,0$ ). Par contre, aucune différence significative a été démontrée entre les lignées en réponse au SIN ( $p > 0,05$ ). Finalement, les acides gras O3 ont prévenu significativement ( $p < 0,001$ ) le déclenchement de la glycolyse par les fibroblastes en conditions de SIN, présentant des ECAR de  $671,5 \pm 86,1$  chez les témoins et de  $647,7 \pm 44,0$  chez les patients.

En présence de CCCP, aucune différence significative a été observée dans le déclenchement de la glycolyse en conditions basales ( $p > 0,05$ ) (Figure 22B). Ainsi, les fibroblastes témoins et patients ont présenté des ECAR maximaux comparables de  $531,3 \pm 53,7$  et de  $486,6 \pm 47,1$ , respectivement. En outre, une différence significative ( $p < 0,001$ ) dans les ECAR a été observée entre les lignées en conditions de SIN et de découplage de la respiration mitochondriale. Dans ce contexte, les résultats révèlent une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du ECAR des fibroblastes témoins ( $1244,0 \pm 56,4$ ), comparativement à celui des fibroblastes patients ( $740,6 \pm 76,6$ ), lesquels ne semblent pas avoir été en mesure de s'adapter au stress. Finalement, les acides gras O3 ont prévenu significativement ( $p < 0,001$ ) la glycolyse des fibroblastes témoins face au SIN. Aussi, les acides gras O3 ont diminué légèrement ( $p < 0,05$ ) l'ECAR des fibroblastes patients par rapport à la condition de SIN seule. Ainsi, on observe des ECAR de  $596,9 \pm 43,1$  chez les témoins et de  $472,6 \pm 52,5$  chez les patients. Les changements dans les ECAR basal et maximal des fibroblastes, dans différentes conditions, sont illustrés à la figure 22C.

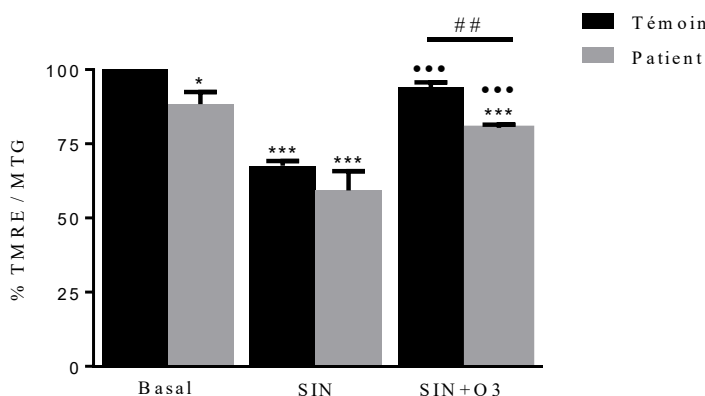


**A****B****C**

**Figure 22. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur les taux d'acidification extracellulaire « ECAR » basal (A) et maximal (B) des mitochondries des fibroblastes.** Tracé représentatif généré par Seahorse XFe (C). Portes d'injection : **A** (oligomycine), **B** (CCCP) et **C** (antimycine A). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$ SEM) d'une expérience réalisée avec un n=4 par condition. \* p<0,05, \*\*\* p<0,001 vs Basal; ### p<0,001 vs Témoin; • p<0,05, ••• p<0,001 vs SIN.

### 1.3.2. Potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Dans notre étude, le ratio TMRE/MTG a été utilisé afin d'évaluer l'impact du SIN sur le  $\Delta\Psi_m$ . En conditions basales, les résultats démontrent que la mutation du gène LRPPRC réduit significativement ( $p < 0,05$ ) le  $\Delta\Psi_m$  des fibroblastes patients ( $88,3 \pm 2,4\%$ ) comparativement à celui de fibroblastes témoins ( $100,0 \pm 10,8\%$ ). Lorsque les fibroblastes sont exposés au SIN, une diminution significative ( $p < 0,001$ ) a été observée dans le  $\Delta\Psi_m$  des fibroblastes témoins ( $67,7 \pm 0,9\%$ ) et patients ( $59,3 \pm 3,7\%$ ). Dans ce cas, aucune différence significative a été observée entre les lignées. Finalement, le prétraitement des fibroblastes avec les acides gras O3 a prévenu significativement les effets néfastes du SIN sur le  $\Delta\Psi_m$ . En effet, on observe que les taux sont retournés à la normale : témoins ( $94,0 \pm 1,0\%$ ) et patients ( $80,3 \pm 0,7\%$ ). Une différence significative ( $p < 0,01$ ) a été observée entre les lignées dans la façon de répondre au prétraitement avec les acides gras O3 (Figure 23).



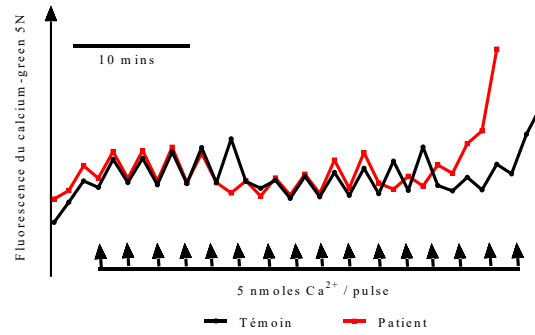
**Figure 23. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).** Les valeurs en pourcentage, normalisées par rapport à la condition *Basal* de chaque lignée, représentent la moyenne ( $\pm$  SEM) de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs Basal; ##  $p < 0,01$  vs Témoin; \*\*\*  $p < 0,001$  vs SIN.

### 1.3.3. Capacité de rétention calcique (CRC)

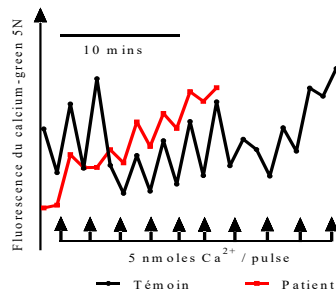
Afin d'investiguer l'impact du SIN sur la CRC des fibroblastes, des expériences ont été réalisées en présence de calcium-green 5N pour évaluer les changements dans la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire en temps réel. Les résultats ont été exprimés en « nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de protéines ».

D'abord, en conditions basales, nos résultats révèlent que la présence de la mutation du gène LRPPRC réduit significativement ( $p < 0,01$ ) la CRC des fibroblastes patients ( $72502 \pm 4200$ ) par rapport aux fibroblastes témoins ( $100947 \pm 10339$ ). Cette condition a rendu les fibroblastes patients plus susceptibles au SIN que les témoins ( $p < 0,05$ ). En fait, le SIN a diminué significativement ( $p < 0,001$ ) la CRC des 2 lignées cellulaires : témoins ( $57907 \pm 5410$ ) et patients ( $40583 \pm 4516$ ). Finalement, le prétraitement des fibroblastes avec les acides gras O3 ne prévient pas l'ouverture précoce de PTP induite par le SIN. Au contraire, une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la CRC des fibroblastes témoins ( $29301 \pm 2098$ ) et patients ( $27218 \pm 2049$ ) a été notée en présence des acides gras O3. Cet effet, par rapport à la condition de SIN seul, a été plus prononcé chez les fibroblastes témoins ( $p < 0,01$ ) que chez les fibroblastes patients ( $p > 0,05$ ) (Figure 24D). Ces résultats sont illustrés, en pics de  $\text{Ca}^{2+}$ , à la figure 24.

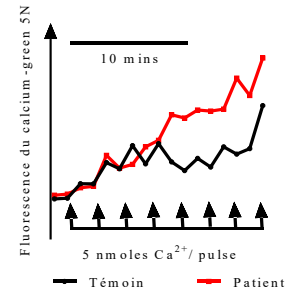
A



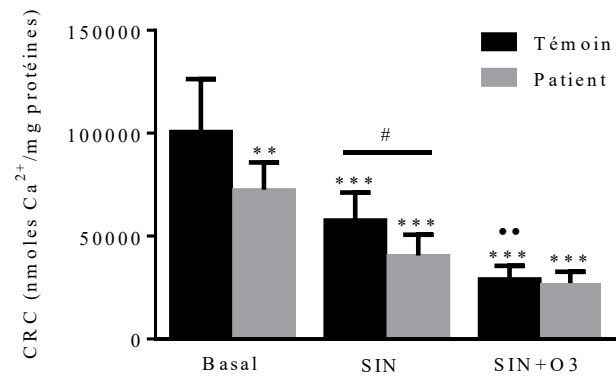
B



C



D



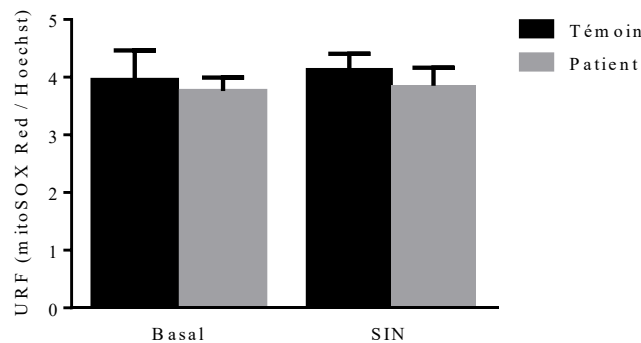
**Figure 24. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur la capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries.** Tracé représentatif en pics de Ca<sup>2+</sup> : Basal (A), SIN (B) et SIN+O3 (C) CRC (D). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$ SEM) des expériences suivantes : Témoin [Basal (n = 6); SIN (n = 6); SIN+O3 (n = 9)] et Patient [Basal (n = 10); SIN (n = 5);

SIN+O3 (n = 7)]. \*\* p<0,01 vs Témoin Basal; \*\*\* p<0,001 vs Basal; # p<0,05 vs Témoin; •• p<0,01 vs SIN.

#### 1.3.4. Espèces réactives oxygénées (ERO)

Afin de déterminer si le SIN induit un stress oxydant dans les fibroblastes témoins et patients, des expériences en présence de mitoSOX Red ont été réalisées. Les résultats ont été exprimés en unités relatives de fluorescence (URF).

En conditions basales, aucune différence significative (p>0,05) a été démontrée dans la production des ERO des fibroblastes témoins (3,9±0,3) et patients (3,8±0,1). Également, aucun changement significatif (p>0,05) a été observé dans la production des ERO par les fibroblastes témoins (4,1±0,2) et patients (3,8±0,2) en conditions de SIN (Figure 25). En conséquence, les expériences avec les acides gras O3 n'ont pas été poursuivies pour ce paramètre.



**Figure 25. Effet du stress inflammatoire et nutritionnel (SIN) sur la production des ERO par les mitochondries.** Les valeurs représentent la moyenne (±SEM) de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

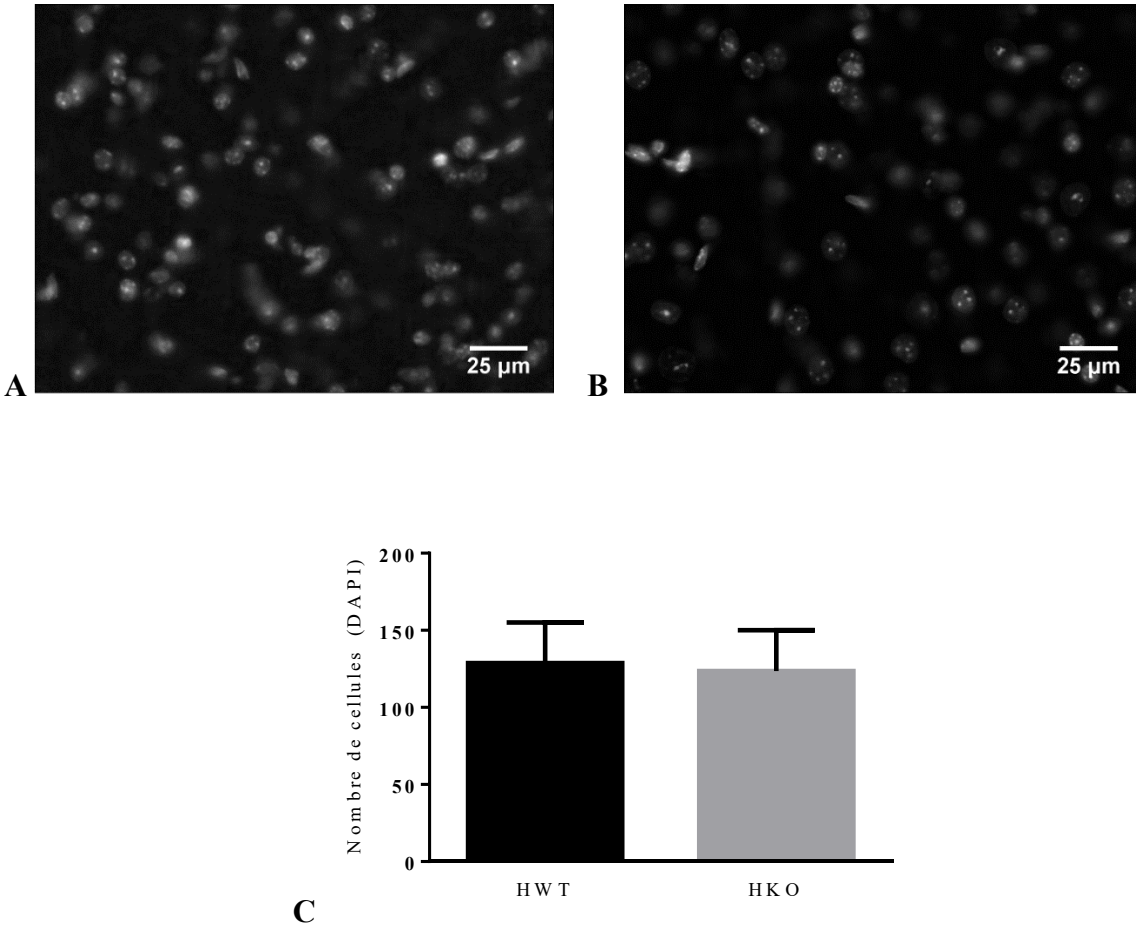
## **2. *Ex vivo***

### **2.1. Caractérisation morphologique cérébrale**

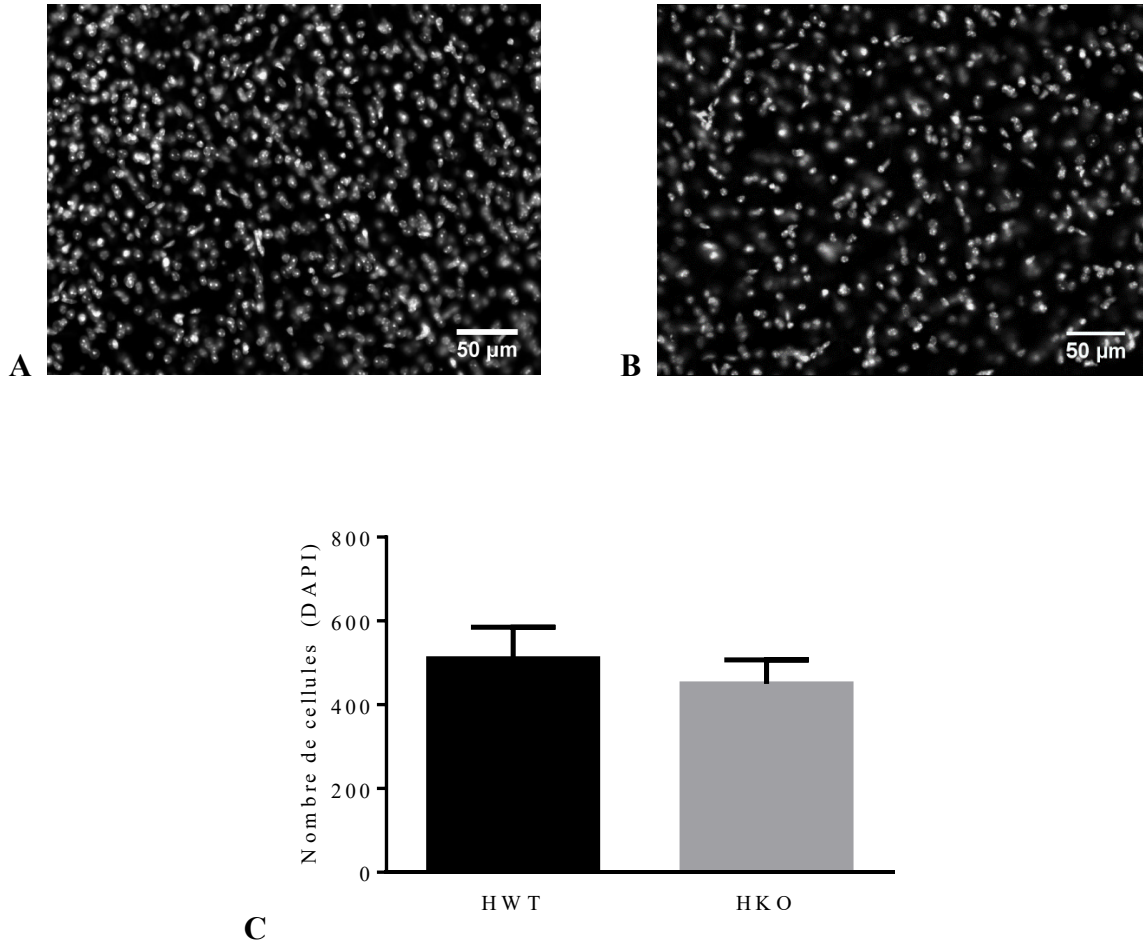
Afin de caractériser l'impact de la délétion hépatique du gène LRPPRC dans les cerveaux des souris HKO, nous avons analysé en immunohistochimie des échantillons issus des régions du cortex frontal, du tronc cérébral et du cervelet. À cet effet, nous avons utilisé le marqueur nucléaire de fluorescence DAPI pour détecter la population cellulaire globale présente dans les échantillons. Également, nous avons utilisé les anticorps primaires NeuN et GFAP pour détecter le nombre de neurones et d'astrocytes, respectivement. Les souris HWT ont été utilisées comme témoin.

#### **2.1.1. Population cellulaire globale**

Dans l'ensemble des régions évaluées, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) a été observée dans la population cellulaire globale des souris HKO et HWT. Ainsi, on observe dans les coupes du cortex frontal une population moyenne de  $129 \pm 11$  cellules chez les souris HWT et de  $123 \pm 11$  cellules chez les souris HKO (Figure 26). Concernant les coupes du tronc cérébral, les souris HWT ont présenté une population moyenne de  $510 \pm 31$  cellules comparativement à celle des souris HKO de  $450 \pm 23$  cellules (Figure 27). Finalement, on observe, dans les coupes du cervelet, des valeurs moyennes d'intensité de fluorescence, en URF, de  $49,2 \pm 4,6$  et de  $33,9 \pm 6,1$  chez les souris HWT et HKO, respectivement (Figure 28).

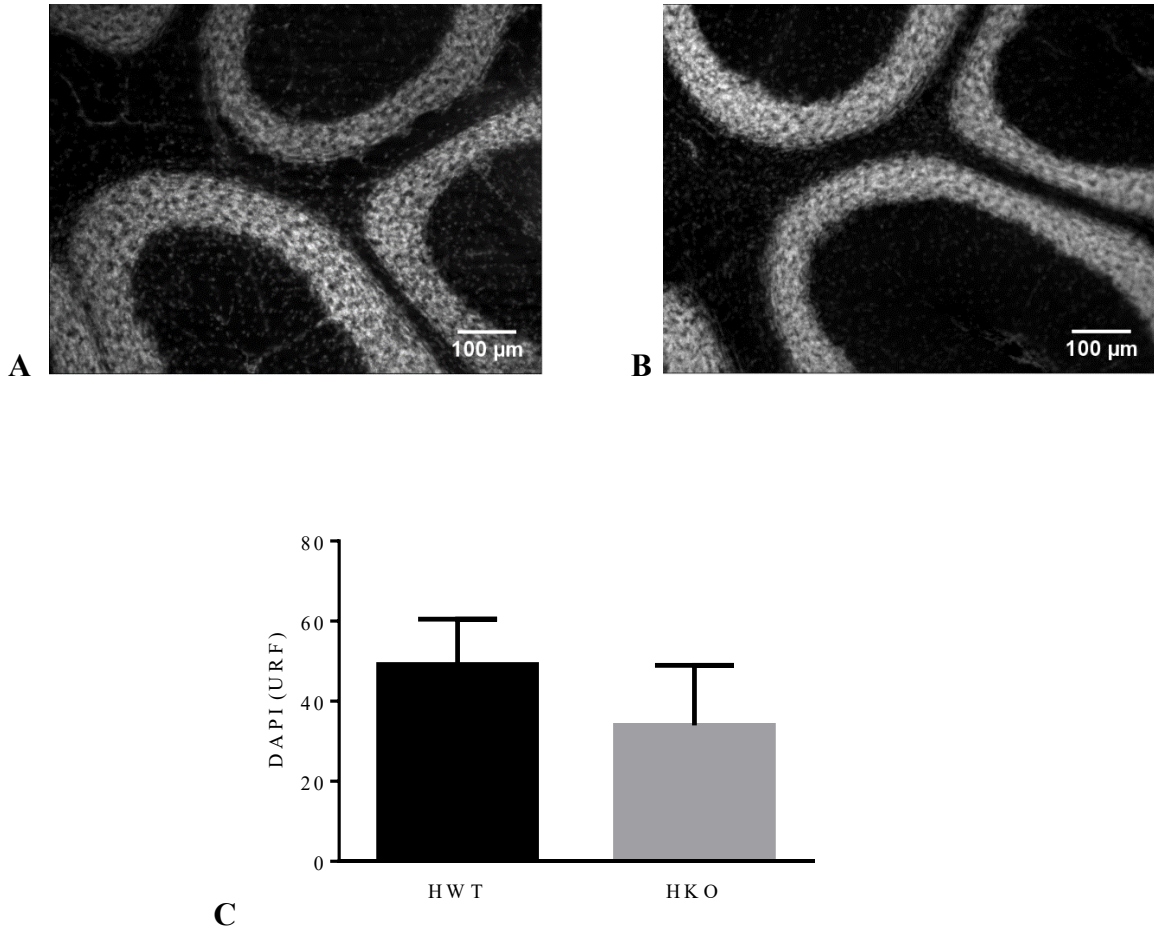


**Figure 26. Population cellulaire globale évaluée par DAPI dans le cortex frontal des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage DAPI : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Nombre de cellules marquées par DAPI (n=6). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 40X.



**Figure 27. Population cellulaire globale évaluée par DAPI dans le tronc cérébral des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage DAPI : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Nombre de cellules marquées par DAPI (n=6). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 20X.

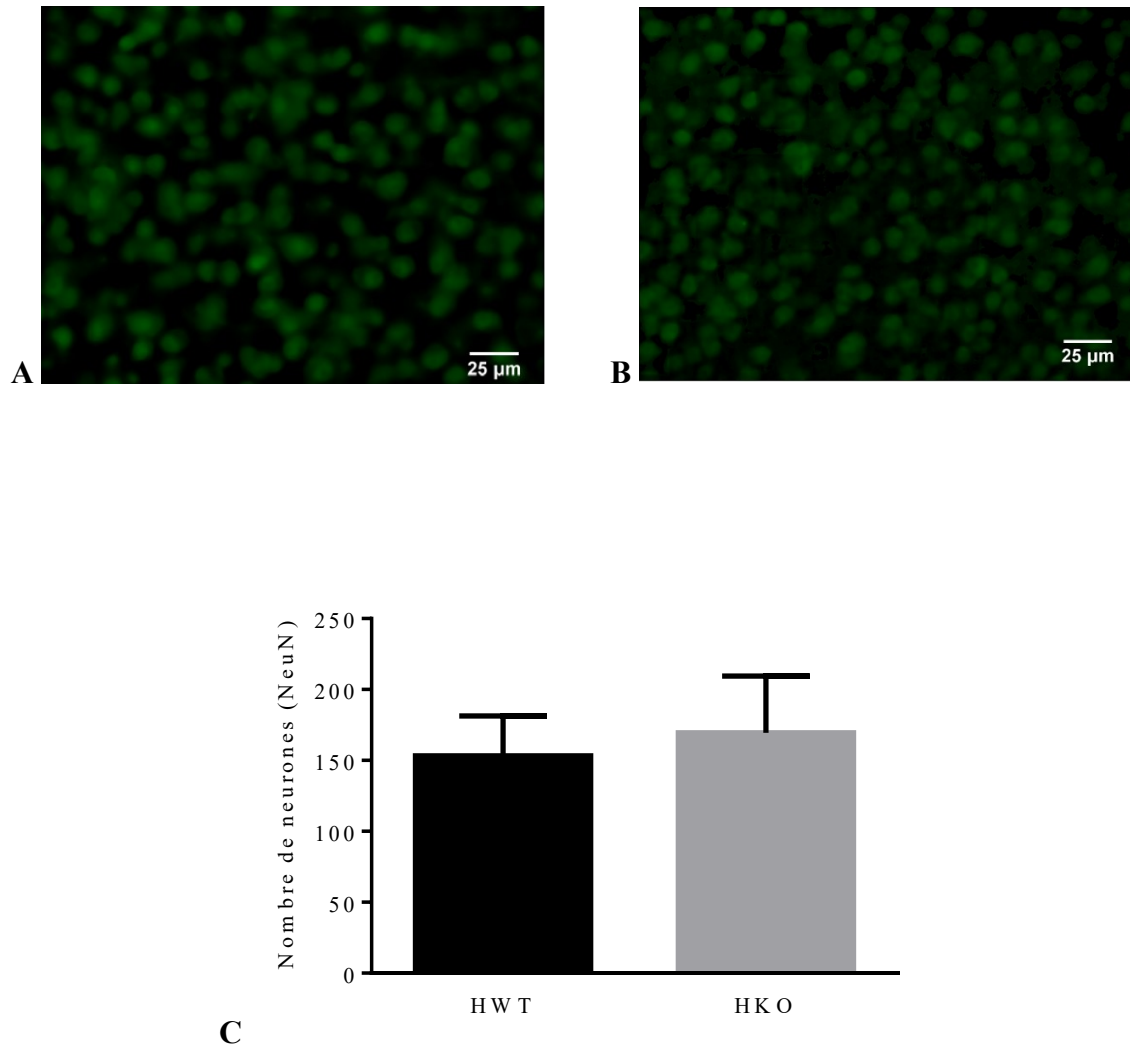




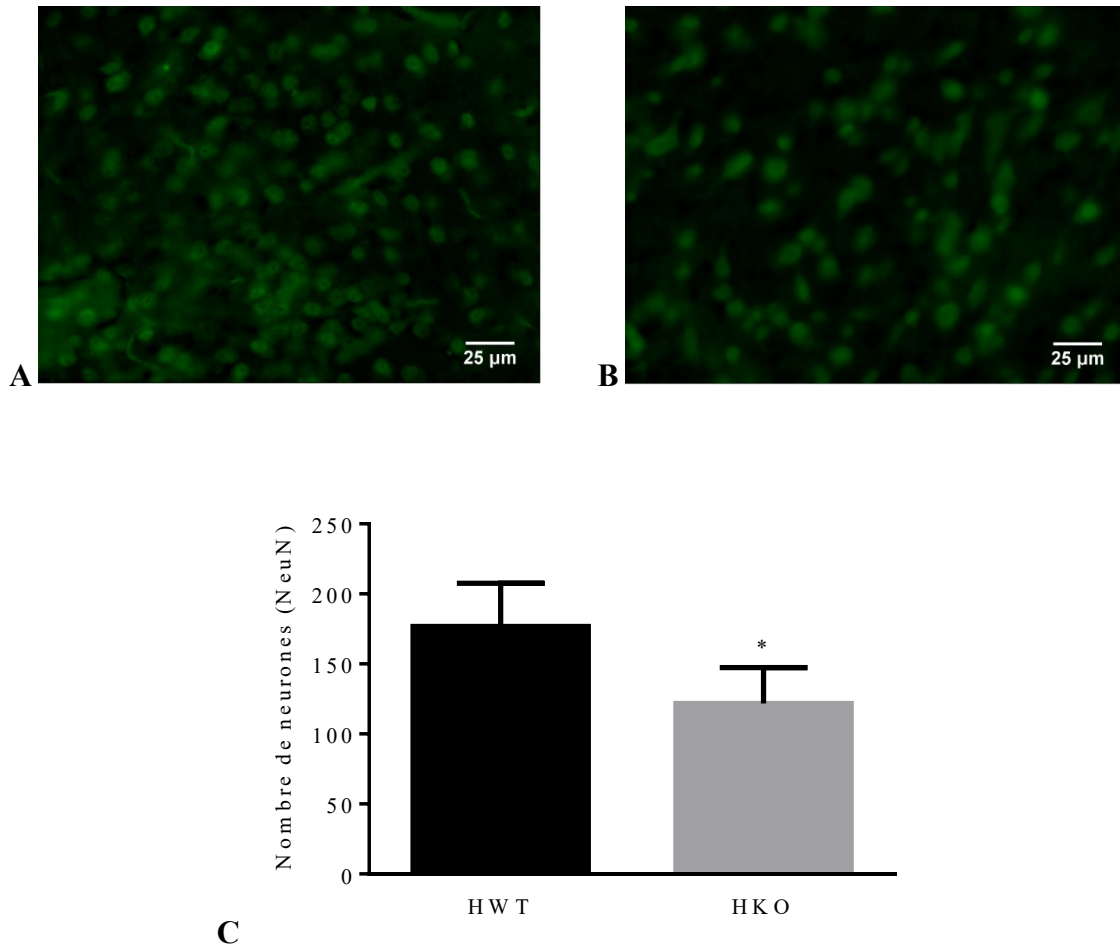
**Figure 28. Population cellulaire globale évaluée par DAPI dans le cervelet des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage DAPI : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Intensités relatives de la fluorescence émise par DAPI (n=6). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 10X.

### 2.1.2. Population neuronale

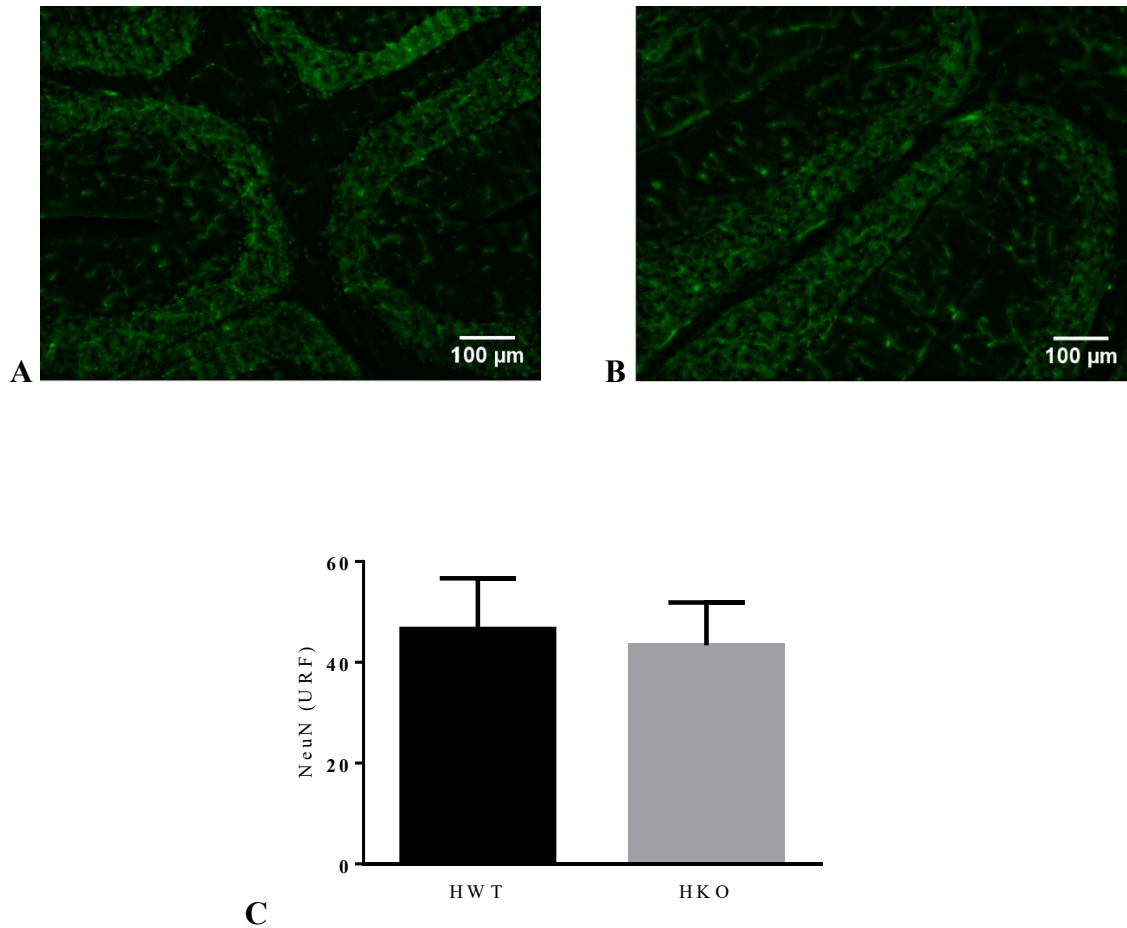
Concernant la population de neurones dans les échantillons, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) a été observée dans le marquage par NeuN au niveau du cortex frontal; chez les souris HWT, on observe une population neuronale de  $153 \pm 11$  et chez les souris HKO de  $169 \pm 18$  (Figure 29). En contrepartie, l'inactivation hépato-spécifique de LRPPRC réduit significativement ( $p < 0,05$ ) la population neuronale dans le tronc cérébral. En effet, on observe dans cette région une population moyenne de  $177 \pm 14$  neurones chez les souris HWT et de  $122 \pm 11$  neurones chez les souris HKO (Figure 30). Finalement, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) a été trouvée dans la région du cervelet par rapport aux valeurs moyennes d'intensité de NeuN, en pixels : HWT ( $46,6 \pm 4,1$ ) et HKO ( $43,4 \pm 3,8$ ) (Figure 31).



**Figure 29. Population neuronale évaluée par NeuN dans le cortex frontal des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage NeuN : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Nombre de neurones marqués par NeuN : HWT (n=6) et HKO (n=5). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 40X.



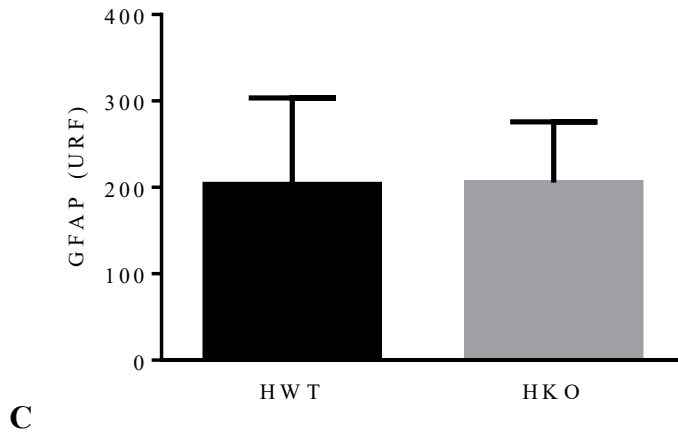
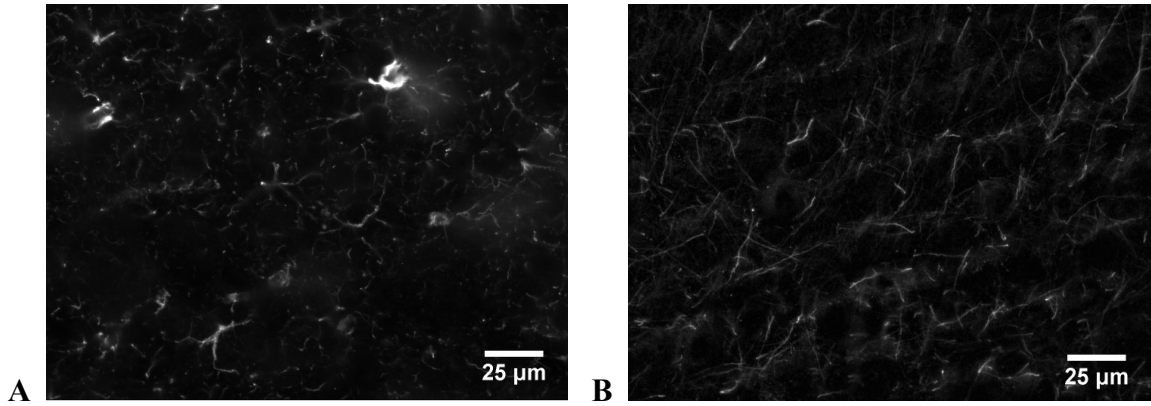
**Figure 30. Population neuronale évaluée par NeuN dans le tronc cérébral des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage NeuN : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Nombre de neurones marqués par NeuN (n=5). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 40X. \*  $p < 0,05$ .



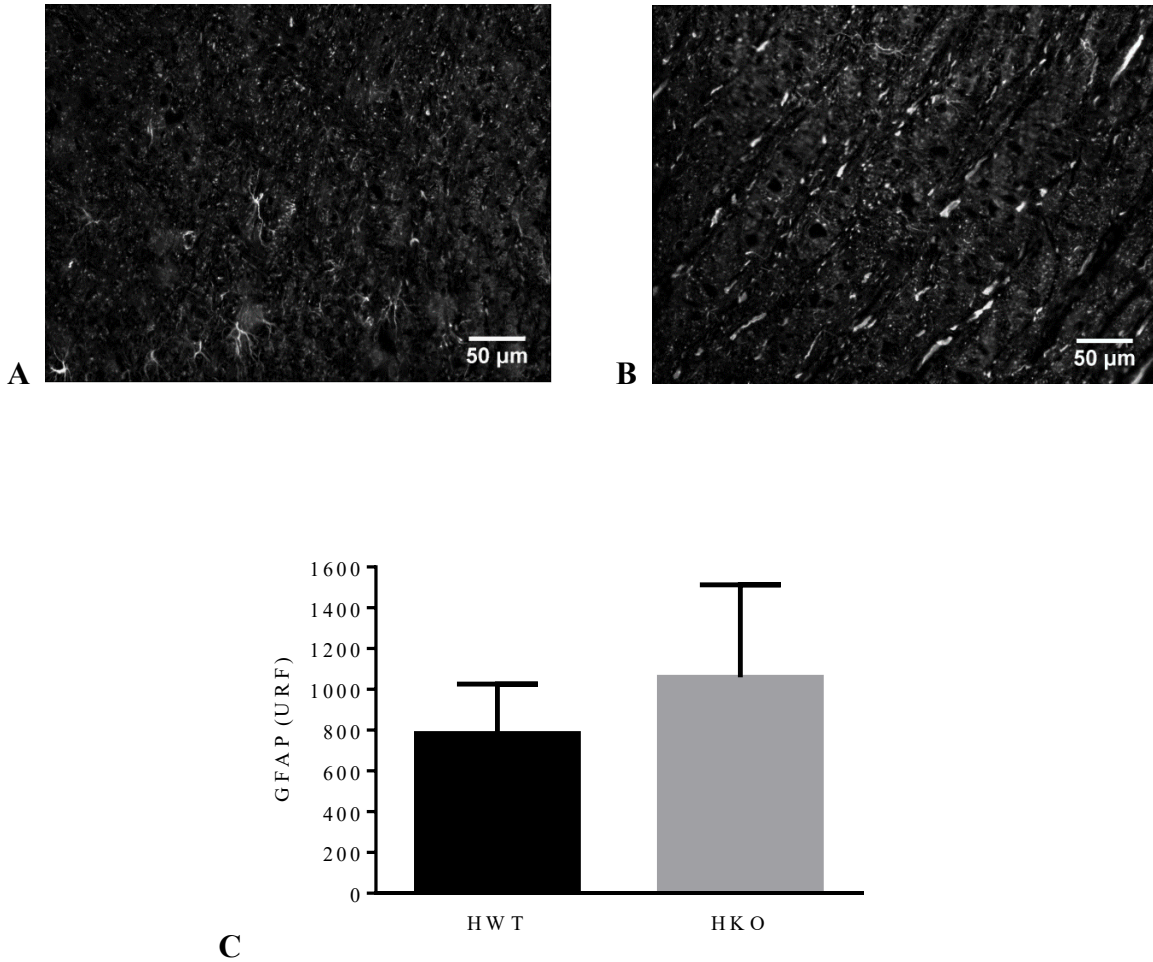
**Figure 31. Population neuronale évaluée par NeuN dans le cervelet des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage NeuN : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Intensités relatives de la fluorescence émise par NeuN : HWT (n=6) et HKO (n=5). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 10X.

### **2.1.3. Population astrocytaire**

En ce qui concerne la population astrocytaire, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) a été trouvée dans les intensités moyennes de GFAP dans toutes les régions évaluées. Ainsi, on observe, dans la région du cortex frontal, une intensité moyenne de  $203,4 \pm 40,8$  chez les souris HWT et de  $205,6 \pm 28,7$  chez les souris HKO (Figure 32). Au niveau du tronc cérébral, ces intensités correspondent à  $783,9 \pm 99,1$  chez les HWT et à  $1060 \pm 202,7$  chez les HKO (Figure 33). Finalement, les souris HWT et HKO ont respectivement présenté des intensités moyennes de  $704,9 \pm 64,2$  et de  $740,9 \pm 122,3$  dans la région du cervelet (Figure 34).

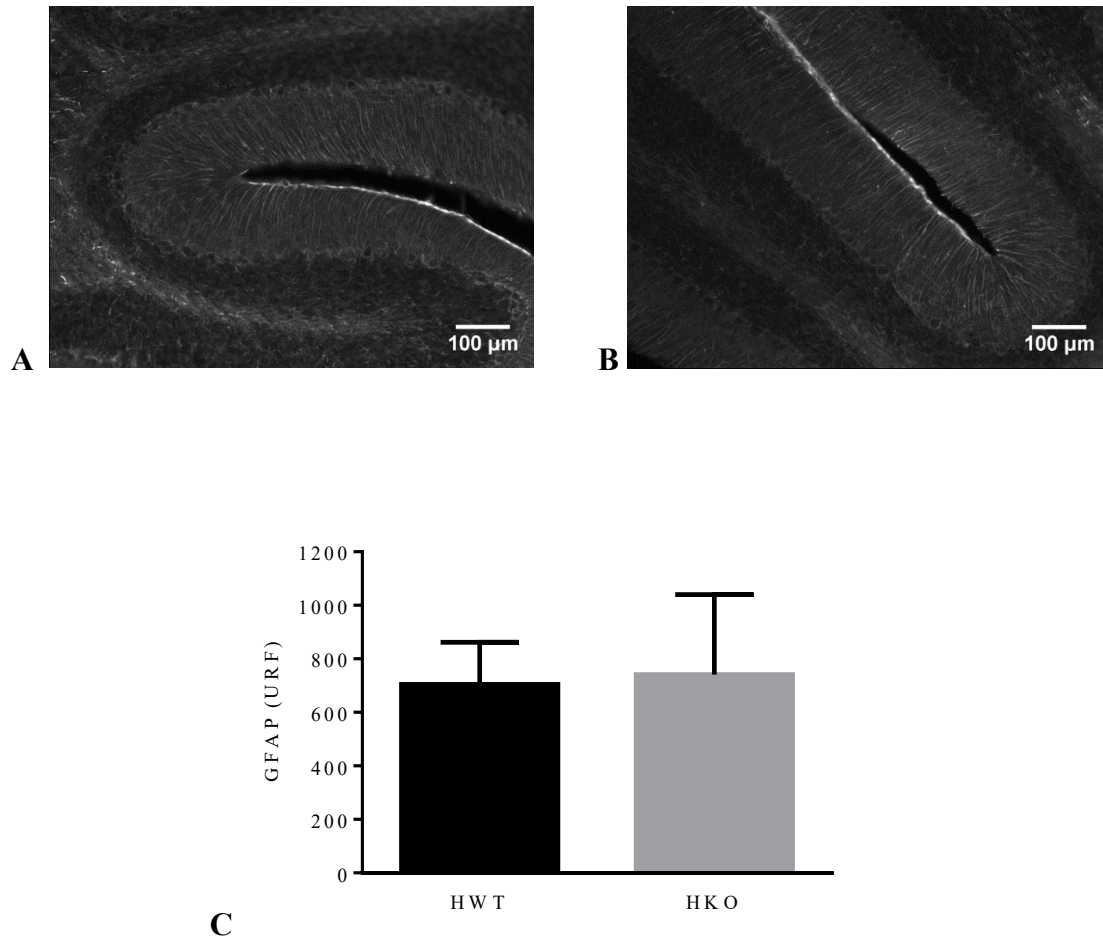


**Figure 32. Population astrocytaire évaluée par GFAP dans le cortex frontal des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage GFAP : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Intensités relatives de la fluorescence émise par GFAP (n=6). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 40X.



**Figure 33. Population astrocytaire évaluée par GFAP dans le tronc cérébral des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage GFAP : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Intensités relatives de la fluorescence émise par GFAP : HWT (n=6) et HKO (n=5). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM). Images observées au grossissement 20X.





**Figure 34. Population astrocytaire évaluée par GFAP dans le cervelet des souris déficientes en LRPPRC hépatique (HKO).** Image représentative d'un marquage GFAP : **A)** souris HWT; **B)** souris HKO; et **C)** Intensités relatives de la fluorescence émise par GFAP (n=6). Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  SEM) des intensités. Images observées au grossissement 10X.

## Discussion

De façon générale, notre étude a été la première à examiner les effets de la combinaison des principaux facteurs déclencheurs de crises acidotiques sur la mort cellulaire et la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC en plus d'explorer le lien entre le cerveau et le foie chez la souris dont le gène LRPPRC hépatique est absent.

Spécifiquement, notre recherche a permis de caractériser *in vitro* l'impact d'un SIN sur la mort cellulaire ainsi que sur la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC. À cet effet, nous avons montré que les fibroblastes LSFC sont plus susceptibles à ce type de stress, présentant des taux de nécrose plus élevés que les témoins. De plus, le SIN a aggravé certains paramètres de la fonction mitochondriale, tels que la consommation d'O<sub>2</sub>, le  $\Delta\Psi_m$  et la CRC. Également, nous avons démontré que le prétraitement des fibroblastes avec les acides gras O<sub>3</sub>, l'EPA et le DHA, a prévenu la mort cellulaire et la perte du  $\Delta\Psi_m$  induites par le SIN. Notre étude a également rendu possible la caractérisation partielle *ex vivo* de l'impact de la mutation du gène LRPPRC spécifiquement au niveau du foie sur la morphologie cérébrale des souris HKO. Ainsi, nous avons trouvé que la délétion de LRPPRC hépatique a réduit la population neuronale dans la région du tronc cérébral.

### 1. L'effet de la mutation du gène LRPPRC sur la fonction mitochondriale des fibroblastes

Le gène LRPPRC est impliqué, entre autres, dans l'assemblage du complexe IV (COX) de la CR (Mourier et al., 2014; Ruzzenente et al., 2012). Il est connu qu'une telle mutation entraîne une réduction d'environ 50% de l'activité de COX chez les fibroblastes LSFC (Merante et al., 1993). Également, il est établi qu'un dysfonctionnement dans la CR entraîne des conséquences néfastes sur la production d'énergie (Saneto & Sedensky, 2013). Ainsi, nous avons évalué l'impact de la mutation de LRPPRC sur certains aspects de la fonction mitochondriale des fibroblastes.

En ce qui concerne le processus de respiration cellulaire, nous avons trouvé que la mutation du gène LRPPRC diminue la capacité de consommation d'O<sub>2</sub> des fibroblastes, présentant des OCR plus faibles que pour les témoins. En effet, l'OCR reflète la capacité des mitochondries à consommer l'O<sub>2</sub> pendant l'activité de la CR (Seahorse Bioscience Inc., 2013). En plus, la respiration mitochondriale est une étape essentielle à la production d'énergie via OXPHOS et elle se produit exclusivement en conditions aérobiques (Da Poin et al., 2010).

En contrepartie, nos résultats ont révélé que les fibroblastes LSFC présentent des ECAR augmentés. Ce dernier est une mesure indirecte de la glycolyse par la quantification de H<sup>+</sup> générés durant la conversion du pyruvate en lactate (Seahorse Bioscience Inc., 2013). D'abord, nos résultats suggèrent que les fibroblastes LSFC ont naturellement tendance à déclencher la voie glycolytique pour compenser le défaut mitochondrial. Ensuite, notre observation est soutenue par le fait que la production d'ATP est maintenue en conditions basales malgré le défaut dans la CR (Burelle et al., 2015). Finalement, l'expression du facteur de transcription « *hypoxia-inductible factor 1-alpha* » (HIF1) et de la voie de signalisation « *protein kinase B/mammalian target of rapamycin* » (Akt/mTOR) sont augmentées chez les fibroblastes LSFC (Mukaneza, 2014). Ensemble, ces voies agissent comme des régulateurs centraux de la glycolyse. D'une part, le HIF1 stimule la glycolyse à travers l'induction de la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose. Plus spécifiquement, l'HIF1 régule les transporteurs de glucose, les enzymes glycolytiques et la production de lactate (Semenza et al., 1994). D'autre part, la voie Akt/mTOR régule, entre autres, la captation de glucose par le récepteur « *glucose transporter 1* » (GLUT1), la phosphorylation de substrats impliqués dans la glycolyse et l'entrée de pyruvate dans la mitochondrie. En effet, l'activation de la voie Akt/mTOR inhibe l'entrée de pyruvate dans la mitochondrie ce qui bloque le système OXPHOS (Altomare & Khaled, 2012).

Similairement, d'autres études ont montré que la dysfonction mitochondriale peut augmenter le taux glycolytique même en condition aérobie (Courtney et al., 2015; Stark et al., 2015). Ce phénomène, connu sous le terme « effet Warburg » ou « glycolyse aérobie »,

a été également observé dans des cellules musculaires de cœurs hypertrophiques de rats ayant subi un arrêt cardiaque (Piran et al., 2012). En effet, le cœur en santé requiert une production d'ATP élevée et stable pour réaliser ses fonctions. Cette énergie est, en grande majorité, fournie par le système OXPHOS (95%), tandis que le reste est fourni par la glycolyse (5%) (Doenst et al., 2013). Dans les cœurs hypertrophiques de rats, le flux anaplérotique (réaction chimique qui produit un métabolite) du cycle de Krebs est augmenté de 83% (Sorokina et al., 2007), ce qui signifie que les mitochondries sont en mesure de rétablir la concentration de certains substrats, utilisés par d'autres voies métaboliques, pour maintenir l'homéostasie du cycle de Krebs (Owen et al., 2002). Ainsi, puisque la mutation du gène LRPPRC entraîne une dysfonction mitochondriale chez les fibroblastes LSFC, il est plausible de déduire que l'augmentation de la glycolyse en conditions basales est probablement due à l'effet Warburg.

De plus, nous avons trouvé que la mutation du gène LRPPRC diminue le  $\Delta\Psi_m$  des fibroblastes. Il est connu que la génération du  $\Delta\Psi_m$  dépend aussi du flux de  $H^+$  à travers les membranes. Également, le  $\Delta\Psi_m$  est essentiel à la production d'énergie étant donné que l'ATP synthase l'utilise pour convertir l'ADP en ATP (Saneto & Sedensky, 2013). Nos données suggèrent que la réduction de l'activité de COX, empêchant le pompage adéquat de  $H^+$  à travers la CR, perturbe l'équilibre de  $H^+$  dans le milieu mitochondrial ainsi que le flux de  $H^+$  nécessaire à la génération du  $\Delta\Psi_m$ . Notre observation est bien corrélée à l'augmentation de la glycolyse que nous avons obtenue chez les fibroblastes LSFC en conditions basales. Aussi, elle est liée au fait que la production d'ATP via OXPHOS dépend du  $\Delta\Psi_m$  (Saneto & Sedensky, 2013).

En ce qui concerne la transition de perméabilité mitochondriale, nous avons trouvé que la mutation du gène LRPPRC diminue la capacité de retenir le  $Ca^{2+}$  dans la matrice mitochondriale des fibroblastes. Il est connu que la plupart des fonctions mitochondriales sont dépendantes du  $Ca^{2+}$  (Picard et al., 2013). En plus, les mitochondries contribuent de façon importante à l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et dépendent du  $\Delta\Psi_m$  pour le mobiliser du cytoplasme à sa matrice (Bakthavachalam & Shanmugam, 2017). Aussi, des situations pathologiques favorisant l'accumulation de  $Ca^{2+}$  dans la matrice mitochondriale, peuvent

déclencher l'ouverture irréversible de PTP dans la MMI. Cette condition est associée au découplage de la respiration mitochondriale, à la déplétion des réserves d'ATP et à la mort cellulaire (Picard et al., 2013). Dans notre étude, nous avons mesuré la CRC par l'induction d'une surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$ , administrée par bolus, afin de mimer une condition pathologique ou de stress. Aussi, nous avons bloqué la captation de  $\text{Ca}^{2+}$  par le sarcoplasme et le RE en utilisant l'inhibiteur thapsigargine afin d'assurer que la CRC a été exclusivement attribuable à l'activité mitochondriale. Ainsi, nos résultats suggèrent que les fibroblastes LSFC présentent une ouverture précoce de PTP lors d'une surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui pourrait réduire sa capacité à répondre à certains types de stress, surtout, ceux favorisant l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale. Également, ces résultats sont corrélés au fait que le  $\Delta\Psi_m$  est diminué dans les fibroblastes LSFC en conditions basales.

En ce qui concerne le stress oxydant, nous avons trouvé que la mutation du gène LRPPRC n'augmente pas la production des ERO des fibroblastes. Il est bien établi que les mitochondries sont responsables de la génération des ERO et, plus spécifiquement, au niveau des complexes respiratoires I et III (Yusoff et al., 2015). Ainsi, des défauts dans la CR peuvent augmenter la production d'ERO. Cette dernière favorise l'apparition du stress oxydant, surtout si les facteurs de protection antioxydants ne sont pas en mesure de compenser cette production (Hayashi & Cortopassi, 2015). Le stress oxydant ne semble toutefois pas être présent chez les individus LSFC. En effet, il a été démontré que le taux sérique de l'antioxydant glutathion chez les gens souffrant de LSFC, dans son état réduit ou oxydé, était semblable aux témoins (Thompson Legault et al., 2015). Néanmoins, il est important de mentionner que le stress oxydant peut être présent dans d'autres maladies mitochondriales, telle que la version classique du LS, dû à l'hétérogénéité des atteintes dans la CR (Hayashi & Cortopassi, 2015). Ainsi, tel qu'attendu, nos résultats corrélaient avec ceux obtenus précédemment (Burelle et al., 2015) et suggèrent que le stress oxydant n'est pas impliqué dans les mécanismes physiopathologiques du LSFC.

En résumé, nos résultats confirment que la mutation du gène LRPPRC a des répercussions importantes sur la fonction mitochondriale des fibroblastes ce qui pourraient les rendre plus vulnérables en situation de stress. En effet, la mutation affecte des paramètres essentiels à la production d'énergie et à la signalisation cellulaire dans lesquels les mitochondries sont impliquées : consommation d'O<sub>2</sub>,  $\Delta\Psi_m$  et capacité de retenir le Ca<sup>2+</sup>. En plus, le déclenchement de la glycolyse aérobie observée dans les fibroblastes LSFC peut constituer l'un des mécanismes cellulaires compensatoires pour maintenir la production d'énergie. Nos résultats sont donc en accord avec d'autres observations obtenues précédemment (Burelle et al., 2015; Mukaneza, 2014).

## **2. Les fibroblastes LSFC sont plus susceptibles au SIN**

Le LSFC est une maladie mitochondriale qui se manifeste principalement par des crises potentiellement mortelles d'acidose lactique. Il est connu que ces crises peuvent être déclenchées, entre autres, par une surcharge nutritionnelle et/ou une infection (Debray et al., 2011) qui elle peut enclencher une réponse inflammatoire aiguë (Bernardo & Fibbe, 2013). D'autre part, la surcharge nutritionnelle, induite par une ingestion excessive de macronutriments tels les glucides et les lipides, provoque la biosynthèse des acides gras dans un processus orchestré entre autres par l'insuline (Nunnari & Suomalainen, 2012). Dans ce contexte, nous avons réalisé une étape de criblage des agents inducteurs de SI et SN afin d'identifier la condition de stress ayant le plus d'impact sur la viabilité des fibroblastes. Pour ce faire, nous avons mesuré la quantité de cellules métaboliquement actives en utilisant le sel de résazurine en spectrofluorométrie.

### **2.1. L'impact du SIN sur la viabilité cellulaire**

Nous avons remarqué que le TNF- $\alpha$  ou le LPS n'a eu aucun effet sur la viabilité des fibroblastes. Le TNF- $\alpha$ , cytokine pro-inflammatoire synthétisée par les macrophages et les monocytes en réponse à une infection (Parameswaran & Patial, 2010), est impliqué dans l'initiation et l'orchestration de l'inflammation. Spécifiquement, le TNF- $\alpha$  peut être synthétisé

lors de la reconnaissance de certains ligands par les récepteurs membranaires de la famille « *toll-like receptor* » (TLR) (Mescher, 2017). Par exemple, le LPS (endotoxine présente à la surface membranaire des bactéries gram négatives) est un ligand qui stimule la sécrétion de TNF- $\alpha$  (Malgorzata-Miller et al., 2016; Parameswaran & Patial, 2010).

En ce qui concerne le SN, nous avons trouvé que le palmitate diminue significativement la viabilité des fibroblastes sans toutefois présenter une différence entre les lignées. Dans notre étude, nous avons utilisé le palmitate conjugué à l'albumine afin de mimer les conditions physiologiques. En général, le palmitate ou l'acide palmitique résulte de la biosynthèse des acides gras effectuée dans le cytosol cellulaire. Il s'agit d'un acide gras saturé, composé de 16 carbones (16:0), formé dans la première étape du processus de lipogenèse (Figure 35). Néanmoins, elle implique la production mitochondriale de l'acétyl-CoA. Pour ce faire, les mitochondries dégradent les molécules de glucose, d'acides gras et de glutamine afin de maintenir la synthèse de citrate par le cycle de Krebs. Cela entraîne une augmentation des ratios ATP/ADP et NADH/NAD<sup>+</sup>, provoquant l'excrétion de citrate dans le cytosol (Lodhi et al., 2011). En parallèle, l'augmentation des concentrations d'ATP et de NADH bloque la biogenèse mitochondriale et favorise la synthèse d'ATP par la voie glycolytique (Nunnari & Suomalainen, 2012). Finalement, le citrate est reconverti en acétyl-CoA pour alimenter la synthèse de l'acide palmitique (Lodhi et al., 2011). Il est déjà connu que l'accumulation de palmitate entraîne la formation de produits cytotoxiques, tels que les céramides et les diacylglycérols (Pinel et al., 2014; Thombare et al., 2017). Ces derniers sont impliqués, entre autres, dans l'induction de l'apoptose et le blocage des récepteurs de l'insuline (Mayer & Belsham, 2010).

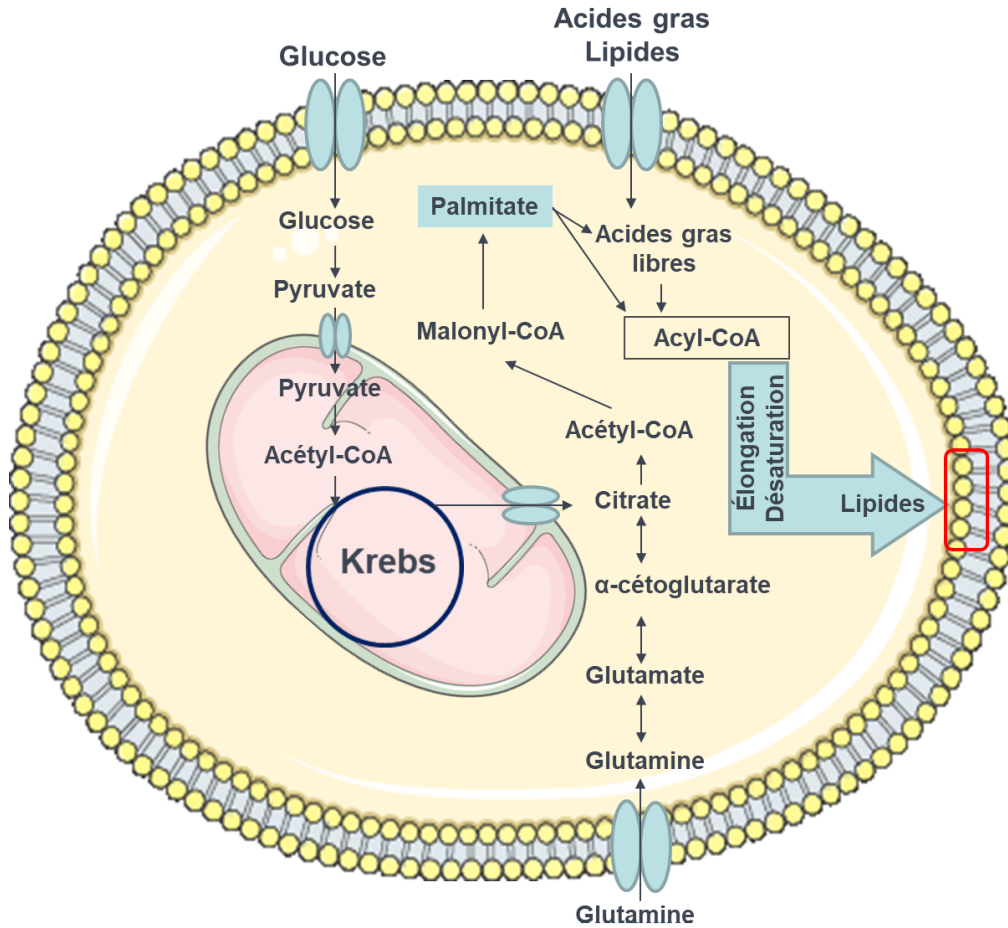


Figure 35. La lipogenèse. Créé à partir de (Servier Medical Art).

## 2.2. L'impact du SIN sur la mort cellulaire

Nous avons remarqué que la combinaison du TNF- $\alpha$  avec le palmitate a aussi diminué la viabilité des fibroblastes, et ce, de façon significative entre les lignées. Ainsi, nous avons choisi cette condition pour évaluer son impact sur la mort des fibroblastes en utilisant une approche méthodologique plus sensible. En effet, nous avons utilisé la microscopie à fluorescence intégrée dans le système Operetta. Ce dernier nous a permis de mesurer la mort cellulaire de façon plus précise à travers l'association entre les intensités de fluorescence et le profil phénotypique de chaque cellule, c'est-à-dire, selon les aires du noyau et du cytoplasme cellulaire (Martin et al., 2014). Aussi, nous avons pu détecter plus précocement la mort cellulaire



par nécrose que les études précédentes (Rivard, 2011), soit 24h après l'exposition des fibroblastes aux différents agents de stress. À cet égard, nous avons utilisé le PI pour détecter les cellules nécrotiques, un marqueur fluorescent capable de se lier à l'ADN des cellules présentant une perte d'intégrité membranaire (Atale et al., 2014). Ainsi, nous avons trouvé que les fibroblastes LSFC sont plus susceptibles aux effets cytotoxiques d'un SIN que les fibroblastes témoins. En effet, les fibroblastes LSFC ont un plus haut taux de cellules nécrotiques (PI+) comparativement aux fibroblastes témoins.

### 2.2.1. La nécrose

D'une part, la nécrose peut être déclenchée de façon accidentelle par des facteurs de stress tels que le traumatisme physique, l'ischémie et les températures extrêmes. Ces facteurs mènent à la rupture de la membrane plasmique et à la libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire. D'autre part, la nécrose peut être génétiquement programmée (nécroptose) à travers l'activation de la voie « *receptor-interacting protein kinases/ mixed lineage kinase domain-like* » (RIP1/RIP3/MLKL) (Zhou & Yuan, 2014). Le TNF- $\alpha$ , par exemple, induit la nécroptose lors de son interaction avec les récepteurs de mort présents sur la membrane plasmique tels que le « *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor* » (TRAILR) et le Fas. Également, la nécroptose peut être déclenchée lors d'une perturbation de l'état redox et du métabolisme énergétique. Ainsi, la transition de perméabilité mitochondriale, la diminution dans les concentrations de NAD<sup>+</sup> et d'ATP, la surcharge de Ca<sup>2+</sup> et l'augmentation dans la production des ERO sont des facteurs qui peuvent induire ce processus (Berghe et al., 2014). Dans ce contexte, malgré le fait que plusieurs types de mort cellulaire peuvent coexister face à des perturbations cellulaires et extracellulaires, nos résultats suggèrent que la nécroptose est le type de mort cellulaire prédominant dans notre étude. De fait, le palmitate est également impliqué dans le déclenchement de la nécroptose (Khan et al., 2012). En plus, cette suggestion peut être soutenue par le fait que le taux de nécrose que nous avons détecté par PI est similaire à la diminution de la viabilité cellulaire évaluée par le sel de résazurine en conditions de SIN.

### **2.2.2. L'apoptose**

Dans notre étude, nous avons débuté la mesure de mort cellulaire par apoptose. À cet égard, nous avons utilisé l'annexine V, un marqueur fluorescent détectant le phosphatidylsérine (PS) présent dans les membranes plasmiques. En effet, le phospholipide PS est exposé à la surface des membranes lors du déclenchement de l'apoptose (Atale et al., 2014). De façon générale, l'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée impliquant la cascade d'activation de caspases. Ce processus peut être déclenché par deux voies distinctes : extrinsèque et intrinsèque. Similairement à la nécroptose, la voie apoptotique extrinsèque implique l'activation des récepteurs de mort TRAILR et Fas, via des voies de signalisation distinctes. D'autre part, la voie apoptotique intrinsèque, également appelée « voie mitochondriale », correspond à l'activation directe des caspases par des agents inducteurs de stress. En effet, cette voie implique la perméabilisation de la MME, la libération de cytochrome c dans le cytosol cellulaire et l'assemblage de l'apoptosome (Ichim & Tait, 2016). Néanmoins, la mesure de l'apoptose n'a pas été possible dans notre étude due à l'absence d'un contrôle positif efficace, c'est-à-dire un agent inducteur d'apoptose nous permettant de nous assurer des caractéristiques phénotypiques à détecter avec le système Operetta. Ainsi, les études pour mesurer l'impact de SIN sur l'apoptose des fibroblastes LSFC sont à poursuivre.

### **2.2.3. L'impact de SIN sur la nécrose des fibroblastes**

Dans notre étude, tel qu'attendu, nous avons remarqué que le TNF- $\alpha$  seul n'induit pas la mort des fibroblastes LSFC et témoins. Par contre, il a agi comme agent potentialisateur de la mort cellulaire induite par le palmitate. Il est connu que le TNF- $\alpha$  peut agir sur la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (Parameswaran & Patial, 2010). De plus, sa liaison à ses récepteurs cellulaires spécifiques est un facteur déterminant de la survie ou de la mort cellulaire. Par exemple, la liaison de TNF- $\alpha$  au récepteur TNF-R1 peut induire des signaux de survie ou de mort cellulaire, dépendamment de la formation des complexes I et II (différents de ceux trouvés dans la CR). Le complexe I est formé au niveau de la membrane plasmique. Il est responsable de l'activation de la voie de survie NF- $\kappa$ B. La formation du complexe I dépend également de l'ubiquitinylation de certaines protéines dans les radeaux lipidiques (Micheau,

2004). Ceux-ci sont des régions de la membrane plasmique, riches en lipides, utilisés préférentiellement pour l'activité de certaines protéines et récepteurs, y compris ceux de l'insuline (Sezgin et al., 2017). Il est connu que l'altération de ces régions sensibilise les cellules à l'activité pro-apoptotique du TNF- $\alpha$ . D'autre part, le complexe II, formé au cytosol, est responsable de l'activation de la voie de mort cellulaire via le recrutement de la procaspase-8. En effet, l'activation de la caspase-8 constitue la première étape de la cascade protéolytique conduisant à la mort cellulaire (Micheau, 2004).

Également, il est important de mentionner l'implication des fibroblastes dans la résolution de l'inflammation. En effet, les fibroblastes sont capables de répondre aux facteurs pro-inflammatoires, tels que le TNF- $\alpha$ , de façon semblable aux cellules du système immunitaire inné, soit à travers de l'activation des récepteurs membranaires TLR. En conséquence, les fibroblastes déclenchent, entre autres, des mécanismes de prolifération, croissance et synthèse de nouvelles composantes de la matrice extracellulaire, tels que les protéines et les protéoglycanes, afin de renforcer le système immunitaire local (Mescher, 2017).

En résumé, puisque les fibroblastes expriment les récepteurs TNF-R1 (Ivanov et al., 2010), nos résultats suggèrent que leur exposition au TNF- $\alpha$  seul a probablement activé la voie de survie NF- $\kappa$ B (Micheau, 2004). Également, nous suggérons que l'exposition des fibroblastes au palmitate seul a déclenché la mort cellulaire par nécroptose (Khan et al., 2012). En plus, le TNF- $\alpha$  a potentialisé la mort cellulaire des fibroblastes par un effet synergique avec le palmitate. Finalement, puisque les fibroblastes LSFC ont des perturbations mitochondriales importantes, nous suggérons qu'elles soient responsables de la plus grande susceptibilité à la mort cellulaire par le SIN. Nos résultats confirment ceux obtenus précédemment (Rivard, 2011). Néanmoins, d'autres études sont nécessaires afin de confirmer nos hypothèses en lien avec la susceptibilité accrue des fibroblastes au SIN.

### **3. Le SIN aggrave la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC**

Il est connu que les fibroblastes LSFC présentent des perturbations mitochondriales qui peuvent nuire à leur fonctionnement optimal (Burelle et al., 2015). Également, ces perturbations rendent les fibroblastes LSFC plus susceptibles à la mort cellulaire en conditions de SIN. Néanmoins, les mécanismes physiopathologiques par lesquels les mitochondries LSFC répondent aux facteurs déclencheurs des crises acidotiques, soit le SIN, ne sont pas complètement élucidés. En plus, aucune étude a été menée à ce jour pour caractériser les paramètres de la fonction mitochondriale en conditions de stress telle l'inflammation combinée à la surcharge en nutriments. Ainsi, afin de combler cette lacune et de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des crises, nous avons évalué l'impact du SIN sur la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC.

Nos résultats démontrent que le SIN diminue considérablement la consommation d'O<sub>2</sub>, le  $\Delta\Psi_m$  et la capacité de retenir le Ca<sup>2+</sup>, sans toutefois induire un stress oxydant chez les fibroblastes LSFC et témoins. En parallèle, nous avons remarqué une augmentation de l'acidification extracellulaire des fibroblastes, ce qui suggère une préférence pour la voie glycolytique en conditions de SIN.

Il est important de rappeler que les paramètres mitochondriaux affectés par le SIN sont déjà altérés chez les fibroblastes LSFC en conditions basales (Burelle et al., 2015). Néanmoins, nous avons observé que le SIN a bloqué la respiration cellulaire en plus d'aggraver la capacité de retenir le Ca<sup>2+</sup> des fibroblastes LSFC. En effet, ils ont présenté des taux plus bas d'OCR et de CRC que les fibroblastes témoins. Tel que discuté précédemment, l'OCR reflète la respiration cellulaire via le système OXPHOS. Celui-ci a un impact direct sur le  $\Delta\Psi_m$  et, en conséquence, sur la CRC et la production d'énergie. En plus, il a été déjà montré que les fibroblastes LSFC présentent un réseau mitochondrial fragmenté en conditions basales, ce qui entraîne des conséquences fonctionnelles importantes (Burelle et al., 2015). En effet, il est bien documenté que des altérations dans la morphologie mitochondriale entraînent une plus grande sensibilité à la transition de perméabilité et à la signalisation apoptotique. Également, la transition de

perméabilité amène à la formation de PTP, et constitue l'un des mécanismes par lesquels les mitochondries répondent aux différentes sources de stress. De plus, une transition de perméabilité prolongée est associée à l'ouverture irréversible de PTP, ce qui entraîne une déplétion des réserves d'ATP et, en conséquence, la mort cellulaire. Aussi, la fragmentation mitochondriale est fortement associée à la diminution de la capacité respiratoire des cellules perméabilisées (Picard et al., 2013).

De façon intéressante, nous avons remarqué que l'exposition des fibroblastes LSFC au CCCP, un inhibiteur de la CR, n'a pas stimulé la voie glycolytique, ni en conditions basales ni de SIN. Cette observation suscite trois points de discussion. Premièrement, nos résultats suggèrent qu'en présence d'un blocage du système OXPHOS, les fibroblastes LSFC ont une capacité limitée à répondre au stress comparativement aux fibroblastes témoins. Ces derniers, en présence de CCCP, ont été capables de respirer en conditions basales ainsi que de déclencher la glycolyse en conditions de SIN. Deuxièmement, l'activité de COX, toujours présente à environ 50% chez les fibroblastes LSFC, semble les rendre capables de maintenir la voie glycolytique en conditions de SIN. Troisièmement, la façon dont les fibroblastes LSFC ont répondu à l'inhibition du système OXPHOS suggère que la capacité à répondre au stress peut dépendre du degré d'atteinte tissulaire par la mutation. Ainsi, le foie et le cerveau, dont l'activité de COX est présente à seulement 10%, ne seraient probablement pas capables de déclencher les mêmes mécanismes compensatoires que les fibroblastes pour surmonter les situations de stress. Il serait intéressant de poursuivre les investigations dans ce sens.

En résumé, nos résultats montrent donc que le SIN entraîne des perturbations mitochondriales importantes ayant un impact sur la survie des fibroblastes. En plus, étant donné que les mitochondries des fibroblastes LSFC présentent, à la base, des perturbations morpho-fonctionnelles importantes, leur capacité à répondre à ce type de stress s'avère limitée.

## 4. Les acides gras oméga-3 préviennent la mort cellulaire et la perte de $\Delta\Psi_m$ des fibroblastes LSFC induites par le SIN

Malgré les efforts de la communauté scientifique pour comprendre les mécanismes physiopathologiques entourant le LSFC, aucun traitement n'existe à ce jour pour prévenir les crises potentiellement mortelles d'acidose lactique. De plus, aucun agent thérapeutique, accessible via l'alimentation, n'avait encore été testé sur le seul modèle cellulaire disponible pour étudier la maladie. Puisque les acides gras O3 sont impliqués dans la modulation du métabolisme énergétique et de l'inflammation (Xue et al., 2012), nous avons évalué leurs impacts sur la mort cellulaire et la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC en conditions de SIN.

Les acides gras O3 sont des macronutriments essentiels à l'organisme humain. Puisque ce dernier est incapable de synthétiser les acides gras O3, il est donc nécessaire de les obtenir par le biais de l'alimentation. L'EPA (20:5n-3) et le DHA (22:6n-3) sont les acides gras O3 les plus communs et largement étudiés. Ils sont naturellement présents dans les sources marines telles que les poissons gras, les fruits de mer et les huiles de poisson (de Oliveira et al., 2017; Les diététistes du Canada, 2013). Aussi, ils peuvent être biosynthétisés à partir de l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA, 18:3n-3) issu des sources végétales telles que certaines huiles végétales, noix, graines et produits à bases de soya (Les diététistes du Canada, 2013). En effet, certaines plantes, algues et animaux peuvent obtenir l'EPA et le DHA à partir d'une série de réactions d'allongements et de désaturations de la chaîne carbonée de l'ALA (Zárate et al., 2017). Néanmoins, cette conversion dans l'organisme humain est inefficace (de Oliveira et al., 2017). Des nombreuses évidences scientifiques, *in vitro* et *in vivo*, ont montré les effets bénéfiques des acides gras O3 sur plusieurs modèles de maladies, ayant un dysfonctionnement mitochondrial à la base de leur mécanismes physiopathologiques, telles que les maladies cardiovasculaires, métaboliques, inflammatoires, neurodégénératives ainsi que le cancer (de Oliveira et al., 2017). De façon générale, les acides gras O3 sont impliqués dans la modulation du métabolisme énergétique et de l'inflammation par l'activation de la voie « *AMP-activated protein kinase/NAD-dependent deacetylase sirtuin-1* » (AMPK/SIRT1) (Xue et al., 2012).

Les études suggèrent que les mécanismes moléculaires par lesquels les acides gras O3 jouent leurs rôles thérapeutiques sont associés à leur incorporation dans les phospholipides membranaires, plus spécifiquement dans la région des radeaux lipidiques. À cet endroit, ils participent à la modulation de multiples protéines de signalisation (Cao et al., 2006; de Oliveira et al., 2017). Également, plusieurs mécanismes d'action ont été déjà proposés afin d'expliquer les effets bénéfiques des acides gras O3 sur la fonction mitochondriale : amélioration de l'état redox et de la dynamique mitochondriale (Sakamoto et al., 2017); prévention de la perte de  $\Delta\Psi_m$ ; stimulation de la biogenèse; suppression de l'apoptose intrinsèque et restauration du statut bioénergétique (de Oliveira et al., 2017). Dans notre étude, les acides gras O3 ont prévenu la nécrose induite par le SIN des fibroblastes LSFC et témoins.

En ce qui concerne la fonction mitochondriale, nous avons observé que le prétraitement des fibroblastes LSFC et témoins avec les acides gras O3 a prévenu la perte de  $\Delta\Psi_m$  induite par le SIN. Néanmoins, dans notre étude, les acides gras O3 semblent exercer un effet néfaste sur la consommation d' $O_2$  et la capacité de retenir le  $Ca^{2+}$  des fibroblastes. Les études suggèrent que la surcharge de  $Ca^{2+}$  peut perturber la structure des membranes mitochondriales et le flux d'électrons dans la CR, favorisant les réactions pro-oxydantes. En effet, le  $Ca^{2+}$  peut interagir avec la charge négative de la cardiolipine (riche en acides gras polyinsaturés). Cette dernière est le phospholipide le plus abondant dans les membranes mitochondriales (Ascenzi et al., 2015). Également, il est important de mentionner que les effets des acides gras O3 peuvent varier selon la concentration et le temps d'exposition (de Oliveira et al., 2017). Dans notre étude, le temps de prétraitement des fibroblastes avec les acides gras O3 a varié selon la technique utilisée. Pour les mesures de nécrose,  $\Delta\Psi_m$  et CRC, le temps de prétraitement a été de 4h avant de recevoir le SIN, tandis que pour les mesures d'OCR et ECAR ce temps a été de 2h. Finalement, certaines études montrent que les acides gras EPA et DHA augmentent la captation cellulaire et mitochondriale de  $Ca^{2+}$ , ce qui pourrait potentialiser les effets néfastes de la surcharge de  $Ca^{2+}$ . Néanmoins, ces effets sur la modulation de l'apoptose semblent dépendre du type cellulaire (de Oliveira et al., 2017).

En résumé, nos résultats démontrent que les acides gras O3 sont capables de prévenir la nécrose de fibroblastes induite par le SIN. Néanmoins, il est encore précoce d'affirmer que cette prévention a été uniquement due à la modulation du  $\Delta\Psi_m$  des fibroblastes. Ainsi, des études plus approfondies sont nécessaires pour explorer les effets thérapeutiques potentiels des acides gras O3 dans le contexte du LSFC, et ce, sur les mécanismes de prévention de la mort cellulaire ainsi que sur d'autres paramètres mitochondriaux et extra-mitochondriaux.

## **5. L'ablation de LRPPRC hépatique cause la perte neuronale dans le tronc cérébral des souris**

Le cerveau et le foie sont les tissus les plus sévèrement touchés par la mutation du gène LRPPRC dans le LSFC (Merante et al., 1993). De plus, les atteintes neurologiques sont parmi les manifestations cliniques les plus fréquentes chez les individus LSFC (Debray et al., 2011). Ainsi, puisqu'il y a un lien métabolique étroit entre le cerveau et le foie, tel qu'observé lors d'encéphalopathie hépatique, nous avons débuté la caractérisation de la morphologie cérébrale des souris HKO afin de vérifier si l'ablation du gène LRPPRC hépatique exerce un impact au niveau cérébral.

Les souris HKO présentent une déficience combinée en COX et en ATP synthase au niveau hépatique. En conséquence, ces souris présentent des atteintes hépatiques caractéristiques de maladies mitochondriales. En effet, cette hépatopathie est accompagnée, entre autres, d'une prolifération mitochondriale aberrante, un défaut dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras et un retard de développement (Cuillierier et al., 2017). La souris HKO constitue donc un modèle expérimental qui reflète en partie le phénotype général des patients LSFC.

En ce qui concerne la caractérisation basale que nous avons réalisée en immunohistochimie, nous avons trouvé que le tronc cérébral des souris HKO est la seule région affectée par l'ablation hépatique du gène LRPPRC. En effet, les souris HKO présentent une réduction significative dans la population neuronale comparativement aux souris HWT. En



général, les lésions cérébrales observées dans les maladies mitochondriales sont associées à la perte neuronale. Au niveau du tronc cérébral, ces lésions se manifestent par des atteintes respiratoires et neuromusculaires importantes (Finsterer, 2008). De plus, aucune différence significative n'a été observée dans la population cellulaire totale et astrocytaire des souris HKO et HWT, et ce, dans toutes les régions évaluées (cortex, cervelet et tronc cérébral).

En général, le métabolisme du lactate est compromis en présence des atteintes hépatiques ce qui favorise son accumulation dans le sang (Berg et al., 2002). De plus, l'accumulation pathologique du lactate est associée, entre autres, à des lésions cérébrales (Shih et al., 2004). Aussi, il est connu que les individus atteints d'une maladie hépatique, aiguë ou chronique, ainsi que les modèles expérimentaux d'hépatopathies présentent une augmentation du lactate cérébral (Rose, 2010). Ainsi, puisque les souris HKO présentent une hépatopathie mitochondriale sévère, nous suggérons que le lactate pourrait être parmi les facteurs impliqués dans la perte neuronale observée dans notre étude.

Il est connu que des petites quantités de lactate sont synthétisées par le cerveau à partir du glycogène cérébral. Néanmoins, certaines conditions, telles que l'activité physique intense seule ou associée à une hypoxie, augmentent considérablement la glycolyse cérébrale et, ainsi, la production de lactate (van Hall et al., 2009). D'autre part, le cerveau peut capter le lactate de façon proportionnelle aux concentrations trouvées dans le sang (Overgaard et al., 2012). En effet, de 85 à 100% du lactate capté par les neurones est oxydé afin d'éviter son accumulation dans le cerveau et dans le LCR (Dalsgaard et al., 2004; van Hall et al., 2009). De plus, le lactate représente une source d'échange d'énergie entre les organes. En effet, ses carbones sont oxydés et utilisés dans la production de glucose via la gluconéogenèse (Overgaard et al., 2012). Chez l'homme, la production ainsi que l'oxydation de lactate sont régulées à travers l'interaction étroite entre les cellules (Brooks, 1999). Cette interaction est observée au cerveau, plus spécifiquement, entre les neurones et les astrocytes. Ces derniers sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie énergétique cérébrale en fonction de la demande métabolique (Overgaard et al., 2012).

Les atteintes neuronales peuvent être également causées par une inflammation systémique. De fait, les cellules du système immunitaire inné peuvent traverser la BHE et produire des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  au cerveau (Fischer & Maier, 2015). Dans notre modèle, l'hépatopathie est accompagnée d'une inflammation périportale et centre-lobulaire (Cuillerier et al., 2017). Ainsi, nous suggérons également que cette inflammation pourrait être associée à la perte neuronale des souris HKO en conditions basales.

Finalement, les neurones sont sensibles aux effets toxiques du palmitate. En effet, l'accumulation de palmitate dans les cellules neuronales perturbe la signalisation centrale de l'insuline en plus de déclencher les mécanismes de mort cellulaire (Mayer & Belsham, 2010). Ainsi, puisque les souris HKO présentent un défaut dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Cuillerier et al., 2017), nous suggérons également que l'accumulation de palmitate dans le sang pourrait être associée à la mort neuronale observée dans notre étude.

En résumé, nos résultats démontrent que l'ablation du gène LRPPRC hépatique entraîne une perte neuronale dans le tronc cérébral des souris HKO en conditions basales. Ces résultats corrént avec les lésions neurologiques normalement observées dans le tronc cérébral des individus LSFC (Debray et al., 2011). De plus, considérant la condition hépatique des souris HKO, nous suggérons que l'accumulation sérique de lactate, de facteurs pro-inflammatoires ou de palmitate pourrait expliquer en partie leurs atteintes neurologiques. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires afin de valider ces informations dans notre modèle.

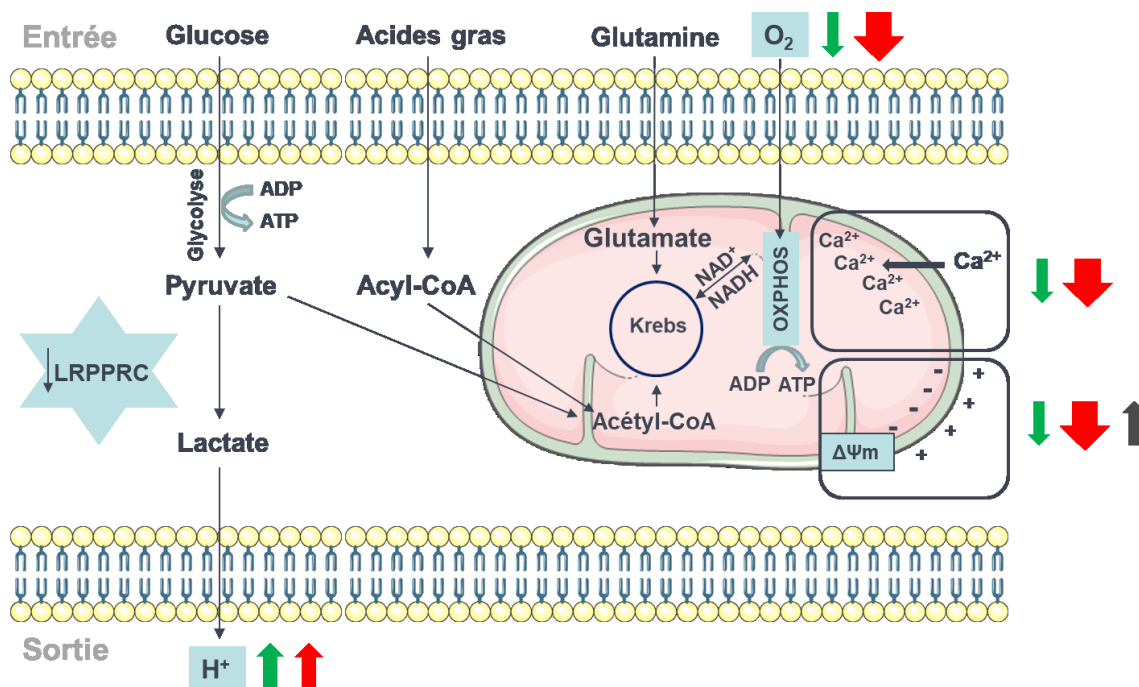
## Conclusion et perspectives

Le LSFC est une maladie mitochondriale rare caractérisée par une déficience tissus-spécifique en COX. Le foie et le cerveau sont les organes les plus affectés par la maladie. En conséquence, les crises potentiellement fatales d'acidose lactique et les lésions neurologiques représentent leurs principales manifestations cliniques. Il a été rapporté que l'infection/inflammation et la surcharge nutritionnelle sont des facteurs pouvant déclencher ces crises. Cependant, les mécanismes physiopathologiques demeurent à élucider. De plus, aucun traitement existe à ce jour pour prévenir ces crises, orientant ainsi la recherche vers la compréhension des aspects mécanistiques entourant la maladie ainsi que vers l'identification des agents thérapeutiques potentiels.

Les fibroblastes de peau, issus des patients LSFC, constituent le seul modèle cellulaire disponible pour étudier la maladie. Ce modèle, déjà caractérisé en conditions basales par des études précédentes (Burelle et al., 2015; Cuillerier et al., 2017), révèle que la mutation du gène LRPPRC entraîne une réduction d'environ 50% dans l'activité de COX (Merante et al., 1993). Cette perturbation dans la CR est associée à une réduction globale de certains aspects essentiels à la fonction mitochondriale : consommation d'O<sub>2</sub>,  $\Delta\Psi_m$  et capacité de retenir le Ca<sup>2+</sup> (Burelle et al., 2015). De plus, la voie de signalisation Akt/mTOR et le facteur de transcription HIF1, impliquées dans la glycolyse, sont surexprimés dans ce modèle (Mukaneza, 2014). Notre étude a permis de confirmer ces perturbations mitochondriales. Aussi, nous avons montré que la glycolyse constitue l'un des mécanismes compensatoires utilisé par les fibroblastes LSFC dans le but de surmonter le défaut dans le système OXPHOS et, donc, maintenir la production d'énergie en conditions basales.

Également, nous avons montré que la mutation du gène LRPPRC rend les fibroblastes plus susceptibles en conditions de SIN. Malgré le fait que les fibroblastes LSFC utilisent la glycolyse comme système compensatoire, leur capacité glycolytique est limitée lorsqu'ils sont exposés à l'action combinée de plusieurs facteurs de stress entraînant le découplage de la

respiration cellulaire. Aussi, nous avons trouvé que le SN semble être le facteur déterminant de cytotoxicité pour les fibroblastes. En plus, le SN, associé aux perturbations mitochondriales de base, rend les fibroblastes LSFC plus vulnérables à d'autres facteurs de stress, tels que l'inflammation. Finalement, nous avons trouvé que les acides gras O3 ont protégé les fibroblastes contre les effets cytotoxiques du SIN par la prévention de la mort cellulaire et de la perte du  $\Delta\Psi_m$ . La figure 36 résume nos résultats *in vitro* dans toutes les conditions testées.



**Figure 36. Représentation schématique de l'impact de LRPPRC sur la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC dans les différentes conditions évaluées.** Basal (flèches en vert), SIN (flèches en rouge) et SIN+O3 (flèches en noir). Paramètres mitochondriaux : OCR ( $O_2$ ), ECAR ( $H^+$ ), potentiel membranaire mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) et CRC ( $Ca^{2+}$ ). Créé à partir de (Servier Medical Art).

Malgré nos découvertes, d'autres études *in vitro* sont nécessaires afin d'élucider et de comprendre les mécanismes mitochondriaux ou extra-mitochondriaux par lesquels les acides gras O3 ont prévenu la mort des fibroblastes. D'abord, il est nécessaire d'évaluer les effets isolés

d'EPA et DHA sur la fonction mitochondriale des fibroblastes LSFC, tant en conditions basales qu'en conditions de stress. De fait, la plupart des bénéfices rapportés dans la littérature scientifique sont basés sur leurs effets isolés. Par exemple, la prévention de la perte du  $\Delta\Psi_m$  est rapportée par les études utilisant le DHA comme agent thérapeutique (de Oliveira et al., 2017). Ensuite, il est nécessaire d'investiguer leurs effets sur l'amélioration des autres paramètres mitochondriaux altérés par la mutation tels que la dynamique et la biogenèse mitochondriaux. En plus, il est important de vérifier leur impact sur la modulation de certaines voies de signalisations, entre autres, l'AMPK. Cette dernière, impliquée dans l'homéostasie du métabolisme énergétique, est altérée chez les fibroblastes LSFC (Mukaneza, 2014). Aussi, il est important d'explorer d'autres concentrations et d'autres temps de prétraitement des fibroblastes avec les acides gras O3 capables d'améliorer les paramètres respiratoires. Il serait également intéressant d'étudier l'impact du SIN est des acides gras O3 sur la dynamique mitochondriale. Finalement, il serait pertinent d'explorer l'impact des acides gras O3 sur la modulation d'autres types de mort cellulaire tels que l'apoptose, et ce, en conditions de stress. L'apoptose serait d'ailleurs un mécanisme à investiguer dans les conditions basales, avec les contrôles appropriés.

En ce qui concerne les conditions de stress, il serait intéressant de caractériser l'impact isolé des différents types de stress, soit le SN (palmitate seul) et le SI, sur la fonction mitochondriale. Ainsi, nous pourrions élucider si le SN est responsable pour la création d'un environnement métabolique favorable au déclenchement des crises ainsi que pour la capacité limitée de répondre à d'autres sources de stress tels que l'infection/inflammation. Ces données pourraient être comparées avec l'évaluation des apports nutritionnels des patients LSFC ainsi que leurs profils métaboliques. Également, il serait intéressant de vérifier l'effet du TNF- $\alpha$  sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B afin de vérifier si cette voie représente un mécanisme impliqué dans la survie des fibroblastes que nous avons observée dans notre étude.

En ce qui concerne les souris HKO, elles constituent le seul modèle animal disponible pour étudier la maladie *in vivo* et *ex vivo*. Ce modèle, présentant une hépatopathie caractéristique de maladie mitochondriale, nous a permis de confirmer en conditions basales que des atteintes

hépatiques ont des répercussions importantes sur la morphologie cérébrale des souris surtout au niveau du tronc cérébral. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour investiguer les mécanismes par lesquels l'ablation du gène LRPPRC hépatique a causé la perte neuronale des souris HKO. À cet égard, il serait intéressant de mesurer les concentrations de lactate, de cytokines pro-inflammatoires et de palmitate circulants de ces souris. En plus, puisqu'aucun changement dans la population cellulaire totale a été trouvé chez les souris HKO, il serait important de vérifier d'autres populations cellulaires telles que les cellules microgliales. En effet, ces cellules sont responsables du système de défense immunitaire ainsi que de la réparation tissulaire du SNC face aux lésions (Fischer & Maier, 2015). Aussi, malgré les limitations de notre modèle concernant l'ablation de LRPPRC uniquement au foie, les souris HKO pourrait nous aider à explorer *in vivo* les mécanismes de déclenchement des crises acidotiques à travers l'induction des différentes sources de stress explorées au niveau cellulaire. De plus, l'étude des mécanismes de production d'énergie OCR et ECAR serait également intéressante à réaliser chez les souris HKO. Ainsi, il serait possible de déterminer si l'ablation hépato-spécifique de LRPPRC est associée à un mécanisme compensatoire, tel que décrit dans le modèle cellulaire. Aussi, la caractérisation de la BHE chez la souris HKO serait importante à réaliser afin de vérifier son intégrité et sa contribution potentielle à la physiopathologie du LSFC. Finalement, il serait pertinent de valider si la supplémentation en acides gras O3 jouerait un rôle dans la prévention des marqueurs de crises ainsi que de la mort neuronale chez les souris HKO.

En conclusion, notre étude a permis d'identifier certains mécanismes par lesquels l'ablation de LRPPRC contribue à la mort cellulaire et à la dysfonction mitochondriale. De façon intéressante, notre étude a également permis l'identification des acides gras O3 comme agent préventif et thérapeutique potentiel pour les patients atteints du LSFC. Par contre, d'autres études, de nature fondamentale et clinique, sont nécessaires afin de valider leur effet et leur innocuité dans le contexte du LSFC. En attendant ces études, l'adoption de saines habitudes de vie constitue la meilleure arme pour la prévention des crises chez les patients atteints du LSFC. L'alimentation est un élément-clé de ces habitudes de vie puisqu'elle exerce un impact important sur le maintien d'un environnement métabolique stable et l'amélioration du système

immunitaire. Ainsi, une saine alimentation adaptée aux besoins nutritionnels et aux manifestations cliniques de la maladie est essentielle pour les patients atteints de LSFC.

## Bibliographie

A. Altomare, D., & R. Khaled, A. (2012). Homeostasis and the Importance for a Balance Between AKT/mTOR Activity and Intracellular Signaling. *Current Medicinal Chemistry*, 19(22), 3748-3762.

Abadie, V., Champagnat, J., Fortin, G., & Couly, G. (1999). Succion-déglutition-ventilation et gènes du développement du tronc cérébral. *Archives de Pédiatrie*, 6(10), 1043-1047.

Angin, Y., Beauloye, C., Horman, S., & Bertrand, L. (2016). Regulation of Carbohydrate Metabolism, Lipid Metabolism, and Protein Metabolism by AMPK. *EXS*, 107, 23-43.

Ascah, A. (2011). Vulnérabilité cardiaque au stress au cours du remodelage ventriculaire pathologique : rôle de la mitochondrie et du pore de perméabilité transitionnelle (PTP). Consulté à l'adresse <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/5233>.

Ascenzi, P., Coletta, M., Wilson, M. T., Fiorucci, L., Marino, M., Polticelli, F., Santucci, R. (2015). Cardiolipin–cytochrome c complex: Switching cytochrome c from an electron-transfer shuttle to a myoglobin- and a peroxidase-like heme-protein. *IUBMB Life*, 67(2), 98-109.

Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. c. s., & Rani, V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*, 255(1), 7-19.

Bakthavachalam, P., & Shanmugam, P. S. T. (2017). Mitochondrial dysfunction – Silent killer in cerebral ischemia. *Journal of the Neurological Sciences*, 375, 417-423.

Balaban, R. S. (2012). Metabolic homeostasis of the heart. *The Journal of General Physiology*, 139(6), 407-414.

Ballinger, S. W. (2013). Beyond retrograde and anterograde signalling: mitochondrial-nuclear interactions as a means for evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 111-117.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (5th éd.). W H Freeman.



- Bergersen, L. H. (2015). Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body–brain interaction. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(2), 176-185.
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 135-147.
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., & Lippe, G. (2015). The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 95(4), 1111-1155.
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392-402.
- Bilston, L. E., & SpringerLink. (2011). *Neural tissue biomechanics*. Berlin ; New York: Springer. Consulté à l'adresse <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-13890-4>.
- Bostan, A. C., Dum, R. P., & Strick, P. L. (2013). Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends in cognitive sciences*, 17(5), 241-254.
- Brooks, G. A. (1999). Are arterial, muscle and working limb lactate exchange data obtained on men at altitude consistent with the hypothesis of an intracellular lactate shuttle? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 474, 185-204.
- Burelle, Y., Bemeur, C., Rivard, M.-E., Legault, J. T., Boucher, G., Consortium, L., Rosiers, C. D. (2015). Mitochondrial Vulnerability and Increased Susceptibility to Nutrient-Induced Cytotoxicity in Fibroblasts from Leigh Syndrome French Canadian Patients. *PLOS ONE*, 10(4), e0120767.
- Butow, R. A., & Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial Signaling: The Retrograde Response. *Molecular Cell*, 14(1), 1-15.
- Cao, J., Schwichtenberg, K. A., Hanson, N. Q., & Tsai, M. Y. (2006). Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clinical Chemistry*, 52(12), 2265-2272.
- Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D. C. (2005). Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26185-26192.

Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Molecular Medicine*, 7(12), 1503-1512.

Chujo, T., Ohira, T., Sakaguchi, Y., Goshima, N., Nomura, N., Nagao, A., & Suzuki, T. (2012). LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 40(16), 8033-8047.

Courtney, R., Ngo, D. C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S. M., & Karagiannis, T. C. (2015). Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biology Reports*, 42(4), 841-851.

Cuillerier, A. (2016). *Dysfonctions mitochondriales associées à l'acidose lactique du Saguenay-Lac-Saint-Jean révélées par l'étude d'un nouveau modèle murin de la maladie*. Montréal: Université de Montréal.

Cuillerier, A., Honarmand, S., Cadete, V. J. J., Ruiz, M., Forest, A., Deschênes, S., Burelle, Y. (2017). Loss of hepatic LRPPRC alters mitochondrial bioenergetics, regulation of permeability transition and trans-membrane ROS diffusion. *Human Molecular Genetics*, 26(16), 3186-3201.

Da Poin, A. T., El-Bacha, T., & Luz, M. R. M. P. (2010). Nutrient Utilization in Humans: Metabolism Pathways. *Nature Education*, 3 (9):11.

Dalsgaard, M. K., Quistorff, B., Danielsen, E. R., Selmer, C., Vogelsang, T., & Secher, N. H. (2004). A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. *The Journal of Physiology*, 554(Pt 2), 571-578.

Darin, N., Oldfors, A., Moslemi, A. R., Holme, E., & Tulinius, M. (2001). The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Annals of Neurology*, 49(3), 377-383.

De Oliveira, M. R., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Jardim, F. R. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and mitochondria, back to the future. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 76-92.

Debray, F.-G., Lambert, M., Chevalier, I., Robitaille, Y., Decarie, J.-C., Shoubbridge, E. A., Mitchell, G. A. (2007). Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases. *Pediatrics*, 119(4), 722-733.

Debray, F.-G., Morin, C., Janvier, A., Villeneuve, J., Maranda, B., Laframboise, R., Mitchell, G. A. (2011). LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 48(3), 183-189.

DiMauro, S., Schon, E. A., Carelli, V., & Hirano, M. (2013). The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nature reviews. Neurology*, *9*(8), 429-444.

Dimmer, K. S., & Scorrano, L. (2006). (De) constructing Mitochondria: What For? *Physiology*, *21*(4), 233-241.

Doenst, T., Nguyen, T. D., & Abel, E. D. (2013). Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circulation Research*, *113*(6), 709-724.

Finsterer, J. (2008). Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatric Neurology*, *39*(4), 223-235.

Fischer, R., & Maier, O. (2015). Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.

Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(12), 780-788.

Gibson, K., Halliday, J. L., Kirby, D. M., Yaplito-Lee, J., Thorburn, D. R., & Boneh, A. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders presenting in neonates: clinical manifestations and enzymatic and molecular diagnoses. *Pediatrics*, *122*(5), 1003-1008.

Giorgi, C., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Pinton, P. (2012). Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*, *12*(1), 77-85.

Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*, 16080.

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(9), 505-513.

Hardie, D. G. (2015). AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, *33*, 1-7.

Hayashi, G., & Cortopassi, G. (2015). Oxidative Stress in Inherited Mitochondrial Diseases. *Free radical biology & medicine*, *88*(0 0), 10-17.

Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, *16*(8), 539-548.

Ivanov, V. N., Zhou, H., Ghandhi, S. A., Karasic, T. B., Yaghoubian, B., Amundson, S. A., & Hei, T. K. (2010). Radiation-induced bystander signaling pathways in human fibroblasts: a role for interleukin-33 in the signal transmission. *Cellular Signalling*, *22*(7), 1076-1087.

Kartikasawah, A., & LH, N. (2010). Leigh syndrome: MRI findings in two children. *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, *6*(1).

Khan, M. J., Alam, M. R., Waldeck-Weiermair, M., Karsten, F., Groschner, L., Riederer, M., Malli, R. (2012). Inhibition of Autophagy Rescues Palmitic Acid-induced Necroptosis of Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(25), 21110-21120.

Koopman, W. J., Beyrath, J., Fung, C., Koene, S., Rodenburg, R. J., Willems, P. H., & Smeitink, J. A. (2016). Mitochondrial disorders in children: toward development of small-molecule treatment strategies. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(4), 311-327.

Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(12).

Legault, J., Larouche, P.-L., Côté, I., Bouchard, L., Pichette, A., Robinson, B. H., & Morin, C. (2011). Low-concentration methylene blue maintains energy production and strongly improves survival of Leigh syndrome French Canadian skin fibroblasts. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, *14*(3), 438-449.

Leigh, D. (1951). Subacute Necrotizing Encephalomyelopathy in an Infant. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *14*(3), 216-221.

Leigh, P. N., Al-Sarraj, S., & DiMauro, S. (2015). Subacute necrotising encephalomyelopathy (Leigh's disease; Leigh syndrome). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, jnnp-2012-304601.

Les diététistes du Canada. (2013). Sources alimentaires d'acides gras oméga-3.

Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113), 787-795.

Lodhi, I. J., Wei, X., & Semenkovich, C. F. (2011). Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *22*(1), 1-8.

- Malgorzata-Miller, G., Heinbockel, L., Brandenburg, K., van der Meer, J. W. M., Netea, M. G., & Joosten, L. A. B. (2016). Bartonella quintana lipopolysaccharide (LPS): structure and characteristics of a potent TLR4 antagonist for in-vitro and in-vivo applications. *Scientific Reports*, 6.
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M. R., Su, Y. A., Rennert, O. M., & Chrousos, G. P. (2007). Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 18(5), 190-198.
- Martin, H. L., Adams, M., Higgins, J., Bond, J., Morrison, E. E., Bell, S. M., Tomlinson, D. C. (2014). High-content, high-throughput screening for the identification of cytotoxic compounds based on cell morphology and cell proliferation markers. *PloS One*, 9(2), e88338.
- Mayer, C. M., & Belsham, D. D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 151(2), 576-585.
- McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1353-1363.
- Merante, F., Petrova-Benedict, R., MacKay, N., Mitchell, G., Lambert, M., Morin, C., Robinson, B. H. (1993). A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *American Journal of Human Genetics*, 53(2), 481-487.
- Mescher, A. L. (2017). Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxford, England)*, 4(2), 39-53.
- Micheau, O. (2004). To die or not to die? un modèle de la signalisation dichotomique de TNF-R1, 20(2). Consulté à l'adresse [www.erudit.org](http://www.erudit.org)
- Mootha, V. K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Lander, E. S. (2003). Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 605-610.
- Morin, C., Mitchell, G., Larochelle, J., Lambert, M., Ogier, H., Robinson, B. H., & De Braekeleer, M. (1993). Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *American Journal of Human Genetics*, 53(2), 488-496.
- Mourier, A., Ruzzenente, B., Brandt, T., Kühlbrandt, W., & Larsson, N.-G. (2014). Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Human Molecular Genetics*, 23(10), 2580-2592.

Mukaneza, Y. (2014). Effet de la mutation du gène *lrpprc* sur l'activité de l'AMPK dans les fibroblastes des patients atteints du syndrome de Leigh, type canadien français. Consulté à l'adresse <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/10981>

Murphy, M. P., & Smith, R. A. J. (2007). Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 629-656.

Nasrallah, C. M., & Horvath, T. L. (2014). Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(11), 650-658.

Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*, 148(6), 1145-1159.

Overgaard, M., Rasmussen, P., Bohm, A. M., Seifert, T., Brassard, P., Zaar, M., Secher, N. H. (2012). Hypoxia and exercise provoke both lactate release and lactate oxidation by the human brain. *The FASEB Journal*, 26(7), 3012-3020.

Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30409-30412.

Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20(2), 87-103.

Parikh, S., Goldstein, A., Koenig, M. K., Scaglia, F., Enns, G. M., Saneto, R., DiMauro, S. (2015). Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(9), 689-701.

Parpura, V., Haydon, P. G., & SpringerLink. (2009). *Astrocytes in (patho) physiology of the nervous system*. New York: Springer.

Picard, M., Juster, R.-P., & McEwen, B. S. (2014). Mitochondrial allostatic load puts the « gluc » back in glucocorticoids. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(5), 303-310.

Picard, M., & McEwen, B. S. (2014). Mitochondria impact brain function and cognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 7-8.

Picard, M., Shirihai, O. S., Gentil, B. J., & Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(6), R393-R406.

Pinel, A., Rigaudière, J.-P., Laillet, B., Pouyet, C., Malpuech-Brugère, C., Lenoir, V., Capel, F. (2014). P153: Les acides gras omega-3 A longue chaîne réduisent la lipotoxicité induite par le

palmitate en modifiant son métabolisme et son stockage dans la cellule musculaire C2C12. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 28, S148.

Piran, S., Liu, P., Morales, A., & Hershberger, R. E. (2012). Where genome meets phenome: rationale for integrating genetic and protein biomarkers in the diagnosis and management of dilated cardiomyopathy and heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(4), 283-289.

Poole, O. V., Hanna, M. G., & Pitceathly, R. D. S. (s. d.). Mitochondrial Disorders: Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Discovery Medicine*, 20(111), 325-331.

Rivard, M.-E. (2011). Impact de facteurs sanguins et d'agents thérapeutiques sur la survie de fibroblastes de sujets atteints de la forme canadienne-française du syndrome de Leigh (LSFC). Consulté à l'adresse <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/4760>

Rose, C. F. (2010). Increase brain lactate in hepatic encephalopathy: cause or consequence? *Neurochemistry International*, 57(4), 389-394.

Ruzzenente, B., Metodiev, M. D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C. B., Cámara, Y., Larsson, N.-G. (2012). LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *The EMBO Journal*, 31(2), 443-456.

Sakamoto, A., Saotome, M., Hasan, P., Satoh, T., Ohtani, H., Urushida, T., Hayashi, H. (2017). Eicosapentaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipotoxicity via the AMP kinase/dynamin-related protein-1 signaling pathway in differentiated H9c2 myocytes. *Experimental Cell Research*, 351(1), 109-120.

Saneto, R. P., & Sedensky, M. M. (2013). Mitochondrial disease in childhood: mtDNA encoded. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 10(2), 199-211.

Sasarman, F., Nishimura, T., Antonicka, H., Weraarpachai, W., Shoubridge, E. A., Allen, B., Shoubridge, E. A. (2015). LRPPRC. *Human Molecular Genetics*, 24(2), 480-491.

Sasarman, F., Nishimura, T., Antonicka, H., Weraarpachai, W., Shoubridge, E. A., & LSFC Consortium. (2015). Tissue-specific responses to the LRPPRC founder mutation in French Canadian Leigh Syndrome. *Human Molecular Genetics*, 24(2), 480-491.

Seahorse Bioscience Inc. (2013). XFe 24 Extracellular Flux Analyzer Manual.

Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., & Wang, G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23757-23763.

- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(6), 361-374.
- Shih, M. T., Singh, A. K., Wang, A.-M., & Patel, S. (2004). Brain lesions with elevated lactic acid peaks on magnetic resonance spectroscopy. *Current Problems in Diagnostic Radiology*, 33(2), 85-95.
- Sofou, K., De Coo, I. F. M., Isohanni, P., Ostergaard, E., Naess, K., De Meirleir, L., ... Darin, N. (2014). A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 52.
- Sorokina, N., O'Donnell, J. M., McKinney, R. D., Pound, K. M., Woldegiorgis, G., LaNoue, K. F., Lewandowski, E. D. (2007). Recruitment of compensatory pathways to sustain oxidative flux with reduced carnitine palmitoyltransferase I activity characterizes inefficiency in energy metabolism in hypertrophied hearts. *Circulation*, 115(15), 2033-2041.
- Stark, H., Fichtner, M., König, R., Lorkowski, S., & Schuster, S. (2015). Causes of upregulation of glycolysis in lymphocytes upon stimulation. A comparison with other cell types. *Biochimie*, 118, 185-194.
- Suliman, H. B., & Piantadosi, C. A. (2016). Mitochondrial Quality Control as a Therapeutic Target. *Pharmacological Reviews*, 68(1), 20-48.
- Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 6(5), 389-402.
- Thombare, K., Ntika, S., Wang, X., & Krizhanovskii, C. (2017). Long chain saturated and unsaturated fatty acids exert opposing effects on viability and function of GLP-1-producing cells: Mechanisms of lipotoxicity. *PLoS ONE*, 12(5).
- Thompson Legault, J., Strittmatter, L., Tardif, J., Sharma, R., Tremblay-Vaillancourt, V., Aubut, C., Des Rosiers, C. (2015). A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell reports*, 13(5), 981-989.
- Tumanov, S., Bulusu, V., & Kamphorst, J. J. (2015). Analysis of Fatty Acid Metabolism Using Stable Isotope Tracers and Mass Spectrometry. *Methods in Enzymology*, 561, 197-217.
- Vafai, S. B., & Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, 491(7424), 374-383.
- Van Hall, G., Strømstad, M., Rasmussen, P., Jans, O., Zaar, M., Gam, C., Nielsen, H. B. (2009). Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(6), 1121-1129.



- Wachsman, G., & Heidstra, R. (2010). The CRE/lox system as a tool for developmental studies at the cell and tissue level. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 655, 47-64.
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 12(10), 685-698.
- Wallace, D. C., & Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11).
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(12), 872-884.
- Wong, L.-J. C. (2012). Mitochondrial syndromes with leukoencephalopathies. *Seminars in Neurology*, 32(1), 55-61.
- Xu, F., Morin, C., Mitchell, G., Ackerley, C., & Robinson, B. H. (2004). The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochemical Journal*, 382(Pt 1), 331-336.
- Xue, B., Yang, Z., Wang, X., & Shi, H. (2012). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Antagonize Macrophage Inflammation via Activation of AMPK/SIRT1 Pathway. *PLOS ONE*, 7(10), e45990.
- Yao, J., & Shoubridge, E. A. (1999). Expression and functional analysis of SURF1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Human Molecular Genetics*, 8(13), 2541-2549.
- Yusoff, A. A. M., Ahmad, F., Idris, Z., Jaafar, H., & Abdullah, J. M. (2015). Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6, 25.
- Zhou, W., & Yuan, J. (2014). Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 35, 14-23.