

Université de Montréal

Modulation de la concentration du malonyl-CoA  
dans le cœur : rôle crucial du citrate.

Par

Myriame Poirier

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)

Juin, 2000

© Myriame Poirier, 2000



W  
4  
U58  
2000  
V.032

University of Minnesota

Department of the History of Art and Architecture  
The University of Minnesota

1997

History of Art

Department of the History of Art and Architecture

The University of Minnesota

Department of the History of Art and Architecture  
The University of Minnesota  
1997

1997

Department of the History of Art and Architecture



Université de Montréal  
Faculté des Études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Modulation de la concentration du malonyl-CoA  
dans le cœur : rôle crucial du citrate .

Présenté par :

Myriame Poirier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr Marc Prentki  
Directeur de recherche : Dr Christine Des Rosiers  
Membre du jury : Dr Tony Antakly

Mémoire accepté le :

## REMERCIEMENTS

*Je suis très reconnaissante au Dr Christine Des Rosiers de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Sa confiance, son précieux savoir, sa disponibilité et ses encouragements m'ont permis de réaliser le travail présenté dans ce mémoire. Je la remercie sincèrement.*

*Je remercie énormément Geneviève et Bertrand pour leur coopération, leur encouragement, leur patience et leur amitié tout au long de ma maîtrise.*

*Je remercie de tout cœur mes parents, mon frère et ma sœur qui, malgré la distance, m'ont soutenue et encouragée par leurs judicieux conseils.*

*Je remercie chaleureusement mon copain Marc-André pour son soutien moral grandement apprécié tout au long de ma maîtrise.*

## **DÉDICACE**

**À ceux qui me comblent de bonheur;  
mes parents,  
mon frère, ma soeur  
et Marc-André.**

## SOMMAIRE

Le taux de mortalité demeure élevé chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires et ce, malgré les améliorations considérables dans le domaine de la chirurgie cardiaque et des interventions pharmacologiques. Ces maladies sont aussi associées à un taux de morbidité élevé lequel résulte d'une diminution de la performance du coeur des patients ayant subi un infarctus. Une meilleure compréhension des mécanismes ou facteurs responsables de cette diminution de la performance du coeur est nécessaire au développement et à l'optimisation de thérapies protectrices ou salvatrices. Parmi les nombreux facteurs potentiellement impliqués dans la dysfonction du coeur se retrouvent des perturbations du métabolisme énergétique du coeur.

Dans le présent mémoire, l'accent est mis sur la clarification du rôle du citrate cytosolique et de son rôle comme signal moléculaire, modulant la sélection des substrats utilisés par le coeur pour sa contraction. Le citrate est le premier intermédiaire du cycle de Krebs, lequel processus est crucial pour la production d'énergie dans le coeur. Depuis longtemps, le citrate est reconnu comme un inhibiteur de la glycolyse via la phosphofructokinase (le cycle glucose-acide gras de Randle). Récemment, le citrate a reçu une attention particulière pour son implication potentielle en tant que précurseur du malonyl-CoA, un inhibiteur de l'oxydation des acides gras via la carnitine palmitoyl-CoA transférase I.

L'hypothèse du présent mémoire prédit que le citrate, suite à son transfert de la mitochondrie au cytosol ou cataplérose, fournit l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse du malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase. Ce problème a été abordé en utilisant un modèle d'étude *in vitro*, soit le coeur isolé de rats perfusé selon la méthode Langendorff. Le choix des protocoles de perfusions fut un élément clé dans cette étude. De fait, il était connu que les niveaux cardiaques de malonyl-CoA fluctuent très rapidement suite à des changements de l'activité des enzymes responsables de sa synthèse et de sa dégradation, en fonction de l'apport en substrats ou de la demande énergétique du coeur. Ainsi, il s'agissait de définir des conditions permettant une synthèse active de malonyl-CoA, tel que démontré par une augmentation dans le temps des niveaux tissulaires de malonyl-

CoA. En outre, un autre élément clé de cette étude fut la mesure d'un indice des niveaux de citrate cytosolique dans l'organe intact. Celle-ci fut réalisée grâce à une technologie de pointe, soit la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, appareil reconnu pour sa grande sensibilité. Une étude récente effectuée dans le laboratoire (Vincent et al., 2000) a démontré que le taux de citrate libéré par des coeurs perfusés dans l'effluent coronarien reflète la cataplérose du citrate mitochondrial, soit le transfert du citrate de la mitochondrie au cytosol. Cette étude démontre aussi que la cataplérose du citrate est modulée par l'apport en substrats pour la synthèse de citrate mitochondrial et par la demande énergétique, en accord avec un rôle du citrate cytosolique dans la sélection des substrats. Dans la présente étude, cette cataplérose du citrate fut quantifiée et mise en relation avec la concentration du malonyl-CoA tissulaire mesurée par dosage radioenzymatique.

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent une modulation différentielle des taux de cataplérose du citrate mitochondrial et de synthèse de malonyl-CoA dans les coeurs perfusés en présence de divers mélanges de substrats, suggérant qu'entre le citrate et le malonyl-CoA, il existe plus qu'une simple relation précurseur-produit. Toutefois, cette relation complexe n'exclut par un rôle du citrate comme précurseur, puisque l'inhibition de l'ATP-citrate lyase par l'hydroxycitrate diminue la synthèse du malonyl-CoA, du moins dans les coeurs perfusés en présence de glucose, lactate, pyruvate et insuline. De fait, ce résultat supporte notre hypothèse initiale concernant le rôle du citrate comme précurseur du malonyl-CoA. Finalement, d'autres résultats suggèrent la présence d'une autre voie de synthèse du malonyl-CoA localisée dans la mitochondrie.

En conclusion, les résultats de la présente étude mettent en évidence pour la première fois, le rôle du citrate comme précurseur du malonyl-CoA dans le coeur intact. De plus, ces résultats suggèrent une régulation différentielle au niveau de la cataplérose du citrate mitochondrial et l'ATP-citrate lyase, laquelle serait indépendante de celle déjà connue au niveau de l'acétyl-CoA carboxylase cytosolique. En fait, une telle complexité de régulation de ces réactions est en accord avec les autres rôles joués par le citrate dans la cellule cardiaque, en plus de son rôle de précurseur du malonyl-CoA. D'autres études devront toutefois être réalisées afin d'obtenir des évidences directes appuyant d'une part, le rôle du citrate comme précurseur du malonyl-CoA et d'autre part, son rôle proposé

dans la sélection des substrats. Il est à prévoir que l'obtention de telles évidences nécessite l'utilisation de substrats marqués au  $^{13}\text{C}$ , afin de quantifier les taux d'oxydation des acides gras et du glucose. Une meilleure compréhension des mécanismes modulant la conversion du citrate en malonyl-CoA dans le coeur pourrait permettre entre autres de suggérer de nouvelles interventions métaboliques ciblant l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le coeur, ce qui est reconnu comme une intervention salvatrice lors de l'ischémie-reperfusion cardiaque.



## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	i
DÉDICACE.....	ii
SOMMAIRE .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTES DES FIGURES .....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
<b>I. <u>INTRODUCTION</u></b> .....	<b>1</b>
<b>I.1 <u>Préambule</u></b> .....	<b>1</b>
<b>I.2 <u>Le métabolisme énergétique du coeur</u></b> .....	<b>2</b>
<b>I.3 <u>Le métabolisme cardiaque et sa régulation</u></b> .....	<b>4</b>
I.3.1 Le métabolisme des glucides .....	5
I.3.1.1 Le transport du glucose.....	5
I.3.1.2 La glycolyse, l'oxydation du glucose et sa régulation.....	5
I.3.2 Le métabolisme des lipides et sa régulation.....	8
I.3.2.1 La $\beta$ -oxydation des acides gras.....	8
I.3.2.2 Régulation de la $\beta$ -oxydation des acides gras.....	8
I.3.3 Le cycle de Randle: une régulation concertée de l'oxydation des glucides et des lipides. ....	9
<b>I.4 <u>Le malonyl-CoA</u></b> .....	<b>11</b>
I.4.1 La carnitine palmitoyl-CoA transférase 1 .....	12
I.4.2 Composantes du métabolisme du malonyl-CoA.....	14
I.4.2.1 L'acétyl-CoA carboxylase .....	14
I.4.2.1.1 La régulation de l'acétyl-CoA carboxylase.....	15
I.4.2.2 Les précurseurs de l'acétyl-CoA cytosolique .....	15

I.4.2.2.1 Le citrate.....	15
I.4.2.2.2 L'acétyl-carnitine .....	18
I.4.2.3 L'ATP-citrate lyase.....	18
I.4.2.4 Devenir métabolique du malonyl-CoA dans le coeur.....	19
I.4.3 L'implication clinique du métabolisme du malonyl-CoA. ....	21
<b>I.5 <u>Approches méthodologiques pour l'étude du métabolisme cardiaque.</u></b> .....	<b>23</b>
I.5.1 La méthode Langendorff.....	23
I.5.2 La Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).....	23
I.5.2.1 Principes de base de la CG-SM .....	24
I.5.2.2 Principe d'analyse d'isotopomères de masse par CG-SM.....	25
<b>I.6 <u>Hypothèse et objectifs de travail</u></b> .....	<b>26</b>
<b>II. <u>MANUSCRIT</u></b> .....	<b>28</b>
<b>III. <u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u></b> .....	<b>54</b>
<b>III.1 <u>Aspects méthodologiques</u></b> .....	<b>54</b>
<b>III.2 <u>Le rôle du citrate dans la synthèse du malonyl-CoA dans le coeur.</u></b> .....	<b>56</b>
<b>III.3 <u>Perspectives futures</u></b> .....	<b>61</b>
<b>III.4 <u>Conclusion</u></b> .....	<b>62</b>
<b>IV. <u>RÉFÉRENCES</u></b> .....	<b>63</b>

## LISTES DES FIGURES

Figure 1. Causes de décès au Canada en 1995.....	1
Figure 2. Principales voies métaboliques impliquées dans la conversion des substrats énergétiques en énergie dans le coeur. ....	3
Figure 3. Aperçu général des réactions de la glycolyse et du cycle de Krebs dans une cellule cardiaque. ....	7
Figure 4. Présentation schématique de l'inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose.....	10
Figure 5. Représentation schématique du métabolisme du malonyl-CoA dans le coeur. .....	11
Figure 6. Représentation schématique du système de la CPT-1. ....	13
Figure 7. Le citrate : molécule centrale dans la régulation du glucose et des acides gras. .....	16
Figure 8. Schéma de couplage de la spectrométrie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CG-SM).....	25

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I. Les principaux sites de régulation connus des voies métaboliques impliquées dans l'utilisation des glucides et des lipides. ....	5
Tableau II. Principaux intervenant reliés au métabolisme du malonyl-CoA et à sa régulation. ....	12
Tableau III. Devenir métabolique du malonyl-CoA dans le coeur .....	20

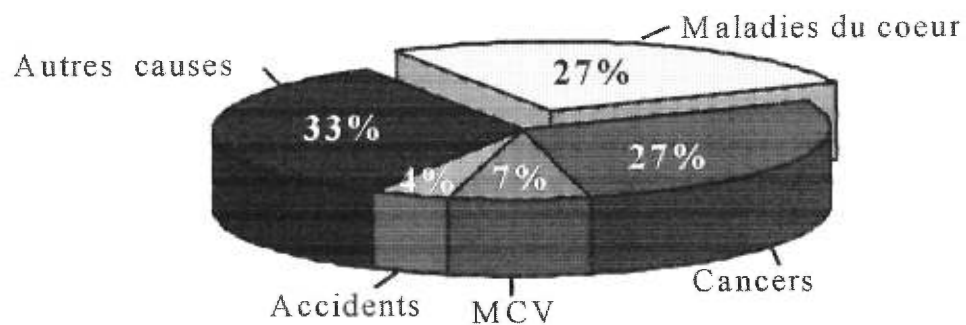
## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACC	: Acétyl-CoA carboxylase
ACL	: ATP-citrate lyase
AGCL	: Acide gras à chaîne longue
AGCM	: Acide gras à chaîne moyenne
AMPK	: Protéine kinase activée par l'AMP
CAC	: Cycle de l'acide citrique
<sup>13</sup> C	: Carbone 13
ADP	: Adénosine diphosphate
ATP	: Adénosine triphosphate
CG-SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CPT-1	: Carnitine palmitoyl-CoA transférase 1
CPT-11	: Carnitine palmitoyl-CoA transférase 11
F6P	: Fructose-6-phosphate
GAPDH	: Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
G6P	: Glucose-6-phosphate
MCD	: Malonyl-CoA décarboxylase
MCV	: Maladie cérébrale vasculaire
m/z	: Rapport masse/charge
NAD <sup>+</sup>	: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
OAA	: Oxaloacétate
PDH	: Pyruvate déshydrogénase
PFK	: Phosphofructokinase

## **I. INTRODUCTION**

### **I.1 Préambule**

Les maladies cardiovasculaires demeurent l'une des principales causes de mortalité et de morbidité au Canada (Figure 1) ainsi que dans tous les pays industrialisés et ce, malgré les progrès considérables dans le domaine de la chirurgie cardiaque et des interventions pharmacologiques. Les maladies cardiovasculaires sont caractérisées, entre autres, par des perturbations métaboliques, lesquelles compromettent l'assimilation des nutriments par le cœur pour la production d'énergie nécessaire à sa contraction. Ainsi le développement des thérapies nutritionnelles efficaces repose sur une meilleure compréhension du métabolisme des nutriments et de sa régulation dans le cœur.



**Figure 1. Causes de décès au Canada en 1995.**

**Source :Statistiques Canada**

Dans cette section, un survol des connaissances actuelles du métabolisme cardiaque et de sa régulation sera présenté. Il sera question des voies métaboliques empruntées par chacun des substrats énergétiques en insistant sur les éléments pertinents au sujet du présent mémoire. Outre les références spécifiques citées dans le texte, plusieurs références sont des articles de revue traitant de ce sujet qui ont servi à la rédaction de ce mémoire (Depré et al., 1998; Kantor et al., 1999; Lopaschuk et al., 1993; Ruderman et al., 1999; Schulz, 1994)

## **I.2 Le métabolisme énergétique du coeur**

### **I.2.1 Les substrats énergétiques**

Le bon fonctionnement du coeur dépend d'un apport continu en oxygène et en substrats exogènes, lesquels permettent une activité constante du cycle de l'acide citrique (CAC) et donc une production d'énergie sous la forme d'ATP. Le coeur est de nature omnivore (Taegtmeier, 1985); il peut utiliser une variété de substrats tels le glucose, le lactate, les acides gras, les corps cétoniques et les acides aminés (Ballard et al., 1960, Bing et al., 1954, Blain et al., 1956). La figure 2 illustre les principales voies métaboliques du myocarde impliquées dans la conversion des substrats en énergie. La majorité de l'énergie provient de l'oxydation des glucides, soit le glucose et le lactate, à l'état nourri, alors que l'oxydation des acides gras à chaîne longue (AGCL) prédomine lors du jeûne (Neely et al., 1974).

La contribution relative des substrats exogènes à la production d'énergie dépend de nombreux facteurs, dont les concentrations plasmatiques de ces substrats (Bing, 1955). De plus, l'entrée de ces substrats dans la cellule, aussi bien que la synthèse et la dégradation des réserves de substrats emmagasinés, sont contrôlées par les fluctuations hormonales (insuline, glucagon, catécholamines) ainsi que par l'état physiologique du myocarde (l'état nutritionnel, la charge de travail, la disponibilité en oxygène) (Keul et al., 1965, Krebs et al., 1971, Taegtmeier et al., 1985). Les glucides, d'importance majeure pour le métabolisme énergétique cardiaque dans des conditions physiologiques, sont le glucose et le lactate comme substrats exogènes et le glycogène comme substrat

endogène. Le glycogène est emmagasiné dans le cytoplasme des cellules cardiaques sous forme de gros granules. Par ailleurs, les acides gras à chaîne longue (AGCL) dont, le palmitate et l'oléate, sont fournis au coeur majoritairement par la circulation, car la capacité des cellules cardiaques à les synthétiser *de novo*, est faible (Gilbertson, 1977). Les AGCL, emmagasinés principalement dans le tissu adipeux sous forme d'esters de triglycérides, constituent la réserve principale de substrats pour un bon nombre de tissus ou d'organes.

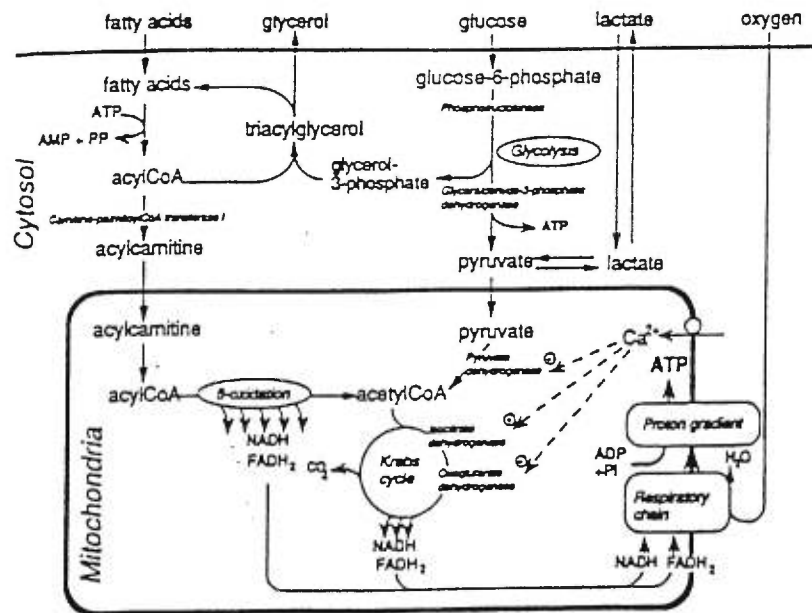


Figure 2. Principales voies métaboliques impliquées dans la conversion des substrats énergétiques en énergie dans le coeur. Tiré de Lerch R. (Lerch, 1993)

### I.2.2 D'où provient l'ATP ?

La chaîne respiratoire mitochondriale est le principal site de formation d'ATP du coeur normoxique. En présence d'oxygène, celle-ci oxyde des équivalents réduits, principalement le NADH formé lors du métabolisme des divers substrats. Elle génère ainsi un gradient de protons, qui est utilisé par l'ATP synthase pour convertir l'ADP, formé principalement lors de la contraction musculaire en ATP (phosphorylation oxydative). La production d'ATP repose sur l'activité mitochondriale continue du CAC, laquelle est maintenue grâce à un apport constant en acétyl-CoA et en oxaloacétate (OAA).



### **I.3 Le métabolisme cardiaque et sa régulation**

Le terme métabolisme vient d'un mot grec qui veut dire "changement". Le métabolisme cardiaque est caractérisé par un grand nombre de réactions interreliées, catalysées par des enzymes hautement régulées qui ensemble, orchestrent les besoins en énergie du muscle cardiaque. La balance énergétique du coeur est assurée grâce à des mécanismes complexes de régulations qui équilibrent la vitesse d'oxydation du glucose et des acides gras d'après les besoins en énergie (Kantor et al., 1999). Le bon fonctionnement du coeur est rendu possible grâce à l'harmonie d'un système interactif complexe de protéines, de bases puriques, de membranes, d'ions, et de signaux moléculaires. Le coeur possède une grande capacité d'ajustement et d'adaptation dès le moindre changement environnemental.

Il existe une relation étroite entre l'utilisation du glucose et des acides gras. La régulation du flux des substrats à travers les diverses réactions est complexe et fait intervenir divers facteurs dont les rapports  $[ATP]/[ADP]$ ,  $[NADH]/[NAD^+]$  ainsi que le calcium (Lerch, 1993). Ces facteurs modulent entre autres l'activité de plusieurs enzymes de la glycolyse et du CAC (Tableau I). Ainsi, grâce à cette régulation, le flux des substrats à travers les diverses réactions s'ajuste aux besoins énergétiques du coeur lesquels sont déterminés par la vitesse d'hydrolyse de l'ATP en ADP, résultant principalement de la contraction musculaire. L'oxydation des glucides et des acides gras fait l'objet d'une régulation réciproque et concertée. Le cycle glucose-acide gras, décrit par Randle, démontre la régulation des glucides par les acides gras (voir ci-dessous) (Randle et al., 1963). Par ailleurs, il est proposé que la régulation des acides gras par les glucides se situe au niveau du malonyl-CoA et de la carnitine palmitoyl-CoA transférase 1 (CPT-1) enzyme qui limite l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie.

**Tableau I. Les principaux sites de régulation connus des voies métaboliques impliquées dans l'utilisation des glucides et des lipides.**

Voies Métaboliques	Sites de régulation	Modulateurs/Effecteurs
Glycolyse	PFK	Citrate, [ATP]/[ADP]
	GAPDH	[NADH]/[NAD <sup>+</sup> ]
PDH		[ATP]/[ADP], [Acétyl-CoA]/[CoA], [NADH]/[NAD <sup>+</sup> ], calcium, phosphorylation/déphosphorylation
$\beta$ -oxydation des acides gras	CPT-1	Malonyl-CoA

### **I.3.1 Le métabolisme des glucides**

#### **I.3.1.1 Le transport du glucose**

Les transporteurs spécifiques du glucose dans le cœur sont la famille des GLUT. Le transporteur principal exprimé à la surface des cardiomyocytes est le GLUT 4 (Depré et al., 1998). Ce transporteur, sensible à l'insuline, est également exprimé dans les tissus adipeux et les muscles squelettiques. L'insuline augmente le contenu en ARNm du transporteur GLUT4 et stimule sa translocation dans la membrane plasmique (Depré et al., 1998). Quand le transport du glucose est stimulé par l'insuline, l'activité de l'hexokinase, première enzyme de la glycolyse, devient limitante. L'entrée du glucose dans le cœur est aussi modulée par les substrats et la charge de travail du cœur. Ainsi, le pyruvate diminue l'entrée du glucose. Par ailleurs, une augmentation de la charge de travail du cœur entraîne une stimulation de la translocation du transporteur du glucose dans le cœur, en plus d'augmenter la captation du lactate (Gertz et al., 1988). L'augmentation de l'entrée du glucose en fonction de la charge de travail du cœur permet au flux glycolytique de s'adapter à la demande d'énergie.

#### **I.3.1.2 La glycolyse, l'oxydation du glucose et sa régulation**

La glycolyse est un processus biochimique qui transforme le glucose en pyruvate et éventuellement en lactate (Figure 3). Le produit final de la glycolyse aérobie est le pyruvate; sa destination principale ainsi que celle du NADH produit par la glycolyse est l'oxydation mitochondriale. La réduction du pyruvate en lactate, qui reforme le NAD<sup>+</sup> est

prépondérante en absence d'oxygène. En condition aérobie, la majorité du pyruvate est transporté dans la mitochondrie où ce dernier sera soit décarboxylé et oxydé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) ou carboxylé en OAA via la pyruvate carboxylase ou l'enzyme malique. L'acétyl-CoA combiné à l'OAA formera le citrate via la citrate synthase suivi par l'oxydation complète des atomes de carbone de l'acétyl-CoA par le CAC.

Plusieurs étapes sont impliquées dans le contrôle de la glycolyse. Les principaux sites de régulation de la glycolyse se situent au niveau de la phosphofructokinase (PFK), de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Tableau I). La PFK-1, une des isoformes de la PFK, catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate (F6P) en fructose 1,6-diphosphate représentant la première étape irréversible de la glycolyse. Plusieurs effecteurs activent la PFK 1 tels le F6P, l'AMP et le fructose 2,6-diphosphate ou l'inhibent tels l'ATP, le citrate et les protons. La GAPDH est quant à elle, régulée par le rapport  $[NADH]/[NAD^+]$ .

La PDH est un complexe multienzymatique mitochondrial dont l'activité dans le coeur dépend aussi de la disponibilité en substrats, du travail cardiaque et des hormones. L'activité de la PDH est sous le contrôle d'un processus de phosphorylation/déphosphorylation ainsi que de plusieurs effecteurs (Tableau I). La PDH kinase est stimulée par l'acétyl-CoA et le NADH et est inhibée par le pyruvate. Inversement, la PDH phosphatase est activée par le  $Mg^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$ . L'adrénaline et l'AMPc sont aussi des effecteurs positifs de la PDH. L'oxydation des acides gras ou des corps cétoniques entraîne l'inactivation de la PDH. Les mécanismes par lesquels ceux-ci inhibent l'oxydation du glucose sont centrés sur des effets, sur les rapports  $[acétyl-CoA]/[CoA]$ ,  $[NADH]/[NAD^+]$  et sur l'activité de la PDH mitochondriale (Weiss et al., 1989).

Le flux glycolytique peut être altéré par la disponibilité en substrats et par des hormones telles l'insuline et l'adrénaline (Depré et al. 1998). La glycolyse est également contrôlée par des hormones dont l'adrénaline et l'insuline qui sont des stimulateurs. L'insuline stimule aussi la synthèse du glycogène, contrairement à l'adrénaline qui favorise la glycogénolyse. Le principal effet de l'insuline est de favoriser l'entrée du glucose dans le cœur, mais cette hormone agit aussi à différentes étapes de la glycolyse, par exemple en stimulant la PFK-1 et PFK-2. De plus, elle inhibe l'oxydation des acides gras en favorisant l'augmentation du malonyl-CoA. Donc, sous l'action de l'insuline, l'utilisation des glucides sera favorisée, plutôt que celle des lipides.

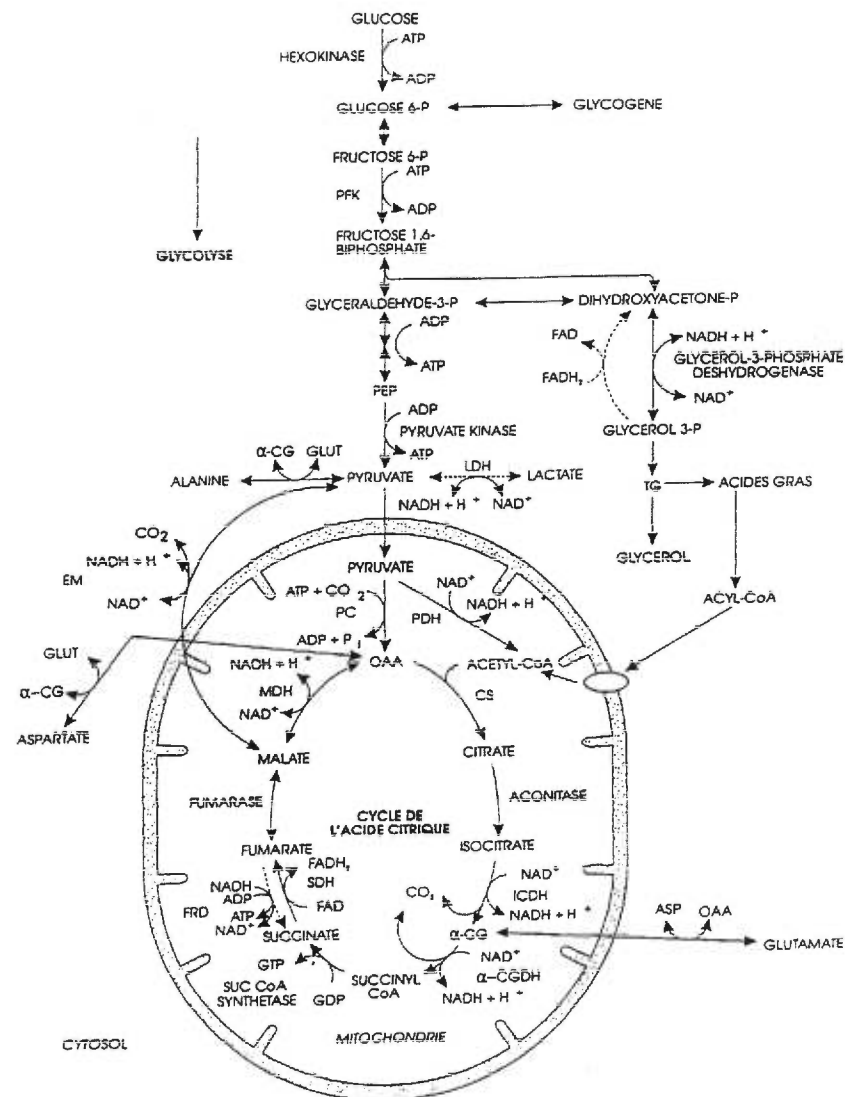


Figure 3. Aperçu général des réactions de la glycolyse et du cycle de Krebs dans une cellule cardiaque.

### **I.3.2 Le métabolisme des lipides et sa régulation**

#### **I.3.2.1 La $\beta$ -oxydation des acides gras**

Pour une même quantité de substrats oxydés, les acides gras permettent une plus grande production d'ATP. Les acides gras utilisés par le cœur sont principalement les AGCL liés à l'albumine et aux esters acides présents dans les chylomicrons et les lipoprotéines de très faibles densités. Les mécanismes qui régissent la captation des acides gras libres par la cellule demeurent un sujet controversé. Il est proposé que les acides gras libres entrent dans la cellule par des transporteurs ou par une diffusion passive à travers la membrane. (Van der Vusse et al., 1992). Une fois dans le cytoplasme, les acides gras se lient aux protéines de liaison des acides gras et sont activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase. Les acyl-CoA sont alors transportés dans la mitochondrie par un complexe enzymatique qui comprend la CPT-1, la carnitine-acylcarnitine translocase, et la CPT-2. Une fois dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA passent à travers le complexe multienzymatique de la  $\beta$ -oxydation pour produire l'acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA est ensuite métabolisé dans le CAC, entraînant ainsi la production de 2  $\text{CO}_2$ , 3 NADH et 1  $\text{FADH}_2$ .

En ce qui concerne les acides gras à chaîne moyenne (AGCM) comme l'octanoate, contrairement aux AGCL, ils peuvent passer directement à travers la membrane interne de la mitochondrie. Ces derniers peuvent alors être activés directement dans la matrice mitochondriale par une acyl-CoA synthétase à chaîne moyenne. Donc, la  $\beta$ -oxydation des AGCM n'est pas régulée au niveau de la CPT-1 contrairement aux AGCL. Les AGCM ne sont toutefois pas des substrats physiologiques.

#### **I.3.2.2 Régulation de la $\beta$ -oxydation des acides gras**

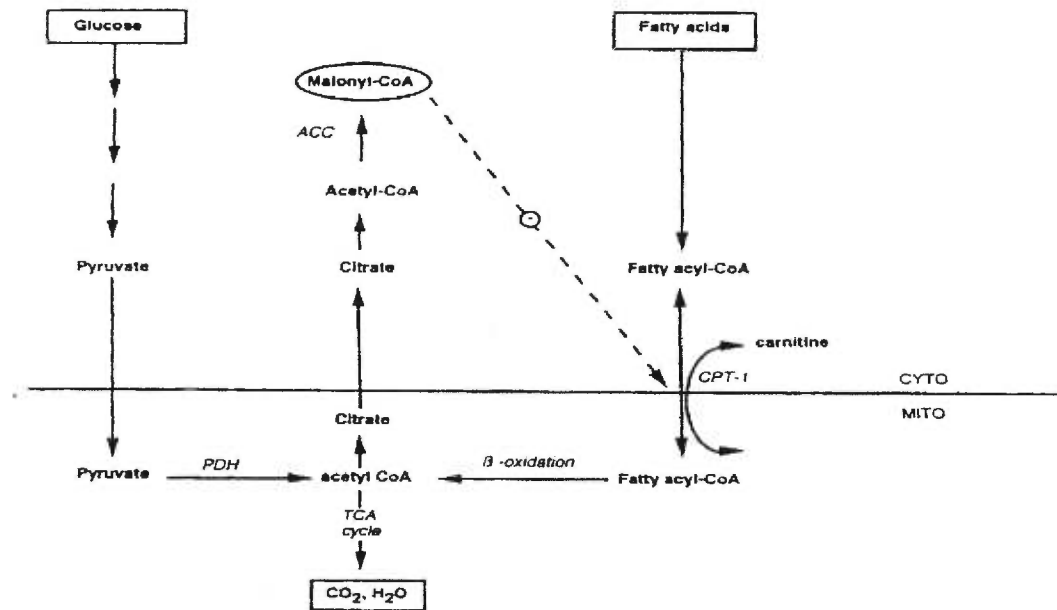
La  $\beta$ -oxydation des acides gras en acétyl-CoA, un processus exclusivement mitochondrial, est catalysée par un complexe multienzymatique dont l'activité dépend de la présence d'oxygène. La vitesse de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le cœur dépend de la disponibilité des acides gras exogènes ainsi que de l'utilisation de l'énergie par les tissus (Neely et al., 1974). Ainsi, lorsque l'apport en acides gras est élevé, la  $\beta$ -oxydation

dépend principalement de la demande énergétique. Des études effectuées sur des coeurs de rats perfusés ont démontré que les rapports  $[NADH]/[NAD^+]$  et  $[acétyl-CoA]/[CoA]$  diminuent en réponse à une augmentation de la demande en énergie consécutive à une augmentation de la charge de travail imposée aux coeurs (Oram et al., 1973 et Neely et al., 1976). La diminution du rapport  $[acétyl-CoA]/[CoA]$  favorise l'activité de la 3-oxoacyl-CoA thiolase et de l'acyl-CoA déshydrogénase. Inversement, une diminution de la demande en ATP aura pour conséquence d'augmenter le niveau d'acétyl-CoA intramitochondrial et de diminuer l'activité de ces enzymes. Par ailleurs, les hormones comme le glucagon, l'épinéphrine et l'insuline affectent indirectement la  $\beta$ -oxydation dans le myocarde en contrôlant la disponibilité des substrats. Finalement, depuis quelques années, plusieurs évidences expérimentales indiquent que le principal site de régulation de l'oxydation des acides gras dans le coeur est au niveau de l'entrée de ces derniers dans la mitochondrie. L'enzyme clé impliquée dans ce processus est la CPT-1, laquelle est inhibée par le malonyl-CoA. Puisque reliée au présent projet de recherche, cette régulation par le malonyl-CoA fera l'objet d'une section séparée (section I.5).

### **I.3.3 Le cycle de Randle: une régulation concertée de l'oxydation des glucides et des lipides.**

Il convient de consacrer une section au cycle de Randle, puisque ce dernier a été le premier à proposer en 1963 un mécanisme permettant une régulation concertée du métabolisme glucidique et lipidique (Randle et al., 1963). Le cycle de Randle prédit qu'en présence d'une concentration élevée de lipides, une augmentation de leur oxydation inhibe le métabolisme glucidique en agissant principalement au niveau de la PDH. D'autre part, suite à l'augmentation du citrate mitochondrial causée par une production accélérée d'acétyl-CoA dérivé des acides gras, le citrate cytosolique augmente et inhibe la PFK, résultant en une inhibition du flux glycolytique. Le glucose serait alors transformé en glycogène. En résumé, le cycle de Randle prédit qu'une augmentation de l'apport en substrats dérivés des acides gras entraîne l'inhibition de la glycolyse et de l'oxydation du glucose. Les points de contrôle de ce cycle se situent au niveau de la PFK-1 dans le cytosol, et de la PDH dans la mitochondrie.

Une lacune du cycle de Randle tel que décrit initialement résidait dans l'incapacité à expliquer comment l'utilisation des glucides inhibe celle des lipides. Plus tard, en 1978, les travaux de McGarry (McGarry et al., 1978) ont permis de mettre en évidence un mécanisme par lequel le métabolisme du glucose pouvait supprimer l'oxydation des acides gras. Pour la première fois le malonyl-CoA fut suggéré comme un inhibiteur de la CPT-1 (McGarry et al., 1979). Ce mécanisme implique l'inhibition de la CPT-1 par le malonyl-CoA, tel qu'illustré à la figure 4, et un rôle modulateur crucial joué par l'insuline. Depuis lors, ce mécanisme de régulation a fait l'objet de nombreuses études, et s'avère bien documenté et accepté dans les tissus lipogéniques comme le foie et les tissus adipeux (voir Saggerson et al., 1992, pour revue). Toutefois, l'étude de ce mécanisme dans les tissus non-lipogéniques comme les cellules  $\beta$ , le muscle squelettique et le coeur, est plus récente et s'avère le sujet de la prochaine section de ce mémoire.



**Figure 4. Présentation schématique de l'inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose. Tiré de Depré et al., 1998.**

#### I.4 Le malonyl-CoA

Dans les cellules animales lipogéniques, le malonyl-CoA possède trois fonctions métaboliques. Premièrement, il fournit les carbones nécessaires à la synthèse *de novo* du palmitate. Deuxièmement, il est requis pour l'élongation des acides gras dans le réticulum endoplasmique. Enfin, il contrôle l'oxydation des acides gras en inhibant la CPT-1. Dans les tissus non-lipogéniques, comme les cellules  $\beta$ , les muscles squelettiques et cardiaques où la synthèse *de novo* d'acides gras est quasi inexistante, le rôle principal du malonyl-CoA est de contrôler l'oxydation des acides gras. Ce rôle du malonyl-CoA dans les cellules  $\beta$  et le muscle squelettique a fait l'objet d'articles de revue récentes (Prentki et Corkey, 1996, Ruderman et al., 1999). Il est proposé que le malonyl-CoA est un signal cytosolique reflétant l'abondance en glucose. Il aurait la propriété de réguler la répartition des substrats par l'inhibition de la CPT-1. L'intérêt pour le mécanisme de régulation faisant intervenir l'interaction malonyl-CoA/CPT-1 est suscité par la possibilité qu'une dysrégulation soit reliée à plusieurs pathologies citées au palmarès des ennemis numéro 1 de la santé tels que l'ischémie cardiaque et le diabète.

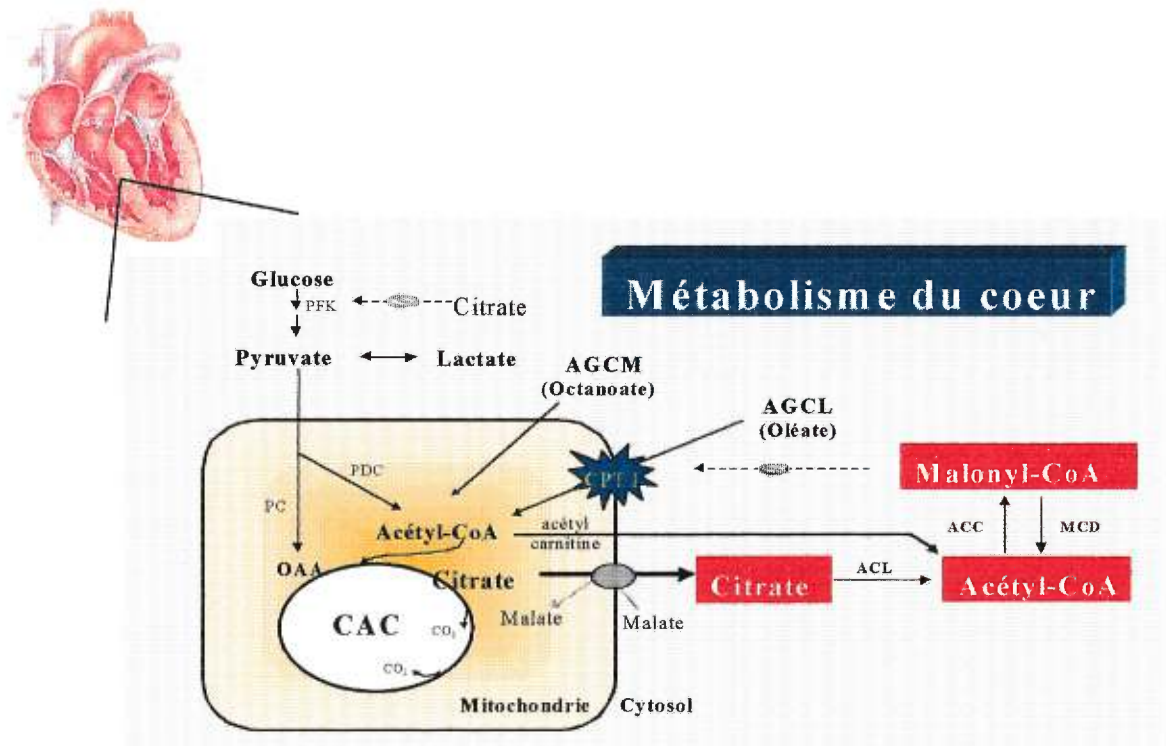


Figure 5. Représentation schématique du métabolisme du malonyl-CoA dans le coeur.



Afin de mieux comprendre le rôle du malonyl-CoA dans la maladie, il est primordial de connaître son métabolisme ainsi que sa régulation. La figure 5 illustre les étapes importantes menant à la formation du malonyl-CoA dans le cœur. Dans la présente section, seront d'abord revues les connaissances actuelles sur le rôle du malonyl-CoA dans l'inhibition de la CPT-1 et sur les principales composantes du métabolisme du malonyl-CoA (Lopaschuk et al. 1994, Awan et Saggerson, 1993, Thampy, 1989) Un résumé des principaux intervenants reliés au malonyl-CoA est retrouvé dans le Tableau II. Pour terminer cette section, l'implication clinique d'une dysrégulation au niveau du malonyl-CoA sera brièvement discutée.

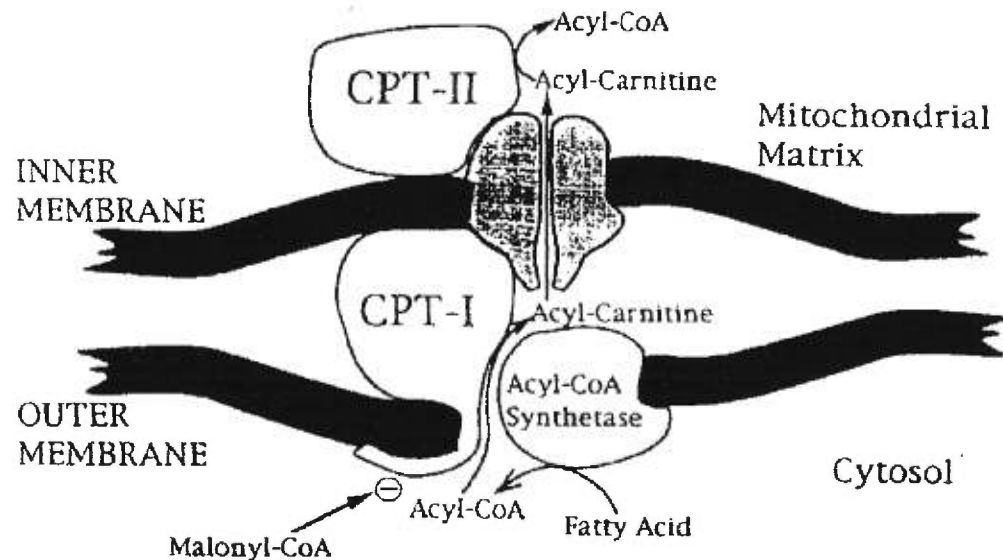
**Tableau II. Principaux intervenants reliés au métabolisme du malonyl-CoA et à sa régulation.**

Rôles	Enzymes/Métabolites	Modulateurs/Effecteurs
Cible	CPT-1	Négatif : <b>Malonyl-CoA</b>
Synthèse	Acétyl-CoA carboxylase (ACC)	Positifs : <b>Glucose, insuline, citrate</b> Négatifs : <b>Malonyl-CoA, AGCL, AMPK</b>
Précurseur	Citrate cytosolique Acétylcarnitine	Positif : <b>Abondance en substrats mitochondriaux</b>
Dégradation	Malonyl-CoA Décarboxylase (MCD)	<b>Inconnu</b>

#### **I.4.1 La carnitine palmitoyl-CoA transférase 1**

La CPT-1 est située sur la surface interne de la membrane externe de la mitochondrie. La CPT-1 fait partie d'un complexe CPT-1/carnitine/CPT-2 (voir la Figure 6). Elle est une enzyme régulant l'entrée des AGCL dans la mitochondrie. La CPT-1 échange une molécule de coenzyme A pour une molécule de carnitine, ce qui permet le transfert du groupement acyl dans la mitochondrie. La carnitine: acylcarnitine translocase transporte

l'acylcarnitine à travers la membrane interne de la mitochondrie. La CPT-2 qui est associée à la face interne de la membrane catalyse, quant à elle, la réaction inverse qui régénère l'acyl-CoA dans la mitochondrie pour la  $\beta$ -oxydation (Lopaschuk et al., 1994).



**Figure 6. Représentation schématique du système de la CPT-1.**  
Tiré de Édouard et al., 1998.

Les tissus extra-hépatiques, comme le coeur et les muscles squelettiques, possèdent une haute activité mitochondriale de la CPT-1 (Power et al., 1997). La CPT-1 exerce un contrôle sur la vitesse de la  $\beta$ -oxydation. Cette enzyme est régulée directement par le malonyl-CoA et indirectement par deux enzymes cytosoliques importantes soit l'AMPK et l'ACC (Kantor et al., 1999). De fait, le malonyl-CoA, synthétisé dans le cytosol par l'ACC, est un puissant inhibiteur de la CPT-1. Dans le coeur ou les muscles squelettiques, la CPT-1 est beaucoup plus sensible au malonyl-CoA que dans le foie (Mills et al., 1983). Cette sensibilité accrue pour le malonyl-CoA suggère une interaction importante entre la CPT-1 et le malonyl-CoA dans les organes non-lipogéniques. La comparaison entre le  $K_i$  (constante d'inhibition) et la concentration intracellulaire du malonyl-CoA, laquelle est beaucoup plus faible que le  $K_i$ , pose la question de la régulation de la CPT-1 cardiaque par le malonyl-CoA dans la situation physiologique. De fait, pour que le malonyl-CoA confère un contrôle raffiné entre l'oxydation du

glucose et des acides gras l'inhibition de la CPT-1 ne devrait pas être totale en tout temps. C'est dans cette optique qu'Awan et Saggerson (Awan et Saggerson, 1993) ont proposé que le malonyl-CoA puisse être lié à une enzyme du système d'élongation des acides gras, ce qui réduirait le malonyl-CoA libre disponible pour l'inhibition de la CPT-1. Une autre explication serait une compartimentation intracellulaire du malonyl-CoA (Ruderman et al., 1999). Toutefois, d'autres investigations sont nécessaires afin d'infirmier ou de confirmer ces hypothèses.

## **I.4.2 Composantes du métabolisme du malonyl-CoA**

### **I.4.2.1 L' acétyl-CoA carboxylase**

L'ACC est une enzyme dont l'activité est déterminante pour la régulation du métabolisme du glucose et des acides gras. Il s'agit d'une enzyme cytosolique qui catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. L'ACC fut longtemps considérée comme ayant une activité négligeable dans le cœur, vu l'absence de synthèse *de novo* des acides gras dans ce tissu. Selon certains auteurs (Wit-Peeters et al., 1970), le malonyl-CoA retrouvé dans le coeur ne pouvait provenir que de l'action de la propionyl-CoA carboxylase mitochondriale. En 1989, Thampy identifia et purifia l'ACC à partir d'un homogénat de coeur de rat (Thampy, 1989). Dans le coeur, deux isoformes de l'ACC sont exprimées: une isoforme prédominante de 280 kDa ( $ACC_{\beta}$ ) et une isoforme de 265 kDa ( $ACC_{\alpha}$ ). Dans les tissus lipogéniques, l'isoforme de 265 kDa prédomine. L'ACC utilise spécifiquement l'acétyl-CoA comme substrat, la propionyl-CoA carboxylase utilise aussi l'acétyl-CoA mais avec une affinité qui est cent fois moindre que son substrat naturel le propionyl-CoA (Wang et al., 1996). Néanmoins, vu la grande activité de la propionyl-CoA carboxylase dans la mitochondrie des cœurs, la possibilité que le malonyl-CoA soit formé dans ce compartiment existe. De fait, une étude récente a montré que l' $ACC_{\beta}$  est mitochondriale (Abu-Elheiga et al., 2000)

#### **I.4.2.1.1 La régulation de l'acétyl-CoA carboxylase**

Puisque le contrôle de l'oxydation des acides gras par le malonyl-CoA est primordial pour le bon fonctionnement du myocarde, la régulation de l'ACC est un processus stratégique. L'activité de l'isoforme de 280 kDa de l'ACC semble être régulée principalement par la concentration de son substrat cytosolique l'acétyl-CoA (Wang et al., 1996). Toutefois, l'activité de l'ACC $\beta$  est aussi (i) activée allostériquement par le glucose, l'insuline et le citrate (Saddik et al., 1992), et (ii) inhibée par les AGCL le malonyl-CoA et l'AMPK (Moule et al., 1992, Kudo et al., 1995) (Voir Tableau II). Tout récemment, Saha et al. (1999) ont démontré que certains modulateurs négatifs tels l'AMPK et les acyl-CoA à longue chaîne empêchent l'activation de l'ACC $\beta$  par le citrate.

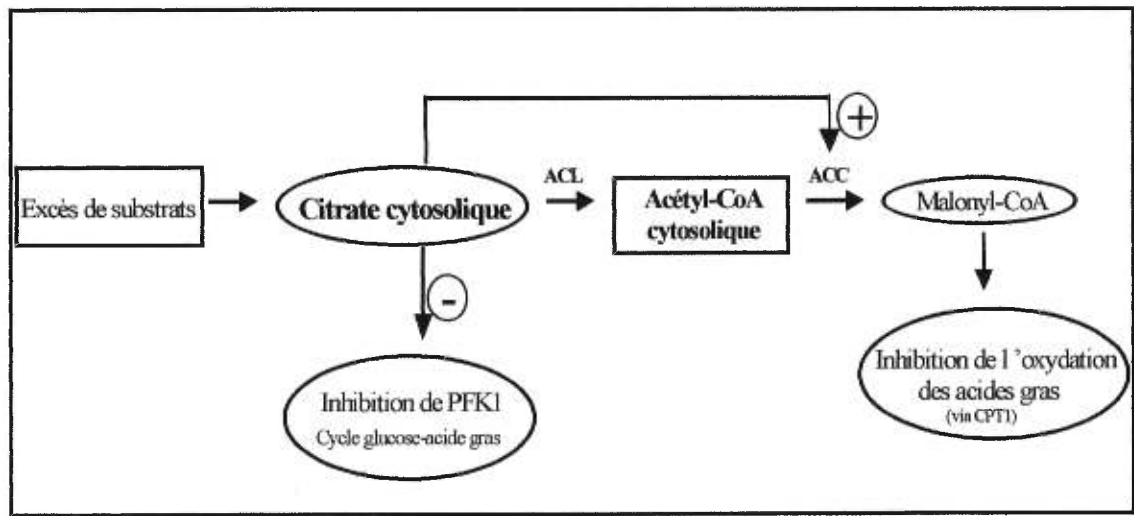
L'ACC $\beta$  du myocarde est sujette à une régulation impliquant un processus de phosphorylation/déphosphorylation régi par l'AMPK. L'activité de l'ACC $\beta$  est inhibée suite à sa phosphorylation par l'AMPK. Lorsque la production d'ATP est diminuée, une faible augmentation de l'AMP cytosolique suffira à activer l'AMPK. Ainsi, via l'AMPK l'activité de l'ACC $\beta$  et donc les niveaux tissulaires de malonyl-CoA varient en fonction de l'état énergétique de la cellule. Lors d'une augmentation du travail cardiaque, l'activité de l'ACC $\beta$  et donc la concentration de malonyl-CoA sont aussi diminuées, ce qui permet de relâcher l'inhibition de la CPT-1 et ainsi augmenter l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et leur  $\beta$ -oxydation pour la production d'énergie.

En outre, contrairement au foie, l'expression génique de l'ACC $\beta$  ainsi que son activité dans les tissus non-lipogéniques subissent peu de changement en réponse au jeûne ou à l'état nourri, et ce, malgré des changements observés au niveau de la concentration en malonyl-CoA (Ruderman et al., 1999).

#### **I.4.2.2 Les précurseurs de l'acétyl-CoA cytosolique**

##### **I.4.2.2.1 Le citrate**

Le rôle du citrate cytosolique dans la régulation de l'oxydation des substrats est reconnu depuis longtemps dans les tissus lipogéniques comme le foie ou les tissus adipeux. De fait, le citrate est un inhibiteur de (i) l'utilisation du glucose via son effet allostérique sur l'activité de la PFK, une enzyme glycolytique (Garland et al., 1963), et (ii) l'oxydation des lipides via son métabolisme en malonyl-CoA, un inhibiteur de la CPT-1. Le malonyl-CoA est formé à partir de l'acétyl-CoA lequel provient du clivage du citrate par l'ATP-citrate lyase (ACL). Toutefois, dans ces tissus, le citrate cytosolique est aussi un intermédiaire dans le transfert des unités acétyls nécessaires à la synthèse *de novo* des lipides. Dans les tissus non-lipogéniques comme le coeur, le muscle squelettique et les cellules  $\beta$  (Prentki et Corkey, 1996, Ruderman et al., 1999), une hypothèse a récemment été proposée où le citrate cytosolique joue un rôle de "signal" moléculaire (voir la Figure 7). Des évidences expérimentales supportent ce concept dans les cellules  $\beta$  (Prentki et Corkey, 1996) et le muscle squelettique (Ruderman et al., 1999), mais dans le coeur, jusqu'à tout récemment, la sortie du citrate de la mitochondrie vers le cytosol ou cataplérose était un processus qui était remis en question à cause de la faible activité du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques (Cheema-Dhadli et al., 1976, Sluse et al., 1971) Pourtant, l'effet inhibiteur du citrate, sur l'activité *in vitro* de la phosphofructokinase isolée de coeur, a été démontré par Garland et al. (Garland et al., 1963). De plus, le malonyl-CoA est aussi reconnu comme un inhibiteur de la CPT-1 du coeur (Murthy et al., 1987)



**Figure 7. Le citrate : molécule centrale dans la régulation du glucose et des acides gras.**  
Adapté de Saha et al., 1997.

Avant de discuter davantage du rôle proposé du citrate cytosolique, il convient de rappeler les notions suivantes. Dans le cœur, il existe des réactions qui catalysent l'entrée de carbones (anaplérose) ou la sortie (cataplérose) dans le CAC. L'existence de ces réactions anaplérotiques et cataplérotiques est illustrée par des changements rapides dans la réserve des intermédiaires du CAC (Peuhkurinen et al., 1983). Ces processus surviennent dans diverses circonstances telles qu'une modification dans l'apport en substrats ou en oxygène (ischémie).

Toutefois, à ce jour, l'identité et le rôle de ces réactions restent à clarifier. En partie, ceci s'explique par les difficultés méthodologiques rencontrées par la quantification de ces voies métaboliques lesquelles sont étroitement reliées au CAC. Ainsi, l'utilisation de traceurs résulte en un marquage des métabolites intermédiaires du CAC qui, est difficile à interpréter. À l'aide de substrats marqués au  $^{13}\text{C}$  et de l'analyse d'isotopomères de masse par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), une nouvelle approche à l'investigation métabolique (voir section I.5.2.2 pour plus de détails), permet de mettre en évidence la contribution relative des différentes voies de formation du citrate (Comte et al., 1997). Pour la première fois, la contribution relative de (i) la carboxylation du pyruvate anaplérotique, (ii) la décarboxylation du pyruvate, (iii) l'oxydation des acides gras, ainsi que (iv) la réaction inverse de l'isocitrate déshydrogénase fut quantifiée. Cette étude a aussi mis en évidence, un efflux de citrate dans un cœur intact, lequel est compatible avec l'activité du transporteur de citrate mitochondrial. Cet efflux de citrate de la mitochondrie au cytosol est ce qu'on appelle une réaction cataplérotique. Cette sortie de citrate est modulée par la demande énergétique du cœur ainsi que par la disponibilité en substrats pour la citrate synthase, soit l'acétyl-CoA et l'OAA anaplérotique (Vincent et al., 2000). Ces résultats supportent un rôle de citrate comme signal moléculaire dans le cœur, lequel rôle serait similaire à celui décrit dans les cellules  $\beta$  (Prentki et Corkey, 1996) et le muscle squelettique (Ruderman et al., 1999). Ainsi une augmentation du citrate cytosolique pourrait agir (i) au niveau de l'utilisation du glucose, en inhibant la glycolyse via la PFK-1 (Randle et al., 1963) et (ii) au niveau de la  $\beta$ -oxydation via l'inhibition de la CPT-1 par le malonyl-CoA (Murthy et al., 1987).

Puisque le citrate cytosolique semble être modulé par le niveau d'abondance en substrats énergétiques mitochondriaux dans le coeur, l'étape suivante d'investigation de ce mécanisme de régulation est d'évaluer si le citrate cytosolique est un précurseur métabolique du malonyl-CoA. Ceci s'avère le sujet du présent mémoire. Jusqu'à maintenant, cette question fut investiguée dans le muscle squelettique chez le rat et chez l'humain (Saha et al., 1999). Ce qui ressort principalement de ces études est une corrélation positive entre les concentrations de citrate et malate tissulaire et de malonyl-CoA dans certaines conditions soit lors d'une hyperinsulinémie et/ou d'une hyperglycémie, ou lors d'inactivité physique. Cependant, cette corrélation n'est pas observée suite à une période de jeûne suivie du retour à l'état nourri, ainsi que durant l'exercice. En outre, dans toutes ces conditions, l'activité de l'ACC $\beta$  est demeurée constante. Ces observations laissent entrevoir l'existence d'une fine régulation entre le citrate cytosolique et le malonyl-CoA.

#### **I.4.2.2.2 L'acétyl-carnitine**

Il convient de mentionner qu'une autre voie de formation de l'acétyl-CoA cytosolique a été proposée. Cette voie implique l'acétyl-carnitine. Ainsi, une augmentation des niveaux d'acétyl-CoA dans la mitochondrie active la carnitine acétyltransférase, entraînant le transfert du groupement acétyl de l'acétyl-CoA à l'acétylcarnitine. Par la suite, l'acétylcarnitine est transporté dans le cytosol par la carnitine acétyltranslocase, régénérant l'acétyl-CoA cytosolique (Lopaschuk et al., 1994).

#### **I.4.2.3 L'ATP-citrate lyase**

L'ACL est une enzyme cytosolique qui catalyse la formation d'acétyl-CoA et d'OAA à partir d'une molécule de citrate. Dans le foie, l'ACL est une enzyme importante dans le transfert des unités acétyls nécessaires à la synthèse d'acide gras et de cholestérol. Les organes non-lipogéniques, quant à eux, possèdent une plus faible activité de l'ACL (0,2  $\mu\text{mol/g}$  poids humide, dans le coeur, Awan et Saggerson, 1993), quoique suffisante pour la production extra-mitochondriale de malonyl-CoA. Dans le coeur, le rôle de cette enzyme dans la synthèse du malonyl-CoA reste à démontrer. Dans les cellules  $\beta$  et les muscles squelettiques, l'hydroxycitrate a été utilisé en tant qu'inhibiteur compétitif de

l'ACL (Saha et al., 1997, Prentki et Corkey, 1996), pour évaluer la possibilité que le citrate via son clivage en acétyl-CoA soit un précurseur de la synthèse du malonyl-CoA cytosolique.

L'hydroxycitrate est un analogue du citrate qui n'est pas métabolisé par les cellules. Il est aussi un activateur de l'ACC (Cheema-Dhadli et al., 1973). Ce composé, tout comme le citrate, est un chélateur de cations métalliques tel que le  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$  ce qui peut produire d'autres actions métaboliques non-spécifiques (Cheema-Dhadli et al., 1973). Fait intéressant, l'hydroxycitrate est un composé naturel se retrouvant dans le fruit de quelques variétés de *Garcinia* qui poussent dans le sud de l'Inde et le sud-est de l'Asie (Lewis, 1969). Il est commercialisé aux États-Unis avec la vertu d'être un supplément nutritionnel, un supprimeur d'appétit, un inhibiteur de la synthèse *de novo* des acides gras, un accélérateur (Clouatre et al., 1994) de l'oxydation des acides gras, ainsi qu'une source naturelle de calcium. On pourrait croire que l'hydroxycitrate est une molécule miracle, mais toutes les vertus qui lui sont attribuées doivent être prises avec un bémol. Non seulement, il existe peu d'évidences expérimentales supportant de tels effets *in vivo* aux doses administrées comme supplément, mais aussi de nombreux effets secondaires, tel qu'une déficience en zinc, en cuivre et en fer ainsi que la formation de pierre au rein, ont été rapportées (Panksepp et al., 1977). Ainsi, plusieurs investigations devront être réalisées sur ce composé afin de documenter son effet chez l'humain.

#### **I.4.2.4 Devenir métabolique du malonyl-CoA dans le cœur**

Dans le cœur, le niveau de malonyl-CoA est sujet à de rapides fluctuations en fonction des conditions nutritionnelles et hormonales. Quoique l'ACC $_{\beta}$ , et sa régulation aient fait l'objet de nombreuses études, une baisse de la synthèse du malonyl-CoA par l'ACC $_{\beta}$  ne peut expliquer qu'en partie les changements rapides des niveaux tissulaires de malonyl-CoA (Lopaschuk et al., 1994). Ceci suggère l'importance des voies possibles d'utilisation ou de dégradation du malonyl-CoA dans le cœur, lesquelles sont présentées au tableau III. Dans la mitochondrie, la MCD aurait pour rôle d'éviter l'accumulation du malonyl-CoA formé par la propionyl-CoA carboxylase (Scholte et al., 1969). Mais il reste à savoir comment le malonyl-CoA cytosolique est dégradé.



**Tableau III. Devenir métabolique du malonyl-CoA dans le coeur**

<b>Réactions du métabolisme du malonyl-CoA</b>	
Décarboxylation par la MCD: $\text{Malonyl-CoA} \xrightarrow{\text{MCD}} \text{Acétyl-CoA}$	
Système d'élongation des AGCL $\text{Palmitate} \xrightarrow{\text{Malonyl-CoA}} \text{Stéarate}$	

La MCD a longtemps été perçue comme une enzyme uniquement mitochondriale. Toutefois, une isoforme de la MCD vient récemment d'être identifiée dans le coeur (Dyck et al., 1998), dans des extraits cytosoliques. Cette isoforme serait régulée par une protéine kinase. De plus, en utilisant un modèle de coeurs de rats perfusés *ex vivo*, ces auteurs ont démontré qu'une diminution de l'activité de l'ACC $\beta$  est associée au maintien ou à l'augmentation de l'activité de la MCD. Ces changements sont compatibles avec un rôle combiné de ces deux enzymes dans le maintien des concentrations tissulaires de malonyl-CoA. La MCD pourrait donc, tout comme l'ACC $\beta$ , jouer un rôle important dans la régulation de l'oxydation des acides gras. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin d'exclure la possibilité que l'activité cytosolique de MCD, démontrée dans l'étude de Dick et al. (Dyck et al. 1998) soit due à une contamination mitochondriale.

En plus de sa localisation cytosolique, le clonage de la MCD a révélé une préséquence dans la mitochondrie ainsi que dans les peroxysomes (Voilley et al., 1999). D'autre part, le séquençage montre plusieurs sites de phosphorylation (Voilley et al., 1999). Dans la mitochondrie, le rôle suggéré de la MCD serait d'enlever le malonyl-CoA, formé par la propionyl-CoA carboxylase, afin de protéger les enzymes mitochondriales d'une possible inhibition par le malonyl-CoA (Sacksteder et al. 1999, Voilley et al., 1999). La MCD située dans les peroxysomes aurait pour fonction d'éliminer le malonyl-CoA intraperoxisomal résultant de l'oxydation des acides gras dicarboxyliques (Sacksteder et al., 1999).

Néanmoins, quelle que soit la localisation ou la distribution cellulaire de la MCD, comme le démontrent les exemples suivants, documentés chez l'homme, la MCD est une enzyme

dont l'activité semble cruciale. En effet, une mutation de la MCD résulte en un ralentissement du développement ainsi qu'en un retard mental (Jang et al., 1989). Par ailleurs, il a été démontré qu'une déficience en MCD peut résulter en l'inhibition de l'oxydation des acides gras, qui peut être la cause de cardiomyopathies. (Yano et al., 1997) Ces auteurs proposent qu'une portion du malonyl-CoA mitochondrial serait transestérifiée en malonylcarnitine par la CPT-2 qui à son tour pourrait être transportée en dehors de la mitochondrie par l'acylcarnitine translocase et estérifiée en malonyl-CoA par la CPT-1. Le malonyl-CoA cytoplasmique ainsi formé pourrait alors inhiber la  $\beta$ -oxydation des acides gras. (Yano et al., 1997)

#### **I.4.3 L'implication clinique du métabolisme du malonyl-CoA.**

Tel que discuté dans les sections précédentes, il apparaît qu'une fine régulation du métabolisme du malonyl-CoA s'avère cruciale pour la régulation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le coeur. Les exemples qui suivent indiquent qu'une dysrégulation de ce mécanisme est présente dans certaines pathologies telles le diabète et les maladies ischémiques, où des altérations métaboliques compromettant la production d'énergie par le coeur et donc son bon fonctionnement, ont été rapportées (Stanley et al., 1997; Feuvray et al., 1997)

D'une part, des évidences cliniques (Olivier et al., 1968) et expérimentales (Lopaschuk, 1996) suggèrent que chez les diabétiques, un haut niveau d'acides gras circulant et/ou une diminution de l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le coeur contribuent au dérèglement des fonctions contractiles. À cet égard, il est proposé que les perturbations métaboliques observées résultent, du moins en partie, de changements dans les niveaux de malonyl-CoA tissulaires. De fait, des études effectuées dans un modèle de coeur perfusé, isolé de rats diabétiques (type I), ont documenté des niveaux de malonyl-CoA plus faibles que ceux des coeurs de rats normaux. Cette baisse du malonyl-CoA, qui serait associée à une diminution de l'activité de l'ACC sans changement de son expression (Stanley et al., 1997), aurait pour conséquence une suppression de l'inhibition de la CPT-1, favorisant ainsi l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (Lopaschuk et al. 1994, Saddik et al., 1993). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le contrôle de la synthèse du malonyl-CoA est altéré par l'état diabétique.

D'autre part, l'ischémie-reperfusion cardiaque est aussi une condition caractérisée par des fluctuations de la concentration tissulaire du malonyl-CoA. De fait, des études réalisées dans un modèle de cœurs perfusés *in vitro* ont montré qu'un protocole d'ischémie-reperfusion diminue les niveaux de malonyl-CoA tissulaires. Cette baisse des niveaux de malonyl-CoA dans les cœurs reperfusés résulterait de l'effet combiné (i) d'une diminution de l'activité de l'ACC, suite à sa phosphorylation par l'AMP kinase laquelle serait favorisée par la déplétion des réserves énergétiques du cœur, et (ii) du maintien de l'activité de la MCD (Dyck, 1998). Il semble que cette baisse soit responsable, du moins en partie, des taux élevés de  $\beta$ -oxydation des AGLC documentés dans les cœurs reperfusés, une condition métabolique associée à une faible récupération des fonctions contractiles (Lopaschuk et al., 1994). En effet, il est proposé qu'une baisse du niveau de malonyl-CoA lève l'inhibition de la CPT-1, entraînant ainsi l'accélération de l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie, et donc de leur  $\beta$ -oxydation. Une altération de l'apport en substrats au cœur s'avère une autre cause possible des taux élevés de  $\beta$ -oxydation des AGCL à la reperfusion (Kantor et al., 1999).

Suivant les considérations mentionnées ci-dessus, il apparaît qu'une meilleure connaissance des mécanismes de contrôle et de régulation des niveaux de malonyl-CoA tissulaires permettrait de proposer des interventions pharmacologiques visant à rétablir à la normale le taux de  $\beta$ -oxydation des ACGL. Mise à part l'inhibition pharmacologique de la CPT-1, des cibles clés de cette approche thérapeutique seraient les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation du malonyl-CoA, soit l'ACC et la MCD, respectivement (Lopaschuk, 1996, Dyck et al., 1998). De plus, une identification du précurseur métabolique du malonyl-CoA pourrait aussi suggérer d'autres approches ou cibles.

L'inhibition pharmacologique de la CPT-1 est une approche qui a déjà été utilisée en vue d'améliorer la récupération fonctionnelle des cœurs reperfusés après l'ischémie. La stratégie de cette approche se résume ainsi: une inhibition de la  $\beta$ -oxydation des AGCL devrait augmenter l'oxydation du glucose et, plus précisément, le flux de substrats à travers la PDH (Clarke et al., 1996). Il s'avère que dans des modèles d'études *in vitro*,

soit le coeur de rat perfusé, l'inhibition de la CPT-1 par des agents pharmacologiques, tels l'étoximir, a eu l'effet escompté, soit une amélioration de la fonction cardiaque à la reperfusion (Wheeler, 1988). Cependant, lorsqu'administrés *in vivo*, ces agents n'ont pas eu d'effets bénéfiques notables et plusieurs problèmes de toxicité suite à leur utilisation à long terme ont été recensés, entre autres l'hypertrophie cardiaque (Wheeler, 1988; Stanley et al., 1997; Kantor et al., 1999). Suite à ces résultats mitigés avec les inhibiteurs de la CPT-1, il apparaît que les recherches futures viseront davantage le développement d'interventions pharmacologiques ciblées sur les enzymes du métabolisme du malonyl-CoA, tel que mentionnées précédemment (Kantor et al., 1999).

## **I.5 Approches méthodologiques pour l'étude du métabolisme cardiaque.**

### **I.5.1 La méthode Langendorff**

Le modèle de perfusion de cœurs de rats isolés selon la méthode de Langendorff a depuis longtemps fait ses preuves dans la recherche cardiovasculaire. Cette approche a vu le jour au début du 20<sup>e</sup> siècle et elle est encore aujourd'hui d'une très grande utilité dans l'étude du métabolisme cardiaque. Ce modèle est utilisé entre autres dans l'étude de la régulation des substrats énergétiques, des mécanismes d'utilisation du glucose et des acides gras, de la synthèse protéique, de la contractilité et de la consommation d'oxygène, pour n'en nommer que quelques-uns (Taegtmayer, 1995). Il a servi également à la mise en évidence du cycle de Randle mentionné précédemment. De plus, cette technique est aussi grandement utilisée en pharmacologie. Le plus grand avantage de cette technique réside en sa simplicité et dans le contrôle des facteurs environnants. Ainsi, toutes ces raisons ont motivé le choix de ce modèle pour la réalisation du présent projet de maîtrise.

### **I.5.2 La Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)**

La section qui suit décrit le principe d'une technique de pointe pour l'investigation métabolique, soit les substrats marqués au <sup>13</sup>C et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Grâce à cette approche, la contribution relative des voies de formation du citrate, ainsi que la cataplérose du citrate, ont pu être

quantifiées. En outre, la grande sensibilité de cette technique est de pouvoir identifier et quantifier la libération de citrate, ou cataplérose, par le coeur perfusé.

### **I.5.2.1 Principes de base de la CG-SM**

L'analyse par CG-SM d'un produit organique (analyte) au sein d'un milieu biologique nécessite un traitement de l'échantillon comportant dans la majorité des cas deux étapes : 1) une purification partielle par déprotéinisation, des chromatographies diverses et/ou une extraction dans un solvant organique et 2) la dérivation chimique de l'analyte non volatil en un dérivé volatil stable.

La plupart des molécules organiques biologiques comportent des groupements polaires qui les rendent peu volatils. La chromatographie gazeuse nécessite la transformation de ces molécules en dérivés moins polaires et plus volatils (Blau et al., 1993, Mc Lafferty, 1980). La dérivation augmente non seulement la volatilité mais également la stabilité thermique de l'analyte, le comportement chromatographique et la détectabilité.

Les molécules en solution sont introduites dans l'injecteur du chromatographe chauffé à haute température (200-250°C). Les molécules sont vaporisées et pénètrent dans la colonne de chromatographie, laquelle est parcourue continuellement par un flux du gaz vecteur (hélium). Les différentes espèces moléculaires qui sortent du chromatographe passent dans le spectromètre de masse dans un ordre constant, avec des temps de rétention spécifiques et reproductibles. Ces conditions chromatographiques doivent être optimisées pour permettre une bonne résolution de séparation des composés à étudier et ce, en un temps raisonnable.

Le spectromètre de masse est muni d'un détecteur quadripolaire composé de trois éléments: une chambre d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur à multiplicateur d'électrons. L'ensemble fonctionne sous vide, lequel est maintenu par des pompes à diffusion ou turbomoléculaires. La technique de CG-SM combine le haut pouvoir de résolution de la chromatographie en phase gazeuse et la haute sensibilité et spécificité de la détection par spectrométrie de masse. (Figure 8).

### I.5.2.2 Principe d'analyse d'isotopomères de masse par CG-SM

Le traceur est un outil très intéressant puisqu'il permet de suivre le devenir métabolique d'une molécule dans l'organisme. Une fois introduite dans un compartiment cellulaire donné, la structure chimique et le devenir métabolique du traceur sont identiques à ceux de la molécule tracée. L'isotope  $^{13}\text{C}$ , qui comporte un neutron de plus que le  $^{12}\text{C}$ , est un isotope stable dont la masse atomique est de 13,00335. L'utilisation d'isotopes stables permet de suivre de façon précise les flux de carbones. Lors du dosage quantitatif d'une molécule, un standard interne est utilisé. Il y a comparaison entre la quantité de molécules naturelles détectées par CG-SM versus la quantité connue de standard interne. Le standard interne possède strictement le même comportement chimique que les produits naturels. Le rapport du produit naturel et du produit marqué au  $^{13}\text{C}$ , multiplié par la concentration connue de standard interne, établit la concentration du produit naturel de façon très précise.

Ainsi, utilisée en combinaison avec des substrats marqués au  $^{13}\text{C}$  ou  $^2\text{H}$  (isotopes stables) et l'analyse d'isotopomères de masse, la GC-MS s'avère une technique plus puissante que les techniques radioisotopiques classiques, tout en étant sécuritaire, pour l'investigation métabolique tant dans l'organe isolé que chez l'humain.

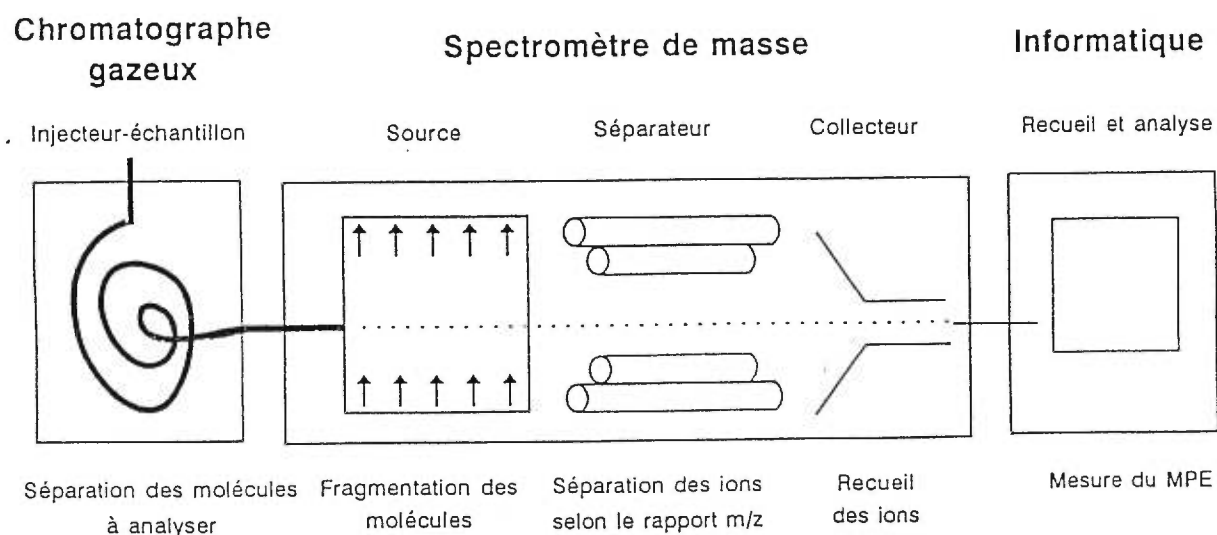


Figure 8. Schéma de couplage de la spectrométrie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CG-SM). Tiré de Chambrier, 1988.

## **I.6 Hypothèse et objectifs de travail**

Une amélioration des taux élevés de mortalité et de morbidité reliés aux maladies cardiovasculaires repose entre autres sur une meilleure compréhension des facteurs responsables des dysfonctions de contractilité observés chez les patients souffrant de ces maladies. À cet égard, les travaux de recherche en cours dans le laboratoire mettent l'emphase sur le rôle des anomalies métaboliques. Plus précisément, ils visent à comprendre les processus de transduction métabolique qui assurent l'équilibre entre (i) la production d'énergie suite à l'oxydation des divers substrats, lipides ou glucides, et (ii) la demande en énergie reliée à la contraction cardiaque. De fait, un mécanisme de régulation concertée du métabolisme et de la contraction du coeur a été proposé, où, interagissent entre autres (i) plusieurs métabolites clés, dont le citrate et le malonyl-CoA, et (ii) des processus métaboliques, tous étroitement reliés au CAC et donc à la production d'énergie, tels le transfert du citrate de la mitochondrie au cytosol (*cataplérose*).

Le présent projet vise à clarifier le rôle du citrate dans la synthèse du malonyl-CoA cytosolique, un inhibiteur de la  $\beta$ -oxydation des ACGL, via son action sur la CPT-I. Personne ne met en doute le rôle du citrate mitochondrial, premier intermédiaire du CAC, dans la production d'énergie nécessaire à la contraction. Toutefois, le rôle du citrate cytosolique comme molécule signal, modulant la sélection des substrats utilisés par le coeur, est un concept qui reste à clarifier. L'intérêt pour ce rôle du citrate dans la synthèse du malonyl-CoA est suscité par les résultats d'études qui suggèrent sa dysrégulation chez des patients souffrant de maladies ischémiques ainsi que chez les diabétiques.

L'hypothèse de travail est la suivante: suite à son transfert de la mitochondrie au cytosol ou cataplérose, le citrate fournit l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse du malonyl-CoA suite à son clivage par l'ATP citrate lyase. Ce problème a été abordé en utilisant (i) un modèle d'étude *in vitro*, soit le cœur isolé de rat perfusé selon la méthode de Langendorff, (ii) une technologie de fine pointe, soit la GC-MS, pour la quantification du processus de cataplérose du citrate mitochondrial, ainsi que (iii) des dosages enzymatique et radioactif des concentrations tissulaires de citrate et de malonyl-CoA, respectivement.

Les objectifs de ce projet de maîtrise ont été les suivants :

- 1) Définir des conditions de perfusion qui permettent une synthèse active de malonyl-CoA dans le temps, tel qu'évaluée par une augmentation de sa concentration tissulaire;
- 2) Clarifier la relation entre la cataplérose du citrate mitochondrial et la synthèse du malonyl-CoA, tel que quantifiée par la mesure de la libération de citrate par le cœur par CG-SM, et l'augmentation des niveaux tissulaires de malonyl-CoA par dosage radioenzymatique, respectivement;
- 3) Évaluer le rôle du citrate cytosolique comme précurseur du malonyl-CoA grâce à l'hydroxycitrate, un inhibiteur de l'ATP-citrate lyase.



## **II. MANUSCRIT**

Le manuscrit inclus dans ce chapitre a pour titre: Mitochondrial citrate cataplerosis and its link to malonyl-CoA synthesis in the perfused rat heart.

## **Mitochondrial citrate cataplerosis and its link to malonyl-CoA synthesis in the perfused rat heart**

**Myriame Poirier<sup>#</sup>, Geneviève Vincent<sup>#</sup> and Christine Des Rosiers<sup>#+@</sup>**

Departments of Biochemistry<sup>#</sup> and Nutrition<sup>+</sup>, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Running title: Cardiac citrate cataplerosis and malonyl-CoA synthesis

@ Correspondence and reprint requests should be addressed to: Dr. Christine Des Rosiers, Laboratory of Intermediary Metabolism, Y-3616, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) - Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke St. East, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1; Telephone: (514) 281-6000 (#7477), Fax: (514) 896-4762. E-mail: [desrosiers@sympatico.ca](mailto:desrosiers@sympatico.ca)

## **ABSTRACT**

The purpose of this study was to assess whether citrate supplies acetyl-CoA for the synthesis of malonyl-CoA, a proposed regulator of fatty acid oxidation in the heart. We hypothesized that following its efflux from the mitochondria, where it is synthesized, citrate is cleaved to acetyl-CoA by cytosolic ATP-citrate lyase. Rat hearts underwent initial 30-min perfusion with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate and 0.05 mM pyruvate (control), followed by an additional 30 min with substrate mixtures, resulting in different citrate release rates, an index of its mitochondrial efflux or cataplerosis (Vincent *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 278: E846-E856, 2000). Malonyl-CoA synthesis was documented by its higher tissue levels at 60 compared to 30 min. Under control conditions, citrate release rates were constant at  $7.8 \pm 0.8$  nmol/min for 60 min, while tissue malonyl-CoA levels increased from  $18.9 \pm 1.2$  to  $26.2 \pm 0.9$  nmol/g protein between 30 and 60 min ( $p < 0.05$ ). Supplementation with pyruvate (0.5 mM), or the fatty acid oleate (0.4 mM) or octanoate (0.2 mM) augmented citrate release rates to various extents, but tissue malonyl-CoA levels rose only with octanoate. The addition of hydroxycitrate (1 mM), an ATP-citrate lyase inhibitor, prevented the elevation of tissue malonyl-CoA levels under control conditions, but not with octanoate. Altogether, our data support the role of citrate as a precursor of malonyl-CoA synthesis in the heart. However, they also indicate (i) the occurrence of another malonyl-CoA-synthesizing pathway, most likely in the mitochondria, and (ii) a differential regulation of mitochondrial citrate cataplerosis and the cytosolic citrate/malonyl-CoA pathway, in agreement with other crucial roles of citrate in the cardiac cell.

**Key words: ATP-citrate lyase, hydroxycitrate, energy metabolism**

## INTRODUCTION

A cytosolic citrate-dependent malonyl-CoA-generating mechanism is proposed to control cellular fuel partitioning in non-lipogenic tissues such as the heart (for a recent review, see Ref. 25). An overview of the metabolic pathways relevant to this regulatory mechanism is presented in Figure 1. In this scheme, cytosolic malonyl-CoA regulates long chain fatty acid (LCFA)  $\beta$ -oxidation by inhibiting carnitine palmitoyl transferase I (CPT-I), a key enzyme involved in LCFA transport into the mitochondria (19, 21). Cytosolic citrate plays a central role in linking the malonyl-CoA regulatory mechanism to the glucose-fatty acid or Randle cycle. It restricts (i) glucose utilization by inhibiting phosphofructokinase (PFK; Refs 11 and 14), and (ii) LCFA oxidation by acting as an activator of acetyl-CoA carboxylase (ACC), which synthesizes malonyl-CoA from acetyl-CoA (19, 36), and/or as a precursor of acetyl-CoA following its cleavage by cytosolic ATP-citrate lyase.

The roles of cytosolic citrate and malonyl-CoA in fuel partitioning have long been recognized in lipogenic tissues, such as the liver and adipose tissues, where these molecules are also intermediates in the *de novo* pathway of fatty acid synthesis. In non-lipogenic tissues, a general theory of fuel sensing, whereby cytosolic citrate and malonyl-CoA act as signaling molecules, is supported by experimental evidence obtained in  $\beta$ -cells (24) and in skeletal muscle (26,28,29). In the heart, numerous studies have documented (i) the role of malonyl-CoA in the control of LCFA  $\beta$ -oxidation, and (ii) the kinetic and regulatory properties of ACC $_{\beta}$ , the cardiac ACC isoform (for reviews, see Refs 17 and 19). More recently, the enzyme catalyzing malonyl-CoA degradation, malonyl-CoA decarboxylase, was also characterized (12). However, the regulatory role of cytosolic citrate in the heart remains to be substantiated.

Classically, in the cardiac cell, the function of citrate has been restricted mostly to the mitochondria. As the first intermediate of the citric acid cycle (CAC), it participates in energy production. The regulatory role of cytosolic citrate has been questioned because of the low activity of the mitochondrial citrate transporter (7, 16, 18, 25, 33). Although the activity of the latter transporter may be low compared to the myocardial dicarboxylate transporter (16), or to the tricarboxylate transporter of lipogenic tissues such as the liver

(16), our recent data support its participation in mitochondrial citrate efflux or cataplerosis in perfused rat hearts (38). Furthermore, we have observed changes in the rates of mitochondrial citrate cataplerosis, which we evaluated from the citrate release rates, with substrate supply and energy demand that suggested a role for citrate as a precursor, rather than an activator, of malonyl-CoA formation. To the best of our knowledge, the metabolic source of cytosolic acetyl-CoA for malonyl-CoA synthesis by heart ACC<sub>β</sub> remains to be identified. One hypothesis is that acetyl-CoA molecules generated by the mitochondrial pyruvate dehydrogenase are channelled to carnitine acetyl transferase and translocase of the mitochondrial membrane (1, 19). An alternative hypothesis is citrate cleavage by cytosolic ATP-citrate lyase. The activity of this myocardial enzyme (0.2 μmol/min x g wet weight, Ref. 3) is probably sufficient to maintain the very small pool of malonyl-CoA (0.2 - 4 nmol/g wet weight, Refs 3, 19 and 21).

The objective of this study was to evaluate if cytosolic citrate cleavage by ATP-citrate lyase supplies acetyl-CoA for malonyl-CoA synthesis in the perfused rat heart. Since malonyl-CoA tissue levels vary acutely within minutes, with the heart's nutritional and energy status, due to changes in its rate of synthesis and degradation (3, 12, 15, 19, 35), a step perfusion protocol was designed to ascertain that time-dependent increments in malonyl-CoA tissue levels can be attributed to net synthesis. Rat hearts underwent initial 30-min perfusion with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate and 0.05 mM pyruvate, followed by an additional 30 min with substrate mixtures resulting in different citrate release rates, which reflects mitochondrial citrate cataplerosis (38). We reasoned that if citrate cleavage supplies acetyl-CoA, addition of the ATP-citrate lyase inhibitor hydroxycitrate in the 30-60-min time period should prevent any increase in tissue malonyl-CoA levels.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### Chemicals

Chemicals, organic solvents, enzymes, coenzymes, insulin and bovine serum albumin (BSA, fraction V) were purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Quebec), Fisher Scientific (Montreal, Quebec), Sigma-Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI) and Anachemia (Dorval, Quebec). [<sup>3</sup>H]Acetyl-CoA (25 μCi/mole) was obtained from ICN Canada (Montreal, Quebec) and [2,2,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]citrate from Cambridge Isotopes Laboratories (Woburn, MA). The derivatization agent N-methyl-N-(t-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide was supplied by Regis Chemical (Morton Grove, IL). All aqueous solutions were made with water purified by a "Milli-Q" system (Millipore, St-Laurent, Quebec). Hydroxycitrate (Citrin<sup>®</sup> K; Garcinia Cambogia Extract Potassium Salt) was a generous gift from Dr. V. Badmaev of Sabinsa Corporation (Piscataway, NJ). The dialyzed albumin solution (13.4 %; BSA fraction V, fatty acid-poor, Bayer, Kankakee, IL) and the stock solution of 20 mM sodium oleate complexed to albumin were prepared and stored, as described previously (38).

### Heart perfusions

Animal experiments were approved by the local animal care committee in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Procedures for isolation and perfusion of rat hearts in the Langendorff mode have been described elsewhere (9, 10, 36). Briefly, the hearts of fed male Sprague-Dawley rats (180-210 g; Charles River Breeding Laboratories, St-Constant, Quebec) were perfused at a constant pressure of 70 mmHg with non-recirculating modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) containing: 119 mM NaCl, 2.1 or 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.5 mM glucose, 8 nM insulin as well as other substrates indicated below. The set-up for continuous monitoring of functional parameters, using instruments linked to a microcomputer, has been described earlier (9, 10, 38). At the end of the experiments, the hearts were freeze-clamped and stored in liquid nitrogen.

### Experimental design

Perfusion protocols were designed on the basis of preliminary experiments whose purpose was to identify substrate mixtures that resulted (i) in different citrate release

rates, and (ii) in malonyl-CoA synthesis, as evidenced by its higher tissue levels at 60 than at 30 min of heart perfusion. The effect of hydroxycitrate was documented with substrate mixtures eliciting malonyl-CoA synthesis. An overview of the experimental design is depicted in Figure 2. Briefly, in all protocols, hearts underwent initial 30-min perfusion with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate and 0.05 mM pyruvate. This substrate mixture served as the control condition. One group of hearts was freeze-clamped after 30 min (*Protocol 1*). All other groups of hearts underwent an additional 30 min of perfusion, either under control conditions (*Protocol 2*) or with modified substrate mixtures. The modifications were either an increase in the concentration of pyruvate from 0.05 mM pyruvate to 0.5 mM (*Protocol 3*), or the addition of a fatty acid, either 0.4 mM oleate, a LCFA (complexed to 4% albumin; *Protocol 4*), and 50  $\mu$ M carnitine, or 0.2 mM octanoate, a medium chain fatty acid (MCFA; *Protocol 5*) whose  $\beta$ -oxidation is not regulated at CPT-I (31). Potassium hydroxycitrate was included directly in the perfusion buffer at a final concentration of 1 mM (29). Buffer potassium concentration was maintained at 4.8 mM by lowering its potassium chloride content. Because hydroxycitrate is a calcium chelator (8), its addition to the perfusion buffer lowers the concentration of ionized calcium from  $0.94 \pm 0.01$  to  $0.68 \pm 0.01$  mM ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ ; unpaired t-test), although it does not change total calcium concentration ( $1.23 \pm 0.03$  mM;  $n = 9$ ). Increasing the total calcium concentration of the buffer containing hydroxycitrate to 1.7 mM re-established its concentration of ionized calcium to  $0.98 \pm 0.02$  mM ( $n = 5$ ). Under all conditions, we documented the following parameters for the two 30-min perfusion periods: (i) The heart's contractile activity, as an index of its energy demand, (ii) citrate release rates, as an index of mitochondrial citrate cataplerosis, (iii) tissue levels of citrate, and (iv) malonyl-CoA as well as (v) [glucose-6-phosphate + fructose-6-phosphate] and fructose-1,6-diphosphate, which are respectively precursors and product of PFK, to evaluate a potential effect of cytosolic citrate on this enzyme.

#### Analytical procedures

For the determination of tissue malonyl-CoA levels, freeze-clamped hearts were pulverized at the temperature of liquid nitrogen, and 0.05 g wet weight of powder was homogenized in 1 ml 10% trichloroacetic acid, followed by centrifugation at 14,000 rpm for 15 min at 4°C. The pellets were kept for protein determination. The supernatant

containing acid-soluble metabolites was collected and washed six times with 1 ml of ether. The samples were dried in a Speed-Vac and stored at -80°C. Malonyl-CoA was measured radioenzymatically (20). The incubation mixture (final volume 1 ml) contained 50 µl of lyophilized extract resuspended in 110 µl 1 M potassium phosphate buffer, pH 7.1, with 10 mM EDTA, 200 µmol potassium phosphate buffer, pH 7.0, 2 µmol EDTA, 2.5 µmol DTT, 0.2 µmol NADPH, 1 mg BSA, 0.75 nmol [<sup>3</sup>H]acetyl-CoA (0.9 µCi/nmol), and 5 mU rat liver fatty acid synthase (23). All assays were calibrated by spiking a corresponding sample with 0.0625 nmol malonyl-CoA. Furthermore, we verified the linearity of the assay with tissue weight in the range 0.05 - 0.1 g wet weight.

#### Other assays:

Citrate release rates were quantitated by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) and flow rate measurements, as described previously (38). Tissue citrate, fructose-1,6-biphosphate and fructose-6-phosphate were assessed by standard enzymatic assays (4) on a Roche Cobas Fara spectrophotometer. Protein concentration was measured by the Bradford method (5). Analyses of total and ionized calcium levels in perfusion buffer samples were conducted by the Clinical Biochemistry Laboratory of Notre-Dame Hospital.

#### Statistical analysis

The data are expressed as means ± S.E. of *n* heart perfusions. Statistical analyses were conducted by either paired or unpaired t-test, one-way analysis of variance followed by a Bonferroni multiple comparison post-test, or non-parametric Kruskal-Wallis one way analysis of variance followed by Dunn's multiple comparison post-test, as indicated. A probability of  $p < 0.05$  was considered to be significant.



## **RESULTS**

Figure 3 presents the functional and biochemical data obtained for hearts perfused under the various conditions described in Figure 2. Since the heart's contractile activity was constant for a given 30-min perfusion period, we reported average  $dP/dt_{\max}$  values. Changes in  $dP/dt_{\max}$  values paralleled those of other indices of contractile activity, such as rate pressure product ( $RPP = \text{heart rate} \times (\text{systolic pressure} - \text{diastolic pressure})$ ; not shown).

### **Effects of various substrate mixtures**

*Contractile function:* Hearts perfused for 60 min with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate and 0.05 mM pyruvate, a condition referred to as control, showed a small but significant decline in contractile activity as evidenced by  $dP/dt_{\max}$  values (Figure 3A). This decline was prevented by increasing pyruvate concentration from 0.05 to 0.5 mM during the 30-60-min time period, in agreement with the cardioprotective effect of pyruvate (6), but not by the addition of the LCFA oleate or the MCFA octanoate.

*Metabolites:* Hearts perfused for 60 min under the control condition maintained a constant citrate release rate and citrate tissue level (Figures 3B and 3C). Increasing pyruvate concentration from 0.05 to 0.5 mM, or adding octanoate or oleate to the perfusion buffer during the 30-60-min time period, augmented citrate release rates and citrate tissue levels in parallel. Higher tissue malonyl-CoA levels at 60 than at 30 min, reflecting net synthesis, were observed for hearts perfused with buffer containing the control substrate mixture alone, or supplemented with pyruvate or octanoate, but not with oleate (Figure 3D). Tissue levels of [glucose-6-phosphate + fructose-6-phosphate], and fructose-1,6-diphosphate changed only slightly under the various conditions (from 0.05 to 0.11, and from 0.18 to 0.35  $\mu\text{mol/g}$  wet weight, respectively, (not shown). However, of all conditions examined, only the addition of pyruvate or octanoate resulted in a significant increase in the tissue levels of [glucose-6-phosphate + fructose-6-phosphate], suggesting inhibition of the PFK reaction.

### **Effect of hydroxycitrate**

The effect of 1 mM hydroxycitrate was documented in hearts perfused with two substrate mixtures that increased tissue malonyl-CoA levels in the 30-60-min period, namely, (i) 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate and 0.05 mM pyruvate, and (ii) 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1.0 mM lactate, 0.2 mM pyruvate and 0.2 mM octanoate.

*Contractile function:* Under both perfusion conditions, hydroxycitrate addition resulted in a 20% decline of  $dP/dt_{\max}$  values (Figure 3A). This effect of hydroxycitrate was not due to calcium chelation (8), since a similar decrease in contractile function was observed after normalization of the buffer concentration of ionized calcium (data not shown).

*Metabolites:* Under both perfusion conditions, tissue levels of citrate (Figure 3C), and of glycolytic intermediates (data not presented) were not significantly modified by the addition of hydroxycitrate. Unfortunately, we were unable to assess citrate release rates because of a background citrate level in the 1 mM hydroxycitrate solution (ca. 5% citrate). However, the effect of hydroxycitrate addition on tissue malonyl-CoA levels depended on substrate composition. Indeed, while hydroxycitrate prevented the time-dependent increase in the malonyl-CoA level of hearts perfused under the control condition, it failed to significantly affect that of hearts perfused with octanoate (Figure 3D). Indeed, perfusions of hearts with octanoate plus hydroxycitrate during the 30-60-min time period resulted in tissue malonyl-CoA levels at 60 min that were significantly increased by 53% compared to those measured at 30 min. Such a time-dependent increase in tissue malonyl-CoA was of smaller magnitude than that observed with octanoate in the absence of hydroxycitrate (88%), although this difference did not reach significance.

## **DISCUSSION**

To the best of our knowledge, this is the first study to examine the role of cytosolic citrate in malonyl-CoA synthesis in the intact heart. We hypothesized that after its efflux from the mitochondria where it is synthesized, citrate is cleaved by cytosolic ATP-citrate lyase and thereby supplies acetyl-CoA for malonyl-CoA synthesis by ACC $\beta$ . This sequence of events, depicted in Figure 1, was proposed on the basis of data obtained by Ruderman et al. in skeletal muscle (26,28,29) and by us in the perfused rat heart (10, 38). The results obtained in this study point to a complex relationship between mitochondrial citrate efflux, or cataplerosis, and malonyl-CoA synthesis. Nevertheless, they also support our hypothesis of a role of citrate as a metabolic precursor of malonyl-CoA after its cleavage by ATP-citrate lyase. Finally, they suggest the occurrence of another pathway for malonyl-CoA synthesis, most likely in the mitochondria. Altogether, our data point to a differential regulation of mitochondrial citrate cataplerosis and of ATP-citrate lyase, in addition to that known to exist at the level of ACC $\beta$ . Such a complex regulation would be compatible with other crucial roles of citrate in the cardiac cell, besides the malonyl-CoA pathway, as well as with a compartmentation of malonyl-CoA metabolism. For simplicity, the aforementioned findings that are depicted in Figure 1 will be sequentially discussed hereafter.

In the present study, as in a previous one (38), we found that perfused hearts released citrate under all conditions examined, in agreement with mitochondrial citrate cataplerosis being a process that precedes cytosolic malonyl-CoA formation. However, the changes in citrate release rates and in tissue malonyl-CoA levels, which we observed in this study when hearts were perfused with various substrate mixtures during the 30-60-min time period, do not support a simple precursor-product relationship between citrate and malonyl-CoA, nor do they suggest a role for citrate as an activator of ACC $\beta$  (19, 36). For instances, augmenting the pyruvate concentration from 0.05 to 0.5 mM increased the citrate release rate, but with no additional increment in tissue malonyl-CoA levels. Similarly, the presence of the LCFA oleate increased citrate release rates and tissue levels above control values, but malonyl-CoA levels remained unchanged. In the latter case, the absence of malonyl-CoA synthesis with oleate supports the inhibitory effect of LCFA on

ACC $\beta$  (19, 21, 36), although there is also a possibility that ATP-citrate lyase activity was limited due to a decreased availability of CoA resulting from LCFA activation (7).

Altogether, we interpret the above data as suggesting a differential regulation of mitochondrial citrate cataplerosis and of ATP-citrate lyase, in addition to that known to exist at the level of ACC $\beta$  (17, 19). Such a complex regulation does not, however exclude, a role of citrate as a metabolic precursor in malonyl-CoA synthesis. Indeed, such a role of citrate is supported by the effect of hydroxycitrate, at least in hearts perfused under the control condition. Specifically, the presence of this ATP-citrate lyase inhibitor in the 30-60-min time-period of our perfusion protocol prevented the increase in tissue malonyl-CoA levels that was observed otherwise in the absence of inhibitor. Hydroxycitrate was also used as a tool to demonstrate participation of the citrate cleavage reaction in malonyl-CoA synthesis in skeletal muscle (29). Under our perfusion conditions, it is likely that inhibition of ATP-citrate lyase was the major metabolic effect of hydroxycitrate. Its  $K_i$  for this enzyme is 8  $\mu$ M, while its effects on other enzymes, such as activation of ACC $\beta$  or inhibition of PFK, citrate synthase and pyruvate dehydrogenase, occur at mM concentrations. Hydroxycitrate is also only slowly transported into the mitochondria (8). Furthermore, our conclusion holds despite hydroxycitrate's lowering effect on the heart's contractile activity since this should increase and not decrease tissue malonyl-CoA levels (26). Finally, we consider unlikely the formation of malonyl-CoA from acetyl-CoA molecules generated by mitochondrial pyruvate dehydrogenase that were channelled to carnitine acetyl transferase and translocase of the mitochondrial membrane (1, 19), at least under our control condition, since hydroxycitrate addition would have elevated, rather than reduced, malonyl-CoA synthesis due to ACC $\beta$  activation (29).

The metabolism of malonyl-CoA in hearts perfused with the MCFA octanoate differs, however, from that of hearts perfused with the LCFA oleate, or any other substrate mixtures examined here. Indeed, while both oleate and octanoate augmented citrate release rates and tissue levels, only octanoate increased tissue malonyl-CoA levels during the 30-60-min period. The presence of hydroxycitrate did not prevent this time-dependent increase in tissue malonyl-CoA levels, although the magnitude of the increase was

lower, though not significantly, than that observed otherwise in the absence of hydroxycitrate. We suggest two explanations for these findings. First, they may suggest that malonyl-CoA is synthesized, at least in part, by a pathway not involving cytosolic ATP-citrate lyase. Besides the ACC $\beta$ , malonyl-CoA synthesis from acetyl-CoA can also be catalyzed by mitochondrial propionyl-CoA carboxylase (31). Although this enzyme has less affinity for acetyl-CoA than for its natural substrate propionyl-CoA, its activity could have been favoured by the high rate of acetyl-CoA formation resulting from octanoate  $\beta$ -oxidation, which is not regulated at CPT-I (32). This high formation of mitochondrial acetyl-CoA in excess of citrate synthesis is evidenced by the release of ketone bodies at a rate that represents as much as 25% of the rate of octanoate uptake or CAC flux (10, 38). A second explanation would be that the inhibitory effect of hydroxycitrate in hearts perfused with octanoate is less than in the control condition. Indeed, in hearts perfused with octanoate, cytosolic citrate accumulation resulting from an increased mitochondrial citrate cataplerosis, could attenuate the inhibitory effect of HC, since this inhibition is of the competitive type (8).

Regarding the physiological significance of a complex relationship between mitochondrial citrate cataplerosis and malonyl-CoA synthesis, it would in fact be expected on the basis of the proposed compartmentation of malonyl-CoA metabolizing enzymes). Indeed, in the heart, the enzyme degrading malonyl-CoA, the malonyl-CoA decarboxylase, has been localized in the cytosol, mitochondria and peroxysomes (12,27,39,), whereas the ACC $\beta$  has been associated with the mitochondrial membrane, most likely with the outer membrane, with the bulk of the polypeptide facing the cytosol (2). Of interest, a citrate synthase isoform is also present in the peroxysomes (30). Furthermore, a differential regulation of mitochondrial citrate cataplerosis, ATP-citrate lyase and ACC $\beta$  would be compatible with other crucial roles played by citrate in the cardiac cell, besides the malonyl-CoA pathway. First, in the mitochondria, as the first intermediate of the CAC, citrate plays a crucial role in energy production. The regulation of mitochondrial citrate utilization and cataplerosis appears to be achieved by tight coupling between citrate synthase and the transporter (34), and, accordingly, we have shown that mitochondrial citrate cataplerosis in perfused hearts is modulated by substrate supply and energy demand (38). Second, in the cytosol, citrate is not only a

negative allosteric modulator of glycolysis at the level of PFK (for a recent review, see Ref.11), but also a potential precursor of acetyl-CoA for the synthesis of biomolecules such as ubiquinone, cholesterol or the neurotransmitter acetylcholine. Further investigations are required to identify factors modulating ATP-citrate lyase activity, and thus, cytosolic citrate accumulation. Little is known about this myocardial enzyme. In part, substrate flux through the enzyme appears to be limited by the availability of cytosolic CoA, which, in turn, would depend on the rate of LCFA activation (7, 37). Other potential modulators of the activity of this enzyme, which could oppose the effect of LCFA, are suggested by studies conducted in other tissues. For instance, in the kidney, hypokalemia and acidosis increase the activity of ATP-citrate lyase (22). In skeletal muscle, heightened tissue malonyl-CoA levels have been documented under conditions of hyperinsulinemia and/or hyperglycemia (26,28,29). The latter finding suggests that in this non-lipogenic tissue, where citrate's role as a metabolic precursor of malonyl-CoA is supported by several studies (26,28,29), the activity and/or expression of ATP-citrate lyase could be increased by insulin and glucose, as in the lipogenic liver (13). Of interest, a differential regulation of mitochondrial citrate cataplerosis, ATP-citrate lyase and ACC $\beta$  may explain why in skeletal muscle, changes in tissue malonyl-CoA levels are better correlated with the sum of tissue citrate plus malate than with that of tissue citrate alone (26,28,29). Citrate cleavage followed by reduction of oxaloacetate forms cytosolic malate, which can then enter the mitochondria in exchange for citrate via the mitochondrial tricarboxylate transporter (7, 25).

In conclusion, the results from this study support a role of citrate as a precursor of malonyl-CoA synthesis in the perfused rat heart, although they indicate also a differential and complex regulation of mitochondrial citrate cataplerosis, cytosolic ATP-citrate lyase and ACC $\beta$ . Such a complex regulation would be expected on the basis of proposed compartmentation of malonyl-CoA metabolism. It would also be compatible with other crucial metabolic and regulatory roles of citrate, besides malonyl-CoA synthesis. However, additional experiments are needed to (i) provide direct evidence for the role of citrate as a precursor of malonyl-CoA, using labeled substrates, and (ii) identify factors modulating myocardial ATP-citrate lyase. A better understanding of cytosolic citrate metabolism and regulation may help explain the chronic alterations in myocardial citrate

release reported in cardiac patients (37). Furthermore, this may provide a basis for designing optimal metabolic interventions to enhance the physiological inhibition of LCFA oxidation at CPT-I, thereby improving the prognosis of functional recovery of the reperfused heart and replacing the pharmacological inhibition of CPT-I that has significant side-effects (17).

## **Acknowledgments**

The authors thank Dr. Henri Brunengraber for generously supplying the dialyzed albumin solution and for his help in the preparation of hydroxycitrate solution, Dr. Marc Prentki and Mrs. Laura Segall for assisting in setting up the malonyl-CoA assay, and Dr. John Chatham for his helpful comments. Thanks are also due to Mr. Ovid Da Silva of the Research Support Office, CHUM Research Center, for editing this text. Part of the work was presented at the Experimental Biology Meeting in April 1999 in Washington. The study was supported by the Medical Research Council of Canada (Grants MA-9575 and MT-10920 to C. Des Rosiers and a studentship to G. Vincent).

## **Abbreviations**

CAC: citric acid cycle; ACC: acetyl-CoA carboxylase; CPT-I: carnitine palmitoyl transferase I; GCMS: gas chromatography-mass spectrometry; LCFA: long chain fatty acid; MCFA: medium chain fatty acid; PFK: phosphofructokinase.



## References

1. Abdel-aleem S, Nada MA, Sayed-Ahmed M, Hendrickson SC, St-Louis J, Walthall HP, and Lowe JE. Regulation of fatty acid oxidation by acetyl-CoA generated from glucose utilization in isolated myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 28: 825-833, 1996.
2. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, and Wakil S. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Biochem* 4: 1444-1449, 2000.
3. Awan MM, and Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295: 61-66, 1993.
4. Bergmeyer HU (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. (2<sup>nd</sup> edition), New York: Academic Press, vol. 3, 1974, p. 1562-1565 and 1585-1589.
5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254, 1976.
6. Bunger R, Swindall B, Brodie D, Zdunek D, Stiegler H, and Walter G. Pyruvate attenuation of hypoxia damage in isolated working guinea-pig heart. *Mol Cell Cardiol* 4: 423-438, 1986.
7. Cheema-Dhadli S, Robinson BH, and Halperin ML. Properties of the citrate transporter in rat heart: implications for regulation of glycolysis by cytosolic citrate. *Can J Biochem* 54: 561-565, 1976.
8. Cheema-Dhadli S, Halperin ML, and Leznoff CC. Inhibition of enzymes which interact with citrate by (-)-hydroxycitrate and 1,2,3-tricarboxybenzene. *Eur J Biochem* 38: 98-102, 1973.

9. Comte B, Vincent G, Bouchard B, and Des Rosiers C. A  $^{13}\text{C}$  mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat heart. *J Biol Chem* 272: 26125-26131, 1997.
10. Comte B, Vincent G, Bouchard B, and Des Rosiers C. Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the  $^{13}\text{C}$  labeling of citrate released by perfused rat heart. *J Biol Chem* 272: 26117-26124, 1997.
11. Depré C, Rider MH, and Hue L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* 258: 277-290, 1998.
12. Dyck JRB, Barr AJ, Barr RL, Kolattukudy PE, Lopaschuk GD. Characterization of cardiac malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid oxidation. *Am J Physiol* 275, H2122-H2129, 1998.
13. Fukuda H, Katsurada A, and Iritani N. Effects of nutrients and hormones on gene expression of ATP-citrate lyase in rat liver. *Eur J Biochem* 209: 217-222, 1992.
14. Garland PB, Randle PJ, and Newsholme EA. Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature* 200: 169-170, 1963.
15. Goodwin GW, and Taegtmeyer H. Regulation of fatty acid oxidation of the heart MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol* 277: E772-E777, 1999.
16. Huizing M, Ruitenbeek W, van den Heuvel LP, Dolce V, Iacobazzi V, Smeitink JAM, Palmieri F, and Trijbels JMF. Human mitochondrial transmembrane metabolite carriers: tissue distribution and its implication for mitochondrial disorders. *J Bioenergetics Biomembranes* 30: 277-284, 1998.
17. Kantor PF, Dyck JRB, and Lopaschuk GD. Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart. *Am J Med Sci* 318: 3-14, 1999.

18. Kauppinen RA, Hiltunen JK, and Hassinen IE. Compartmentation of citrate in relation to the regulation of glycolysis and the mitochondrial transmembrane proton electrochemical potential gradient in isolated perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta* 681: 286-291, 1982.
19. Lopaschuk GD, and Gamble J. Acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid oxidation in the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1101-1109, 1994.
20. McGarry JD, Stark MJ, and Foster DW. Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J Biol Chem* 253: 8291-8293, 1978.
21. McGarry JD, Mills SE, Long CS, and Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 214: 21-28, 1983.
22. Melnick JK, Srere PA, Elshourbagy NA, Moe OW, Preisig PA, and Alpern RJ. Adenosine triphosphate citrate lyase mediates hypocitraturia in rats. *J Clin Invest* 98: 2381-2387, 1996.
23. Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Porter JW. Fatty-acid synthase from rat liver *Methods Enzymol* 35:37-44, 1975.
24. Prentki M, and Corkey BE. Are the  $\beta$ -cells signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM. *Diabetes* 45: 273-283, 1996.
25. Robinson BH, and Oei J. Citrate transport in guinea pig heart mitochondria. *Can. J. Biochem.* 53: 643-647, 1975.

26. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, and Witters LE. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1-E18, 1999.
27. Sacksteder KA, Morrell JC, Wanders RJA., Matalon R, and Gould S. MCD encodes peroxysomal and cytoplasmic forms of malonyl-Coa decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J. Biol Chem* 35, 24461-24468, 1999.
28. Saha, AK, Laybutt DR, Dean D, Vavvas D, Sebokova E, Ellis B, Klimes I, Kraegen EW, Shafir E, and Ruderman NB. Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am J Physiol* 276: E1030-E1037, 1999.
29. Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazipis A, Witters LA, Shafir E, and Ruderman NB. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am J Physiol* 272: E641-E648, 1997.
30. Sandor A, Johnson JH, and Srere PA. Cooperation between enzyme and transporter in the inner mitochondrial membrane of yeast. *J. Biol. Chem.* 47: 29609-29612, 1994.
31. Scholte HR, Luyt-Houwen IEM, Dubelaar M-L, and Hulsmann WC. The source of malonyl-CoA in rat heart. *FEBS Lett* 198: 47-50, 1986.
32. Schulz H. Regulation of fatty acid oxidation in heart. *J Nutr* 124: 165-171, 1994.
33. Sluse FE, Meijer AJ, Tager JM (1971) Anion translocators in rat heart mitochondria. *FEBS Lett.* 18: 148-153, 1971.
34. Srere PA. The molecular physiology of citrate. *Curr Top Cell Regul* 33: 261-275, 1992.
35. Stanley WC, Hernandez LA, Spires D, Bringas J, Wallace S, and McCormack JG. Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl-CoA levels in normal and ischemic swine myocardium: Effects of dichloroacetate. *J Mol Cell Cardiol* 28: 905-914, 1995.
36. Thampy KG. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. *J Biol Chem* 264: 17631-17634, 1989.

37. Thomassen AR, Bagger JP, Nielsen TT, and Henningsen P. Altered global myocardial substrate preference at rest and during pacing in coronary artery disease with stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 62: 686-693, 1998.
38. Vincent G, Comte B, Poirier M, and Des Rosiers C. Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol* : 278, E846-E856, 2000.
39. Voilley, N., Roudit, R., Vicaretti, R., Bonny, C., Waeber, G., Dyck, J.R.B., Lopaschuk, G.D., Prentki, M. Cloning and expression of rat pancreatic  $\beta$ -Cell malonyl-CoA decarboxylase. *Biochem. J.*: 340, 213-217, 1999.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematized overview of metabolic processes and factors relevant to the role of citrate as a precursor of malonyl-CoA synthesis in the heart (see text for details). Abbreviations for: *Enzymes:* ACL, ATP-citrate lyase; CS, citrate synthase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; T<sub>m</sub>, mitochondrial tricarboxylate transporter; T<sub>c</sub>, cell membrane citrate transporter. *Metabolites:* αKG, α-ketoglutarate. *Symbols:* +, activation, -, inhibition.

Figure 2: Experimental design (see text in the Experimental Procedures section for details) Hearts were perfused under normoxia for 30 or 60 min with non-recirculating Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing various substrate mixtures. All hearts underwent an initial 30-min perfusion with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate and 0.05 mM pyruvate, a substrate mixture referred to as control (□). Then, one group of hearts was freeze-clamped (*Protocol 1*). Other groups of hearts were perfused for an additional 30 min under the following conditions. *Protocols 2-3:* Hearts were perfused with the control substrate mixture either alone, or supplemented with 1 mM hydroxycitrate (+ HC) or with pyruvate to achieve a final concentration of 0.5 mM. *Protocols 4-5:* Hearts were perfused with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate (□), and either 0.4 mM LCFA oleate, or 0.2 mM MCFA octanoate in the absence or presence of 1 mM hydroxycitrate (+ HC).

Figure 3: Contractile activity (A), citrate release rates (B), and tissue levels of citrate (C) and malonyl-CoA (D) in hearts perfused with various substrate mixtures in the presence or absence of hydroxycitrate.

Hearts were perfused according to the perfusion protocols depicted in Figure 1. Heart function was monitored continuously through instruments linked to a microcomputer. Samples of coronary effluent perfusate were collected at various times and processed for the measurement of citrate concentration by GCMS. Freeze-clamped hearts were homogenized and processed for the quantitation of citrate and malonyl-CoA concentrations.  $dP/dt_{\max}$  and citrate release rates were averaged for the 15-30- and 45-60-min time periods. The data shown are means  $\pm$  S.E. of 5 to 11 heart perfusion experiments. \* $p \neq 0.05$ : All data at 30-60 min vs those at 0-30 min, and  $^{\dagger}p \neq 0.05$ : effect of hydroxycitrate, using either (i) a paired t-test ( $dP/dt_{\max}$  and citrate release rates), (ii) a one-way analysis of variance parametric test followed by Bonferoni's multiple comparison test (tissue citrate), or (iii) nonparametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by Dunn's multiple comparison test (tissue malonyl-CoA).

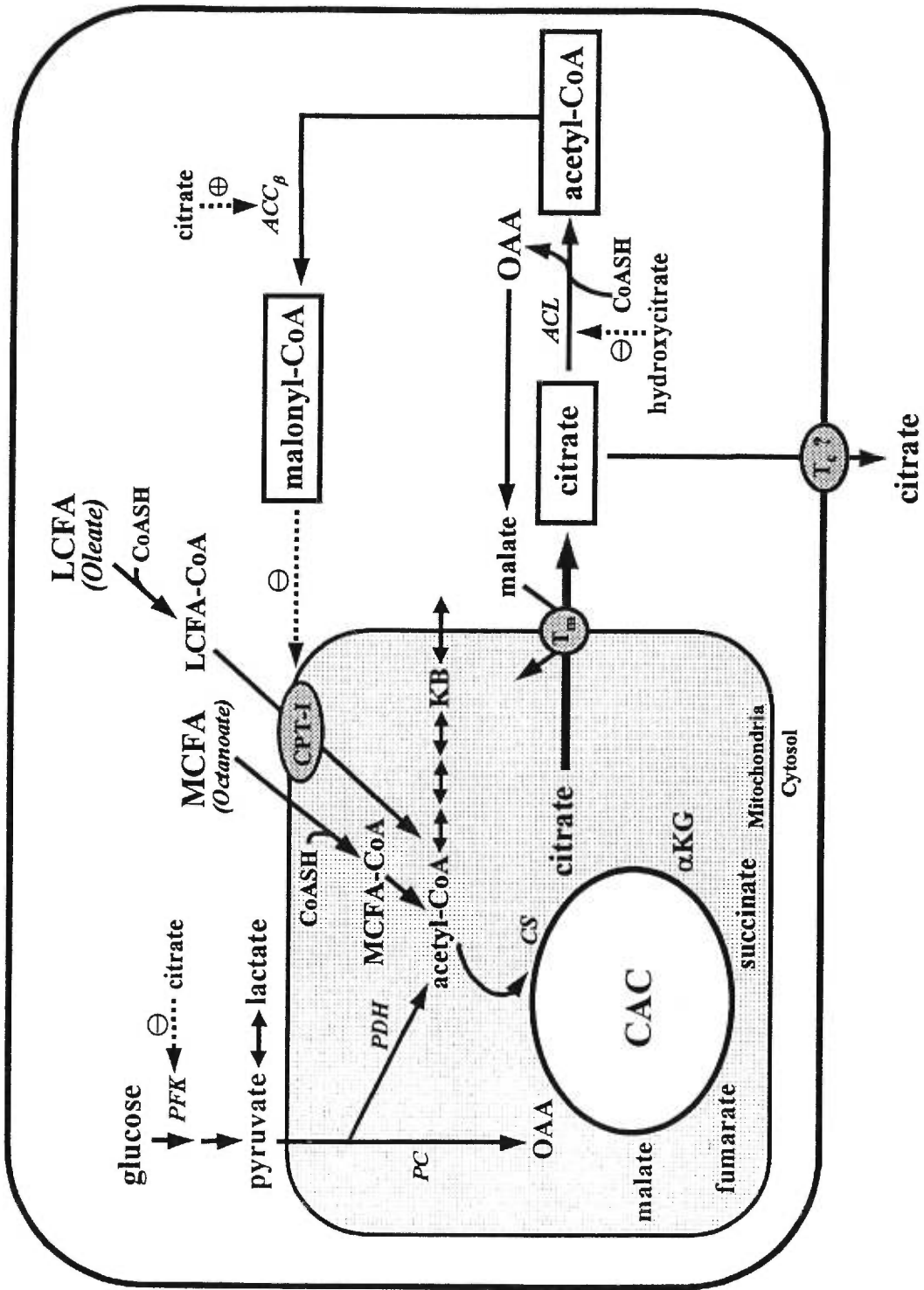


Figure 1



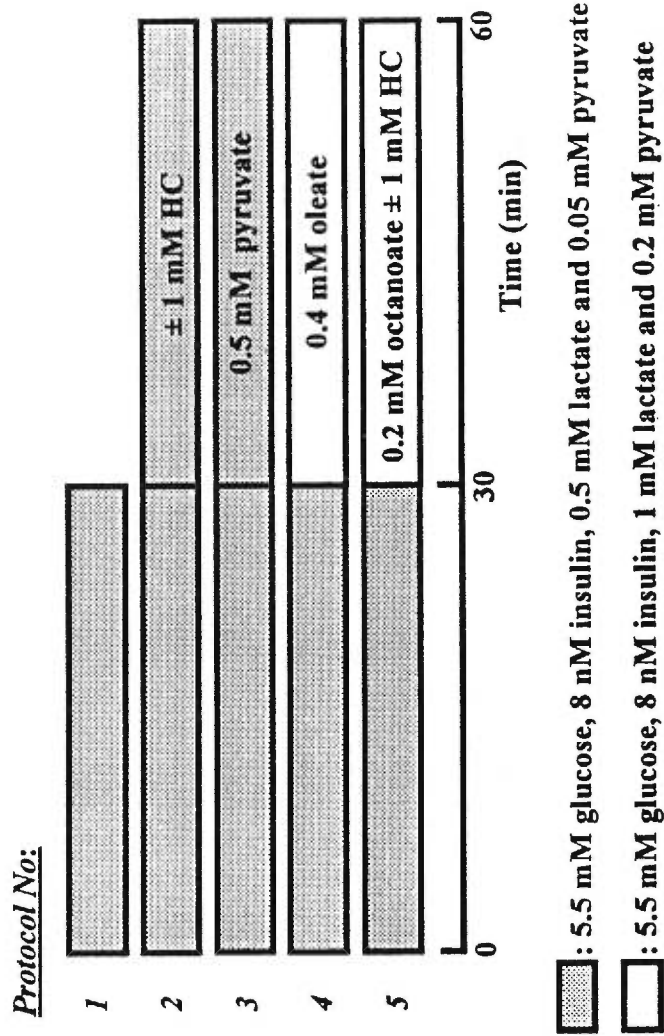


Figure 2

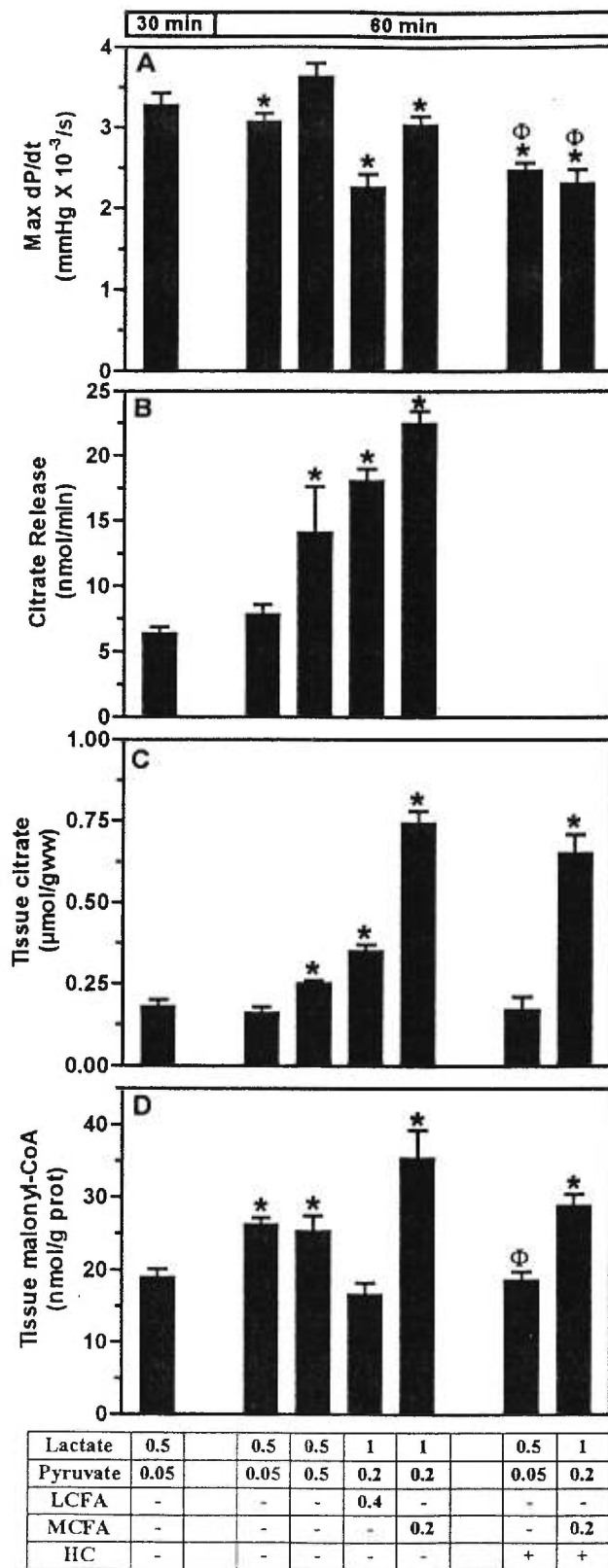


Figure 3

## **II. DISCUSSION ET CONCLUSION**

Le but du présent travail était de clarifier le rôle du citrate dans la synthèse du malonyl-CoA, un inhibiteur de la  $\beta$ -oxydation des AGCL, dans le coeur intact. L'intérêt pour une telle étude était suscité par l'implication potentielle d'un dérèglement du métabolisme du malonyl-CoA dans plusieurs maladies mortelles, dont les maladies cardiovasculaires et le diabète. Notre hypothèse initiale proposait que, suite à son transfert de la mitochondrie au cytosol ou cataplérose, le citrate soit clivé par l'ACL et fournisse ainsi l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse du malonyl-CoA. Les résultats obtenus indiquent une relation complexe entre la cataplérose mitochondriale et la synthèse du malonyl-CoA. Néanmoins, ils supportent notre hypothèse initiale d'un rôle du citrate comme précurseur métabolique du malonyl-CoA. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui rapporte des résultats sur la relation entre le citrate et la synthèse du malonyl-CoA dans le coeur intact. Ce chapitre présente une discussion plus détaillée des résultats obtenus dans la présente étude. De plus, des avenues de recherches futures sont proposées. En tout premier lieu, il convient toutefois de discuter des avantages et limites de l'approche méthodologique utilisée.

### **III.1 Aspects méthodologiques**

Cette étude a été abordée en utilisant un modèle d'étude *in vitro*, soit le coeur isolé de rats perfusé selon la méthode Langendorff. Ce modèle de perfusion de coeur, qui est couramment utilisé dans l'étude du métabolisme cardiaque, a été choisi dans cette première étude du métabolisme du malonyl-CoA en raison de sa simplicité. Toutefois, pour des études futures, le modèle de coeur au travail serait favorisé afin de documenter l'effet de la charge de travail du coeur sur le métabolisme du malonyl-CoA. En effet, la charge de travail détermine en grande partie la demande énergétique, laquelle influence entre autres l'activité du CAC et des enzymes directement reliées au malonyl-CoA (Gertz et al., 1988). Il est donc à prévoir que la relation entre la cataplérose du citrate et la synthèse du malonyl-CoA sera modulée par la charge de travail du coeur.

Par ailleurs, le choix des conditions expérimentales s'est avéré une étape cruciale à la réalisation de ce travail. De fait, la première étape de ce projet fut d'identifier des conditions de perfusions où l'on observait une synthèse active de malonyl-CoA, tel que démontré par une augmentation de sa concentration tissulaire dans le temps. Ceci s'avérait crucial puisqu'il était connu que les niveaux cardiaques de malonyl-CoA fluctuent très rapidement suite à des changements de l'activité des enzymes responsables de sa synthèse ( $ACC_{\beta}$ ) et de sa dégradation (MCD) en fonction de l'apport en substrats ou de la demande énergétique du coeur (Awan et Saggerson, 1993, Dyck et al., 1998, Goodwin & Taegtmeyer, 1999 et Stanley et al., 1995). Dans ce travail, la synthèse de malonyl-CoA a été documentée en présence de divers mélanges de substrats. Les mélanges ont été choisis afin d'imiter les conditions physiologiques. Les substrats qui ont été ajoutés au tampon de perfusion, le glucose, le lactate, le pyruvate et l'oléate, mais pas l'octanoate, sont des substrats énergétiques naturels du coeur normoxique. L'octanoate, un acide gras à chaîne moyenne, a été utilisé comme outil puisque sa  $\beta$ -oxydation n'est pas régulée au niveau de la CPT-1.

Initialement, il avait été prévu de mettre en évidence le rôle du citrate comme précurseur métabolique dans la synthèse de malonyl-CoA en utilisant des substrats marqués au  $^{13}C$  et la CG-SM. Cependant, la mise au point d'une méthode de CG-SM pour quantifier le marquage en  $^{13}C$  du malonyl-CoA tissulaire s'est avérée plus difficile que prévue. Les difficultés rencontrées, qui s'expliquent par l'instabilité chimique et la faible concentration du malonyl-CoA tissulaire, nous ont contraints à modifier notre approche. À cet égard, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ACL, soit l'hydroxycitrate, apparaissait comme un outil indiqué permettant d'évaluer notre hypothèse de travail. En effet, dans une problématique similaire, l'utilisation de cet inhibiteur avait permis l'obtention de résultats concluants dans le muscle squelettique et dans la cellule- $\beta$  (Chen et al., 1994; Prentki et Corkey, 1996; Saha et al., 1997). En choisissant d'utiliser cet inhibiteur, nous étions toutefois conscients des effets secondaires éventuels, en particulier de sa capacité de chélation du calcium. Ceci nous a amenés à porter une attention spéciale aux effets de l'hydroxycitrate sur la fonction contractile du coeur, puisque d'une part, celle-ci dépend de la

concentration extracellulaire de calcium ionisé, et d'autre part, détermine en partie l'activité du CAC, de la cataplérose du citrate mitochondriale et des enzymes directement impliquées dans le métabolisme du malonyl-CoA (Goodwin & Taegtmeyer, 1999; Saddik et al., 1993; Vincent et al., 2000).

Ainsi, la baisse des fonctions contractiles observée en présence d'hydroxycitrate a d'abord été attribuée à une diminution de la concentration extracellulaire de calcium ionisé. Cependant, il s'est avéré qu'une baisse similaire des fonctions en présence d'hydroxycitrate fut observée même après correction de la concentration en calcium ionisé du tampon de perfusion. Ainsi, il apparaît que l'hydroxycitrate diminue les fonctions cardiaques par un mécanisme autre que par la chélation de calcium. Il reste à savoir si le degré de pureté de la préparation d'hydroxycitrate est en cause ou s'il s'agit d'un effet de l'hydroxycitrate relié à son action métabolique d'inhibiteur de l'ACL. En outre, le fait que la seule source d'hydroxycitrate disponible soit en partie contaminée avec du citrate (environ 5 %), n'a malheureusement pas permis de quantifier les niveaux de citrate dans l'effluent coronarien des coeurs perfusés en sa présence.

### **III.2 Le rôle du citrate dans la synthèse du malonyl-CoA dans le coeur.**

Dans le muscle squelettique et les cellules  $\beta$ , des évidences expérimentales attribuent au citrate cytosolique un rôle en tant que (i) précurseur de l'acétyl-CoA suite à son clivage par l'ATP-citrate lyase et (ii) activateur allostérique de l'ACC (Saddik et al., 1993, Saha et al., 1999). *In vitro*, l'ACC $\beta$  isolée du coeur est aussi activée par le citrate (Saha et al., 1997). Toutefois, à notre connaissance, la présente étude s'avère la première investigation du rôle du citrate cytosolique dans la synthèse du malonyl-CoA dans le coeur intact. Sur la base d'évidences expérimentales obtenues dans le muscle squelettique et dans les cellules  $\beta$ , des tissus qui comme le coeur sont non-lipogéniques, et suite à une étude récente effectuée dans le laboratoire (Vincent et al., 2000), nous avons émis l'hypothèse d'un rôle du citrate cytosolique comme précurseur métabolique. Ce rôle du citrate implique d'abord le transfert du citrate de

la mitochondrie vers le cytosol ou cataplérose, suivi de son clivage par l'ACL. Bien que l'activité de l'ACL dans le coeur soit faible ( $0,2 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$  poids humide) (Awan et Saggerson, 1993), celle-ci est probablement suffisante au maintien des faibles concentrations tissulaires de malonyl-CoA rapportées dans ce tissu ( $\text{nmol}/\text{g}$  poids humide, Awan et Saggerson, 1993).

Les résultats obtenus dans ce travail suggèrent une relation complexe entre les taux de cataplérose du citrate mitochondriale et de synthèse de malonyl-CoA. En effet, bien qu'un taux de cataplérose du citrate plus élevé que la condition témoin fut observé lorsque les coeurs ont été perfusés entre 30-60 min en présence de pyruvate  $0.5 \text{ mM}$ , d'oléate ou d'octanoate, cette hausse de la cataplérose du citrate n'était pas associée à une augmentation parallèle de la concentration tissulaire du malonyl-CoA, sauf pour les coeurs perfusés en présence d'octanoate. Les résultats obtenus avec les coeurs perfusés en présence de l'AGCL oléate, condition où la  $\beta$ -oxydation est active, peuvent s'expliquer par une augmentation de la concentration tissulaire des acyl-CoA à longue chaîne. Ces derniers sont reconnus pour leur effet inhibiteur de l' $\text{ACC}_\beta$  (Thampy, 1989), un effet qui prédomine sur l'effet activateur du citrate (Ruderman et al., 1999). Il apparaît également plausible qu'une diminution de la concentration cytosolique de CoA, résultant de l'activation des AGLC, puisse restreindre l'activité de l'ACL (Cheema-Dhadli et al., 1976).

Le fait qu'une hausse de la cataplérose du citrate soit observée dans plusieurs conditions de perfusion, sans pour autant être associée à une élévation de la concentration de malonyl-CoA, soulève la question du rôle du citrate en tant qu'activateur de l' $\text{ACC}_\beta$ . De fait, d'autres résultats obtenus dans cette étude supportent davantage un rôle du citrate comme précurseur métabolique du malonyl-CoA. De fait, dans les coeurs perfusés en présence de glucose, lactate, pyruvate et insuline (condition témoin), l'ajout de l'hydroxycitrate, un inhibiteur de l'ACL, a empêché l'augmentation de la concentration tissulaire du malonyl-CoA qui avait été au préalable observée en absence de l'inhibiteur. Il est à noter qu'une considération des effets de l'hydroxycitrate sur la fonction contractile du coeur ne modifie en rien

les conclusions tirées à partir des résultats de cette étude. En effet, selon les travaux de Ruderman et coll. (1999) dans le muscle squelettique, une baisse de la dépense énergétique reliée à une diminution de la fonction contractile aurait dû plutôt augmenter la concentration tissulaire du malonyl-CoA.

Les résultats obtenus lorsque les coeurs ont été perfusés en présence d'octanoate, un acide gras à chaîne moyenne, se sont avérés fort différents de ceux obtenus en présence de l'ACGL oléate ou de tout autre mélange de substrats. De fait, comme pour les coeurs perfusés en présence d'oléate, ceux perfusés en présence d'octanoate ont montré un taux élevé de cataplérose de citrate. Toutefois, seuls les coeurs perfusés en présence d'octanoate ont montré une augmentation de la concentration tissulaire de malonyl-CoA. Comme ces résultats laissaient percevoir une possible corrélation entre le citrate cytosolique et le malonyl-CoA, il apparaissait logique de documenter dans ces conditions, l'effet de l'hydroxycitrate. Toutefois, l'ajout d'hydroxycitrate a peu modifié l'augmentation des niveaux de malonyl-CoA entre 30 et 60 min, observée au préalable en absence de cet inhibiteur. Il est possible qu'avec un nombre plus élevé d'expériences, la différence entre les niveaux de malonyl-CoA tissulaires mesurés dans les coeurs perfusés entre 30 et 60 min avec l'octanoate en absence ou en présence d'hydroxycitrate, se révélerait significative. Néanmoins, la concentration tissulaire de malonyl-CoA mesurée après perfusion des coeurs en présence d'octanoate et d'hydroxycitrate entre 30 et 60 min demeure significativement plus élevée que celle documentée à 30 min, ce qui suggère une synthèse nette de malonyl-CoA dans cette période, même en présence d'hydroxycitrate.

D'une part, nous proposons que le malonyl-CoA soit synthétisé du moins en partie, par une autre voie, laquelle n'implique pas l'activité de l'ACL cytosolique. La possibilité d'une synthèse du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA par la propionyl-CoA carboxylase mitochondriale, a déjà été soulevée dans la littérature (Saha et al., 1997). Malgré que l'affinité de cette enzyme pour l'acétyl-CoA soit moindre que pour son substrat naturel, le propionyl-CoA, l'activité de cette enzyme pourrait être

augmentée lorsque la concentration d'acétyl-CoA dans la mitochondrie est élevée. Une telle condition existe dans les coeurs perfusés en présence d'octanoate 0.2 mM et résulte du fait que le taux de formation de l'acétyl-CoA par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale non régulée de l'octanoate, dépasse celui de l'utilisation de l'acétyl-CoA par la citrate synthase.

D'autre part, il est également possible que dans les coeurs perfusés en présence d'octanoate, l'inhibition de l'hydroxycitrate sur l'ATP-citrate lyase soit moindre que dans toute autre condition étudiée. En effet, dans ces conditions où la cataplérose du citrate est la plus élevée, une élévation de la concentration cytosolique du citrate pourrait atténuer l'inhibition de l'hydroxycitrate sur l'ACL, puisque cette inhibition est de type compétitif.

En terminant, il convient de souligner qu'une relation complexe entre les taux de cataplérose du citrate mitochondriale et de synthèse de malonyl-CoA serait attendue si l'on considère la compartimentation proposée du métabolisme du malonyl-CoA dans le coeur. En effet, selon plusieurs études (Dyck et al., 1998; Sacksteder et al., 1999; Voilley et al., 1999), l'enzyme qui dégrade le malonyl-CoA, soit la MCD, serait présente dans la mitochondrie, le cytosol et les peroxysomes. Fait intéressant, bien que la citrate synthase est principalement localisée dans la matrice mitochondriale, une isoforme de cette enzyme est exprimée dans les peroxysomes (Sandor et al., 1994). Par ailleurs, les enzymes catalysant la synthèse du malonyl-CoA, soit l'ACC $\beta$  et la propionyl-CoA carboxylase, sont quant à elles associées à la mitochondrie. Toutefois, alors que la propionyl-CoA carboxylase est présente dans la matrice mitochondriale, l'ACC $\beta$  est intégrée à la membrane mitochondriale externe quoique la majeure partie de cette protéine fait face au compartiment cytosolique (Abu-Elheiga et al., 2000).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus suggèrent une régulation différentielle de la cataplérose du citrate mitochondriale et de l'ACL, laquelle serait indépendante de celle déjà connue au niveau de l'ACC $\beta$ . À cet égard, les travaux effectués dans le



laboratoire qui ont précédé le présent projet, ont démontré une régulation de la cataplérose du citrate mitochondriale par l'apport en substrats pour la citrate synthase et la demande énergétique (Comte et al., 1997). Toutefois, à notre connaissance, mis à part la mesure de l'activité maximale de l'ACL dans des homogénats de coeurs (Awan et Saggerson, 1993), cette enzyme n'a fait l'objet d'aucune autre étude. Donc, les facteurs qui modulent l'activité de l'ACL dans le coeur intact ne sont pas connus. Il semble que l'activité de l'ACL du coeur soit limitée par les niveaux de CoA cytosoliques lesquels dépendent du taux d'activation des AGCL (Vincent et al. 2000). D'autres facteurs ou modulateurs possibles, lesquels pourraient activer l'ACL et donc opposer l'action des AGCL, sont suggérés par des études dans le muscle squelettique, le foie ou le rein. Une étude suggère que l'ACL est phosphorylée (Benjamin et al., 1994). De fait, les conditions suivantes ont été associées à une augmentation de la synthèse du malonyl-CoA ou de l'activité de l'ACL dans ces tissus: l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'acidose et l'hypokaliémie (McGarry et al., 1983; Melnick et al., 1996; Robinson et al., 1975; Ruderman et al., 1999; Saha et al., 1999).

En outre, une régulation différentielle de la cataplérose du citrate mitochondriale, de l'ACL et de l'ACC $\beta$  supporte en fait un rôle central du citrate dans le métabolisme cardiaque. En fait, en plus de son rôle comme précurseur dans la synthèse du malonyl-CoA cytosolique, lequel régule la  $\beta$ -oxydation des AGCL via la CPT-I, le citrate joue d'autres rôles cruciaux dans la cellule cardiaque. Dans la mitochondrie, le citrate est le premier intermédiaire du CAC et de ce fait joue un rôle crucial dans le métabolisme énergétique du coeur.

Dans le cytosol, un rôle du citrate comme inhibiteur de la glycolyse au niveau de la PFK a été proposé pour la première fois en 1963 par Garland et coll. (Garland et al., 1963). Par la suite, ce rôle a souvent été remis en question étant donné la faible activité du transporteur mitochondrial du citrate dans la mitochondrie du coeur. Quoique l'étude de ce rôle du citrate cytosolique n'a pas été un objectif spécifique de la présente étude, les concentrations tissulaires des substrats (G6P + F6P) et produit

(FDP) de la PFK ont néanmoins été documentées. Dans l'ensemble, les concentrations tissulaires de ces métabolites ont peu ou pas varié dans les diverses conditions de perfusion. Une augmentation de la concentration tissulaire de F6P + FDP, en accord avec une inhibition de la PFK, a été observée lors des perfusions effectuées en présence de pyruvate 0.5 mM, d'oléate ou d'octanoate, quoique cet effet se soit avéré significatif seulement dans les deux premières conditions. Toutefois, dans toutes ces conditions, la concentration du F6P n'était pas diminuée, tel que serait attendu si la PFK était inhibée. Au contraire, celle-ci était légèrement augmentée, suggérant un autre site d'inhibition de la glycolyse en aval de la PFK, possiblement au niveau de la glycéraldéhyde déshydrogénase. Finalement, dans le cytosol, le citrate peut aussi fournir les unités d'acétyl-CoA nécessaires à plusieurs voies biosynthétiques dont la synthèse du cholestérol, de l'ubiquinone ou celle des neurotransmetteurs, comme l'acétylcholine.

### **III.3 Perspectives futures**

Plusieurs projets de recherche peuvent être suggérés pour faire suite à la présente étude. En tout premier lieu, il s'avère crucial d'obtenir des évidences directes appuyant le rôle du citrate cytosolique en tant que (i) précurseur de l'acétyl-CoA pour la synthèse du malonyl-CoA cytosolique et (ii) modulateur de la sélection des substrats. Il est à prévoir que l'obtention de telles évidences nécessite l'utilisation de substrats marqués au  $^{13}\text{C}$ , afin d'une part, de comparer le marquage des carbones 4 et 5 du citrate représentant la portion acétyl-CoA à celui du malonyl-CoA, et d'autre part, de quantifier les taux d'oxydation des acides gras et du glucose.

Il conviendrait également d'approfondir nos connaissances des aspects suivants: (i) les facteurs modulant l'activité de l'ACL, (ii) le rôle de la charge de travail et (iii) les fluctuations de l'activité et de la concentration de la MCD; en les mettant en relation avec la régulation du métabolisme du malonyl-CoA dans le coeur.

Finalement, outre les études ci-dessus mentionnées, lesquelles visent l'approfondissement de notre compréhension des facteurs régulant la synthèse du

malonyl-CoA dans le coeur normoxique, d'autres études devraient être envisagées où seraient mises à l'épreuve des interventions métaboliques visant à augmenter la synthèse du malonyl-CoA dans les coeurs ischémiés et reperfusés, et de ce fait possiblement améliorer la récupération fonctionnelle de ces coeurs.

### **III.4 Conclusion**

Les résultats de la présente étude mettent en évidence pour la première fois, le rôle du citrate comme précurseur du malonyl-CoA dans le coeur intact. De plus, ils suggèrent une régulation différentielle de la cataplérose du citrate mitochondriale et l'ACL, laquelle serait indépendante de celle déjà connue au niveau de l'ACC $\beta$  cytosolique. En fait, une telle complexité de régulation de ces réactions est en accord avec les autres rôles joués par le citrate dans la cellule cardiaque, en plus de son rôle de précurseur du malonyl-CoA.

Cette étude nous a permis d'atteindre les objectifs fixés qui étaient d'évaluer et de clarifier la place du citrate dans le métabolisme cardiaque du malonyl-CoA. Toutefois, d'autres études devront être réalisées afin d'obtenir des évidences directes appuyant d'une part, le rôle du citrate cytosolique comme précurseur du malonyl-CoA et d'autre part, son rôle proposé dans la sélection des substrats. Il est à prévoir que l'obtention de telles évidences nécessite l'utilisation de substrats marqués au  $^{13}\text{C}$ , afin de quantifier les taux d'oxydation des acides gras et du glucose. Une meilleure compréhension des mécanismes modulant la conversion du citrate en malonyl-CoA dans le coeur pourrait permettre entre autres de suggérer de nouvelles interventions métaboliques ciblant l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le coeur, ce qui est reconnu comme une intervention salvatrice lors de l'ischémie-reperfusion cardiaque.

#### IV. RÉFÉRENCES

- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., Wakil, S. (2000) The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Biochem.* **4**, 1444-1449.
- Awan, M.M., Saggerson, E.D. (1993) Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem. J.* **295**, 61-66.
- Ballard, F.B., Danforth, W.H., Naegle, S., Bing, R.J. (1960) Myocardial metabolism of fatty acids. *J. Clin. Invest.* **39**, 717-730.
- Benjamin, W.B. Pentyala, S.N., Woodgett, J.R., Hod, Y., Marshak, D. (1994) ATP-citrate-lyase and glycogen synthase kinase-3 beta in 3T3-L1 cells during differentiation into adipocytes. *Biochem. J.* **300**, 477-482.
- Bing, R.J. (1955) The metabolism of heart. *Harvey lect.* **50**, 27-70.
- Bing, R.J., Siegel, A., Ungar, I., Gilbert, M. (1954) Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am. J. Med.* **16**, 504-515.
- Blain, J., Schaeffer, H., Siegel, A., Bing, R.J. (1956) Studies of myocardial metabolism. *Am. J. Med.* **20**, 820-833.
- Blau, K., Halket, J.M. (1993) Dans *handbook of derivatives for chromatography*, 2<sup>nd</sup> edition (Blau, K. and Halket, J.M., eds), pp.1-9, John Wiley and Sons.
- Chambrier, C. (1988) Dans: *Les isotopes stables dans l'étude métabolique en nutrition humaine*, Édition Arnette, Paris, p. 19.
- Cheema-Dhadli, S., Halperin, M.L., Leznoff, C.C. (1973) Inhibition of enzymes which interact with citrate by (-)hydroxycitrate and 1,2,3-tricarboxybenzene. *Eur. J. Biochem.* **38**, 98-102.
- Cheema-Dhadli, S., Robinson, B.H., Halperin, M.L. (1976) Properties of the citrate transporter in rat heart: implications for regulation of glycolysis by cytosolic citrate. *Can. J. Biochem.* **54**, 561-565.
- Chen, S., Ogawa, A., Ohneda, M., Unger, R.H., Foster, D.W., McGarry, J.D. (1994) More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling. *Diabetes* **43**, 878-883.
- Clarke, B., Wyatt, K.M., McCormack, J.G. (1996) Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: evidence for an indirect mechanism. *J. mol. Cell. Cardiol.* **28**, 341-350.

- Clouatre, D., Rosenbaum, M.E. (1994) The diet and the health benefits of HCA(hydroxycitric acid), A good health Guide pp. 1-48, copyright.
- Comte, B., Vincent, G., Bouchard, B., Des Rosiers, C. (1997) Probing the origin of acetyl-CoA and OAA entering the citric acid cycle from the  $^{13}\text{C}$  labeling of citrate released by perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **272**, 26117-26124.
- Comte, B., Vincent, G., Bouchard, B., Jetté, M., Cordeau, S., Des Rosiers, C. (1997) A  $^{13}\text{C}$  mass isotoper study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **272**, 26125-26131.
- Depré, C., Rider, M.H., Hue, L. (1998) Mecanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* **258**, 277-290.
- Dyck, J.R.B., Barr, A.J., Barr, R.L., Kolattukudy, P.E., Lopaschuk, G.D. (1998) Characterization of cardiac malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol.* **275**, H2122-H2129.
- Edwards, A.P., Cook, G.A. (1998) Differential regulation in the heart of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I muscle and liver isoforms. *Mol. and Cell. Biochem.* **180**, 27-32.
- Feuvray, D., Lopaschuk, G.D. (1997) Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart is decreased. *Cardiovasc. Res.* **34**: 113-120.
- Garland, P.B., Randle, P.J., Newsholme, E.A. (1963) Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature*, **200**,381.
- Gertz, E.W., Wisneski, J.A., Stanley, W.C., Neese R.A. (1988) Myocardial substrate utilization during exercise in humans. *J. Clin. Invest.* **82**, 2017-2025.
- Gilbertson, H.R. (1977) Cardiac muscle. Dans: Lipid metabolism in mammals, (Snyder F. ed) New-York: Plenum, vol. 1, p.367-397.
- Goodwin, G.W., Taegtmeyer, H. (1999) Regulation of fatty acid oxidation of the heart MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol* **277**, E772-E777.
- Jang, S.H., Cheesbrough, T.M., Kalattukudy, P.E. (1989) Molecular cloning, nucleotide sequence, and tissue distribution of malonyl-CoA decarboxylase. *J. Biol. Chem* **264**, 3500-5.
- Kantor, P.F., Dyck, J.R.B., Lopaschuk, G.D. (1999) Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart. *Am. J. Med. Sci.* **318**, 3-14.

Kantor, P.F., Robertson, M.A., Coe, J.Y., Lopaschuk, G.D. (1999) Volume overload hypertrophy of the newborn heart slows the maturation of enzymes involved in the regulation of fatty acid metabolism. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 33,1724-1734.

Keul, J., Doll, E., Streim, H., Reindell, H. (1965) *Pflugers Arch Ges Physiol.* **282**, 1-27.

Krebs, H.A., Williamson, D.H., Bates, M.W., Page, M.A., Hawkins, R.A. (1971) The role of ketone bodies in caloric homeostasis. Dans: *Advances in enzyme regulations.* (Weber G., ed.) New-York : Pergamon Press, p.387-409.

Kudo, N.A., Barr, R., Barr, S., Desai, S., Lopaschuk, G.D. (1995) High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J.Biol. Chem.* **270**, 17513-17520.

Lerch, R. (1993) Oxidative substrate metabolism during postischemic reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* **88**, 525-544.

Lewis, Y.S. (1969) Isolation and properties of hydroxycitric acid. *Methods enzymol* **13**, 613-619.

Lopaschuk, G.D., Gamble, J. (1994) Acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid oxidation in the heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72** : 1101-1109.

Lopaschuk, G.D. (1996) Abnormal mechanical function in diabetes: relationship to altered myocardial carbohydrate/lipid metabolism. *Coron. Artery Dis.* **7**, 116-123.

Lopaschuk, G.D., Belke, D.D., Gamble, J., Itoi, T., Schonekess, B.O. (1994) Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochem. Biophys. Acta* **1213**, 263-276.

Lopaschuk, G.D., Witters, L.A., Itoi, T., Barr, R., Barr, A. (1994) Acetyl-CoA carboxylase involvement in the rapid maturation of fatty acid oxidation in the newborn rabbit heart. *J. Biol. Chem.* 269,25871-25878.

McGarry, J.D. (1998) Glucose-fatty acid interactions in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 500S-504S.

McGarry, J.D., Foster, D.W. (1979) In support of the roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransferase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Biol. Chem.* **254**, 8163-8168.

McGarry, J.D., Mills, S.E., Long, C.S., Foster, D.W. (1983) Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase

I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem. J.* **214**, 21-28.

McGarry, J.D., Stark, M.J., Foster, D.W. (1978) Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J. Biol. Chem.* **253**, 8291-8293.

Mc Lafferty, F.W. (1980) *Dans Interpretation of mass spectra*, Third edition, pp.1-14, University Science Books, Mill Valley, California.

Melnick, J.Z., Srere, P.A., Elshourbagy, N.A., Moe, O.W., Preisig, P.A., Alpern, R.J. (1996) Adenosine triphosphate citrate lyase mediates hypocitraturia in rats. *J Clin Invest* **98**, 2381-2387.

Mills, S.E., Foster, D.W., McGarry, J.D.(1983) Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J* **214**, 83-91.

Moule S.K., Edgell N.J., Borthwick, A.C., Denton, R.M. (1992) Coenzyme A is a potent inhibitor of acetyl-CoA carboxylase from rat epididymal fat-pads. *Biochem. J.* **283**, 312-315.

Murthy, M.S.R., Pande, S.V. (1987). Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes. *Biochem. J.* **248**, 727-733.

Neely, J.R., Morgan. H.E. (1974) Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of the heart. *Annu. Rev. Physiol.* **36**, 413-459.

Neely, J.R., Whitmer, K.M., Mochizuki, S. (1976) Effects of mechanical activity and hormones on myocardial glucose and fatty utilization. *Circ. Res.* **38**, 122-130.

Olivier, M.F., Kurien, V.A., Greenwood, T.W. (1968) Relation between serum-free-fatty-acids and arrhythmias and death after acute myocardial infarction. *Lancet* **1**, 710-715.

Oram, J.F., Bennetch, S.L., Neely, J.R. (1973) Regulation of fatty acid utilization in isolated perfused rat hearts. *J. Biol. Chem.* **248**, 5299-5309.

Panksepp, J., Pollack, A., Meeker, R.B., Sullivan, A.C. (1977) (-)-Hydroxycitrate and conditioned aversions. *Pharmacol., Biochem. and Behavior* **6**, 683-7.

Power, G.W., Newsholme, E.A. (1997) Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1 in rat heart and skeletal muscle. *J. Nutr.* **127**, 2142-2150.

- Prentki, M., Corkey, B. E. (1996) Are the  $\beta$ -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM *Diabetes*, **45**, 273-283.
- Peuhkurinen, K.J. Takala, T.E.S., Nuutinen, E.M., Hassinen, I.E. (1983) Tricarboxylic acid cycle metabolites during ischemia in isolated perfused rat heart *Am.J.Physiol.* **244**, H281-288.
- Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A. (1963) The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 785-9.
- Robinson, B.H., Oei, J. (1975) Citrate transport in guinea pig heart mitochondria. *Can. J. Biochem.* **53**, 643-647.
- Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D., Witters, L.A. (1999) Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. physiol.* **276**, E1-18.
- Sacksteder, K.A., Morrell, J.C., Wanders, R.J.A., Matalon, R., Gould, S. (1999) MCD encodes peroxysomal and cytoplasmic forms of malonyl-Coa decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* **35**, 24461-24468.
- Saddik, M., Gamble, J., Witters, L.A., Lopaschuk, G.D. (1993) Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J. Biol. Chem.* **268**, 25836-25845.
- Saddik, M., Lopaschuk, G.D. (1992) Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilisation in isolated working rat hearts. *J. Biol. Chem.* **266**, 8162-8170.
- Saha, A.K., D. Laybutt, D.R., Dean, D., Vavvas, D., Sebokova, E., Ellis, B., Klimes I., Kraegen, W., Shafir, E., Ruderman, N.B. (1999) Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am. J. physiol.* **276**, E1030-1037.
- Saha, A.K., D. Vavvas, T.G., Kurowski, A., Apazidis, L.A., Witters, E. Shafir, Ruderman, N.B. (1997) Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle : its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* **272**, E641-E648.
- Saggerson, D., Ghadiminejad, I., Awan, M. (1992) Regulation of mitochondrial carnitine palmitoyl transferases from liver and extrahepatic tissues. *Adv. Enzyme Regul.* **32**, 285-306.



Sandor, A., Johnson, J.H., Srere, P.A. (1994) Cooperation between enzyme and transporter in the inner mitochondrial membrane of yeast. *J. Biol. Chem.* **47**, 29609-29612.

Scholte, H.R. (1969) The intracellular and intramitochondrial distribution of malonyl-CoA decarboxylase and propionyl-CoA carboxylase in rat liver. *Biochim Biophys. Acta.* **178**,137-44.

Schulz, H. (1994) Regulation of fatty acid oxidation in heart *J. Nutr.* **124**, 165-171.

Stanley, W.C., Hernandez, L.A., Spires, D., Bringas, J., Wallace, S., McCormack, J.G. (1995) Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl-CoA levels in normal and ischemic swine myocardium: Effects of dichloroacetate. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 905-914.

Sluse, F.E., Meijer, A.J., Tager, J.M. (1971) Anion translocators in rat-heart mitochondria. *FEBS Lett.* **18**, 148-153.

Stanley, W.C., Lopaschuk, G.D., McCormack, J.G. (1997) Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardio. Res.* **34**, 25-33.

Taegtmeyer, H. (1985) Carbohydrate interconversions and energy production. *Circulation* **72**, 1-8.

Taegtmeyer, H., Passmore, J.M. (1985) Defective energy metabolism of heart in diabetes. *Lancet* **1**, 139-141.

Taegtmeyer, H. (1995) One hundred years ago: Oscar Langendorff and the birth of cardiac metabolism. *Can. J. Cardio.* **11**, 1030-1035.

Thampy, K.G. (1989) Formation of malonyl-Coenzyme A in rat heart. *J. Biol. Chem.* **264**, 17631-17634.

Van der Vusse, G.J., Glatz, J.F., Stam, H.C.G., Reneman, R. (1992) Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol.* **72**, 881-940.

Vincent, G., Comte, B., Poirier, M., Des Rosiers, C. (2000) Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am. J. Physiol.*, **278**, E846-E856.

Voilley, N., Roduit, R., Vicaretti, R., Bonny, C., Waeber, G., Dyck, J.R.B., Lopaschuk, G.D., Prentki, M. (1999) Cloning and expression of rat pancreatic  $\beta$ -Cell malonyl-CoA decarboxylase. *Biochem. J.* **340**, 213-217.

Wang, D., Buja, M., McMillin, J.B. (1996) Acetyl-Coenzyme A carboxylase activity in neonatal rat cardiac myocytes in culture: citrate dependence and effects of hypoxia. *Arch. Biochem. Biophys.* **325**, 249-255.

Weiss, R.G., Chaclo, V.P., Gerstenblith, G. (1989) Fatty acid regulation of glucose metabolism in the intact beating rat heart assayed by carbon-13 NMR spectroscopy: The critical role of pyruvate dehydrogenase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**, 469-478.

Wheeler, T.J. (1988) Translocation of glucose transporters in response to anoxia in heart. *J. Biol. Chem.* **263**, 19447-19454.

Wit-Peeters, E.M., Scholte, H.R., Elenbaas, H.L. (1970) Fatty acid synthesis in heart. *Biochim. Biophys. Acta* **210**, 360-70.

Yono, S., Sweetman, L., Thorburn, D.R., Mofidi, S., Williams, J.C. (1997) A new case of malonyl-CoA decarboxylase deficiency presenting with cardiomyopathy. *Eur. J. Pediatr.* **156**, 382-383.