

Université de Montréal

**Impact de facteurs sanguins et d'agents thérapeutiques sur  
la survie de fibroblastes de sujets atteints de la forme  
canadienne-française du syndrome de Leigh (LSFC)**

Par

Marie-Eve Rivard

Département de nutrition

Faculté de médecine

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

Août, 2010

© Marie-Eve Rivard, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Impact de facteurs sanguins et d'agents thérapeutiques sur la survie de fibroblastes de  
sujets atteints de la forme canadienne-française du syndrome de Leigh (LSFC)

Présenté par :  
Marie-Eve Rivard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Geneviève Mailhot, président-rapporteur  
Dr. Christine Des Rosiers, directeur de recherche  
Dr. Lise Coderre, codirectrice de recherche  
Dr. Geneviève Renier, membre du jury

## Résumé

La forme canadienne-française du syndrome de Leigh (LSFC) est une maladie métabolique associée à une déficience en cytochrome oxydase (COX) et caractérisée par des crises d'acidose lactique, menant à une mort prématurée. Les mécanismes qui sous-tendent l'induction des crises restent inconnus et il n'existe aucune thérapie efficace pour les prévenir. Cette étude vise à caractériser l'effet de facteurs métaboliques périphériques potentiellement altérés chez les patients LSFC sur la mort de lignées cellulaires issues de ces patients et de témoins puis, à identifier des agents thérapeutiques pouvant la prévenir. Nous postulons que (i) ces facteurs métaboliques induiront une mort prématurée des cellules de patients et que (ii) les interventions susceptibles de la prévenir pallieront les conséquences de la déficience en COX, soit la diminution des taux d'adénosine triphosphate (ATP) et l'augmentation du stress oxydant, du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et des lipides toxiques.

Un criblage de 8 facteurs sanguins et 10 agents thérapeutiques a été réalisé. Les paramètres mesurés incluent la nécrose, l'apoptose, l'ATP et l'activité de la COX.

Les fibroblastes LSFC sont plus susceptibles à la mort par nécrose ( $39\pm 6\%$ ) induite par du palmitate plus lactate, un effet associé à des niveaux d'ATP diminués ( $53\pm 8\%$ ). La mort cellulaire est réduite de moitié par l'ajout combiné d'agents ciblant le NADH, l'ATP et les lipides toxiques, alors que l'ajout d'antioxydants l'augmente.

Ainsi, un excès de nutriments pourrait induire la mort prématurée des cellules LSFC et, pour atténuer cette mort, il serait important de combiner plusieurs interventions ciblant différents mécanismes.

Mots clés : LSFC, acidose lactique, leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein, mitochondrie, cytochrome c oxydase, fibroblaste, palmitate, lactate, bleu de méthylène, carnitine.

## Abstract

Leigh syndrome French-Canadian variant (LSFC) is a metabolic disease associated with cytochrome c oxidase (COX) deficiency and characterized by episodes of lactic acidosis, referred to as “crisis”, leading to death at an early age. The mechanisms underlying a crisis and its cellular consequences remain elusive, and there is no effective therapy. The aim of this study was to characterize the effect of peripheral metabolic factors that are potentially altered in patients with LSFC on their cells death and to identify therapeutic agents able to prevent them using cell-lineage from LSFC patients and controls. The hypothesis are that (i) these metabolic factors can induce premature death in patient cells, and (ii) interventions that could rescue these cells may target potential consequences of COX deficiency, namely low adenosine triphosphate (ATP), high nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and toxic lipids, as well as oxidative stress.

A screening of 8 blood factors and 10 therapeutic agents was conducted in fibroblasts. Parameter measured included cell death by necrosis and apoptosis, as well as ATP level and COX activity.

LSFC fibroblasts were more susceptible to necrosis ( $39\pm 6\%$ ) induced by high palmitate plus lactate and this was associated with a lower ATP ( $53\pm 8\%$ ). Cell death decreased 2-fold with combined interventions, which presumably act on NADH, ATP, and the accumulation of toxic lipids, but increased with antioxidants.

Collectively, our results emphasize the importance of nutrient overload as a factor eliciting premature cell death in LSFC cells and of combining interventions acting through various mechanisms for cell death rescue.

Keywords : LSFC, lactic acidosis, leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein, mitochondria, cytochrome c oxidase, fibroblast, palmitate, lactate, methylene blue, carnitine.

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste de sigles et abréviations.....	xi
Remerciement.....	xiii
Introduction .....	1
1- Les maladies mitochondriales.....	1
2- Le syndrome de Leigh.....	1
3- Le syndrome de Leigh de forme canadienne-française .....	2
3.1- Description.....	2
3.2- Le gène LRPPRC .....	6
3.3- La déficience en COX.....	9
3.3.1- La mitochondrie .....	9
3.3.2- L'oxydation des nutriments .....	10
3.3.3- La chaîne respiratoire mitochondriale.....	14
3.3.4- Caractéristiques de la COX.....	16
3.4- Les conséquences de la déficience en COX.....	17
3.4.1- Diminution de la production d'ATP et accumulation de métabolites... 18	
3.4.1.1- L'accumulation de NADH.....	18
3.4.1.2- L'accumulation de lactate .....	19
3.4.2- L'augmentation du stress oxydant.....	20
3.4.3- La mort cellulaire .....	22
3.4.3.1- L'apoptose.....	23
3.4.3.2- L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale	26
4- Les agents potentiellement inducteurs des crises d'acidose .....	27
4.1- Lactate, bicarbonate, pH et glucose .....	28
4.2- Palmitate.....	29

4.3- Cytokines, agoniste $\beta$ -adrénergique et stress oxydant .....	30
5- Les agents thérapeutiques potentiels .....	31
5.1- Agents ciblant les altérations métaboliques .....	31
5.1.1- L'accumulation de NADH (bleu de méthylène et dinitrophénol).....	31
5.1.2- Divers autres mécanismes (carnitine, propionate et fénofibrate).....	33
5.2- Agents ciblant le pore de transition de perméabilité mitochondriale (cyclosporine A et sildénafil) .....	34
5.3- Agents ciblant le stress oxydant.....	35
6- Objectifs de travail, hypothèse et approche expérimentale.....	37
Matériel et méthodes .....	40
1- Principe général de l'étude.....	40
2- Culture des lignées cellulaires.....	43
3- Préparation des conditions .....	45
4- Mesure de la nécrose cellulaire .....	47
5- Mesure de l'apoptose cellulaire .....	49
6- Mesures des niveaux d'ATP cellulaire .....	51
7- Dosage de la COX.....	52
8- Dosage de la citrate synthase .....	54
9- Dosage des protéines.....	55
10- Tests statistiques .....	56
Résultats .....	57
1- Étude pilote : Facteurs sanguins.....	57
2- Étude pilote : Agents thérapeutiques .....	63
3- Étude complète.....	69
4- Activité de la COX.....	73
5- Quantité d'ATP cellulaire .....	75
Discussion .....	77
4.1- Facteurs sanguins .....	77
4.2- Agents thérapeutiques .....	85
4.3- Rôle de la COX et de l'ATP .....	90
4.4- L'hétérozygote composé .....	93

4.5- Limites de l'étude.....	94
Conclusion et perspectives futures.....	98
Bibliographie.....	103

## Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques métaboliques des patients LSFC avant et après la crise comparativement aux témoins.....	5
Tableau II : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires utilisées .....	43
Tableau III : Composition des solutions de vitamines et d'acides aminés.....	44
Tableau IV : Concentrations testées pour les facteurs sanguins .....	46
Tableau V : Concentrations testées pour les agents thérapeutiques.....	47

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma illustrant la production d'énergie à partir des principaux nutriments .....	11
Figure 2 : Transport des acides gras à travers les membranes mitochondriales.....	12
Figure 3 : Réactions enzymatiques de la $\beta$ -oxydation.....	13
Figure 4 : Cycle de l'acide citrique (CAC) ou cycle de Krebs.....	14
Figure 5 : Chaîne respiratoire mitochondriale.....	15
Figure 6 : Schéma illustrant les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose .....	24
Figure 7 : Hypothèse de travail .....	38
Figure 8 : Schéma expérimental suivi pour la deuxième partie de l'étude .....	42
Figure 9 : Réaction chimique induite par la LDH .....	48
Figure 10 : Clivage induit par les caspases 3 et 7 .....	50
Figure 11 : Réaction chimique induite par la luciférase.....	51
Figure 12 : Réaction chimique induite par la CS .....	54
Figure 13 : Effet d'une hyperglycémie, d'une hyperlactatémie, d'une faible concentration de bicarbonate et d'un pH acide sur la relâche de LDH.....	58
Figure 14 : Courbe dose-réponse de l'effet du palmitate 0,5, 0,75 et 1 mM sur la relâche de LDH .....	59
Figure 15 : Effet d'une concentration élevée de palmitate et de lactate sur la relâche de LDH.....	60
Figure 16 : Effet d'une hyperlactatémie, d'une concentration élevée de palmitate et de TNF- $\alpha$ sur la relâche de LDH.....	61
Figure 17 : Effet d'une concentration élevée d'isoprotérénol et de palmitate sur la relâche de LDH .....	62
Figure 18 : Effet d'une concentration élevée de palmitate et de lactate sur l'apoptose cellulaire .....	63
Figure 19 : Effet du MB à 125 nM sur la mort cellulaire induite par une concentration élevée de palmitate et de lactate.....	64
Figure 20 : Effet du resvératrol sur le pourcentage de nécrose induit par une concentration élevée de palmitate et lactate .....	66

Figure 21 : Effet de l'idebenone sur la mort cellulaire induite par une concentration élevée de palmitate et lactate.....	67
Figure 22 : Effet de la carnitine 1 mM, du propionate 0,2 mM, du MB 125 nM et du sildénafil 10 µM sur la mort cellulaire induite par une concentration élevée de palmitate et lactate.....	69
Figure 23 : Mort cellulaire associée à une concentration élevée de palmitate et de lactate pour la moyenne des 4 témoins et des 3 patients .....	70
Figure 24 : Diminution relative de la mort cellulaire associée à la carnitine, le propionate et le MB comparativement à la combinaison de concentrations élevées de palmitate et lactate.....	72
Figure 25 : Activité de la COX pour la moyenne des 4 témoins et la moyenne des 3 patients.....	74
Figure 26 : Effet d'une concentration élevée de palmitate et lactate, ainsi que de la combinaison des trois agents thérapeutiques sur l'activité de la COX .....	74
Figure 27 : Variation relative du taux d'ATP cellulaire avec le palmitate 1 mM, le lactate 10 mM, la carnitine 1 mM, le propionate 0,2 mM et le MB 125 nM .....	76
Figure 28 : Schéma du métabolisme énergétique cellulaire affecté par la déficience en COX.....	92

## Liste de sigles et abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADNmt : ADN mitochondrial
- ADP : adénosine diphosphate
- AMP : adénosine monophosphate
- AMPK : protéine kinase activée par l'AMP
- ANT : adénine nucléotide translocase
- Apaf1 : facteur activateur des protéases apoptotiques 1
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- ATP : adénosine triphosphate
- CAC : cycle de l'acide citrique
- COX : cytochrome c oxydase
- COXI : sous-unité I de la COX
- COXII : sous-unité II de la COX
- COXIII : sous-unité III de la COX
- CPT : carnitine palmitoyltransférase
- CS : citrate synthase
- DMEM : « Dulbecco's modification of eagle's medium »
- DNP : 2,4-dinitrophénol
- D.O. : densité optique
- DPBS : « Dulbecco's phosphate-buffered saline »
- EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
- FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucléotide
- FBS : sérum foetal bovin
- GSH : glutathion
- HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- HNE : 4-hydroxynonéal
- IMDM : « Iscove's modification of DMEM »
- iNOS : oxyde nitrique synthase inductible

kDa : kilodalton  
LCS : liquide cébrospinal  
LDH : lactate déshydrogénase  
L/P : lactate/pyruvate  
LRPPRC : « leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein »  
LS : syndrome de Leigh  
LSFC : syndrome de Leigh de forme canadienne-française  
MB : bleu de méthylène  
MOMP : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale  
NAC : N-acétylcystéine  
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide  
NO : oxyde nitrique  
PGC-1 $\alpha$  : coactivateur 1 $\alpha$  du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes  
Pi : phosphate inorganique  
PLC : propionyl-L-carnitine  
PPAR : récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes  
PPR : motif répété de pentatricopeptide  
PTP : pore de transition de perméabilité  
RLU : unité relative de luminescence  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
SD : écart-type  
SEM : erreur-type  
SIRT1 : sirtuines 1  
SLIRP : « SRA-stem loop interacting RNA-binding protein »  
TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale- $\alpha$   
UCP1 : protéine découplante 1  
VDAC : canal anionique voltage-dépendant

## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Christine Des Rosiers, ainsi que ma codirectrice de recherche, Dre Lise Coderre, de m'avoir permis de réaliser ce projet qui me tient à cœur, pour leur soutien et leur disponibilité pendant ces deux années de collaboration.

Merci à tous les membres du laboratoire pour leur accueil, leur amitié et leur aide précieuse tout au long de ma maîtrise.

Merci à tous les membres du consortium de l'acidose lactique pour leurs conseils avisés ainsi qu'à l'Association de l'acidose lactique qui ont supporté financièrement mon projet.

Un gros merci également à ma famille et mon conjoint pour leur support de tous les jours.

## **Introduction**

### **1- Les maladies mitochondriales**

Les maladies mitochondriales sont extrêmement répandues à travers le monde et affectent particulièrement les enfants en bas âge. On estime leur prévalence à 1 naissance sur 5000. Elles sont souvent reliées à des désordres héréditaires du métabolisme énergétique et elles peuvent affecter tous les organes du corps humain avec un degré de sévérité varié. Environ 10 à 15 % des maladies congénitales mitochondriales sont reliées à des mutations de l'acide désoxyribonucléique mitochondrial (ADNmt) alors que les autres sont induites par des mutations de l'ADN nucléaire. Ces dernières sont les plus communes chez les enfants. Ces mutations peuvent perturber la fonction mitochondriale au niveau des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, des protéines responsables de leur assemblage, des cofacteurs impliqués dans le transport des électrons ou des transporteurs nécessaires à l'importation des protéines dans la mitochondrie. Des problèmes au niveau de la réplication et de la transcription génique sont aussi à considérer. Des facteurs indépendants de la chaîne respiratoire, comme une déficience en pyruvate déshydrogénase, sont responsables d'autres maladies mitochondriales. Il existe donc plusieurs types de maladies mitochondriales dont les symptômes varient fortement <sup>1</sup>.

### **2- Le syndrome de Leigh**

Le syndrome de Leigh (LS) est une maladie mitochondriale congénitale et récessive découverte en 1951 par le Dr. Denis Leigh <sup>2</sup> et qui touche 1 enfant sur 40 000 <sup>3,4</sup>. La maladie se présente généralement chez les jeunes enfants, mais parfois aussi chez les adolescents et plus rarement chez les adultes. Aussi appelé encéphalomyopathie nécrosante subaiguë, ce désordre héréditaire neurodégénératif affecte principalement le système nerveux central et est caractérisé par des lésions nécrosantes symétriques bilatérales dans le tronc cérébral, le thalamus et les noyaux

gris centraux. Les symptômes et la sévérité de la maladie peuvent varier fortement d'un individu à l'autre. Parmi les principaux symptômes reliés au système nerveux central se retrouvent un retard de développement, une régression psychomotrice, une dysfonction du tronc cérébral, différentes atteintes oculaires, de l'ataxie, une dystonie et une insuffisance respiratoire, ce dernier symptôme se retrouvant dans 64-72 % des cas<sup>5,6</sup>. Le LS est caractérisé par une importante hétérogénéité génétique. En effet, les mutations à l'origine de ce syndrome peuvent se situer au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I, II, IV et V), du coenzyme Q ou du complexe de la pyruvate déshydrogénase<sup>6</sup>. La principale conséquence du LS est une augmentation des taux de lactate et de pyruvate dans le sang et le liquide cébrospinal (LCS). Le ratio lactate/pyruvate (L/P), un reflet du taux d'oxydoréduction cellulaire, est également augmenté, résultant en un pronostic défavorable chez les enfants atteints. En effet, cette maladie mène souvent à la mort des patients en bas âge, soit moins de 5 ans<sup>4</sup>. Il n'existe encore aucun traitement efficace pour prévenir ou guérir la maladie. Toutefois, l'administration de certains suppléments de type nutritionnel, dont la carnitine, le coenzyme Q ou certaines vitamines (riboflavine, thiamine, niacine, etc.)<sup>6</sup> a souvent été associée à certains bénéfices dans les cas de maladies mitochondriales, soit de ralentir ou arrêter la progression des symptômes cliniques<sup>7</sup>.

### **3- Le syndrome de Leigh de forme canadienne-française**

#### **3.1- Description**

Il existe une variante du LS que l'on retrouve au Québec. Celle-ci est localisée plus particulièrement dans les régions du Saguenay-Lac-Saint-Jean et de Charlevoix. En effet, ces régions étant géographiquement très éloignées, l'immigration au cours des années fut limitée. Ainsi, la population d'origine, formée en grande partie de colonisateurs français, s'est multipliée pour passer de 600 en 1675 à 320 000 en 2000. Le bagage génétique de la population, résultant de cet effet fondateur, est donc très conservé, ce qui a amené une prévalence plus importante des désordres génétiques

récessifs ou dominants<sup>4</sup>. Dans ces régions, 1 personne sur 23 est porteuse de la mutation associée à la maladie (la mutation sera décrite dans le prochain paragraphe) et l'incidence est de 1 naissance sur 2063<sup>8</sup>. Les premiers symptômes de la maladie ont été observés cliniquement par le pédiatre Jean Larochelle en 1980, soit principalement une hypotonie et un retard de développement. Cette maladie, nommée syndrome de Leigh de forme canadienne-française (LSFC) ou acidose lactique, ressemble beaucoup au LS classique. En effet, il s'agit aussi d'une maladie congénitale récessive touchant les enfants en bas âge. Les mêmes lésions nécrosantes bilatérales et symétriques associées à une prolifération vasculaire et astrocytaire sont présentes dans le système nerveux central. La particularité de ce syndrome est la survenue de crises d'acidose sévères menant souvent à la mort des enfants atteints et dont la cause est inconnue. Cette crise survient généralement avant l'âge de 2 ans et est caractérisée par une respiration de Kussmaul, ou respiration précédant un coma, et une perte de conscience<sup>8</sup>.

En 1991, les parents des enfants malades ou décédés de la maladie ont créé, avec l'importante participation de M. Pierre Lavoie, la Fondation de l'Association de l'acidose lactique<sup>143</sup>. Cette association a permis de faire connaître la maladie à travers le Québec et surtout, d'amasser des fonds pour la recherche, le but principal étant la découverte du gène responsable afin de rendre possible le dépistage. Quelques années plus tard, en 2001, le Dr. Rioux et ses collaborateurs ont découvert le locus qui serait associé au LSFC sur le chromosome 2p16<sup>4</sup>. Deux années plus tard, ils ont découvert les deux mutations responsables de tous les cas du LSFC sur le gène « leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein » (LRPPRC)<sup>9</sup>. La mutation principale consiste en un échange au niveau d'une paire de base (un C remplacé par un T) à la position 1119 de l'exon 9, ce qui résulte en une substitution d'une alanine par une valine en position 354 (A354V). Environ 95 % des enfants atteints sont homozygotes pour cette mutation. En fait, un seul cas à ce jour est un hétérozygote composé. Il possède une deuxième mutation, soit une délétion de 8 nucléotides dans l'exon 35 du même gène qui forme un codon stop prématuré à la position 1277 (C1277STOP)<sup>9</sup>.

Le patient hétérozygote composé présente des symptômes similaires aux patients homozygotes, mais il a survécu à dix crises dans sa vie. Ce patient s'avère un cas clinique très intéressant du fait qu'il semble aussi susceptible que les patients homozygotes à faire des crises, mais il aurait certainement un mécanisme compensatoire lui permettant de survivre à celles-ci. De ce fait, les cellules de ce patient seront incluses dans l'étude, et comparées à celles des patients homozygotes et des témoins afin de mieux comprendre ce mécanisme.

La maladie est caractérisée par une diminution de l'activité de la cytochrome c oxydase (COX) ou complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette déficience varie selon l'organe, ce qui est une différence majeure en comparaison au LS classique. Par exemple, dans le cerveau et le foie, son activité est diminuée de 80 à 90 % comparativement à 50 % dans les muscles squelettiques et les fibroblastes de la peau. La déficience n'atteint ni le cœur, ni les reins. L'atteinte du foie résulte en une stéatose microvésiculaire<sup>8</sup>. Plusieurs études suggèrent que la déficience en COX proviendrait d'un problème au niveau de l'assemblage des sous-unités de cette enzyme<sup>10, 11</sup>.

Chez les enfants atteints du LSFC, les crises d'acidose surviennent dans environ 90 % des cas et, de ce nombre, 82 % vont en mourir\*. Les éléments déclencheurs de cette crise demeurent à ce jour un mystère. Au niveau du bilan clinique, on observe de légères modifications du taux de certains métabolites sanguins et du LCS, notamment le lactate et le bicarbonate, chez les patients LSFC comparativement aux valeurs retrouvées chez les enfants sains (témoins) (Tableau I, p. 5). Pendant une crise, ces modifications sont accentuées et les valeurs fluctuent beaucoup d'un individu à l'autre (Tableau I, p. 5). Il y aurait alors une importante décompensation métabolique qui causerait une défaillance de multiples organes et qui serait associée à une mort rapide, soit en une journée. Les patients qui réussissent à

---

\* François Guillaume DeBray, communication personnelle, article en préparation pour soumission.

traverser cette crise développent en général une déficience neurologique progressive qui mène aussi à la mort en quelques semaines <sup>\*</sup>.

**Tableau I : Caractéristiques métaboliques des patients LSFC avant et après la crise comparativement aux témoins**

	Témoins		Sujets LSFC	
	État basal (sain)		Avant la crise	Pendant la crise
Lactate du LCS	0,8-2,2 mM		4,8 mM (11)	11,5 mM (2)
Lactate sanguin	0,8-2,2 mM		4,3 mM (11)	15,0 mM (2)
Bicarbonate sanguin	22,0-26,0 mM		17,5 mM (14)	9,0 mM (10)
pH sanguin	7,35-7,45		7,42 (14)	7,10 (10)

Informations tirées de : Morin et al. (1993). Les valeurs pour l'état basal et en crise représentent la moyenne des mesures prises chez des enfants atteints de la maladie. Le chiffre entre parenthèse représente le nombre d'enfants chez lesquels la mesure a été possible.

On ne sait pas ce qui déclenche les crises mais les observations rapportées par les parents d'enfants malades suggèrent que celles-ci surviennent souvent suite à des épisodes de stress physique ou émotionnel. Une activité physique trop intense, une infection avec de la fièvre, un repas trop riche en gras ou un jeûne sont d'autres exemples de situations qui peuvent déclencher les crises <sup>143</sup>. Chez les enfants en crise, certains éléments sont associés à un mauvais pronostic, comme une cytolysse hépatique, des pertes de conscience et une glycémie élevée en début de crise. En effet, les enfants ayant un taux de glucose sanguin supérieur à 10 mM au début de la crise ont un risque de mortalité augmenté de 30 fois par rapport à un enfant ayant un taux de glucose sanguin inférieur à 10 mM <sup>\*</sup>. Le traitement utilisé chez les patients en crise comprend une ventilation mécanique, une thérapie à l'oxygène et un traitement alcalin. Les quelques patients qui ne font pas de crises et atteignent l'adolescence ou l'âge adulte ont un léger handicap mental <sup>8</sup>.

<sup>\*</sup> François Guillaume DeBray, communication personnelle, article en préparation pour soumission.

### 3.2- Le gène LRPPRC

Le gène code pour une protéine riche en leucine (13 %) dont le poids moléculaire est de 130 kilodaltons (kDa), nommée LRP130 ou LRPPRC. Jusqu'à ce jour, aucun rôle précis n'a été identifié pour LRPPRC. Les études récentes portant sur cette protéine ont généré plusieurs informations intéressantes qui mèneront sans doute prochainement à la découverte de son rôle exact. Même si le gène est nucléaire, la protéine est localisée principalement dans la matrice mitochondriale<sup>12</sup>. Chez les patients LSFC, la mutation de LRPPRC n'affecte pas son importation vers la mitochondrie, mais plutôt sa stabilité, ce qui cause une dégradation rapide de la protéine<sup>3, 13</sup>. La forte ressemblance entre LRPPRC et PET309, un homologue retrouvé chez la levure, soulève d'autres hypothèses quant au rôle de cette protéine<sup>12</sup>. PET309 est reconnu pour jouer un rôle dans la stabilité de l'ARNm de la sous-unité I de la COX et dans le métabolisme mitochondrial<sup>3, 12</sup>.

Des analyses de la structure de LRPPRC ont fourni d'importantes informations supplémentaires<sup>14</sup>. Il a été démontré que LRPPRC est composé de 2 domaines : le domaine SEC1 qui est impliqué dans le transport vésiculaire et donc possiblement dans la transmission synaptique et l'exocytose, ainsi que le domaine ENTH qui est relié à l'endocytose et à l'organisation du cytosquelette<sup>14</sup>. De plus, la portion N-terminale de la protéine permettrait le transport nucléaire, alors que la partie C-terminale permettrait la liaison de LRPPRC à l'acide ribonucléique messager (ARNm)<sup>12, 14</sup>. LRPPRC fait partie d'une famille de protéines caractérisées par des motifs répétés de pentatricopeptide (PPR) qui forment des super-hélices favorisant les interactions protéines-protéines ou protéines-ARNm. LRPPRC contient 11 motifs de ce genre<sup>12</sup>. Il a été démontré que LRPPRC peut se lier à l'ARN polyadénylé dans le noyau et la mitochondrie<sup>9, 12</sup>. Elle participerait donc à la transcription, la maturation et la stabilité de tous les ARNm mitochondriaux, en particulier au niveau des sous-unités I et III de la COX<sup>15, 16</sup>.

Une étude récente de Sasarman et al. (2010) montre que « SRA-stem loop interacting RNA-binding protein » (SLIRP), un corépresseur de 12 kDa du récepteur nucléaire des stéroïdes<sup>17</sup>, co-immunoprécipite avec LRPPRC. En fait, ces deux protéines forment un complexe de 250 kDa qui serait nécessaire pour maintenir les taux d'ARNm mitochondriaux. En outre, l'article de Baughman et al. (2009) démontre qu'une réduction de l'expression de SLIRP induit une diminution des niveaux d'ARNm mitochondriaux, malgré un état normal de l'ADNmt. Cette diminution est corrélée à une déficience de l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. SLIRP semble donc jouer un rôle dans le maintien de la stabilité des ARNm mitochondriaux. Ce résultat est intéressant puisque les patients LSFC présentent une moins grande quantité de la protéine SLIRP et de LRPPRC<sup>13</sup>.

Dans un article récent, une nouvelle approche génomique a été utilisée pour déterminer le rôle de la protéine LRPPRC<sup>15</sup>. Les auteurs ont induit un « knock-down » du gène LRPPRC, à l'aide d'ARN interférents, dans des fibroblastes de peau et montré que cette déficience amène une diminution du taux d'ARNm mitochondrial, et donc un mauvais assemblage des sous-unités des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>15</sup>. En outre, l'absence de LRPPRC n'influence pas l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales. La délétion de cette protéine a entraîné trois autres effets majeurs au niveau du métabolisme. Premièrement, une augmentation de l'expression d'enzymes nécessaires au métabolisme du fructose et du mannose, suggérant un lien avec la glycolyse. Il pourrait s'agir d'un mécanisme compensatoire à l'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ensuite, une augmentation de la biosynthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Cette observation est intéressante car il est connu que l'inhibition de la chaîne respiratoire et l'acidification du milieu de culture cellulaire induisent une augmentation des prostaglandines qui peuvent inhiber l'apoptose. Finalement, ils ont observé une diminution de la biosynthèse des glycosphingolipides<sup>15</sup>.

Selon une étude réalisée par Cooper et al. (2006) sur des hépatocytes, LRPPRC serait également un des principaux composants d'un énorme complexe transcriptionnel relié à la partie N-terminale du coactivateur  $1\alpha$  du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes (PGC- $1\alpha$ ). PGC- $1\alpha$  participerait à la régulation de l'homéostasie du glucose dans le foie via une augmentation de la transcription de la phosphoénol pyruvate carboxykinase et de la glucose-6-phosphatase. La transcription de PGC- $1\alpha$  est induite lors du jeûne et est augmentée chez les diabétiques<sup>3</sup>. LRPPRC augmenterait l'activité transcriptionnelle de PGC- $1\alpha$  et de son principal homologue, PGC- $1\beta$ . Cet effet est diminué de 50 % lorsque LRPPRC est muté<sup>3</sup>.

PGC- $1\alpha$  a aussi un rôle dans la thermogénèse par sa capacité à lier le récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes (PPAR- $\alpha$ ) dans le tissu adipeux brun<sup>18</sup> et par la coactivation de la protéine découplante 1 (UCP1). Cette protéine libère les électrons de la chaîne de transport, créant de la chaleur plutôt que de l'énergie (adénosine triphosphate (ATP)). L'activation de PPAR- $\alpha$  favorise la respiration mitochondriale et permet la biogenèse des mitochondries, soit l'augmentation du nombre de mitochondries par cellule<sup>18, 19</sup>. Il a été démontré qu'un « knock-down » de LRPPRC induit une diminution de l'expression de la protéine UCP1 dans les cellules adipeuses. LRPPRC agirait au niveau du promoteur du gène d'UCP1. LRPPRC affecterait aussi la différenciation du tissu adipeux brun<sup>18</sup>.

En résumé, la mutation A354V présente chez les patients LSFC entraîne une malformation de la protéine LRPPRC résultant en une dégradation rapide de celle-ci, mais n'affectant pas sa localisation mitochondriale<sup>13</sup>. La diminution de la quantité de LRPPRC entraîne une déficience en ARNm mitochondriaux, ce qui affecte l'assemblage des sous-unités protéiques de la COX et donc son activité au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. LRPPRC a plusieurs autres rôles présumés dont on ne connaît toujours pas l'impact dans le LSFC.

### 3.3- La déficience en COX

#### 3.3.1- La mitochondrie

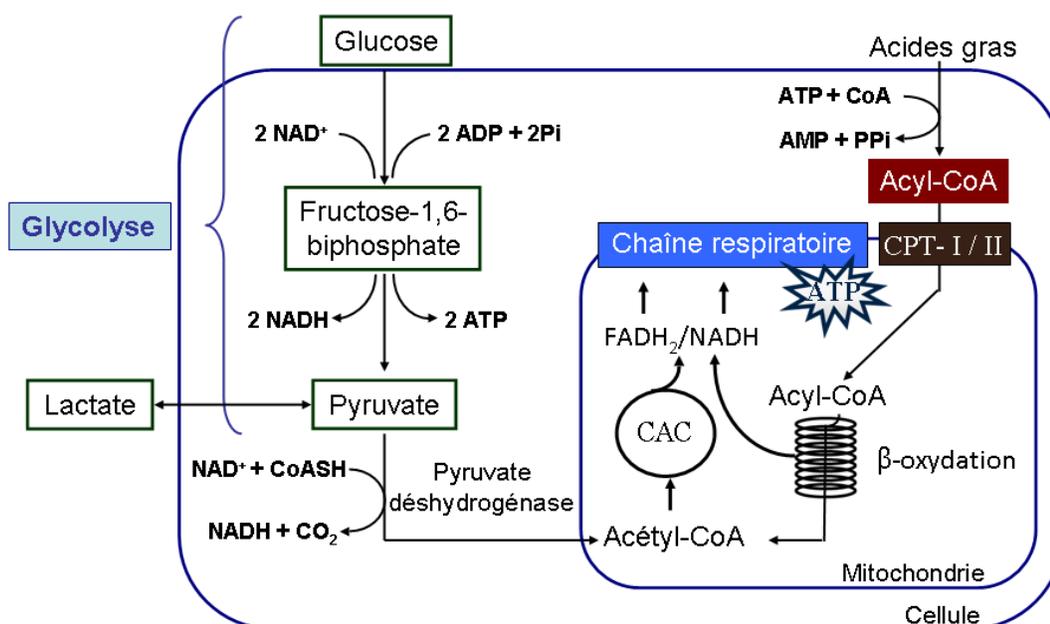
La mitochondrie est un organite présent dans presque toutes les cellules du corps humain, mais en quantité variable. Elle est composée de deux membranes, de l'espace intermembranaire et de la matrice mitochondriale. Cette dernière contient l'ADNmt qui est circulaire. Cet ADNmt est composé de 13 gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire, de 22 gènes codant pour des ARN de transfert et deux gènes codant pour des ARN ribosomiques<sup>1</sup>. L'ADNmt n'est pas protégé par des histones et se situe près de la membrane interne, le principal site de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>20</sup>. Cet ADNmt est aussi caractérisé par (i) une transmission uniquement maternelle puisque seul l'ovaire contient des mitochondries, (ii) un haut taux de mutation et (iii) un très grand nombre de copies par cellule<sup>21</sup>. Comme les mutations sont présentes seulement dans une partie des génomes mitochondriaux (hétéroplasmie), il existe un seuil d'ADNmt muté à atteindre pour obtenir une dysfonction mitochondriale. Ce seuil se situe généralement autour de 90 %<sup>6</sup>, mais il peut varier d'un organe à l'autre puisqu'il dépend de la quantité d'énergie requise par le tissu<sup>21</sup>. Cette hétéroplasmie peut changer avec la division cellulaire et donc la maladie peut se transformer avec l'âge et lors de la transmission de mère en fille<sup>21</sup>.

Les membranes mitochondriales diffèrent de la membrane plasmique par une proportion plus élevée de protéines et par une haute concentration de cardiolipines, un phospholipide anionique ayant un rôle important au niveau du fonctionnement de la chaîne respiratoire<sup>22-24</sup>. La principale fonction de la mitochondrie consiste en la production d'ATP, soit d'énergie, par la phosphorylation oxydative. Les autres rôles de la mitochondrie sont non négligeables : soit la régulation du métabolisme oxydatif cellulaire, la synthèse de l'hème et de stéroïdes, l'homéostasie et le transport du calcium, la mort cellulaire programmée (ou apoptose) et la nécrose cellulaire<sup>21</sup>.

### 3.3.2- L'oxydation des nutriments

Le métabolisme énergétique comprend l'oxydation du glucose, des acides gras libres et des protéines provenant de l'alimentation. Ces réactions fournissent les substrats de la chaîne respiratoire mitochondriale qui est atteinte chez les patients LSFC. Il est donc important de bien comprendre ces réactions afin de voir l'impact possible de la diminution de l'activité de la COX au niveau mitochondrial et cellulaire.

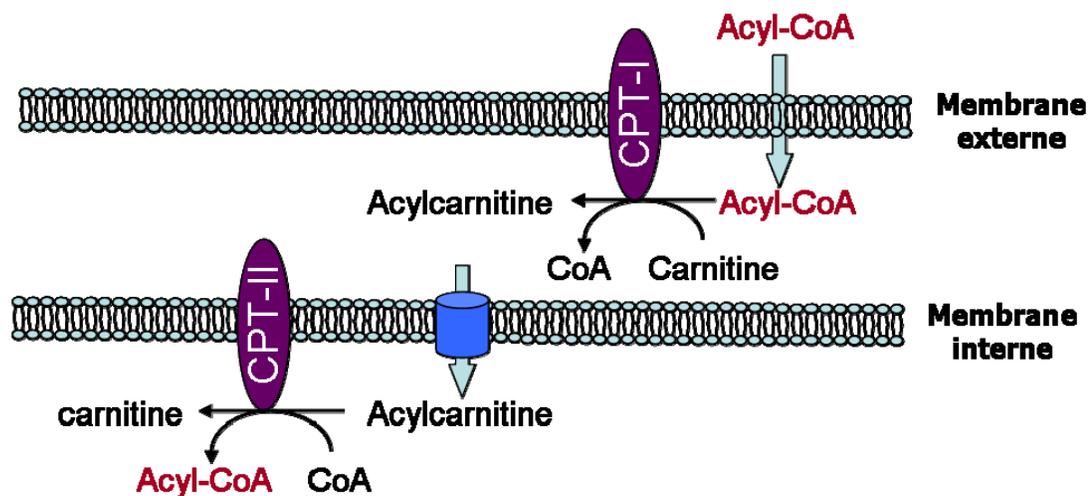
Dans le cytosol, le glucose est métabolisé par la glycolyse en pyruvate (Figure 1, p. 11). Cette cascade enzymatique produit deux molécules d'ATP ainsi que deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Le pyruvate est par la suite transformé en acétyl-CoA par l'enzyme pyruvate déshydrogénase. Cette réaction produit une molécule de NADH. L'acétyl-CoA est le substrat du cycle de l'acide citrique (CAC) ou cycle de Krebs<sup>25</sup> (Figure 1, p. 11). Les protéines, quant à elles, sont catabolisées par des protéases en acides aminés, lesquels peuvent être recyclés en d'autres protéines ou convertis en intermédiaires du CAC. Par exemple, en acétyl-CoA, en succinyl-CoA, en oxaloacétate et  $\alpha$ -cétoglutarate<sup>146</sup>.



**Figure 1 : Schéma illustrant la production d'énergie à partir des principaux nutriments.**

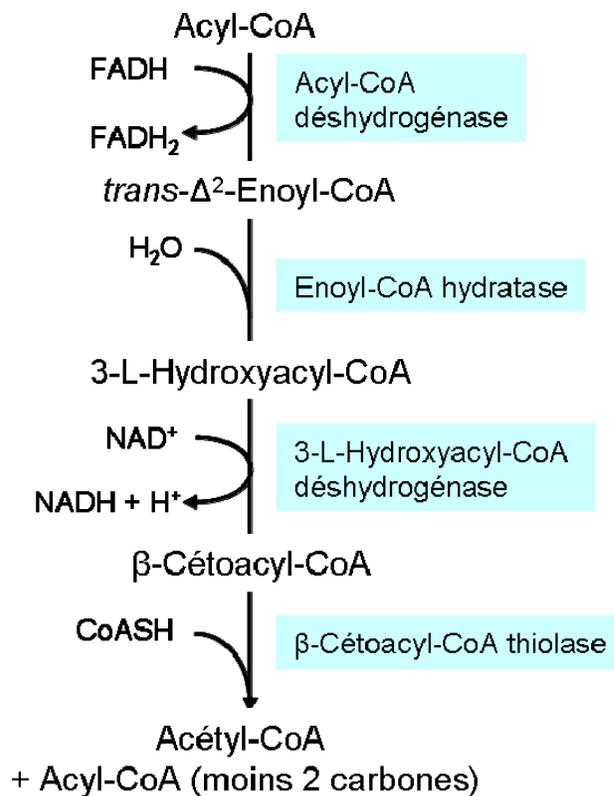
Le glucose et les acides gras sont oxydés par la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation en acétyl-CoA, le substrat du cycle de l'acide citrique (CAC) qui fournit les équivalents réduits permettant à la chaîne respiratoire de produire de l'énergie (ATP). NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, FAD : flavine adénine dinucléotide, ADP : adénosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique, CoASH : coenzyme A, AMP : adénosine monophosphate, CPT : carnitine palmitoyltransférase.

Les acides gras libres entrent dans la cellule puis doivent traverser les membranes mitochondriales. Les acides gras à chaîne courte ou moyenne traversent librement ces membranes. Inversement, les acides gras à chaîne longue doivent être activés pour y parvenir. Cette activation se fait en plusieurs étapes. En premier lieu, l'acide gras se lie à un groupement coenzyme A pour former un acyl-CoA qui sera transporté vers l'espace intermembranaire (Figures 1 et 2, p. 11 et 12). Cet acyl-CoA va ensuite se lier à la carnitine via l'action de la carnitine palmitoyltransférase (CPT)-I pour former un acylcarnitine qui sera transporté vers la matrice par une translocase. Puis, la CPT-II permet de retransformer l'acylcarnitine en carnitine et acyl-CoA<sup>146</sup> (Figure 2, p. 12).



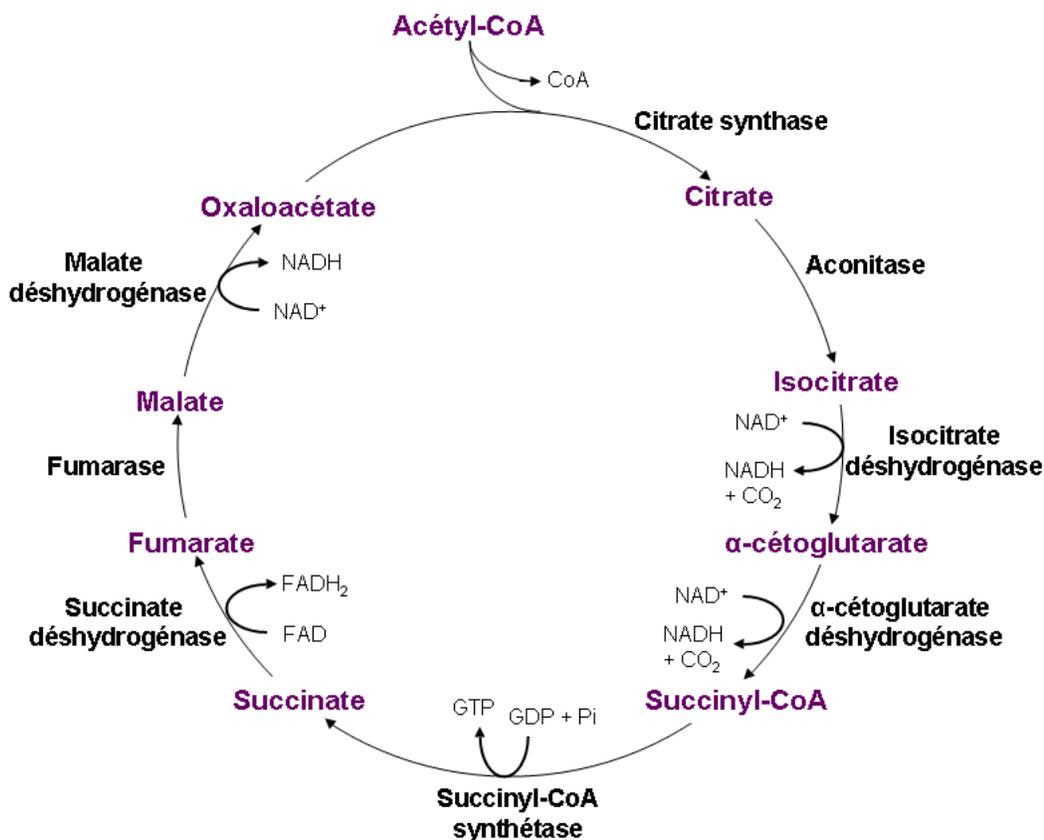
**Figure 2 : Transport des acides gras à travers les membranes mitochondriales.** Figure adaptée de Matera et al. (2003). CPT : carnitine palmitoyltransférase, CoA : coenzyme A.

Les acyls-CoA sont ensuite dégradés par la  $\beta$ -oxydation, soit 4 enzymes qui permettent de former l'acétyl-CoA (Figure 3, p. 13). Les quatre étapes consistent en une déshydrogénation produisant une flavine adénine dinucléotide ( $\text{FADH}_2$ ), suivie d'une hydratation puis, d'une deuxième déshydrogénation produisant une molécule de NADH. L'étape finale est un clivage de deux carbonnes pour former un acétyl-CoA. L'acyl-CoA restant est donc plus court et retournera comme substrat de la  $\beta$ -oxydation jusqu'à ce qu'il soit complètement dégradé ou, si le nombre de carbonnes de la chaîne est impair, il restera un acétyl-CoA accompagné d'un propionyl-CoA <sup>146</sup>.



**Figure 3 : Réactions enzymatiques de la β-oxydation.** Figure adaptée de *Biochemistry*, Voet & Voet, 1990. NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, FAD : flavine adénine dinucléotide, CoA/CoASH : coenzyme A.

Le CAC consiste en huit réactions enzymatiques permettant d'oxyder l'acétyl-CoA, générant ainsi les équivalents réduits nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, parmi les principaux produits se retrouvent trois molécules de NADH, une molécule de FADH<sub>2</sub>, une guanosine triphosphate, deux CO<sub>2</sub> et un groupement CoA (Figure 4, p. 14). L'acétyl-CoA peut aussi, via l'enzyme acétyl-CoA carboxylase, se transformer en malonyl-CoA. Ce dernier est un inhibiteur puissant du CPT-I, empêchant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie <sup>146</sup>.

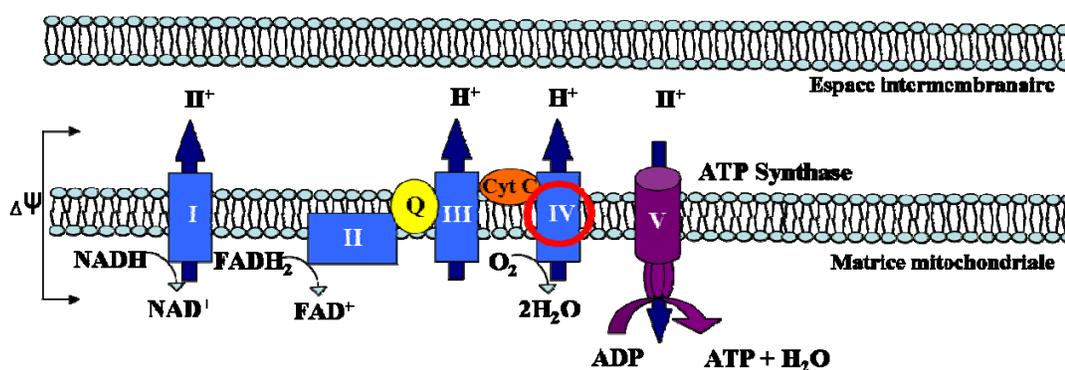


**Figure 4 : Cycle de l'acide citrique (CAC) ou cycle de Krebs.** Figure adaptée de *Biochemistry*, Voet & Voet, 1990. NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, FAD : flavine adénine dinucléotide, GTP : guanosine triphosphate, GDP : guanosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique, CoA : coenzyme A.

### 3.3.3- La chaîne respiratoire mitochondriale

La production d'ATP à partir des équivalents réduits générés par le CAC se fait via la chaîne respiratoire mitochondriale. Celle-ci consiste en 5 complexes protéiques intégrés à la membrane interne (Figure 5, p. 15)<sup>26</sup>. Certaines des sous-unités qui forment ces complexes proviennent de l'ADN nucléaire et d'autres de l'ADNmt. Le complexe I, ou NADH déshydrogénase, reçoit les électrons provenant du NADH. Ce transfert permet l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  qui pourra retourner comme substrat de la glycolyse, de la  $\beta$ -oxydation et du CAC via le système de

navette. Le complexe II, ou succinate déshydrogénase, reçoit des électrons du  $\text{FADH}_2$  qui est produit lors de la transformation du succinate en fumarate (Figure 4, p. 14). Il est le seul complexe qui n'est pas transmembranaire. Il est plutôt attaché à la membrane interne du côté de la matrice. Les électrons sont ensuite transportés vers le complexe III, ou cytochrome c oxydoréductase, qui est l'un des sites majeurs de production de ROS, principalement l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ). Finalement, les électrons sont transférés au complexe IV, ou COX, qui permet la transformation de l'oxygène en eau via le cytochrome c réduit<sup>26</sup>.



**Figure 5 : Chaîne respiratoire mitochondriale.** Le transport des électrons du NADH et  $\text{FADH}_2$  via les 4 complexes de cette chaîne permet le passage de protons  $\text{H}^+$  vers l'espace intermembranaire. Ceci permet à l'ATP synthase ou complexe V de produire l'ATP. Figure adaptée de Bayir et Kagan (2008). NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, FAD : flavine adénine dinucléotide, Q : coenzyme Q, cyt c : cytochrome c,  $\Delta\psi$  : potentiel de membrane, les 5 complexes sont représentés par : I, II, III, IV et V.

Les complexes I, III et IV permettent le transfert des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un fort gradient électrochimique. L'ATP synthase utilise ce gradient pour générer l'ATP à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi). Finalement, la chaîne nécessite deux protéines capables de transporter les électrons entre les complexes, soit le coenzyme Q, situé entre le complexe II et III et le cytochrome c, situé entre le complexe III et IV (Figure 5, p. 15). Le cytochrome c est localisé dans l'espace intermembranaire, lié à la membrane interne. Le gradient de protons forme

un potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) qui est important pour la régulation de l'activité de la chaîne de transport des électrons. En effet, un potentiel de membrane élevé (180-200 mV) inhibe les différents complexes de la chaîne respiratoire et, à l'inverse, un potentiel bas stimule la respiration <sup>27</sup>.

Toutes ces réactions font partie du mécanisme de la phosphorylation oxydative dont les rôles principaux sont la production d'énergie et l'oxydation des coenzymes réduits par la glycolyse, la  $\beta$ -oxydation et le CAC, impliquant le système de navette. Une déficience ou une dysfonction à n'importe quelle étape de ce mécanisme induit un trouble de la chaîne respiratoire mitochondriale, soit la plus grande classe de désordres métaboliques congénitaux <sup>26</sup>.

### **3.3.4- Caractéristiques de la COX**

Le complexe IV de la chaîne respiratoire est celui dont l'activité est diminuée chez les patients atteints du LSFC. Il s'agit d'un complexe protéique membranaire composé de 13 sous-unités dont trois proviennent de l'ADN mitochondrial (COXI, COXII et COXIII) et forment le noyau catalytique de l'enzyme. Ces trois sous-unités possèdent les sites de liaison pour 2 molécules de cuivre et pour 2 hèmes <sup>21, 28</sup>. L'assemblage et la stabilité des sous-unités de la COX nécessitent plusieurs protéines incluant: COX10, SCO1, SCO2 et SURF1 <sup>29</sup>. COX10 est nécessaire pour la liaison de l'hème à la sous-unité COXI. SCO1 et SCO2 sont situés sur la sous-unité COXII et servent de chaperons pour le cuivre, ce qui permet la liaison du cytochrome c. Ces protéines sont extrêmement importantes puisqu'elles sont reliées au bon fonctionnement des sous-unités formant le cœur catalytique de la COX <sup>30</sup>. En revanche, aucun rôle n'a encore été démontré au niveau du LSFC. Finalement, SURF1 aiderait plutôt à l'assemblage des sous-unités. Plusieurs articles démontrent que la déficience en COX dans le LS classique serait causée par une mutation dans SURF1, menant à une dégradation rapide des sous-unités non assemblées par des protéases <sup>6, 29</sup>.

Parmi les 10 sous-unités de la COX encodées dans l'ADN nucléaire, deux sous-unités (COXVIa et COXVIIa) existent en deux isoformes différents (H ou L) dont l'expression est spécifique au tissu. Ces isoformes diffèrent par leur séquence et leur expression, ce qui pourrait expliquer la différence dans la sévérité et l'atteinte des différents tissus dans les cas de LSFC, particulièrement entre le cœur et le foie<sup>4, 27</sup>.

L'activité de la COX dépend en premier lieu de la quantité d'énergie requise par le tissu cible. Il a été démontré qu'un ratio ATP/ADP bas, résultant d'une forte dépense énergétique ou d'une diminution de la production d'ATP, permet d'activer la COX et inversement, une accumulation d'ATP, par augmentation de la production ou diminution de la dépense énergétique, inhibe l'enzyme lorsqu'elle est phosphorylée<sup>27</sup>. L'activité de la COX est aussi modulée par la concentration d'oxygène présente dans le sang, puisque 90 % de l'oxygène respiré est métabolisé par la COX. En absence d'oxygène, par exemple en état d'hypoxie, son activité est diminuée<sup>31</sup>.

La composition lipidique de la membrane et la quantité de ROS modulent aussi l'activité de la COX. Par exemple, une diminution de la quantité de cardiolipines et une augmentation des radicaux peroxydes diminuent son activité<sup>31</sup>. Il existe aussi plusieurs inhibiteurs du complexe IV, entre autres, le cyanure, le cobalt et le monoxyde de carbone. Finalement, l'oxyde nitrique (NO), qui est produit dans plusieurs conditions pathologiques liées au stress et à l'inflammation, inhibe aussi son activité<sup>4, 32</sup>.

### **3.4- Les conséquences de la déficience en COX**

Il est connu que la mutation de LRPPRC chez les patients LSFC induit une diminution de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci mène probablement à un ralentissement ou un blocage partiel du transport des électrons et même possiblement à un renversement du flot d'électrons selon la sévérité de la déficience<sup>33, 34</sup>. En effet, dans cette maladie, la diminution de l'activité

de la COX varie selon le tissu et la demande énergétique. Les conséquences au niveau du métabolisme énergétique sont inévitables et varient d'un organe à l'autre. Par exemple, les cellules du cerveau ont besoin de plus d'ATP que les fibroblastes de la peau et la déficience en énergie au niveau du cerveau devrait être beaucoup plus dommageable.

Les principales conséquences possibles de la diminution de la COX ont fait l'objet de nombreuses études et sont résumées dans les sections suivantes.

### **3.4.1- Diminution de la production d'ATP et accumulation de métabolites**

Une première conséquence de la diminution de l'activité de la COX qui a été proposée est le ralentissement de l'activité de la chaîne respiratoire, ce qui induirait une diminution globale du pompage de protons dans l'espace intermembranaire. Le gradient électrochimique s'en retrouverait alors diminué et l'activité de l'ATP synthase, qui en dépend, le serait aussi. L'ATP étant la principale source d'énergie pour la cellule, et la chaîne respiratoire mitochondriale étant le principal générateur d'ATP<sup>26</sup>, ce ralentissement aurait certainement un impact très important sur la survie cellulaire. La possibilité d'une carence énergétique chez les enfants atteints du LSFC est suggérée par la présence d'hypotonie<sup>8, 31</sup>.

#### **3.4.1.1- L'accumulation de NADH**

Une autre conséquence possible du ralentissement de l'activité de la chaîne respiratoire serait une accumulation, en amont de celle-ci, des équivalents réduits (NADH, FADH<sub>2</sub>) provenant de la glycolyse, de la  $\beta$ -oxydation et du CAC. En effet, le NAD<sup>+</sup> sert d'accepteur d'électrons au niveau de ces trois étapes du catabolisme cellulaire. Le NADH formé est ensuite oxydé par le complexe I de la chaîne respiratoire et permet le transport des électrons ainsi que la formation du gradient électrochimique nécessaire à la production d'ATP. Ainsi, chez un individu sain, le

ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , qui reflète le taux d'oxydoréduction de la cellule, reste constant. Certains auteurs estiment qu'une diminution de l'activité de la COX amène un ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  très élevé, par accumulation du NADH au niveau du complexe I, ce qui altère le bon fonctionnement des cascades enzymatiques en amont de la chaîne respiratoire<sup>35</sup> et favorise l'accumulation d'acétyl-CoA et de métabolites comme le pyruvate et le lactate<sup>146</sup>.

### 3.4.1.2- L'accumulation de lactate

Chez un individu sain, le taux de lactate sanguin (entre 0,8-2,2 mM) varie très peu grâce à un bon équilibre avec le pyruvate<sup>36</sup>. En condition aérobie, la glycolyse produit du pyruvate qui est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA est ensuite métabolisé par le CAC qui produit, entre autres, du NADH. En condition anaérobie le pyruvate est plutôt réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), ce qui génère du  $\text{NAD}^+$ . Les conditions qui induisent une forte augmentation du taux de lactate sanguin sont l'exercice intense (anaérobie) et certaines pathologies. Par exemple, l'exercice peut faire augmenter la concentration de lactate de 2 mM à 20 mM. Ce surplus de lactate est temporaire, puisqu'il est rapidement métabolisé via le cycle de Cori dans le foie. Ce cycle permet de transformer le lactate ou pyruvate en glucose qui pourra retourner aux autres tissus. Il n'y a pas de conséquences à cette augmentation de lactate car le ratio L/P est maintenu<sup>37</sup>. Dans le LSFC, le foie subit une atteinte importante (stéatose microvésiculaire) et il est probable que sa capacité à métaboliser le lactate soit altérée\*. D'autre part, il est probable que les enfants atteints du LSFC aient une diminution de la production d'ATP. Ceci affecterait également la conversion du lactate en glucose, puisque cette réaction nécessite beaucoup d'énergie<sup>37</sup>.

Les troubles de l'oxydation mitochondriale, comme une atteinte de la chaîne respiratoire, sont aussi reconnus pour induire une augmentation de lactate par

---

\* François Guillaume DeBray, communication personnelle, article en préparation pour soumission.

diminution de l'oxydation du pyruvate. Le ratio L/P est alors augmenté, ce qui est très nocif pour les cellules dû à l'acidification du pH<sup>5, 36</sup>. Dans notre modèle, les patients LSFC ne souffrent pas d'une augmentation du ratio L/P avant la crise<sup>6</sup>. Ils présentent souvent un lactate sanguin entre 2 et 11 mM<sup>8</sup>. Toutefois, lors d'une crise, le taux de lactate atteint des niveaux plus élevés, allant de 12 à 26 mM. À ce moment, le ratio L/P pourrait être augmenté.

### 3.4.2- L'augmentation du stress oxydant

La chaîne de transport des électrons est un site constant de formation de ROS, même chez des individus sains<sup>38</sup>. En effet, les électrons transportés aux complexes I, III et IV peuvent interagir avec l'oxygène et former l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Le taux de formation basal d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est estimé à 2 % et il augmenterait avec l'âge et certaines pathologies<sup>34, 39, 40</sup>. La cellule possède des antioxydants pour contrebalancer cette production de ROS. Les problèmes surviennent lorsqu'il y a un déséquilibre entre la quantité de ROS produits et la quantité d'antioxydants disponibles, ce qui peut se produire, entre autres, lors d'une déficience de la chaîne respiratoire ou d'une hypoxie<sup>31</sup>. Une production importante de ROS risque d'endommager les protéines, les lipides et les acides nucléiques présents dans la cellule<sup>34, 39, 40</sup>. À cet égard, il est proposé que ceci soit responsable des mutations de l'ADNmt et impliqué dans le vieillissement cellulaire<sup>34</sup>. Une autre conséquence du stress oxydant serait l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP), un important médiateur d'apoptose et de nécrose cellulaire. Chez l'homme, un excès de stress oxydant, jouerait un rôle dans plusieurs pathologies comme le cancer, le diabète de type 2, l'athérosclérose, la réponse inflammatoire chronique, les dommages reliés à l'ischémie/reperfusion et les maladies neurodégénératives<sup>40</sup>.

Parmi les tissus de l'organisme, il semble que le cerveau et les muscles squelettiques soient plus vulnérables au stress oxydant puisqu'ils consomment beaucoup d'oxygène. De plus, le cerveau possède une activité antioxydante plus faible due à une moins grande quantité de glutathion (GSH) et de catalase. Le cerveau

est aussi composé en grande partie d'acides gras polyinsaturés qui sont d'excellents sites pour la peroxydation lipidique *i.e.* la formation de ONOO<sup>-</sup> (peroxynitrite) à partir du NO et de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> <sup>39</sup>. Ceci pourrait être particulièrement important dans les cas de LSFC puisque la diminution de l'activité de la COX est plus importante dans le cerveau.

Un article de Chen et al. (1998) suggère que la peroxydation lipidique peut amplifier le dommage initié par les ROS par production de 4-hydroxynonanal (HNE), un aldéhyde qui réagit chimiquement avec les composantes cellulaires. Son précurseur est l'acide linoléique que l'on retrouve principalement dans les cardiolipines liés à la COX. Cette molécule réagit fortement avec les protéines et peut inhiber la COX en se liant aux principales sous-unités de cette dernière. Les auteurs ont effectivement démontré (i) que le stress oxydant induit une augmentation de HNE qui est associée à une diminution de l'activité de la COX, (ii) que les inhibiteurs du métabolisme du HNE préviennent sa dégradation et amplifient cet effet, puis, (iii) que la dégradation du HNE par conjugaison avec le GSH prévient les effets nocifs du stress oxydant. Ce dernier point serait un mécanisme intéressant pour prévenir la diminution de l'activité de la COX <sup>41</sup>. Le GSH est un puissant antioxydant qui a comme précurseur la cystéine. Ainsi, la supplémentation en cystéine par le biais du N-acétylcystéine (NAC) pourrait aider à contrer les effets du stress oxydant dans certaines maladies de la chaîne respiratoire mitochondriale <sup>20</sup>.

La diminution de l'activité de la COX pourrait provoquer une augmentation d'oxygène libre dans la mitochondrie, augmentant les chances que ce dernier soit transformé en O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le précurseur de la plupart des ROS (peroxyde d'hydrogène, groupement hydroxyle) <sup>40</sup>. Le blocage de la chaîne de transport au niveau de la COX pourrait aussi induire une accumulation des électrons en amont ou même un renversement de la chaîne résultant en une augmentation des équivalents réduits et de la formation de ROS au niveau des complexes I et III particulièrement <sup>34</sup>.

### 3.4.3- La mort cellulaire

La littérature décrit deux voies de mort cellulaire. D'abord, la nécrose est une mort subite et non programmée de la cellule. Ce type de mort cellulaire est souvent associé à une infection, un traumatisme important, un déficit métabolique ou une pathologie comme l'infarctus du myocarde<sup>42</sup>. Elle consiste souvent en une perte d'intégrité de la membrane plasmique et de la membrane des organelles, induisant éventuellement la lyse cellulaire. Il y a alors une libération du contenu cellulaire causant une importante inflammation<sup>42, 43</sup>. À l'opposé, l'apoptose est une mort cellulaire physiologique qui est programmée. Elle résulte d'une cascade très précise d'événements qui mènent à la condensation du noyau, à la fragmentation de la cellule et finalement à la formation de corps apoptotiques. Ces derniers sont rapidement phagocytés grâce à certains signaux émis par la membrane cellulaire, dont l'intégrité n'est pas altérée, évitant ainsi l'inflammation. Elle survient, entre autres, lorsque les cellules sont en sénescence afin de garder un équilibre avec la prolifération cellulaire normale, ou dans la morphogenèse, par exemple dans la formation des doigts lors du processus de développement de l'embryon<sup>43, 44</sup>. L'apoptose peut aussi être déclenchée suite à une perturbation de la cascade de signalisation, qui peut provenir d'une mutation génétique ou de facteurs extracellulaires associés à certaines pathologies. Une bonne régulation de l'apoptose est nécessaire puisqu'une déficience à ce niveau peut contribuer au développement du cancer alors qu'un excès est souvent associé à des maladies neurodégénératives ou autoimmunes<sup>45-47</sup>.

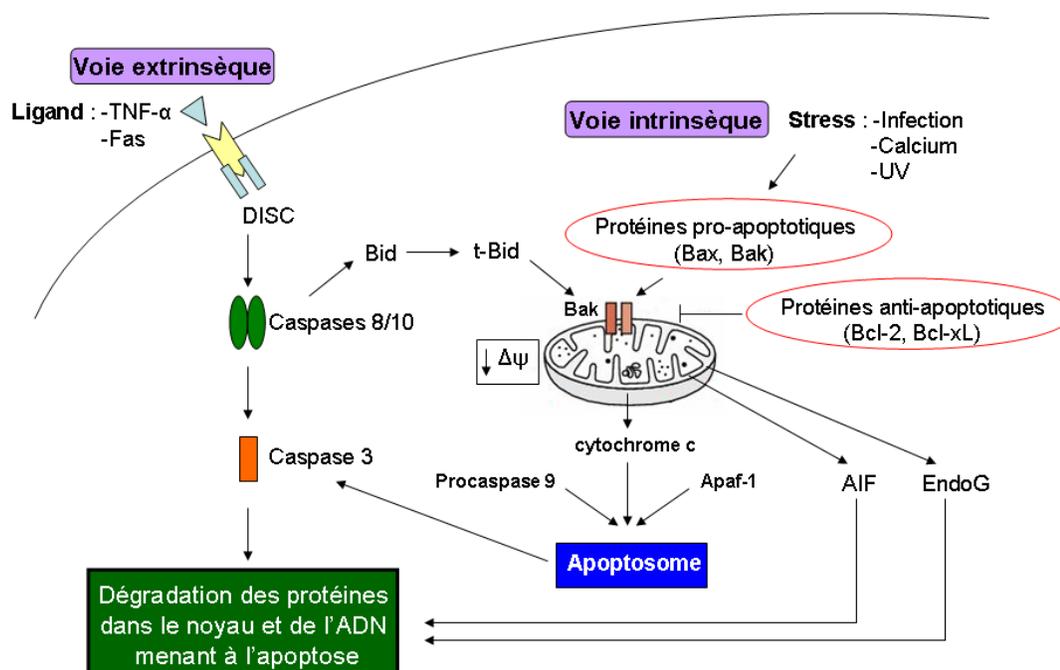
La mitochondrie joue un rôle prépondérant dans l'apoptose et la nécrose cellulaire par l'activation des caspases, par la modulation des flux de calcium, par contrôle du mécanisme de fusion et fission et par sa capacité à produire un stress oxydant<sup>45</sup>. La mitochondrie est aussi extrêmement importante de par sa fonction bioénergétique reliée à la chaîne de transport des électrons<sup>48</sup>. En effet, la cascade menant à l'apoptose nécessite de l'énergie sous forme d'ATP. Ainsi, lorsque l'atteinte des fonctions bioénergétiques est trop sévère, les cellules sont déviées vers la nécrose. L'apoptose et la nécrose sont deux voies de mort cellulaire qui peuvent

être induites par des conditions similaires, mais à des niveaux de sévérité différents<sup>49</sup>. Par exemple, dans le cas d'une augmentation de la production de stress oxydant résultant d'une déficience de la chaîne respiratoire mitochondriale, la cellule va d'abord déclencher la cascade de l'apoptose. Puis, avec l'augmentation constante du stress oxydant, l'atteinte des diverses fonctions cellulaires sera de plus en plus importante et la cellule sera déviée vers la nécrose<sup>43, 50</sup>.

Chez les patients LSFC, des lésions de nécrose symétriques bilatérales dans le tronc cérébral, le thalamus et les noyaux gris centraux ont été rapportés<sup>8</sup>, lesquelles sont probablement associées à la diminution de 80-90 % de l'activité de la COX, même si une relation de cause à effet n'a pas été spécifiquement démontrée. Les conséquences de la déficience en COX au niveau du métabolisme énergétique ont été présentées dans les sections précédentes, soit une diminution de la production d'ATP, une accumulation de métabolites toxiques pour la cellule et une augmentation du stress oxydant. Tous ces mécanismes peuvent mener à la mort cellulaire, soit par apoptose ou par nécrose<sup>26, 51, 52</sup>. Pour bien caractériser la mort cellulaire, il s'avère donc important de mesurer l'apoptose, qui survient de manière plus précoce, et la nécrose<sup>50</sup>. Par conséquent, les principaux mécanismes impliqués dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose seront décrits plus en détails.

### **3.4.3.1- L'apoptose**

L'apoptose peut être déclenchée par une modification de la concentration de divers facteurs sanguins ou par un stress cellulaire. La mitochondrie y joue un rôle prépondérant via l'ouverture du PTP et la libération du cytochrome c. Ce dernier induit l'activation des caspases effectrices (3, 6 et 7). Ces caspases sont des cystéines protéases qui clivent les résidus d'acide aspartique, menant à la dégradation de l'ADN et des protéines, et ainsi à la résorption de la cellule. Les mécanismes impliqués dans l'apoptose sont divisés en voies intrinsèques et extrinsèques<sup>42, 46</sup> (Figure 6, p. 24).



**Figure 6 : Schéma illustrant les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.** Figure adaptée de Bayir et Kagan (2008). TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ , Apaf1 : facteur activateur des protéases apoptotiques 1, AIF : facteur inducteur d'apoptose, EndoG : endonucléase G,  $\Delta\psi$  : potentiel de membrane.

La voie intrinsèque est initiée par un stress intra- ou extracellulaire, comme le stress oxydant, le dommage à l'ADN, les radiations UV, les céramides, etc. Ces signaux permettent l'activation de protéines de la famille Bcl-2. Les protéines de cette famille se divisent en deux classes selon leur domaine : les protéines anti-apoptotiques qui bloquent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) (Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>) et les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bid, Bad, Bim et Bmf qui ont l'effet inverse. Les ratios Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub>/Bax ou Bak détermineraient la probabilité de survie ou de mort des cellules<sup>46, 53</sup>.

Le MOMP mène à la libération du contenu de l'espace intermembranaire dans le cytosol, ce qui aura pour conséquence la dissipation du potentiel de membrane. L'espace intermembranaire contient le facteur inducteur d'apoptose et l'endonucléase G (Figure 6, p. 24), qui sont deux protéines qui induisent l'apoptose suite à leur

libération dans le cytosol puis leur translocation vers le noyau, où elles conduisent à la fragmentation de l'ADN et à la condensation de la chromatine<sup>54</sup>. L'espace intermembranaire contient aussi des molécules activatrices de caspases comme le cytochrome c. Pour être libéré dans le cytosol, le cytochrome c doit d'abord être dissocié des cardiolipines. L'oxydation de ces dernières par les ROS entraîne la réduction du cytochrome c, favorisant ainsi son détachement de la membrane interne puis son relargage dans le cytosol lors de la rupture de la membrane<sup>40</sup>. Le cytochrome c est nécessaire à la formation de l'apoptosome via sa liaison au facteur activateur des protéases apoptotiques 1 (Apaf1)<sup>55</sup>. Ce complexe permet l'activation par dimérisation de la caspase 9, une caspase initiateur. Cette dernière pourra cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7, menant à la dégradation de l'ADN et des protéines menant à la fragmentation de la cellule et en la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés<sup>55</sup> (Figure 6, p. 24). Un autre mécanisme menant à au MOMP est l'ouverture du PTP qui sera décrit dans la section suivante.

Cette cascade d'activation de l'apoptose nécessite de l'ATP pour l'oligomérisation de Apaf1, qui est obligatoire pour la liaison du cytochrome c et de la procaspase 9<sup>42</sup>. Puisque l'apoptose est aussi associée à l'ouverture du PTP et à la dépolarisation membranaire menant à une diminution de production d'ATP, il faut donc être prudent avec la mesure du taux d'ATP cellulaire et de sa signification. Une diminution trop importante d'ATP empêchera l'apoptose mais favorisera la nécrose cellulaire<sup>49, 56</sup>.

Quant à la voie extrinsèque, celle-ci est initiée par la liaison d'une molécule de mort cellulaire à son récepteur (facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et Fas). Un complexe multi-protéique (appelé « DISC ») est alors formé au niveau du récepteur qui permet de recruter les procaspases 8 et 10 qui seront activées par dimérisation. Elles pourront ainsi activer la caspase 3 et Bid (Figure 6, p. 24). Comme mentionné précédemment, Bid est une protéine pro-apoptotique impliquée dans la voie intrinsèque, démontrant que les deux voies sont interreliées. La caspase 3, une

caspase effectrice, permet le clivage nucléotidique et la dégradation des protéines, soit l'étape finale de l'apoptose <sup>46</sup>.

La cellule est capable de se protéger contre l'apoptose, dans une certaine mesure, par la production de protéines anti-apoptotiques. Il existe aussi des voies de survie cellulaire. Par exemple, certains facteurs de survie comme l'insuline qui se lie à la membrane cellulaire déclenchant une cascade impliquant la phosphatidylinositol 3-kinase et l'Akt. Cette dernière contrôle plusieurs voies métaboliques et de survie, par exemple en augmentant le métabolisme du glucose et en supprimant l'autophagie <sup>42, 57</sup>. De plus, Akt induit la phosphorylation et l'inhibition de Bad et de la pyruvate déshydrogénase kinase. L'apoptose est ainsi inhibée et le métabolisme du pyruvate est augmenté <sup>58</sup>.

#### **3.4.3.2- L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale**

Un des mécanismes mitochondriaux qui semble impliqué dans l'apoptose et la nécrose est l'ouverture du PTP. Ce dernier peut être ouvert de façon définitive en présence d'un fort potentiel de membrane, ce qui mène au gonflement de la mitochondrie, à une dépolarisation et à la mort cellulaire. L'ouverture peut aussi être transitoire en présence de faibles conductances, et donc sans gonflement <sup>59</sup>. Il s'agit alors d'un état réversible ; dans ce cas, l'ouverture du PTP n'induit pas de dépolarisation membranaire <sup>60</sup>.

Le PTP est activé par le stress oxydant, une accumulation de calcium dans la matrice, une variation dans le potentiel de membrane et une diminution d'ATP <sup>61</sup>. Toutes ces conditions pourraient être retrouvées lors d'une déficience en COX. Il apparaît donc légitime de formuler l'hypothèse que le LSFC soit associé à l'ouverture du PTP, et ceci pourrait expliquer la mort cellulaire observée.

La composition exacte du PTP n'est pas encore connue. Toutefois, on l'associe souvent à une protéine de la membrane interne, ANT, une porine de la

membrane externe, ou canal anionique voltage-dépendant (VDAC) et à la cyclophiline-D<sup>51</sup>. D'autres protéines pourraient favoriser la formation de ce canal, comme Bax et plusieurs kinases. Le PTP permet à des molécules allant jusqu'à 1,5 kDa de franchir la membrane mitochondriale. Ces échanges sont non spécifiques et permettent d'équilibrer le gradient ionique entre le cytosol et la matrice mitochondriale<sup>62</sup>. Ces échanges sont généralement associés à un gonflement de la membrane interne qui peut s'étirer grâce à ses nombreuses invaginations. Par contre, la membrane externe ne pouvant pas s'étirer, celle-ci finit par éclater, menant à la dissipation du gradient de proton et à la libération des protéines pro-apoptotiques dans le cytosol, ce qui induit le découplage de la chaîne de transport des électrons<sup>62</sup>. L'ouverture du PTP est inhibée ou retardée par la cyclosporine A qui lie la cyclophiline-D de la matrice à son site actif<sup>60, 62</sup>.

Comme mentionné précédemment, la fermeture du PTP est possible. Malheureusement, certains effets sont irréversibles. Par exemple, on peut rétablir le gradient de proton de l'espace intermembranaire, mais les molécules qui sont entrées ou sorties par le PTP et pour lesquelles il n'existe pas de transporteurs physiologiques sont prises au piège dans la matrice ou exclues de la mitochondrie. Ce phénomène peut être observé par l'ajout aux cellules de calcéine, un complexe fluorescent qui ne peut entrer dans la mitochondrie que par l'ouverture du PTP<sup>60</sup>. L'ATP et l'ADP peuvent inhiber la formation du PTP, mais pas l'adénosine monophosphate (AMP). Les mécanismes d'actions restent à être clairement identifiés<sup>51</sup>.

#### **4- Les agents potentiellement inducteurs des crises d'acidose**

Depuis la découverte de la maladie de Leigh en 1980, plusieurs observations ont été faites concernant les symptômes et l'évolution de la maladie, autant en clinique par les pédiatres qu'à la maison par les parents des enfants malades. Il est maintenant connu que certains événements sont susceptibles de déclencher la crise d'acidose lactique. Ces informations sont disponibles sur le site web de l'Association de l'acidose lactique<sup>143</sup>. Par exemple, plusieurs parents ont rapporté qu'une situation

de stress physique (exercice intense) ou émotionnel pouvait la déclencher. Plusieurs crises surviennent aussi suite à une infection avec fièvre ou à une modification de l'apport alimentaire, comme un repas riche en gras ou à l'inverse, un jeûne. Tous ces événements occasionnent une augmentation de la demande en énergie de l'organisme ou une surcharge de l'apport en nutriments. Comme tous les patients LSFC ont une activité de la COX diminuée, on s'attend à ce qu'ils aient une diminution du métabolisme énergétique dans son ensemble, mais aussi de leur capacité d'adaptation à ces changements. Ainsi, ces événements sont considérés comme pouvant déclencher une crise d'acidose<sup>31, 63-66</sup>. La prochaine section discutera des facteurs sanguins susceptibles de jouer un rôle dans le déclenchement des crises.

#### **4.1- Lactate, bicarbonate, pH et glucose**

L'étude de Morin et al. (1993) a démontré que la crise d'acidose lactique est définie par une augmentation importante de la concentration de lactate dans le sang et le LCS, ainsi que par une diminution du bicarbonate sanguin. Bien que ces deux changements occasionnent une acidification importante et nocive du sang, qui peut être associée à une défaillance de multiples organes menant au coma, on ne sait pas encore s'ils sont responsables de la crise ou plutôt une conséquence de celle-ci. En outre, l'étude de Merante et al. (1993) rapporte qu'une glycémie sanguine de plus de 10 mM est un important facteur prédictif de mortalité chez les enfants en crise. En effet, plusieurs études ont démontré que l'hyperglycémie induit la mort cellulaire dans la plupart des complications associées au diabète de type 2. L'augmentation de glucose dans le sang accentue l'activité de la glycolyse et donc du CAC, fournissant plus de substrats pour la chaîne respiratoire mitochondriale. Chez un individu sain, la chaîne respiratoire compense en pompant plus de protons dans l'espace intermembranaire provoquant une hyperpolarisation pouvant mener à une production accrue de ROS<sup>67, 68</sup>. Dans le cas des patients atteints du LSFC, la chaîne respiratoire est possiblement bloquée ou ralentie, résultant plutôt en une accumulation de ces substrats en amont de la COX. Ainsi, on ne sait pas si l'hyperglycémie induit la crise

ou si elle est une conséquence de celle-ci, mais il est possible qu'elle joue un rôle dans la mort cellulaire associée à la crise.

#### 4.2- Palmitate

Un repas riche en lipides a aussi été associé à la crise. Le palmitate est l'acide gras à chaîne longue saturée (C16:0) le plus abondant dans le sang. Il est lié à l'albumine ou aux triglycérides et phospholipides des lipoprotéines. Le palmitate est considéré comme étant cytotoxique, puisqu'il est reconnu pour induire l'apoptose ; soit suite à sa transformation en céramide, un sphingolipide impliqué dans la réponse cellulaire au stress et dans la sénescence<sup>69</sup>, soit suite à la diminution de la synthèse de cardiolipines menant à la libération du cytochrome c<sup>70</sup>. Toutefois, il existe une controverse quant à l'augmentation des ROS induite par le palmitate. Certains chercheurs pensent qu'une concentration élevée de palmitate dans la cellule augmente l'activité de la chaîne de transport des électrons suite à l'activation de la  $\beta$ -oxydation, laquelle produit les équivalents réduits NADH et FADH<sub>2</sub>. Ceci aurait pour effet d'augmenter la production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>71</sup>. D'autres études ont plutôt démontré que les niveaux de ROS ne changent pas suite à l'ajout de palmitate puisque les antioxydants sont incapables de prévenir la mort cellulaire<sup>72</sup>. Finalement, le palmitate inhiberait la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), une protéine qui joue plusieurs rôles bénéfiques au niveau du métabolisme cellulaire. L'AMPK est activée lors d'une déplétion en ATP et active les voies qui produisent de l'ATP tout en inhibant celles qui en consomment<sup>73</sup>. Entre autres, elle inhibe l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase et diminue ainsi la formation du malonyl-CoA, un inhibiteur de la CPT-I et donc de la  $\beta$ -oxydation<sup>71</sup> et elle augmente la biogenèse mitochondriale par activation de l'expression de PGC-1 $\alpha$ <sup>73</sup>. Ainsi, l'inhibition d'AMPK favoriserait l'accumulation néfaste d'acides gras dans la cellule et réduirait la production d'énergie par les mitochondries. Ces deux conséquences pourraient être associées à la mort des cellules par apoptose. Le rôle de l'AMPK sera discuté plus en profondeur à la section 5.3.

Étant donné les conséquences possibles de la diminution de l'activité de la COX chez les enfants atteints du LSFC, soit une accumulation de substrats dans la mitochondrie, il apparaît justifié de considérer que la  $\beta$ -oxydation puisse être inhibée du moins partiellement, ce qui pourrait favoriser, entre autres, la conversion du palmitate en céramide et l'induction des effets lipotoxiques mentionnés ci-dessus. De façon conceptuelle, il apparaît donc possible qu'un repas riche en gras puisse contribuer, du moins en partie, au déclenchement des crises acidotiques.

### **4.3- Cytokines, agoniste $\beta$ -adrénergique et stress oxydant**

Les cytokines sont des molécules libérées dans le sang suite à une infection et sont reliées à la réponse inflammatoire. Le TNF- $\alpha$  est une molécule inductrice de mort cellulaire par apoptose. Ce facteur agit sur la fonction mitochondriale en diminuant la transcription de l'ADNmt, en augmentant la synthèse de NO (par activation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS)) qui est un inhibiteur de la COX et en augmentant la production de ROS<sup>74</sup>. De plus, il a été démontré qu'il pouvait diminuer l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>75</sup>. Finalement, le TNF- $\alpha$  inhibe la sous-unité catalytique I de la COX par phosphorylation<sup>64</sup>.

L'isoprotérénol est un agoniste  $\beta$ -adrénergique qui mime les effets du système nerveux sympathique face à un stress. Il permet d'augmenter les niveaux cellulaires d'AMP cyclique activant ainsi la protéine kinase A<sup>76</sup>. Cette dernière, lorsque présente dans la matrice ou la membrane interne mitochondriale, permet la phosphorylation de différentes sous-unités de la COX, régulant à la baisse leur activité<sup>31</sup>. L'isoprotérénol active aussi la lipolyse et favorise l'oxydation des acides gras et l'augmentation du glucose sanguin<sup>45</sup>.

Finalement, plusieurs évidences démontrent que la déficience en COX puisse augmenter la production de ROS par la mitochondrie. Il est aussi connu que ces ROS sont de forts inducteurs de la mort cellulaire par apoptose et nécrose<sup>54</sup>. Par

conséquent, dans notre étude, le peroxyde d'hydrogène sera utilisé comme outil pour induire la mort des fibroblastes de patients LSFC.

## **5- Les agents thérapeutiques potentiels**

Pour prévenir le déclenchement des crises d'acidose chez les enfants malades, il faut pallier aux conséquences potentielles résultant de la diminution de l'activité de la COX, lesquelles ont été décrites à la section 3. Pour notre étude, nous avons ciblé des agents thérapeutiques déjà utilisés en clinique pour traiter d'autres maladies. De fait, la pharmacocinétique et la pharmacologie de ces agents étant déjà connues chez l'humain, ceci permettra d'accélérer la transposition éventuelle de nos données à la clinique. De plus, tous les agents choisis devaient pouvoir traverser la barrière hémato-encéphalique, étant donné la prépondérance des symptômes neurologiques chez les patients LSFC. Dans cette section seront abordés les différents agents thérapeutiques qui ont été sélectionnés et étudiés. Ceux-ci sont présentés et regroupés selon leurs mécanismes d'action potentiels en lien avec les conséquences reliées à la baisse d'activité de la COX.

### **5.1- Agents ciblant les altérations métaboliques**

#### **5.1.1- L'accumulation de NADH (bleu de méthylène et dinitrophénol)**

Le bleu de méthylène (MB) est reconnu pour sa capacité à transférer des électrons<sup>77</sup>. En effet, le MB est une molécule ayant une forte capacité d'oxydoréduction. Elle peut accepter des électrons du NADH et les transmettre au cytochrome c, à l'O<sub>2</sub> ou à l'hème. Cette capacité lui permet aussi de jouer un rôle d'antioxydant qui serait en mesure de renverser les effets néfastes induits par le peroxyde d'hydrogène, comme le vieillissement cellulaire, et de contrer la production de radicaux d'oxygène<sup>78, 79</sup>. Le MB est utilisé depuis longtemps dans le traitement de la méthémoglobinémie. De par son rôle d'accepteur d'électrons, il permet de

transformer la méthémoglobine en hémoglobine. Celle-ci peut alors fixer le fer ferreux, permettant la distribution de l'oxygène aux tissus <sup>78, 80</sup>.

Le MB est aussi reconnu pour prévenir la sénescence cellulaire. Atamna et al. (2008) ont effectivement démontré un prolongement de la vie de fibroblastes humains résultant de l'augmentation de l'activité mitochondriale. En effet, le MB augmenterait l'activité de la COX de 30 % et la consommation d'oxygène de 37-70 % <sup>77, 78, 81</sup>.

Le MB est utilisé dans plusieurs autres situations, par exemple, pour protéger l'organisme contre les endotoxines bactériennes, pour inhiber iNOS et pour prévenir les chocs septiques. Ces trois fonctions sont interreliées : les endotoxines activent iNOS, ce qui produit du NO. Ce dernier active la guanylate cyclase qui induit la vasodilatation (hypotension) vue dans les cas de choc septique. Le MB inhibe cette cascade par l'inhibition directe de iNOS <sup>74</sup>.

Le 2,4-dinitrophénol (DNP) est un découpleur de la chaîne de transport des électrons qui a longtemps été utilisé dans le traitement de l'obésité <sup>82</sup>. Il permet le transport des protons  $H^+$  à travers la membrane mitochondriale, menant à la perte du gradient électrochimique et une augmentation du ratio AMP/ATP. Il y a alors une activation de l'AMPK, du métabolisme énergétique et de la respiration mitochondriale pour rétablir la situation <sup>83</sup>. Les substrats de la chaîne respiratoire, et par conséquent le NADH, sont alors oxydés dans la mitochondrie de façon non régulée par la demande énergétique de la cellule. Toutefois, le DNP peut-être toxique à forte dose dû à une diminution trop importante de la production d'ATP et du potentiel de membrane ou par une augmentation de la température corporelle suite à l'activation de la respiration <sup>82</sup>.

### **5.1.2- Divers autres mécanismes (carnitine, propionate et fénofibrate)**

Le rôle principal de la carnitine consiste à permettre le transport des acides gras à chaîne longue vers la matrice mitochondriale, via les CPT-I et II, où a lieu la  $\beta$ -oxydation<sup>84</sup>. Elle est synthétisée par les reins et le foie à partir de la lysine et de la méthionine. La carnitine aurait d'autres rôles bénéfiques par exemple, pour traiter les maladies cardiaques par l'augmentation de la phosphorylation oxydative et dans l'excrétion d'acides organiques et de certains métabolites toxiques produit lors d'une ischémie<sup>22</sup>. De plus, une étude de Mutomba et al. (2000) montre que la carnitine permet d'inhiber les caspases de la voie extrinsèque de l'apoptose. La carnitine aurait aussi un rôle d'antioxydant permettant de contrer la peroxydation lipidique.

Il a été démontré précédemment qu'une atteinte de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale peut diminuer la production d'ATP et inhiber l'oxydation des acides gras. L'accumulation subséquente des acyls-CoA est responsable d'une lipotoxicité associée, entre autres, à la synthèse de céramide et de triglycérides. Une telle accumulation peut aussi être associée à un effort physique très intense. La carnitine agit en se liant à ces acides gras en surplus, formant des acylcarnitines qui sont moins dommageables pour la cellule<sup>85, 86</sup>. Il a d'ailleurs été démontré que les maladies mitochondriales diminuent la quantité de carnitine libre qui se retrouve principalement sous sa forme estérifiée. La formation de ces acylcarnitines facilite également la sortie des acides gras du cytosol vers le plasma<sup>84, 85</sup>. Ainsi, l'administration de carnitine est bénéfique dans le traitement des maladies mitochondriales<sup>84</sup>.

Il existe aussi des acyls esters de la carnitine qui ont des effets thérapeutiques potentiels, soit l'acétylcarnitine et le propionyl-L-carnitine (PLC)<sup>22</sup>. L'acétylcarnitine est plus facilement absorbée et distribuée aux différents tissus de l'organisme et elle traverse mieux la barrière hémato-encéphalique. Elle est reconnue pour augmenter la production d'ATP et protéger contre le stress oxydant<sup>84</sup>. Le propionate favorise le

bon fonctionnement du CAC, puisqu'il est un précurseur du succinate. La formation de ce substrat génère de l'ATP de façon indépendante de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans la présente étude, la L-carnitine est utilisée en combinaison avec le propionate pour mimer l'effet du PLC. Ce dernier est reconnu pour améliorer la fonction cardiaque suite à une ischémie, probablement par la combinaison des effets bénéfiques reliés aux deux composantes de ce nutriment synthétique<sup>87-90</sup>.

Une approche génétique a aussi été considérée pour améliorer la survie des cellules. Par exemple, par l'activation de facteurs de transcription de la mitochondrie. Le PPAR- $\alpha$  est un facteur de transcription relié à l'oxydation des acides gras. Son activation permet d'augmenter la phosphorylation oxydative. Un agoniste de PPAR- $\alpha$ , le fénofibrate, peut jouer un rôle similaire et favoriser ainsi le fonctionnement de la respiration mitochondriale. Une étude réalisée chez des enfants ayant subi des brûlures majeures montre une diminution de la fonction oxydative mitochondriale d'environ 70 %. Ce problème est relié à une diminution de la quantité et de la fonction des gènes et des protéines mitochondriales<sup>91</sup>. L'utilisation d'agonistes de PPAR- $\alpha$  a été suggérée pour augmenter l'activité mitochondriale, permettant d'améliorer le pronostic chez ces patients. Ils ont effectivement observé une augmentation de la fonction mitochondriale et de l'oxydation du glucose avec un traitement au fénofibrate, par augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire et du CAC<sup>91</sup>. Ainsi, dans le cas des patients LSFC, il est possible que le fénofibrate aide à rétablir la fonction mitochondriale déficiente.

## **5.2- Agents ciblant le pore de transition de perméabilité mitochondriale (cyclosporine A et sildénafil)**

La cyclosporine A est un agent immunosuppresseur qui bloque la formation du PTP via une liaison très spécifique à la cyclophiline D, une composante importante de celui-ci<sup>51, 62</sup>. Le sildénafil, un inhibiteur de la phosphodiesterase 5, est reconnu pour son effet vasodilatateur et est utilisé dans les cas de dysfonction érectile. Le sildénafil a aussi plusieurs autres fonctions reconnues. Il est utilisé pour

diminuer la pression artérielle pulmonaire et la résistance vasculaire dans les cas d'hypertension pulmonaire. Dans l'insuffisance cardiaque chronique, il permet l'inhibition de l'agrégation des plaquettes, la dilatation des artères coronaires et l'amélioration de la dysfonction endothéliale<sup>39, 92</sup>. Il existe certaines évidences montrant que le sildénafil inhibe l'ouverture du PTP dans le cœur. En effet, la cascade induite par l'activation de la guanosine monophosphate cyclique et la protéine kinase G permettrait de diminuer l'influx calcique vers la mitochondrie et favoriserait la phosphorylation/activation de différentes kinases responsables de l'inhibition de l'ouverture du PTP dans les cellules vasculaires du myocarde<sup>93</sup>.

### **5.3- Agents ciblant le stress oxydant (idebenone, N-acétylcystéine et resvératrol)**

L'idebenone, le NAC et le resvératrol sont des antioxydants puissants, parmi lesquels l'idebenone cible plus particulièrement la mitochondrie. L'idebenone est un analogue du coenzyme Q qui possède une chaîne plus courte, lui permettant de mieux traverser la barrière hémato-encéphalique<sup>84, 94</sup>. Le coenzyme Q est un antioxydant membranaire et un constituant important de la chaîne de transport des électrons. L'idebenone inhibe la peroxydation lipidique, protège les mitochondries contre le stress oxydant et augmente le métabolisme mitochondrial<sup>95</sup>. Il est utilisé pour le traitement de maladies neurodégénératives, comme l'Alzheimer, la maladie d'Huntington et le Parkinson<sup>84</sup>. Dans l'ataxie de Friedreich, l'idebenone diminue le stress oxydant et l'hypertrophie cardiaque, mais pas la fonction neurologique<sup>96-98</sup>. Un désavantage de l'idebenone est un faible taux d'accumulation dans la mitochondrie dû à une distribution très large<sup>94</sup>.

Le NAC est le précurseur du GSH. Ce dernier a un rôle central dans la défense antioxydante de l'organisme. Quelques études ont démontré que la supplémentation alimentaire en cystéine sous forme de NAC diminue le stress oxydant dans plusieurs pathologies affectant l'état d'oxydoréduction cellulaire, dont les maladies mitochondriales et l'Alzheimer<sup>20, 99, 100</sup>. Le NAC protégerait contre le

dommage à l'ADN et les cancers <sup>101</sup>, et stimulerait l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale <sup>100, 102</sup>.

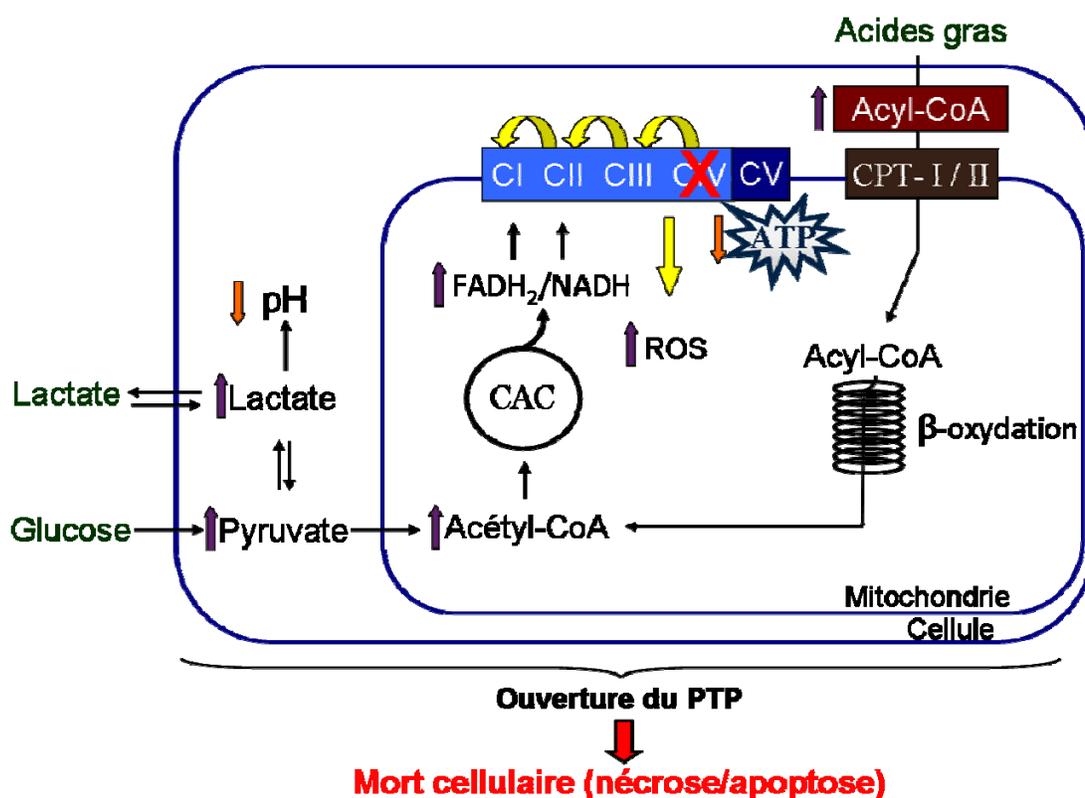
Quant au resvératrol, il fait partie des polyphénols que l'on retrouve dans les raisins et le vin rouge. Il préviendrait certains cancers par une action inhibitrice sur la cyclooxygénase 2 et sur l'inflammation en plus de favoriser l'apoptose <sup>103</sup>. Le resvératrol permettrait aussi de diminuer le taux de HNE, qui est augmenté dans plusieurs pathologies liées à la peroxydation lipidique <sup>104</sup>. Cet antioxydant aurait aussi un effet protecteur sur le cœur par inhibition de la formation d'athérosclérose via une action directe sur la diminution de la production de stress oxydant de la cellule et des membranes. Le resvératrol permettrait d'inhiber l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et l'agrégation plaquettaire <sup>103</sup>. Il augmenterait aussi l'activité de la superoxyde dismutase et activerait l'AMPK, le PGC-1 $\alpha$  et la sirtuine 1 (SIRT1).

L'AMPK est considéré comme un senseur des niveaux énergétiques de la cellule. L'AMPK est activé lorsque le ratio AMP/ATP est trop élevé, révélant une perturbation dans l'apport nutritionnel et dans la production d'énergie ou une utilisation importante des réserves énergétiques (exercice) <sup>105</sup>. L'AMPK stimulerait la captation de glucose et inhiberait l'acétyl-CoA carboxylase menant à une diminution de malonyl-CoA et donc une augmentation de la  $\beta$ -oxydation et de la production d'ATP <sup>71, 106</sup>. L'AMPK permettrait aussi la croissance des prolongements des cellules neuronales et la biogenèse mitochondriale via l'activation de PGC-1 $\alpha$  <sup>105</sup>. L'AMPK activerait l'expression des protéines UCP mitochondriales. Ces découpleurs de la respiration cellulaire favoriseraient la diminution de la formation de ROS aux complexes I et III <sup>107</sup>. D'un point de vue théorique, le resvératrol semble donc avoir un excellent potentiel thérapeutique pour traiter les cas d'acidose lactique en contrant les effets néfastes du stress oxydant et par son activation de l'AMPK qui a plusieurs effets bénéfiques pour la cellule et la fonction mitochondriale.

## **6- Objectifs de travail, hypothèse et approche expérimentale**

La présente étude visait d'abord (i) à caractériser l'effet de facteurs métaboliques périphériques potentiellement altérés chez les patients LSFC sur la mort de lignées cellulaires issues de ces sujets puis, (ii) à identifier des agents thérapeutiques capables de prévenir ou retarder cette mort en palliant les conséquences de la déficience en COX.

Pour ce faire, des fibroblastes primaires provenant de biopsies de peau prélevées chez des patients LSFC et des témoins ont été utilisés puisqu'aucun autre modèle n'était disponible pour cette maladie (Figure 7, p. 38). Les mutations qui sont à l'origine de la maladie ayant été découvertes récemment, il n'existe à ce jour aucun modèle de souris LSFC ou de souris « knock-out/knock-in ».



**Figure 7 : Hypothèse de travail.** Le schéma représente les différentes conséquences de la déficience en COX (X). Les flèches mauves indiquent une accumulation, les flèches orange indiquent une diminution, les flèches noires indiquent le déplacement des différentes molécules et les flèches jaunes représentent le déplacement possible des électrons de la chaîne respiratoire et l'effet associé sur les espèces réactives de l'oxygène (ROS). CI, CII, CIII, CIV et CV : les 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, CAC : cycle de l'acide citrique, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, FAD : flavine adénine dinucléotide, CPT : carnitine palmitoyltransférase, PTP : pore de transition de perméabilité.

L'hypothèse de travail, illustrée à la figure 7 (p. 38), prédit que les facteurs sanguins sélectionnés pourront induire la mort des cellules de patients LSFC de façon prématurée ou accrue comparativement aux cellules de témoins. Ces facteurs seraient alors potentiellement associés au déclenchement des crises d'acidose chez ces enfants.

Par la suite, les agents thérapeutiques agissant sur les diverses conséquences potentielles de la diminution de la COX, soit une diminution du taux d'ATP, et l'augmentation du stress oxydant, du NADH et des dérivés lipidiques toxiques, pourraient prévenir ou retarder la mort cellulaire observée avec les facteurs sanguins. Ces agents pourraient alors potentiellement prévenir le déclenchement des crises d'acidose.

Finalement, le mécanisme sous-jacent à la mort cellulaire observée pourrait possiblement être relié à une diminution de l'activité de la COX ou une diminution de la production d'ATP cellulaire associée à l'utilisation des facteurs sanguins.

Ainsi, les cellules de patients LSFC et de témoins ont été soumises à 8 facteurs sanguins puis 10 agents thérapeutiques utilisés seuls ou en combinaison. La nécrose, via la relâche de la LDH, et l'apoptose, via l'activité des caspases effectrices 3 et 7, ont été mesurés et la réponse a été comparée entre les cellules des patients homozygotes, du patient hétérozygote composé et des témoins. De plus, des mesures de l'activité de la COX et du taux d'ATP cellulaire ont été faites afin d'évaluer le rôle de ces facteurs dans l'induction de la mort des cellules.

## Matériel et méthodes

### 1- Principe général de l'étude

En premier lieu, il est important de rappeler que le LSFC est une maladie rare ayant été découverte relativement récemment et ayant un pronostic très grave. Le nombre de patients est donc limité. Historiquement, on dénombre 56 patients ayant eu cette maladie dont 10 sont vivants à ce jour, incluant le patient hétérozygote composé<sup>\*</sup>. De plus, les informations cliniques disponibles pour ces patients sont très restreintes. Étant donné cette limite au niveau des connaissances, une étude pilote de type exploratoire a d'abord été réalisée.

Cette étude pilote consiste en un important criblage de facteurs sanguins préalablement sélectionnés afin de déterminer lesquels induisent une mort accrue ou prématurée des cellules de patients LSFC comparativement aux cellules de témoins. La mort cellulaire par apoptose et par nécrose a été évaluée par des mesures de l'activation des caspases 3 et 7 et de la relâche de la LDH respectivement. Pour chaque facteur sanguin choisi, nous avons effectué une courbe dose-réponse afin de s'assurer d'avoir l'effet optimal. Les facteurs ont été testés seuls et en diverses combinaisons. Pour cette première partie de l'étude, le but était d'identifier rapidement les molécules ayant un effet bénéfique. Pour atteindre ce but, les tests ont été faits un nombre limité de fois et sur un nombre restreint de lignées cellulaires. Pour cette raison, aucun test statistique n'a été réalisé dans cette partie de l'étude. Parmi les facteurs ayant induit une mort cellulaire importante, nous avons sélectionné ceux qui avaient une plus grande pertinence (patho)physiologique pour la deuxième partie de l'étude où les facteurs ont été testés de façon systématique sur la totalité des lignées cellulaires disponibles, et ce pour un nombre d'expériences suffisamment

---

<sup>\*</sup> François Guillaume DeBray, communication personnelle, article en préparation pour soumission.

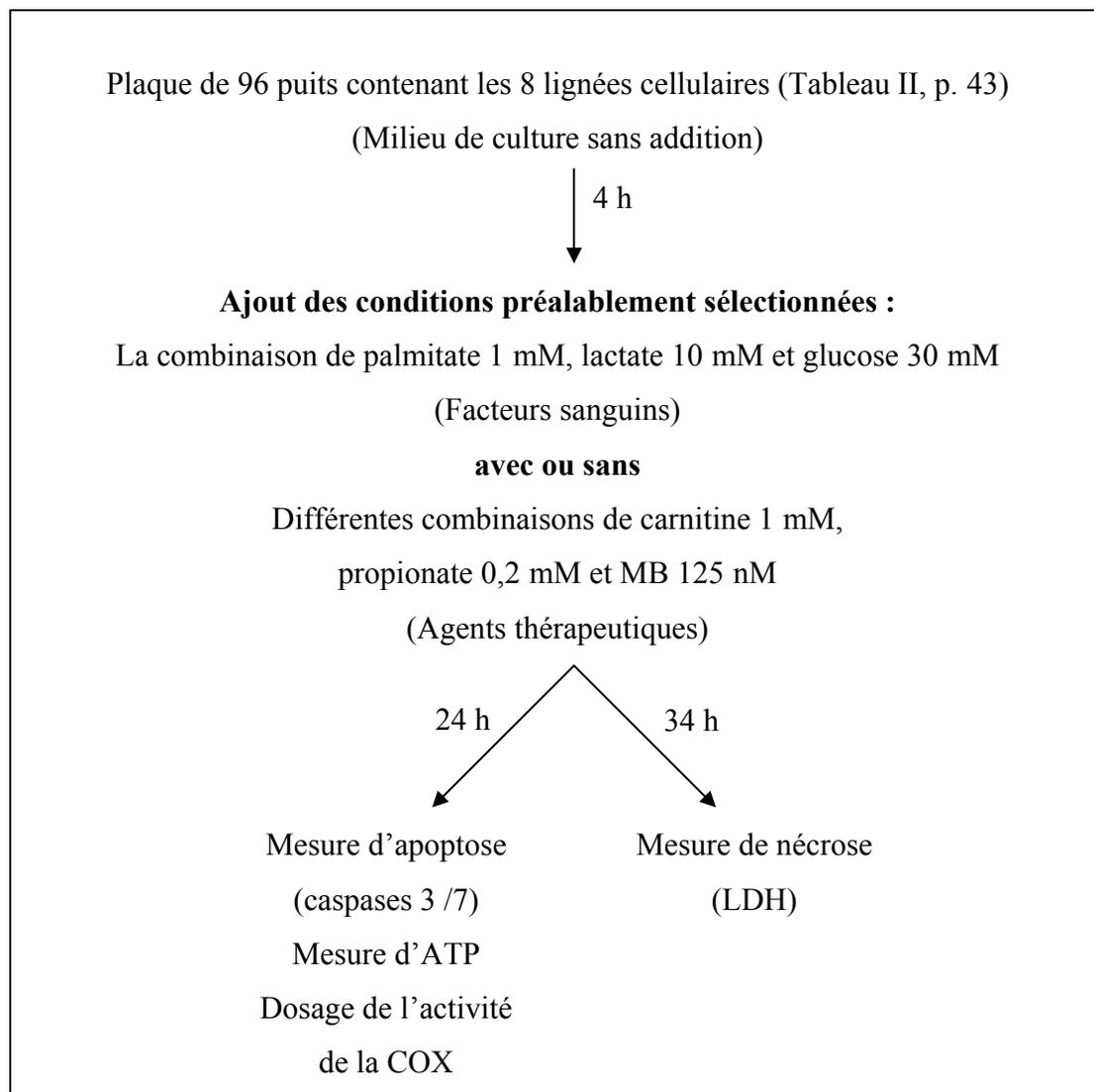
grand pour confirmer la reproductibilité des résultats et permettre les analyses statistiques.

L'étude pilote a également permis de sélectionner le temps d'incubation optimal pour chacun des tests selon le facteur sanguin ou l'agent thérapeutique utilisé. L'idéal aurait été de pouvoir suivre l'évolution de la mort cellulaire dans le temps. Malheureusement, une telle mesure était impossible à réaliser avec les appareils disponibles. Il a donc fallu se limiter à des mesures ponctuelles. En ce qui concerne la mesure de nécrose, les temps d'incubations choisis initialement étaient de 24 et 48 h. Après quelques essais, nous avons déterminé qu'à 24 h le taux de nécrose était généralement trop faible pour être mesuré avec précision, alors qu'à 48 h, il était trop élevé, soit supérieur à 90 %, pour toutes les cellules, incluant celles provenant des témoins. Nous avons donc opté pour des temps de 30 et 34 h afin d'obtenir un pourcentage de mort cellulaire qui permettait de documenter des changements, soit une diminution ou une augmentation. Ainsi, le temps d'incubation de 34 h a été choisi pour la deuxième partie de l'étude. Quant aux tests d'apoptose, d'ATP et de COX, le temps d'incubation était toujours de 24 h.

Par la suite, toujours dans le contexte de l'étude pilote, nous avons mesuré l'efficacité des différents agents thérapeutiques à prévenir ou diminuer la mort cellulaire induite par les différents facteurs sanguins en agissant au niveau des conséquences possibles de la diminution de l'activité de la COX. Nous avons effectué des courbes dose-réponse pour la plupart des agents et nous avons mesuré l'effet de ces agents seul ou en combinaison. Nous avons encore une fois sélectionné les agents ayant les effets les plus intéressants et qui avaient un plus grand potentiel d'application clinique à court terme.

La deuxième partie de l'étude visait à mesurer l'effet de ces facteurs sanguins et agents thérapeutiques (conditions) sélectionnés sur la base des résultats de l'étude pilote sur les 8 lignées cellulaires disponibles (Tableau II, p. 43) et à s'assurer de la reproductibilité des résultats par des tests statistiques. En parallèle, nous avons

mesuré l'effet de ces conditions sur l'activité de la COX et sur la production d'ATP cellulaire. La figure 8 (p.42) illustre le protocole expérimental suivi pour la deuxième partie de l'étude ; les détails de ce protocole sont présentés aux sections suivantes.



**Figure 8 : Schéma expérimental suivi pour la deuxième partie de l'étude.** Le temps d'incubation optimal a été déterminé expérimentalement pour chaque test dans la première partie de l'étude. LDH : lactate déshydrogénase.

## 2- Culture des lignées cellulaires

Les 8 lignées cellulaires utilisées au cours de cette étude sont des fibroblastes primaires provenant de biopsies de peau prélevées chez des patients LSFC et des témoins (Tableau II, p. 43). Elles ont été cultivées dans un milieu DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium ») contenant du glucose (30 mM), de la L-glutamine (584 mg/L) et du pyruvate de sodium (110 mg/L) (Mediatech, Manassa, VA, USA) auquel ont été ajoutés du sérum fœtal bovin (FBS) (10 %) préalablement inactivé 1h30 à 55 °C, de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (10 mg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Des vitamines et une solution d'acides aminés ont aussi été ajoutées à ce milieu (Tableau III, p. 44).

**Tableau II : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires utilisées**

Code	Nom de la lignée	Sexe	Âge au prélèvement	Origine	Provenance – Caractéristiques
T1	EBS-3FD	F	9	Française	*Biobanque
T2	EBS-4FA	F	5		
T3	JGE	M	39	Québécoise	McGill
T4	MCO	F	19		
HC	AL001	M	25	Québécoise	Biobanque – Hétérozygote composé A354V et C1277STOP
P1	AL002	M	25	Québécoise	Biobanque –
P2	AL005	F	25		Patients LSFC
P3	AL006	F	8		Homozygotes A354V

\*Biobanque de l'acidose lactique, Laboratoire Gépromic, UQAC, Chicoutimi. Le passage maximal, déterminé expérimentalement, est de 20 pour chaque lignée cellulaire, sauf pour la lignée HC qui est de 15. Cette valeur a été respectée tout au long de l'étude.

Une autre lignée cellulaire témoin provenant de chez ATCC (Manassa, VA, USA) a été utilisée au début de l'étude. Il s'agit de fibroblastes de peau provenant d'un nouveau-né caucasien de sexe masculin (CRL-2429). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu IMDM (« Iscove's Modification of DMEM ») (ATCC) additionné de FBS (10 %), de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (10 mg/ml). Nous avons cessé d'utiliser cette lignée lorsque nous avons appris que nos cellules de patients provenaient d'enfants plus âgés et d'adultes. Ceci nous a aussi amené à trouver deux nouveaux témoins adultes (T3 et T4) pour mieux représenter nos patients (Tableau II, p. 43).

**Tableau III : Composition des solutions de vitamines et d'acides aminés**

<b>Solution de vitamines (Mediatech)</b>		<b>Solution d'acides aminés non essentiels (Mediatech)</b>	
<b>Composantes</b>	<b>Concentration (mg/L)</b>	<b>Composantes</b>	<b>Concentration (mg/L)</b>
NaCl	8500,00	L-Alanine	890,00
Pantothénate de D-Calcium	100,00	L-Asparagine•H <sub>2</sub> O	1500,00
Chlorure de choline	100,00	Acide L-aspartique	1330,00
Acide folique	100,00	Acide L-glutamique	1470,00
i-Inositol	200,00	Glycine	750,00
Nicotinamide	100,00	L-Proline	1150,00
Pyridoxine•HCl	100,00	L-Sérine	1050,00
Riboflavine	10,00	<b>Spécifications</b>	
Thiamine•HCl	100,00	pH (avant tampon)	3,5 ± 0,2
<b>Spécifications</b>		pH (après tampon)	3,5 ± 0,5
pH	6,8 – 7,6	Osmolarité	74 ± 15
Osmolarité	250 ± 50		

Les informations sont tirées du site internet de Mediatech <sup>145</sup>.

### 3- Préparation des conditions

Pour chacun des tests effectués (nécrose, apoptose, ATP et COX), les cellules de témoins et de patients ont été incubées avec les différents facteurs sanguins ou agents thérapeutiques. Le protocole pour la préparation de ces conditions a toujours été le même sauf pour quelques exceptions. Voici le principe général de la préparation des conditions.

En premier lieu, nous avons voulu voir l'effet d'une hyperglycémie sur la survie cellulaire. Comme les cellules sont normalement incubées dans un milieu contenant 30 mM de glucose, elles ont été préalablement conditionnées pendant 24 h dans un milieu contenant 5 mM de glucose. Les cellules ont ensuite été incubées à nouveau dans un milieu contenant 30 mM de glucose pour mimer une hyperglycémie.

Nous avons ensuite mesuré l'effet combiné d'une hyperglycémie, d'une diminution du bicarbonate sanguin et d'un pH acide sur la mort cellulaire. Les cellules ont, encore une fois, été conditionnées pendant 24 h dans un milieu contenant 5 mM de glucose. Puis elles ont été incubées dans un milieu contenant 30 mM de glucose et des concentrations réduites de bicarbonate de façon à diminuer le pH (Tableau IV, p. 46). Nous avons aussi ajouté 25 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (Invitrogen) au milieu acide (pH = 7,0) et au milieu normal (pH = 7,4) pour stabiliser le pH.

Pour toutes les autres conditions, les facteurs sanguins et les agents thérapeutiques ont été ajoutés directement dans le milieu de culture de base, *i.e.* du DMEM contenant 30 mM de glucose, de la glutamine et du pyruvate de sodium. Ainsi, pour toutes les autres conditions testées, nous considérons, dans l'interprétation des résultats, que la concentration de glucose est élevée. Les tableaux IV et V (p. 46 et 47) présentent les concentrations utilisées pour ces facteurs sanguins et ces agents thérapeutiques, respectivement. Pour chaque condition testée, l'osmolarité a été ajustée avec du mannitol (Sigma, St-Louis, MO, USA). Lorsque

nécessaire, le véhicule (DPBS, BSA ou éthanol 96 %) était ajouté au milieu seul pour la condition basale.

**Tableau IV : Concentrations testées pour les facteurs sanguins**

<b>Facteur sanguin</b>	<b>Concentrations testées</b>
Glucose	5, 10, 20 et 30 mM
Lactate	10 mM
Bicarbonate de sodium	7 et 23 mM
Palmitate	0,20, 0,50, 0,75 et 1,00 mM
Peroxyde d'hydrogène	10, 50, 75, 100, 150 et 200 $\mu$ M
TNF- $\alpha$	2, 10, 20, 30, 50 et 100 ng/ml
Isoprotérénol	1 et 10 $\mu$ M

Le TNF- $\alpha$  humain recombinant a été dilué dans du « Dulbecco's phosphate-buffered saline » (DPBS) (Invitrogen) additionné de 0,01 % d'albumine pour le stabiliser. Le peroxyde d'hydrogène a été dilué dans le DPBS et l'isoprotérénol dans de l'eau. Tous les autres facteurs ont été ajoutés directement dans le milieu de culture.

Le glucose et le peroxyde d'hydrogène proviennent du Laboratoire MAT, le lactate et l'isoprotérénol de Sigma alors que le TNF- $\alpha$  provient de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Le palmitate (Sigma), qui est ajoutée au milieu d'incubation des cellules, a d'abord été complexé à l'albumine (Millipore, Billerica, MA, USA : albumine de sérum bovin sans acide gras) afin de reproduire les conditions retrouvées dans le plasma. La concentration de la solution de palmitate était de 12 mM avec 16 % d'albumine. Dans le milieu de culture des cellules, la concentration finale du palmitate complexé à l'albumine variait de 0,5 à 1 mM, alors que celle de l'albumine était constante (1,33 %).

**Tableau V : Concentrations testées pour les agents thérapeutiques**

<b>Agent thérapeutique</b>	<b>Concentration finale</b>
Bleu de méthylène	125, 250 et 500 nM
Resvératrol	10, 50 et 100 $\mu$ M
N-acétylcystéine	1 mM
Idebenone	10 et 25 $\mu$ M
Sildénafil	0,3, 1 et 10 $\mu$ M
Cyclosporine A	0,2 $\mu$ M
Fénofibrate	20 $\mu$ M
L-carnitine	1, 3 et 10 mM
Dinitrophénol	10, 25 et 50 $\mu$ M
Propionate	0,2 mM

Le resvératrol, l'idebenone, la cyclosporine A et le fénofibrate ont été dilués dans de l'éthanol 96 %. Pour ces agents, le volume ajouté au milieu de culture était inférieur ou égal à 5  $\mu$ l pour 100  $\mu$ l afin d'éviter la toxicité induite par l'éthanol sur les cellules. Les autres agents ont été dilués dans de l'eau.

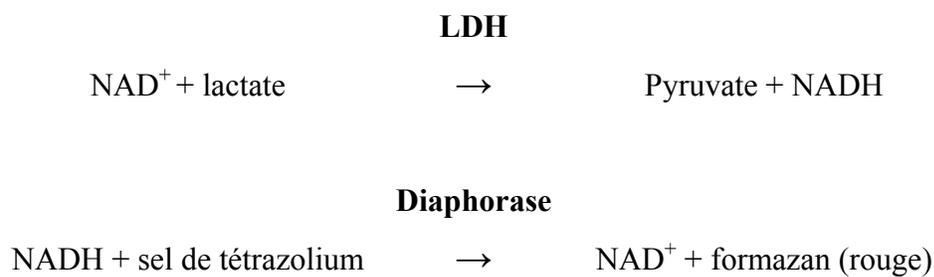
Le MB provient de la pharmacie de l'Institut de Cardiologie de Montréal (Montréal, Qc, Canada), alors que le resvératrol, le NAC, l'idebenone, la cyclosporine A, le fénofibrate, la L-carnitine, le DNP et l'acide propionique proviennent de Sigma. Le sildénafil est une gracieu seté de Pfizer (Kirkland, Qc, Canada).

#### **4- Mesure de la nécrose cellulaire**

- Principe de la mesure

La mesure de nécrose est basée sur la libération de LDH, une enzyme cytosolique, relâchée par les cellules nécrotiques suite à la rupture des membranes. La mesure du LDH a été effectuée à l'aide du « Cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity

assay » (Promega, Madison, WI, USA). La réaction enzymatique couplée de la LDH et de la diaphorase permet de transformer le sel de tétrazolium en formazan, qui est de couleur rouge (Figure 9, p. 48). L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la quantité de LDH relâchée dans le milieu et celle-ci est mesurée par densité optique (D.O.).



**Figure 9 : Réaction chimique induite par la LDH.** LDH : lactate déshydrogénase, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide.

La quantité de LDH présente dans le surnageant des cellules est normalisée pour la concentration totale de LDH présente. Le taux de cytotoxicité ou pourcentage de nécrose est donc calculé selon la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{D.O. du surnageant (cellules nécrotiques)}}{\text{D.O. du culot + surnageant (cellules totales)}} \times 100$$

- Protocole expérimental

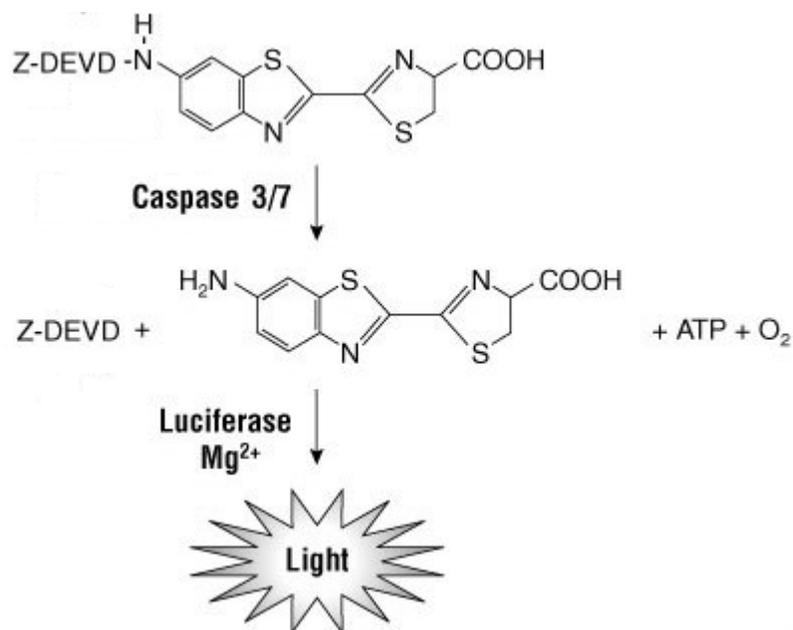
Les cellules des 8 lignées ont été mises dans des plaques transparentes de 96 puits (10 000 cellules par puits) (Corning) contenant les agents inducteurs et thérapeutiques. À ces plaques, un blanc a été ajouté, *i.e.* un puits ne contenant que du milieu de culture pour mesurer le bruit de fond provenant du FBS. Cette valeur a été soustraite des résultats. Deux contrôles positifs ont été utilisés, soit une solution de LDH (fournie par la compagnie) et une concentration élevée de peroxyde d'hydrogène (500  $\mu\text{M}$ ).

Les cellules ont été incubées avec les agents inducteurs et thérapeutiques à 37 °C pendant 24, 30 ou 48 h. Ensuite, le surnageant et le culot cellulaire ont été prélevés puis incubés avec une solution de lyse pendant 1 h. Une fois les cellules lysées, un mélange de substrats contenant la diaphorase et le sel de tétrazolium a été ajouté. Après 30 min à la température de la pièce dans le noir, la réaction a été arrêtée avec 1 M d'acide acétique et la D.O. a été mesurée à 490 nm à l'aide du Synergy 2 de chez Biotek (Winooski, VT, USA).

## **5- Mesure de l'apoptose cellulaire**

- Principe de la mesure

Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose cellulaire nécessitent l'activation par clivage des caspases effectrices (3/7). Ces protéases, lorsqu'activées, clivent les résidus d'acides aspartique (Asp) des protéines et de l'ADN menant à la résorption de la cellule. Ainsi, la mesure de l'activité de ces caspases est un bon moyen d'évaluer l'apoptose cellulaire. Cette mesure a été réalisée à l'aide du «Caspase-Glo 3/7 Assay» (Promega). Celui-ci utilise un réactif qui permet la lyse des cellules, libérant les caspases 3/7, et qui contient de la luciférase liée à un tétrapeptide appelé DEVD (Asp-Glu-Val-Asp). Si les cellules sont en situation d'apoptose, les caspases seront activées et le DEVD sera alors clivé, libérant la luciférase qui émet de la lumière (Figure 10, p. 50). Ainsi, la quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité de caspases 3/7 activées dans les cellules. Cette lumière est exprimée en unité relative de luminescence (RLU).



**Figure 10 : Clivage induit par les caspases 3 et 7.** Figure tirée de : Technical Bulletin, Caspase-Glo 3/7 Assay (Part# TB323), Promega. Mg<sup>2+</sup> : ion magnésium, ATP : adénosine triphosphate, O<sub>2</sub> : oxygène.

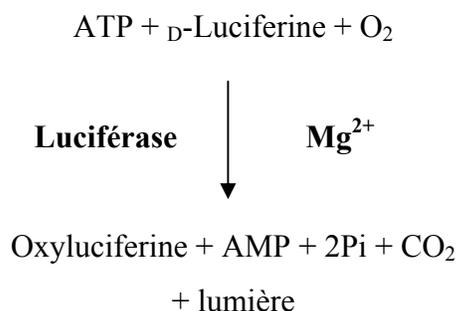
- Protocole expérimental

Les cellules des 8 lignées ont été mises dans des plaques opaques de 96 puits (10 000 cellules par puits) (Perkin Elmer) contenant les agents inducteurs et thérapeutiques et un blanc. Puis, les cellules ont été incubées pendant 24 h. Le jour de l'expérience, 100 µl du réactif fourni par la compagnie ont été ajoutés aux cellules. Ces dernières ont ensuite été agitées pendant 30 s puis incubées pendant 30 min à la température de la pièce pour permettre la réaction. Des mesures de luminescence ont ensuite été effectuées à l'aide du Synergy 2 et le blanc a été soustrait des résultats.

## 6- Mesures des niveaux d'ATP cellulaire

- Principe de la mesure

Le taux d'ATP cellulaire est un bon marqueur de la viabilité cellulaire. En effet, la concentration d'ATP cellulaire chute rapidement suite au déclenchement des processus de nécrose ou d'apoptose. Cette mesure a été réalisée à l'aide du « ATPlite luminescence ATP detection assay system » (Perkin Elmer). L'enzyme luciférase catalyse l'oxydation de la  $D$ -luciférine en présence d'ATP pour former de la lumière (Figure 11, p. 51). Comme le substrat et l'enzyme sont en excès, la lumière émise est proportionnelle à la concentration d'ATP cellulaire.



**Figure 11 : Réaction chimique induite par la luciférase.** ATP : adénosine triphosphate,  $\text{Mg}^{2+}$  : ion magnésium, AMP : adénosine monophosphate, Pi : phosphate inorganique

- Protocole expérimental

Les cellules des 8 lignées ont été mises dans des plaques opaques de 96 puits (10 000 cellules par puits) (Perkin Elmer) contenant les agents inducteurs et thérapeutiques. La courbe standard a été réalisée en duplicata dans une série de puits contenant uniquement du milieu de culture. Les concentrations de celle-ci ont été déterminées expérimentalement. Après 24 h d'incubation, une solution de lyse a été ajoutée à tous les puits, suivi d'une agitation de 5 min à 700 rpm. Puis, la solution contenant le substrat a été ajoutée à tous les puits, suivi d'une agitation de 5 min à

700 rpm. La lumière émise par la réaction a été mesurée à l'aide du Synergy 2, après 10 min d'adaptation au noir.

## **7- Dosage de la COX**

Pour les dosages de la COX, de la citrate synthase (CS) et des protéines, un homogénat de tissu cardiaque a été utilisé comme contrôle positif. Il a subi exactement le même traitement que les cellules de fibroblastes, mais des dilutions supplémentaires dans le tampon d'homogénéisation ont été effectuées étant donné que l'activité de la COX et de la CS est beaucoup plus importantes dans le cœur. Ces dilutions ont été prises en compte lors des calculs.

- Principe de mesure

Le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale permet l'oxydation du cytochrome c. Ainsi, l'activité de la COX est déterminée par la diminution de l'absorbance du cytochrome c (préalablement réduit par du sodium hydrosulfite) causée par son oxydation et mesurée par spectrophotométrie. Pour ce faire, les cellules doivent être homogénéisées pour briser les membranes cellulaires et mitochondriales.

- Protocole expérimental

Les cellules ont été incubées dans un pétri de 100 mm avec les agents inducteurs et thérapeutiques. Après 24 h, les cellules ont été détachées et récoltées à l'aide de trypsine-acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) (Invitrogen). Suite à deux rinçages au DPBS («Dulbecco's phosphate-buffered saline») stérile froid, le culot a été resuspendu dans 400 µl de tampon d'homogénéisation contenant 20 mM d'acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique pH 7,2 (Sigma), 3 mM d'EDTA (Sigma), 0,25 M de sucrose (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) et 1 mg/ml de digitonine (Sigma) pendant 35 s. La solution a ensuite été centrifugée à 10 000 rpm à

4 °C pendant 1 min. Le culot a été resuspendu dans 1 ml de tampon d'homogénéisation sans digitonine puis centrifugé à 10 000 rpm à 4 °C pendant 1 min. Le culot a été resuspendu dans 400 µl du tampon d'homogénéisation. Les cellules ont ensuite été soumises à trois cycles de gel/dégel dans l'azote liquide, puis ont été sonifiées dans un bain pendant 1 min. Les échantillons ont été gardés sur la glace jusqu'au dosage de l'activité de la COX. Les mêmes échantillons et le même tampon d'homogénéisation ont été utilisés pour le dosage de la CS et des protéines.

L'activité de la COX, déterminée par la diminution de l'absorbance à 550 nm du cytochrome c, a été mesurée par spectrophotométrie à 37 °C (Cobas Fara, Roche, Basel, Suisse). Le réactif est composé de 600 µM de cytochrome c (Sigma) et 69 mM de sodium hydrosulfite (Sigma) dilués dans un tampon phosphate pH 7,5, 50 mM. Cette solution a été gazée à l'air ambiant pendant 15 min juste avant le dosage. Au moment du dosage, 70 µl d'échantillon additionné de 280 µl de tampon phosphate pH 7,5, 50 mM ont été placés dans une cuvette. Puis, 20 µl de réactif ont été ajoutés et 40 lectures ont été prises à intervalle de 10 s.

L'activité de la COX a été calculée selon la formule suivante :

$$U/L = \frac{\Delta \text{absorbance}}{\text{temps (min)}} \times F$$

Où F est calculé selon la formule suivante :

$$F = \frac{10^3}{\epsilon} \times \frac{r^2}{sv}$$

$r^2$  étant la surface de la fenêtre optique de la cuvette (0,25 cm<sup>2</sup>)

sv étant le volume de l'échantillon (ml)

$\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire du cytochrome c à 550 nm : 29,5 mM<sup>-1</sup>

Ainsi :

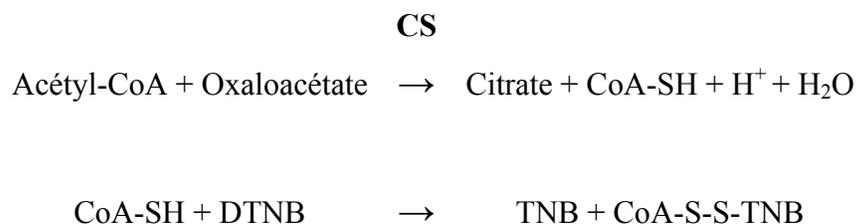
$$F = \frac{10^3}{29,5} \times \frac{0,25}{0,07} = 121,06$$

Le tampon d'homogénéisation a été utilisé comme blanc.

## 8- Dosage de la citrate synthase

- Principe de mesure

L'activité de la COX est normalisée en fonction de l'activité de la CS, une enzyme qui reflète la quantité de mitochondries présente dans les échantillons. Le principe du dosage enzymatique de la CS est le suivant : le CoA réduit par la CS réagit avec le DTNB (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) pour le transformer en TNB (Figure 12, p. 54). Cette dernière substance absorbe spécifiquement à 412 nm. Ainsi, l'activité de la CS est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 412 nm à 37 °C.



**Figure 12 : Réaction chimique induite par la CS.** CoA : coenzyme A, DTNB : acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque, -SH : groupement thiol.

- Protocole expérimental

Deux solutions ont d'abord été préparées. La première était composée de 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) et 1,25 mM de DTNB (Sigma-Aldrich). La deuxième solution (réactif) contenait 50 mM d'oxaloacétate pH 6,5 (Boehringer Mannheim, Basel, Suisse) et 5 mM d'acétyl-CoA (Sigma). Au moment du dosage, 10  $\mu$ l d'échantillon additionné de 300  $\mu$ l de la première solution ont été placés dans une cuvette, puis, 20  $\mu$ l de réactif ont été ajoutés. L'absorbance à 550 nm a été mesurée par spectrophotométrie à 37 °C à l'aide du Cobas Fara et 15 lectures ont été prises à intervalle de 10 s.

L'activité de la CS est calculée selon la même formule, mais le coefficient d'extinction molaire du DTNB à 412nm est de 13,6mM<sup>-1</sup>. Ainsi :

$$F = \frac{10^3}{13,6} \times \frac{0,25}{0,01} = 1838,24$$

Le tampon d'homogénéisation a été utilisé comme blanc.

## 9- Dosage des protéines

- Principe de mesure

Les valeurs de l'activité de la COX et de la CS ont été normalisées en fonction de la quantité de protéines présente dans les échantillons. Celle-ci a été évaluée avec le réactif de Bradford. Ce dernier contient du bleu de Coomassie qui change de couleur suite à sa liaison aux protéines (Bio-Rad Laboratories). Le bleu formé absorbe à 596 nm.

- Protocole expérimental

Le dosage protéique de Bradford a été réalisé à l'aide du Cobas Fara. Cinq standards ont été préparés pour obtenir les concentrations d'albumine sérique bovine suivantes : 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 mg/ml. Le réactif de Bradford a été préparé par dilution du « Reagent concentrate » (Bio-Rad Laboratories) dans l'eau avec un ratio 1/5. Le blanc a été préparé par la dilution du tampon d'homogénéisation dans l'eau avec le même ratio. Au moment du dosage, 10 µl d'échantillon ont été ajoutés à 370 µl du réactif de Bradford dans une cuvette puis, l'absorbance à 596 nm a été mesurée par spectrophotométrie à 30 °C à l'aide du Cobas Fara et 24 lectures ont été prises à intervalle de 5 s.

## **10- Tests statistiques**

La plupart des résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur-type (SEM). Le test statistique utilisé pour la majorité des expériences est un test de *t* pour données non appariées. Pour une expérience, où plusieurs agents thérapeutiques ont été testés sur chaque groupe et où les résultats ont été exprimés en pourcentage, les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart-type (SD) et une analyse de variance (ANOVA) à une voie a été utilisée, suivie d'un post-test de Bonferroni pour comparer tous les résultats entre eux. Ces analyses ont été faites à partir du logiciel « GraphPad Prism » 5. Pour les deux tests, une valeur de *p* inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

## Résultats

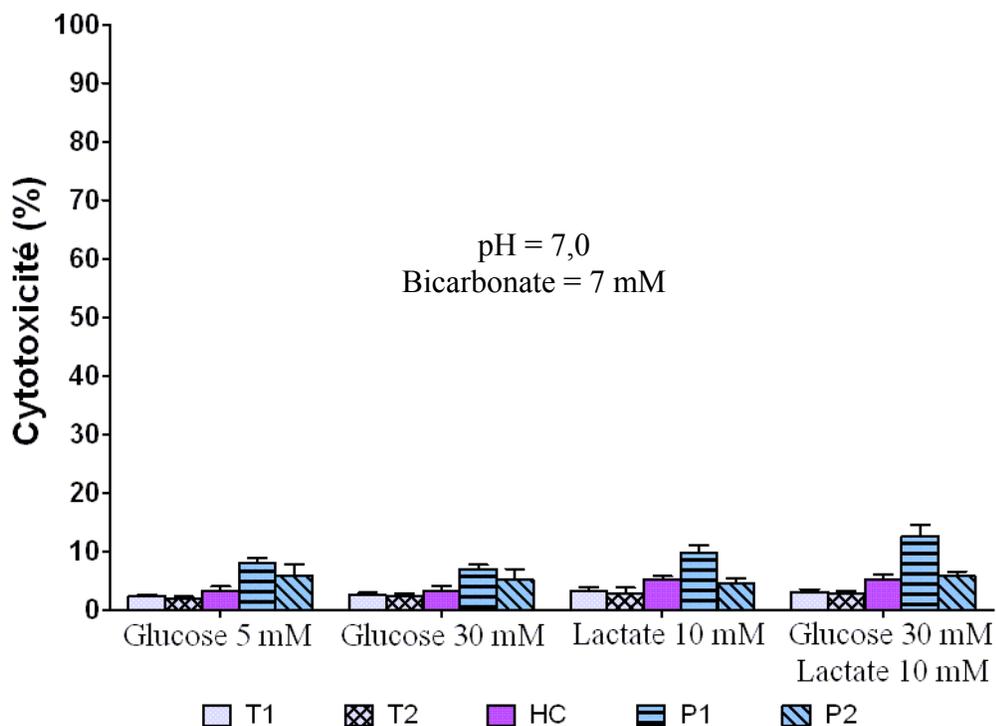
### 1- Étude pilote : Facteurs sanguins

Étant donné le mauvais pronostic associé à une glycémie sanguine élevée chez les enfants atteints du LSFC lors des crises<sup>\*</sup>, ce facteur sanguin fut le premier testé sur les cellules provenant de la lignée commerciale CRL-2429 (ATCC), puis sur les cellules de la lignée T2 et des lignées P1 et P2 (Tableau II, p. 43). Ainsi, les cellules ont d'abord été incubées avec une concentration de 5 mM de glucose pendant 24 h, puis avec des concentrations de 10, 20 et 30 mM pendant 24 et 48 h, et la relâche de LDH a été mesurée. De plus, l'effet d'une hyperglycémie combinée à une hyperlactatémie a été testé par l'ajout de 10 mM de lactate, cette concentration ayant été déterminée d'après l'article de Morin et al. (1993). En outre, afin d'évaluer l'effet d'une diminution du bicarbonate sanguin et de l'acidification du pH sanguin sur la mort cellulaire, la concentration du bicarbonate du milieu de culture a aussi été modifiée pour atteindre des valeurs de 7 et 23 mM associées respectivement à un pH de 7,0 et 7,4<sup>8</sup>.

Ces 4 facteurs, utilisés seuls ou en combinaison n'ont pas occasionné d'augmentation de nécrose par rapport à la condition de base, quelle que soit la lignée cellulaire testée. La figure 13 (p. 58) illustre les résultats obtenus avec un pH de 7,0 pour les cellules de 2 témoins (T1 et T2), de 2 patients (P1 et P2) et de l'hétérozygote composé (HC) après 48 h d'incubation. Le pourcentage de nécrose est resté faible et n'a dans aucun cas dépassé 15 %.

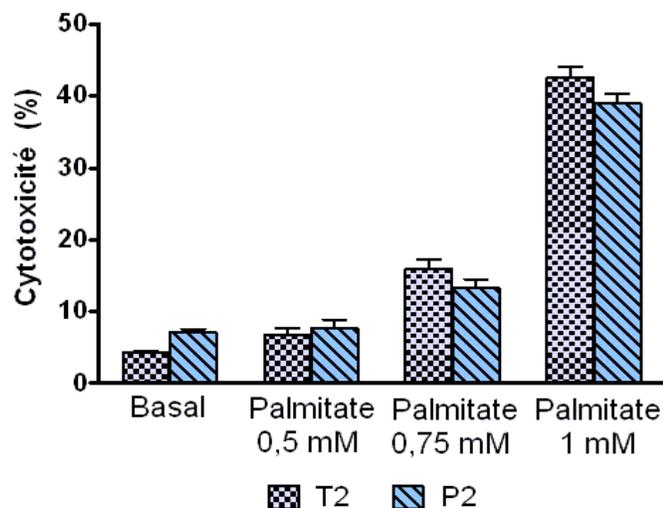
---

<sup>\*</sup> François Guillaume DeBray, communication personnelle, article en préparation pour soumission.



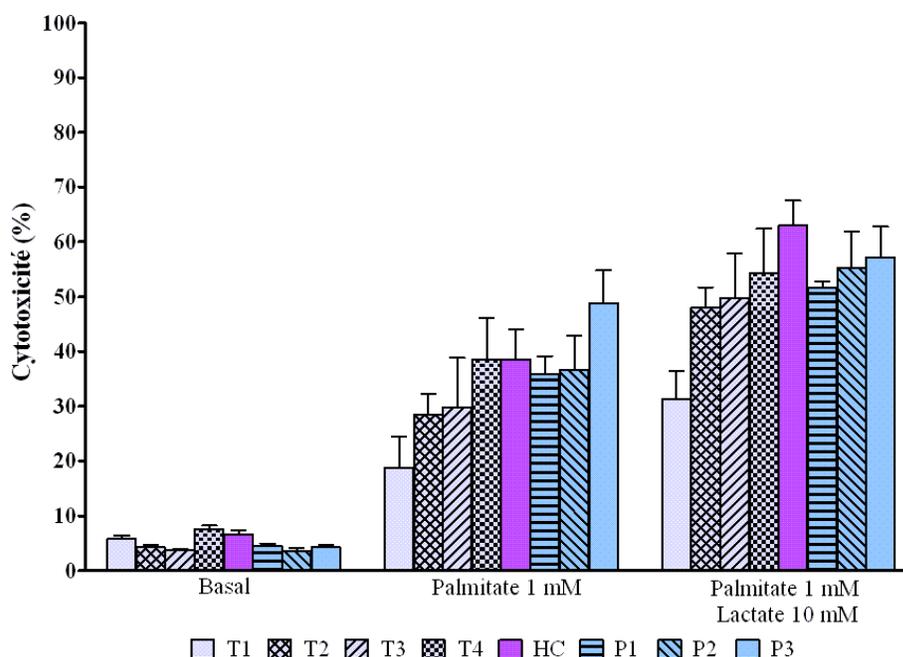
**Figure 13 :** Effet d'une hyperglycémie, d'une hyperlactatémie, d'une faible concentration de bicarbonate et d'un pH acide sur la relâche de LDH. Moyenne ( $\pm$  SEM) de trois expériences réalisées en triplicata. Le temps d'incubation est de 48 h.

Par la suite, le palmitate a été utilisé afin de voir si l'augmentation de la concentration d'acides gras libres dans le sang serait un mécanisme associé à la mort des cellules de patients. Comme il n'existe à ce jour aucune donnée sur la concentration sanguine d'acides gras chez les patients LSFC, la concentration de palmitate utilisée dans cette étude a été déterminée sur la base d'essais préliminaires comparant l'effet de différentes concentrations de palmitate sur la mort cellulaire (Figure 14, p. 59). Des concentrations de palmitate de 0,5 et 0,75 mM n'ont pas amené un taux de mort cellulaire assez élevé ( $< 20\%$ ) pour nous permettre de mesurer subséquemment la diminution de la mort cellulaire qui pourrait être associée aux agents thérapeutiques. La concentration de 1 mM, qui, selon les données actuelles, apparaît supraphysiologique<sup>108, 109</sup>, a été sélectionnée malgré tout car, dans notre modèle cellulaire in vitro, elle a induit une mort cellulaire intéressante d'environ 45 % (Figure 14, p. 59).



**Figure 14 : Courbe dose-réponse de l'effet du palmitate 0,5, 0,75 et 1 mM sur la relâche de LDH.** Une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata). L'état basal contient le véhicule. Le temps d'incubation est de 48 h.

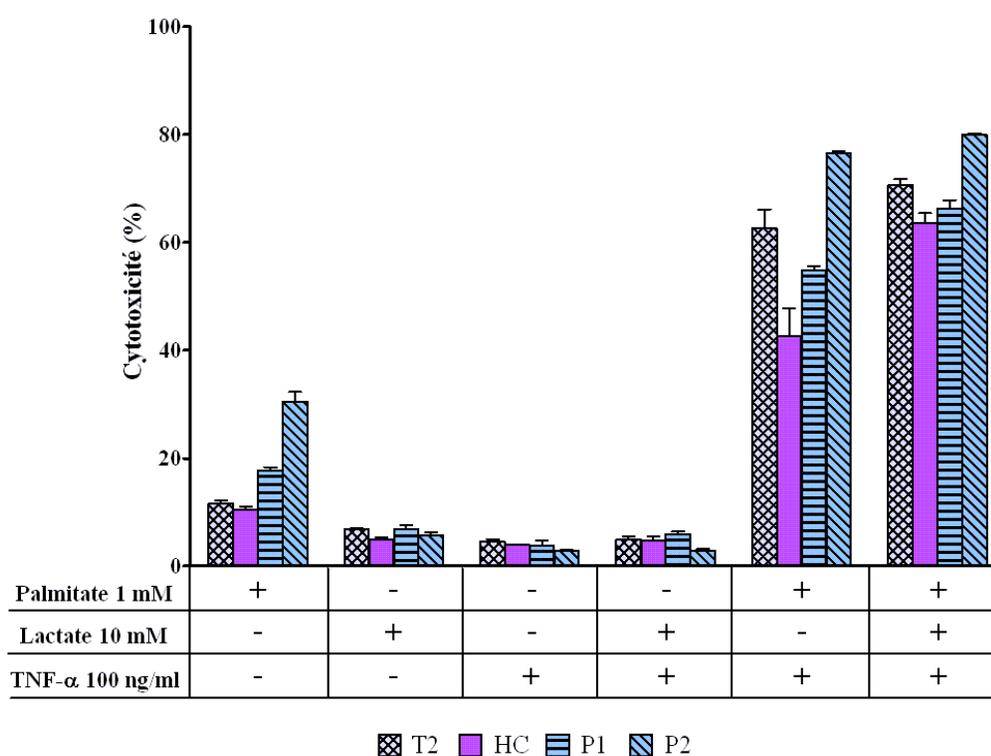
Avec la concentration de 1 mM, nous avons obtenu l'effet recherché, soit une relâche de LDH plus importante pour la moyenne des 3 lignées cellulaires de patients (40,4 %) comparativement à la moyenne des 4 lignées cellulaires de témoins (28,9 %) (Figure 15, p. 60), après 48 h d'incubation. La concentration de lactate de 10 mM a été choisie d'après la littérature et correspond à une concentration pouvant être atteinte chez un individu en santé lors d'une activité physique intense<sup>36</sup>. Ce taux de lactate a été choisi pour voir si une concentration physiologique élevée de lactate induit une augmentation accrue de la mort cellulaire chez les patients LSFC. Les résultats montrent que le lactate ne l'augmente pas lorsqu'il est utilisé seul (Figure 13, p. 58), mais il potentialise l'effet du palmitate en augmentant la mort observée pour la moyenne des 3 lignées cellulaires de patients (54,8 %) et des 4 lignées cellulaires de témoins (45,8 %) (Figure 15, p. 60). Les cellules de l'hétérozygote composé réagissent de manière semblable aux cellules de patients avec des pourcentages de nécrose de 38,6 % (palmitate 1 mM) et 63,0 % (palmitate 1 mM combiné au lactate 10 mM) (Figure 15, p. 60).



**Figure 15 : Effet d'une concentration élevée de palmitate et de lactate sur la relâche de LDH.** Lignées T4, P1 et P3 : n = 4. Lignées T1, T2, T3, HC et P2 : n = 5. L'état basal contient le véhicule. Ces expériences ont été réalisées en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM). Le temps d'incubation est de 48 h.

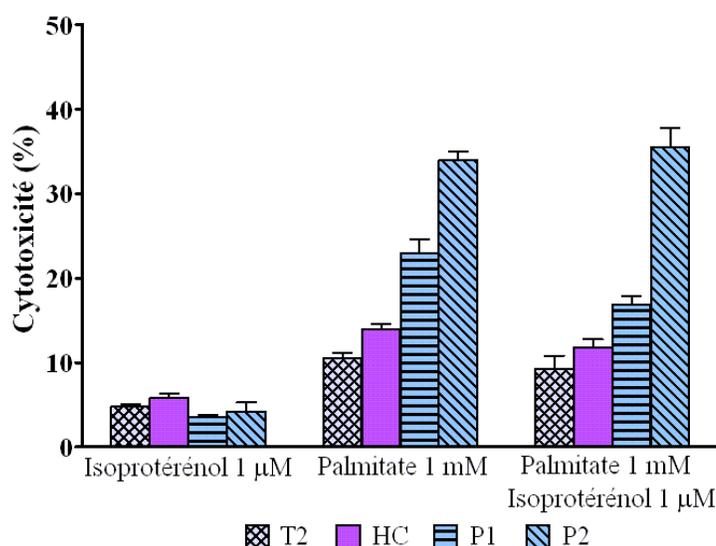
Les autres facteurs qui ont été étudiés sont (i) le peroxyde d'hydrogène, (ii) le TNF- $\alpha$  et (iii) un agoniste  $\beta$ -adrénergique, l'isoprotérénol, lesquels miment le stress oxydant, l'action des cytokines lors d'une infection et la réponse du système nerveux sympathique face à un stress, respectivement. Le choix des concentrations pour ces divers facteurs a été fait sur la base d'expériences préliminaires. Les différentes concentrations testées sont mentionnées dans le tableau IV (p. 46). Avec le peroxyde d'hydrogène, à des concentrations de 75 et 100  $\mu$ M, les cellules de patients (P1 et P2) avaient un taux de mortalité légèrement plus élevé (36,2 % à 75  $\mu$ M, 83,5 % à 100  $\mu$ M) que les cellules du témoin (T2) (12,3 % à 75  $\mu$ M, 76,7 % à 100  $\mu$ M) et de l'hétérozygote composé (HC) (20,6 % à 75  $\mu$ M, 56,5 % à 100  $\mu$ M) (données non présentées). Une concentration de 500  $\mu$ M de peroxyde d'hydrogène a aussi été utilisée comme contrôle positif de mortalité pour les tests de nécrose. Le temps d'incubation optimal pour ce facteur a été difficile à déterminer, la réponse étant très variable entre 24 et 48 h d'incubation.

La relâche de LDH, en présence de 100 ng/ml de TNF- $\alpha$ , s'est avérée inférieure à 10 % et l'ajout de 10 mM de lactate ne l'a pas augmentée (Figure 16, p. 61). Toutefois, la combinaison du TNF- $\alpha$  avec le palmitate 1 mM a augmenté la relâche de LDH comparativement au palmitate utilisé seul (Figure 16, p. 61). Par exemple, pour le patient P2, après 48 h d'incubation, le taux de nécrose passe de 32,4 % à 74,6 %. Enfin, l'ajout de lactate à la combinaison de palmitate et de TNF- $\alpha$  a accentué la mortalité de cette lignée jusqu'à 79,3 % (Figure 16, p. 61). Le lactate et le TNF- $\alpha$  ont donc un effet synergique en présence de palmitate. D'après les résultats obtenus, les cellules des patients (P1 et P2) ne sont pas plus susceptibles à ce facteur sanguin que celles du témoin (T2). La réponse des cellules de l'hétérozygote composé (HC) ne s'est pas distinguée de celle des autres lignées (Figure 16, p. 61).



**Figure 16 : Effet d'une hyperlactatémie, d'une concentration élevée de palmitate et de TNF- $\alpha$  sur la relâche de LDH.** Une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata). Le temps d'incubation est de 48 h.

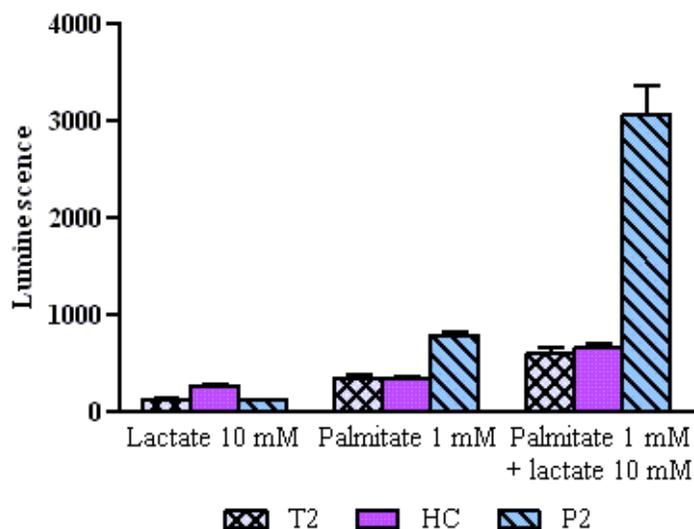
Finalement, l'isoprotérénol n'a eu aucun effet sur la nécrose cellulaire à 1 ou 10  $\mu\text{M}$ , même lorsqu'il a été utilisé en combinaison avec le palmitate à 1 mM, du moins lorsqu'évalué avec un temps d'incubation de 48 h et avec les lignées cellulaires T2, HC, P1 et P2 (Figure 17, p. 62) (Les données obtenues avec une concentration d'isoprotérénol de 10  $\mu\text{M}$  ne sont pas présentées).



**Figure 17 : Effet d'une concentration élevée d'isoprotérénol et de palmitate sur la relâche de LDH.** Une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata). Le temps d'incubation est de 48 h.

Dans l'ensemble, parmi les facteurs sanguins ayant donné des résultats de nécrose intéressants, la combinaison de palmitate 1 mM et de lactate 10 mM a été choisie pour documenter les niveaux d'apoptose, et ce, sur les lignées T2, HC et P2. Après 24 h d'incubation, avec cette combinaison, les cellules de la lignée P2 ont un taux de mortalité beaucoup plus important comparativement à celles des lignées T2 et HC (Figure 18, p. 63). De plus, le lactate seul a induit une luminescence très faible chez les cellules de ce patient (131 RLU) comparativement au palmitate (788 RLU). De plus, la combinaison de ces deux facteurs a fortement potentialisé le taux de mort cellulaire (3066 RLU) (Figure 18, p. 63). Ces résultats ont permis de confirmer l'effet de ces conditions et la susceptibilité des cellules de patients comparativement aux cellules de témoins obtenus par la mesure de nécrose. Cependant, dans cette

expérience, les cellules de la lignée HC semblent réagir comme celles de la lignée de témoin plutôt que celles de la lignée de patient.



**Figure 18 : Effet d'une concentration élevée de palmitate et de lactate sur l'apoptose cellulaire.** Une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata). Le temps d'incubation est de 24 h.

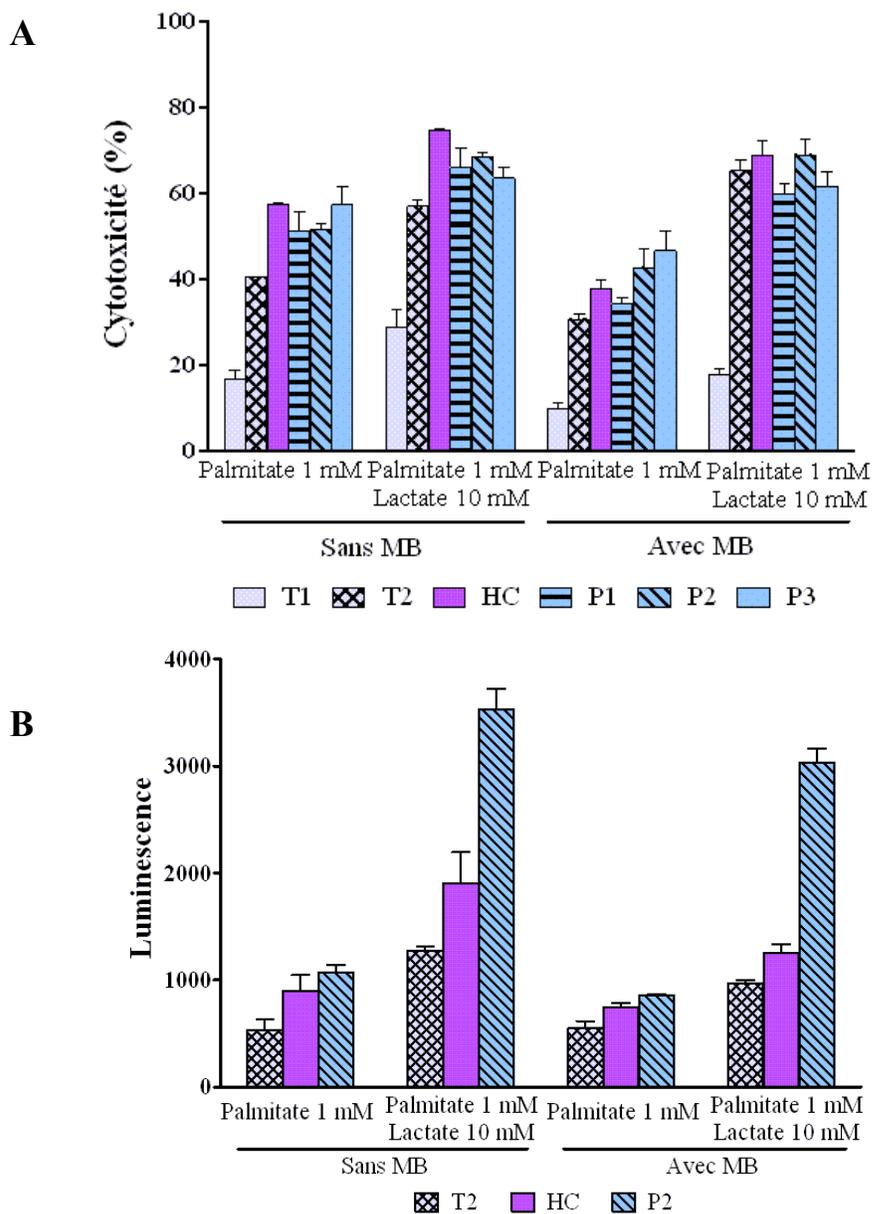
## 2- Étude pilote : Agents thérapeutiques

Pour tester l'efficacité des divers agents thérapeutiques sélectionnés, les cellules de témoins et patients ont été incubées simultanément avec la combinaison de palmitate 1 mM et de lactate 10 mM et avec l'agent thérapeutique ciblé, puis la mort cellulaire a été mesurée par nécrose et apoptose.

Tout d'abord, le MB a été testé pour ses nombreux effets bénéfiques au niveau de la fonction mitochondriale et pour son rôle d'accepteur d'électrons. Le MB, à 125 nM<sup>\*</sup>, combiné au palmitate et au lactate, a permis une diminution de la nécrose de 3,3 % pour la moyenne de 2 lignées cellulaires de témoins (T1 et T2), de 8,0 % pour les cellules de l'hétérozygote composé et de 3,8 % pour la moyenne des 3 lignées cellulaires de patients (Figure 19A, p. 64). La diminution de l'apoptose

<sup>\*</sup> Jean Legault, communication personnelle, article en préparation pour soumission.

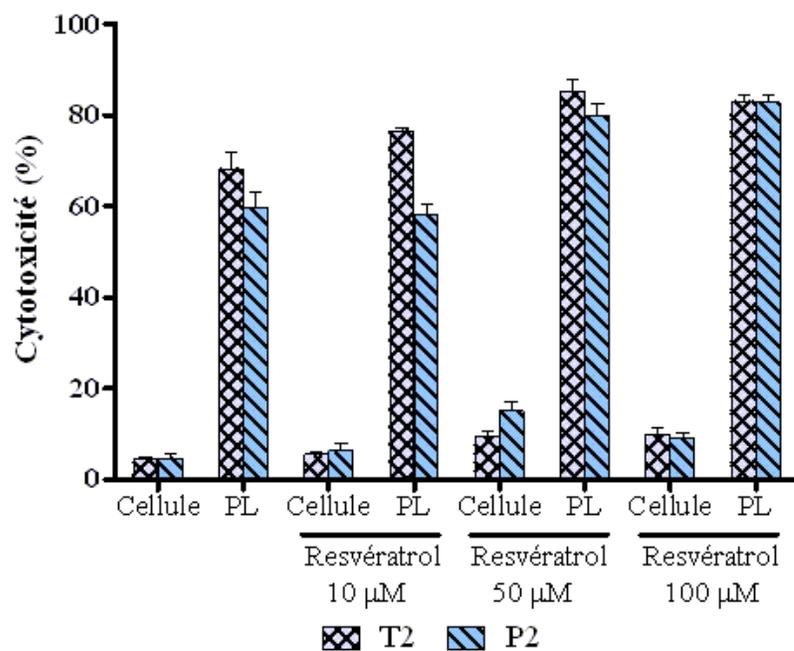
était plus importante, soit de 24,4 % pour les cellules du T2, de 34,5 % pour celles de l'HC et de 14,1 % pour celles du P2 (Figure 19B, p. 64).



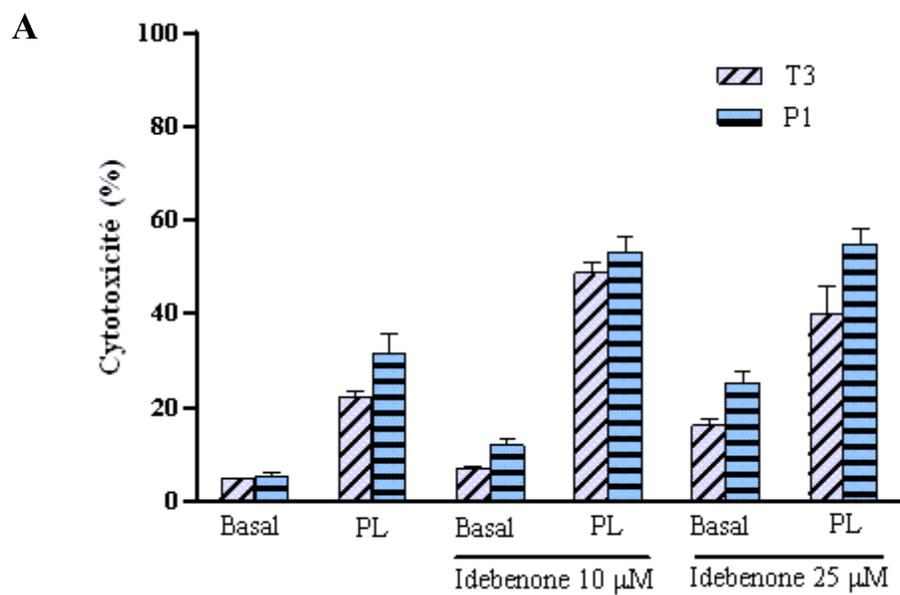
**Figure 19 : Effet du MB à 125 nM sur la mort cellulaire induite par une concentration élevée de palmitate et de lactate.** (A) représente la nécrose, une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata) où le temps d'incubation est de 48 h. (B) représente l'apoptose, une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata) où le temps d'incubation est de 24 h.

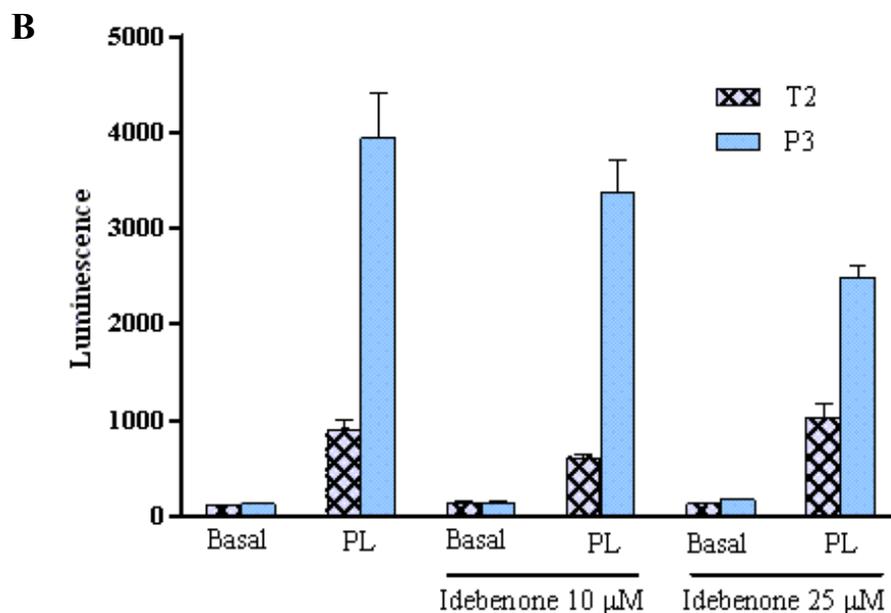
Le découpleur de la chaîne de transport des électrons, le DNP, à des concentrations de 10, 25 et 50  $\mu\text{M}$ , a eu des effets mitigés lorsque testé sur au moins une lignée cellulaire de témoin et de patient. Il a généralement eu un effet bénéfique en apoptose (24 h d'incubation), mais un effet néfaste en nécrose (48 h d'incubation), et les résultats variaient d'une expérience à l'autre (données non présentées). Il s'est donc avéré difficile de tirer une conclusion quant à l'efficacité de cet agent. De plus, étant donné sa toxicité connue lorsqu'utilisé à forte dose, nous avons jugé inutile de poursuivre les expériences avec ce produit.

Nous avons aussi examiné l'effet de trois antioxydants, soit le resvératrol, le NAC et l'idebenone, un analogue du coenzyme Q. Contrairement à nos attentes, tous les antioxydants ont induit une augmentation de la nécrose. En effet, le resvératrol à 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  (Figure 20, p. 66) et le NAC à 1 mM (données non présentées) ont accentué le pourcentage de nécrose résultant de la combinaison de palmitate et de lactate, et cela autant chez les cellules de témoins que de patients. L'idebenone, à 10 et 25  $\mu\text{M}$ , a eu un effet opposé entre les mesures de nécrose et d'apoptose, soit une augmentation du taux de nécrose et une diminution de l'apoptose (Figures 21A et 21B, p. 66 et 67). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, lorsque le stress est trop grand, les cellules peuvent passer d'une mort par apoptose à une mort par nécrose.



**Figure 20 : Effet du resvératrol sur le pourcentage de nécrose induit par une concentration élevée de palmitate et lactate.** Cellule : représente l'état basal qui contient le véhicule. PL : représente la combinaison de palmitate 1 mM et de lactate 10 mM. Une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata). Le temps d'incubation est de 48 h.



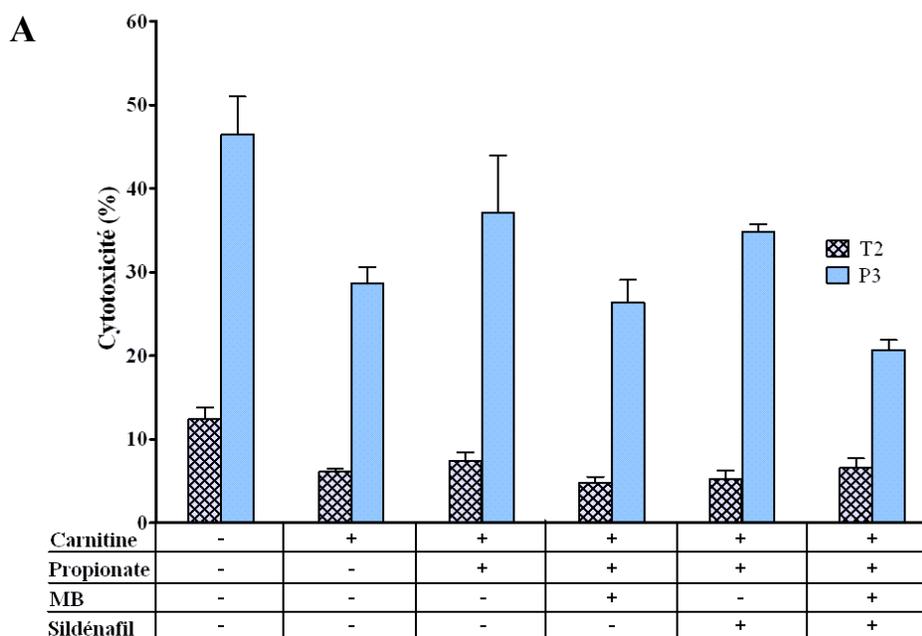


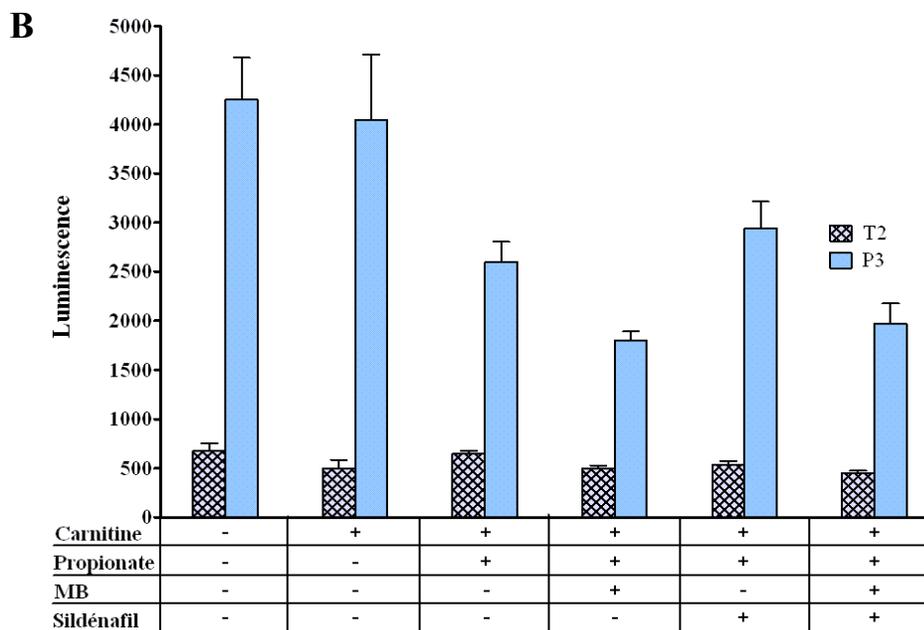
**Figure 21 : Effet de l'idebenone sur la mort cellulaire induite par une concentration élevée de palmitate et lactate.** L'état basal contient le véhicule. PL : combinaison de palmitate 1 mM et de lactate 10 mM. (A) représente la nécrose, une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata) où le temps d'incubation est de 30 h. (B) représente l'apoptose, une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata) où le temps d'incubation est de 24 h.

Les deux inhibiteurs du PTP, soit la cyclosporine A (0,2  $\mu$ M) et le sildénafil (10  $\mu$ M), ainsi que l'agoniste de PPAR- $\alpha$ , le fénofibrate (20  $\mu$ M), n'ont pas eu d'effet d'augmentation ou de diminution de la nécrose cellulaire induite par la combinaison de palmitate et de lactate (données non présentées). Le sildénafil est le seul agent à avoir aussi été testé sur l'apoptose, et encore une fois, aucun effet n'a été observé (données non présentées). Ces agents ont toujours été testés sur au moins une lignée cellulaire de témoin et de patient à des temps d'incubation de 24 h pour l'apoptose et de 48 h pour la nécrose.

Finalement, l'effet de la carnitine (1 mM) sur la nécrose et l'apoptose cellulaire induite par la combinaison de palmitate et de lactate a été mesuré sur les cellules des lignées T2 et P3. Suite à une incubation de 24 h (apoptose) ou de 34 h

(nécrose), les différences au niveau de la mortalité ont surtout été observées chez les cellules du patient. En effet, la carnitine a diminué la mort chez ces cellules de 38,3 % pour la nécrose et de 5,0 % pour l'apoptose (Figures 22A et 22B, p. 68 et 69). Le propionate (0,2 mM), lorsqu'ajouté à la carnitine, a eu un effet différent sur la nécrose et sur l'apoptose. En nécrose, la diminution de la mort cellulaire a été moins importante (20,2 %) que l'effet de la carnitine seule. Toutefois, en apoptose, la diminution de la mort cellulaire a été fortement accentuée (38,9 %) (Figures 22A et 22B, p. 68 et 69). Il est intéressant de constater que malgré un effet minime obtenu avec le MB et le sildénafil lorsqu'ils sont utilisés seuls, ces derniers ont contribué à la diminution de la mortalité lorsqu'ils ont été utilisés en combinaison avec la carnitine et le propionate. En effet, la combinaison de ces 4 agents a permis une diminution de 55,5 % en nécrose et de 53,6 % en apoptose (Figures 22A et 22B, p. 68 et 69).





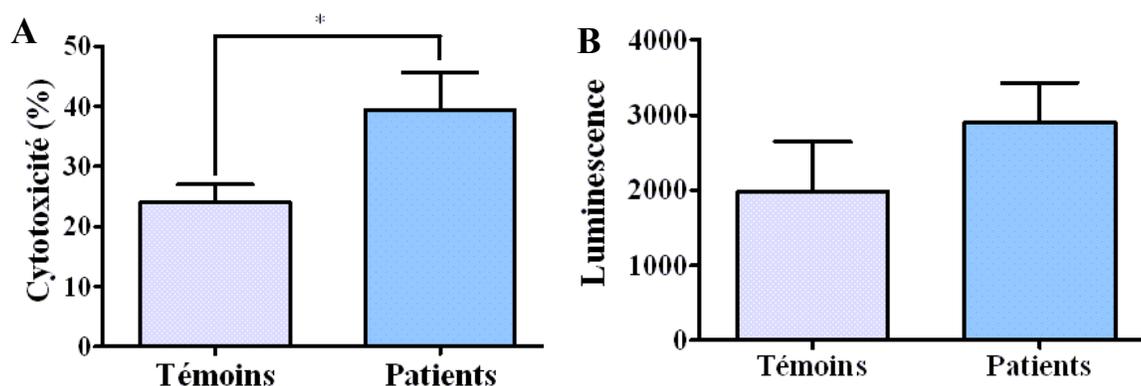
**Figure 22 : Effet de la carnitine 1 mM, du propionate 0,2 mM, du MB 125 nM et du sildénafil 10  $\mu$ M sur la mort cellulaire induite par une concentration élevée de palmitate et lactate.** La combinaison de palmitate 1mM et de lactate 10mM est présente dans chacun des cas. (A) représente la nécrose, une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata) où le temps d'incubation est de 34 h. (B) représente l'apoptose, une expérience réalisée en triplicata (moyenne  $\pm$  SEM du triplicata) où le temps d'incubation est de 24 h.

Suite à ces études pilotes, nous avons sélectionné la carnitine, la combinaison de carnitine et de propionate (pour mimer l'effet potentiel du PLC) ainsi que la combinaison de carnitine, de propionate et de MB comme agents thérapeutiques.

### 3- Étude complète

Suite aux résultats obtenus dans l'étude pilote, nous avons refait les mesures de nécrose et d'apoptose avec les conditions choisies sur les 8 lignées cellulaires disponibles. Ces tests ont été faits 5 fois en triplicata afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Le premier résultat confirme l'augmentation du taux de nécrose et d'apoptose associée au palmitate 1 mM combiné au lactate 10 mM chez les

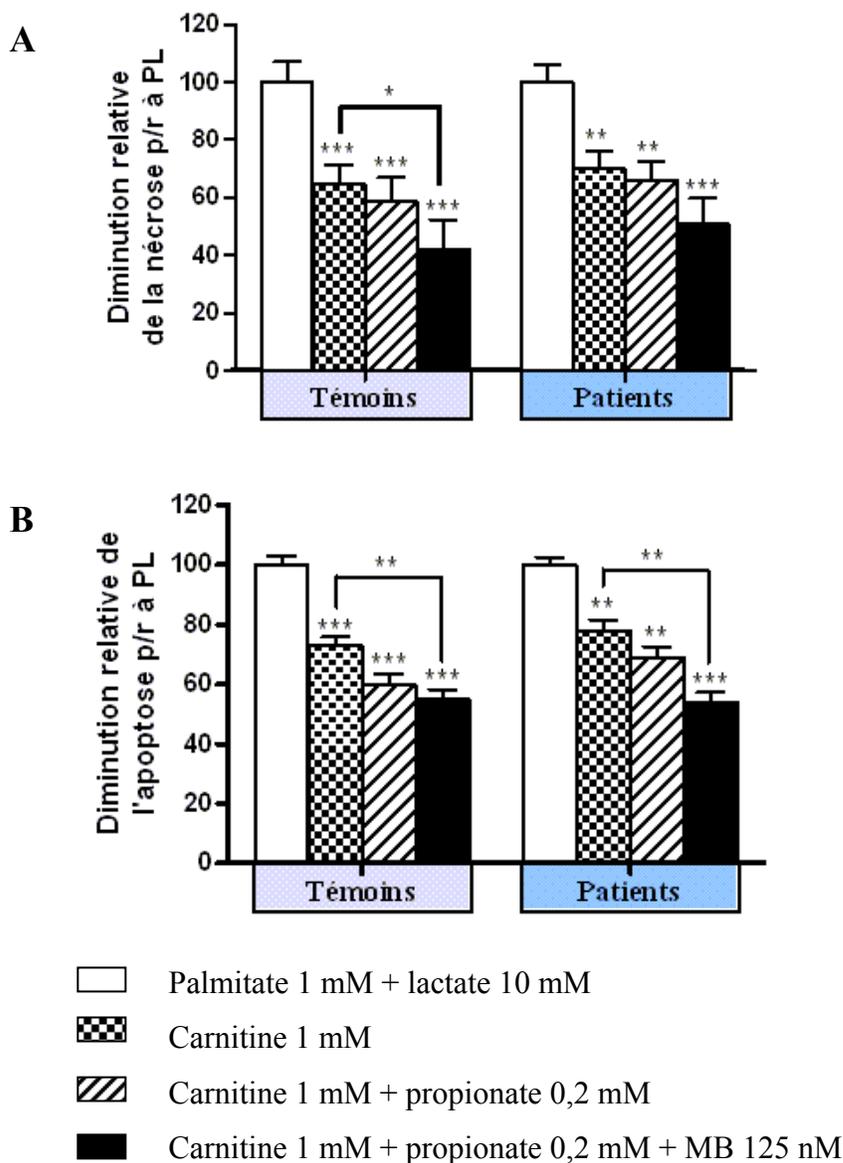
cellules des 4 témoins et des 3 patients. La moyenne des résultats montre que les cellules de patients ont un taux de nécrose significativement plus élevé de 39,0 % comparativement à celles de témoins ( $P < 0,05$ ) (Figure 23A, p. 70). Une augmentation non significative de 32,0 % a été observée en apoptose (Figure 23B, p. 70). Ce résultat suggère une susceptibilité accrue des cellules de patients face à une augmentation d'acide gras libre et de lactate. Les cellules de l'hétérozygote composé ont un taux de mortalité semblable à celui des cellules des patients homozygotes pour la nécrose (HC : 41,4 %, moyenne des patients : 39,4 %). Malheureusement, la réponse de cette lignée au niveau du taux d'apoptose varie beaucoup trop pour tirer une conclusion.



**Figure 23 : Mort cellulaire associée à une concentration élevée de palmitate et de lactate pour la moyenne des 4 témoins et des 3 patients.** (A) représente la nécrose, où le temps d'incubation est de 34 h. Moyenne ( $\pm$  SEM) de 5 expériences réalisées en triplicata. (B) représente l'apoptose, où le temps d'incubation est de 24 h. Moyenne ( $\pm$  SEM) de 5 expériences réalisées en triplicata. L'analyse statistique utilisée est un test de  $t$  unilatéral pour données non appariées (\* $P < 0,05$ ).

Afin de bien évaluer l'effet bénéfique de la carnitine, de la combinaison de la carnitine et du propionate ainsi que de la combinaison de ces deux derniers avec le MB, les résultats ont été exprimés en pourcentage de diminution de la mort cellulaire induite par la combinaison de palmitate et de lactate. Ainsi, la carnitine et les deux combinaisons ont induit une diminution significative de la nécrose et de l'apoptose,

autant chez les témoins que chez les patients (Figures 24A et 24B, p. 72). Toutefois, aucune différence significative entre la réponse des cellules de patients et de témoins n'a été notée. Les résultats les plus marquants ont été observés avec la carnitine qui a induit une diminution de la nécrose de 35,3 % chez les cellules de témoins et de 30,0 % chez les cellules de patients (Figure 24A, p. 70), et de l'apoptose de 26,3 % et 22,0 % respectivement (Figure 24B, p. 70). La combinaison des trois agents thérapeutiques a induit une diminution du taux de mortalité significative comparativement à la combinaison de palmitate et lactate, mais aussi par rapport à l'effet de la carnitine seule, excepté chez le groupe patient pour le test de nécrose (Figure 24A, p. 70). La combinaison des trois agents a donc été extrêmement efficace, puisque la diminution totale de la nécrose a été de 57,8 % chez les cellules de témoins et 49,3 % chez celles des patients (Figure 24A, p. 70), et de l'apoptose de 45,2 % et 46,3 % respectivement (Figure 24B, p. 70). Les agents thérapeutiques ont induit, chez les cellules de l'hétérozygote composé, une valeur de nécrose se situant généralement entre celle des cellules de témoins et de patients. Par exemple, avec la combinaison des 3 agents, des valeurs de nécrose de 10,6 % (moyenne des 4 témoins), 16,4 % (HC) et 19,9 % (moyenne des 3 patients) ont été obtenues. En comparaison, avec la combinaison de palmitate et de lactate, des valeurs de 24,0 %, 41,4 % et 39,4 % respectivement ont été obtenues. Encore une fois, la réponse de cette lignée cellulaire varie beaucoup trop en apoptose pour tirer une conclusion.

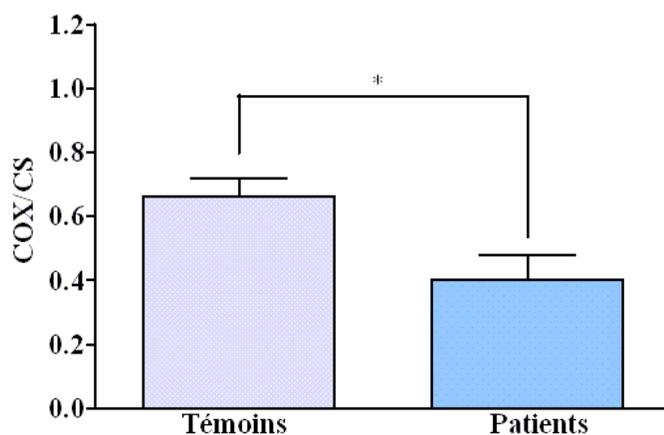


**Figure 24 : Diminution relative de la mort cellulaire associée à la carnitine, le propionate et le MB comparativement à la combinaison de concentrations élevées de palmitate et lactate.** PL : combinaison de palmitate 1 mM et de lactate 10 mM. Les valeurs ont été ajustées à 100 % pour la moyenne des 4 témoins et des 3 patients. (A) représente la nécrose, où le temps d'incubation est de 34 h. Moyenne ( $\pm$  SD) de 5 expériences réalisées en triplicata. (B) représente l'apoptose, où le temps d'incubation est de 24 h. Moyenne ( $\pm$  SD) de 5 expériences réalisées en triplicata. L'analyse statistique utilisée est une analyse de variance (ANOVA) à une voie (\*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001).

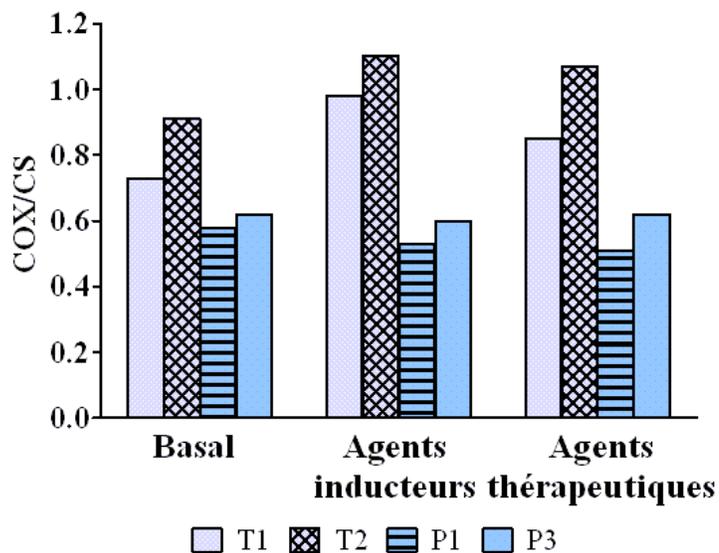
Suite à l'identification de facteurs sanguins capables d'induire une augmentation de la mort chez les cellules de patients et de témoins et ensuite, d'agents thérapeutiques capables de la prévenir, nous nous sommes intéressés aux mécanismes sous-jacents à cette mort. Deux hypothèses ont été testées, soit une diminution accrue de l'activité de la COX et une diminution de la production d'ATP cellulaire.

#### **4- Activité de la COX**

Tel que mentionné précédemment, le LSFC est caractérisé, au niveau des fibroblastes de la peau, par une diminution de l'activité de la COX d'environ 50 %. Celle-ci a été mesurée et normalisée pour la quantité de protéines et pour l'activité de la CS. Les résultats montrent que les cellules des 3 patients ont une diminution significative de l'activité de la COX de 39,4 % comparativement aux cellules des 4 témoins ( $P < 0,05$ ) (Figure 25, p. 74). L'hétérozygote composé a aussi une diminution de l'activité de la COX de 50 % (données non présentées). L'ajout combiné de palmitate et de lactate n'a pas induit une diminution accrue de l'activité de l'enzyme chez les lignées T1, T2, P1 et P3. De plus, aucun effet n'a été observé avec l'ajout de la combinaison des trois agents thérapeutiques (Figure 26, p. 74).



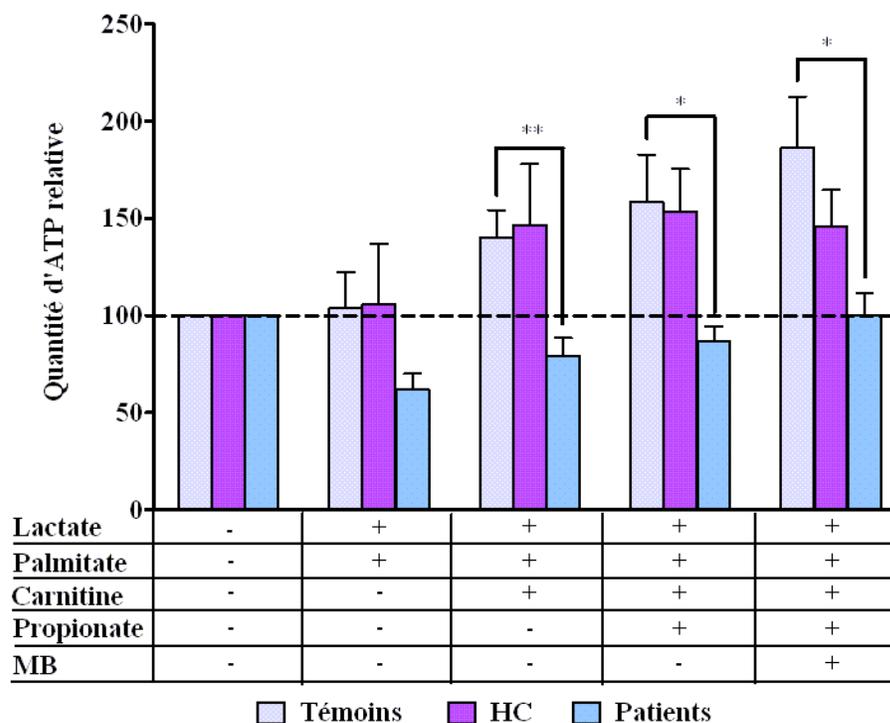
**Figure 25 : Activité de la COX pour la moyenne des 4 témoins et la moyenne des 3 patients.** T1 : n=3, T2 : n=1, T3 : n=4, T4 : n=3, P1 : n=4, P2 : n=5 et P3 : n=3 ( $\pm$  SEM). L'activité de la COX est normalisée par l'activité de la CS et la quantité de protéines. L'analyse statistique utilisée est un test de *t* bilatéral pour données non appariées (\* $P < 0,05$ ).



**Figure 26 : Effet d'une concentration élevée de palmitate et lactate, ainsi que de la combinaison des trois agents thérapeutiques sur l'activité de la COX.** Basal : contient le véhicule. Agents inducteurs : palmitate 1 mM et lactate 10 mM. Agents thérapeutiques : carnitine 1 mM, propionate 0,2 mM et MB 125 nM. Expérience réalisée une fois sur les lignées T1, T2 et P3, et 2 fois sur la lignée P1. Le temps d'incubation est de 24 h.

## 5- Quantité d'ATP cellulaire

La conséquence la plus plausible de la déficience en COX est une diminution de la production d'ATP cellulaire (section 3.4.1). À l'état basal, la quantité d'ATP chez les cellules de patients et de témoins était similaire. L'incubation des cellules avec la combinaison de palmitate et de lactate a induit une diminution non significative de 38,1 % du taux d'ATP chez les cellules des 3 patients. Toutefois, chez les cellules des 4 témoins et de l'hétérozygote composé, le taux d'ATP n'a pas changé. Avec la combinaison des 3 agents thérapeutiques, le taux d'ATP des cellules de patients a remonté pour atteindre 99,9 %, suggérant un effet bénéfique de ces agents. Chez les cellules de témoins et de l'hétérozygote composé, malgré l'absence d'une diminution préalable du taux d'ATP, celui-ci a grandement augmenté avec l'ajout des agents thérapeutiques. Ainsi, les cellules de patients et de témoins ne semblent pas répondre de la même manière aux facteurs sanguins et aux agents thérapeutiques en ce qui concerne la production d'ATP. Cette différence est d'ailleurs significative pour toutes les combinaisons d'agents thérapeutiques (Figure 27, p. 76). Les résultats obtenus avec le patient HC ont été placés dans la graphique pour faciliter la comparaison. Toutefois, comme il n'y a qu'un seul patient HC, les résultats le concernant ne sont pas inclus dans l'analyse statistique.



**Figure 27 : Variation relative du taux d'ATP cellulaire avec le palmitate 1 mM, le lactate 10 mM, la carnitine 1 mM, le propionate 0,2 mM et le MB 125 nM.** L'état basal contient le véhicule. Les valeurs ont été ajustées à 100 % pour la moyenne des 4 témoins, la moyenne des 3 patients et l'hétérozygote composé. Moyenne ( $\pm$  SEM) de 5 expériences réalisées en triplicata. Le temps d'incubation est de 24 h. L'analyse statistique utilisée est un test de  $t$  bilatéral pour données non appariées qui a été réalisé pour chaque combinaison de facteurs et agents utilisés et uniquement en comparant les groupes témoins et patients (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ). Les résultats obtenus avec le patient HC ont été ajoutés au graphique pour faciliter la comparaison mais ne sont pas inclus dans l'analyse statistique.

## **Discussion**

La diminution de l'activité de la COX dans les fibroblastes de peau de patients LSFC peut amener plusieurs problèmes relatifs au bon fonctionnement de la mitochondrie. Ces conséquences, énumérées dans l'introduction, sont multiples et affectent le métabolisme énergétique cellulaire. Pour les patients LSFC, ceci peut mener à une crise d'acidose sévère dont la cause est inconnue. Cette crise induit des dommages irréversibles au cerveau et à d'autres tissus de l'organisme, et s'avère le plus souvent mortelle. En lien avec la déficience en COX et la crise d'acidose, la présente étude visait à caractériser l'effet de facteurs métaboliques périphériques potentiellement altérés chez les patients LSFC sur la mort de lignées cellulaires issues de ces sujets puis, des agents thérapeutiques qui pourraient la prévenir ou la retarder.

Pour ce faire, nous avons utilisé des cultures primaires de fibroblastes de peau de patients LSFC et de témoins, lesquels ont permis de tester la capacité de différents facteurs sanguins à induire une augmentation de la mort cellulaire (nécrose et apoptose), ainsi que le potentiel de plusieurs agents thérapeutiques à renverser cette augmentation. Bien que notre modèle d'étude comporte certaines limites, lesquelles seront abordées à la section 4.5, il s'avérait le meilleur disponible au début de notre étude. En effet, le modèle animal pour le LSFC est présentement en cours de développement. En outre, les résultats obtenus avec ce modèle fournissent des pistes intéressantes quant à l'identité de facteurs sanguins pouvant induire la mort cellulaire qui serait associée aux crises. De plus, ils suggèrent de bonnes indications quant au traitement potentiel des enfants atteints du LSFC.

### **4.1- Facteurs sanguins**

Il convient d'abord de rappeler les mécanismes par lesquels les différents facteurs sanguins sont susceptibles d'induire une augmentation de la mort chez les cellules de patients LSFC et de témoins. Premièrement, nous avons ciblé les facteurs qui ont été mesurés en clinique chez ces patients et qui caractérisent la crise d'acidose

(lactate élevé, bicarbonate bas et pH acide) ou qui sont associés à la mortalité (glycémie sanguine > 10 mM)<sup>8,\*</sup>. Ensuite, d'après les différentes conséquences métaboliques mitochondriales associées à la diminution de l'activité de la COX (section 3.4), de fortes concentrations de palmitate, le principal acide gras saturé de la circulation sanguine, et de peroxyde d'hydrogène, qui mime l'effet du stress oxydant, ont été sélectionnés. Finalement, d'après les informations fournies par les parents des enfants malades concernant le déclenchement des crises<sup>143</sup>, l'isoprotérénol et le TNF- $\alpha$  ont été sélectionnés. Le premier étant un agoniste  $\beta$ -adrénergique mimant la réponse du système nerveux sympathique face à un stress physique ou émotionnel et le deuxième, une cytokine reliée à la réponse du système immunitaire face à une infection.

Dans l'ensemble, les résultats de notre étude démontrent que certains de ces facteurs sont susceptibles d'induire la mort cellulaire dans les fibroblastes de patients LSFC, et ce de façon plus importante que dans les cellules témoins. Les facteurs ont d'abord été testés seuls puis en différentes combinaisons selon les résultats obtenus.

D'abord, dans la présente étude, une hyperglycémie induite n'a pas affecté la mort des cellules de témoins et patients, même lorsqu'elle a été combinée à une concentration élevée de lactate et une faible concentration de bicarbonate associée à un pH acide (Figure 13, p. 58). Ce résultat peut apparaître surprenant puisqu'un taux de glucose sanguin plus élevé que 10 mM au début de la crise est associée, dans les cas de LSFC, à un mauvais pronostic<sup>\*</sup>. De plus, dans la littérature, une glycémie élevée est souvent associée à une augmentation de la mort cellulaire par divers mécanismes, dont la diminution de l'activité de PGC-1 $\alpha$ <sup>66</sup> et la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire<sup>63</sup>. De plus, une forte concentration de glucose favoriserait la glycolyse, amenant ainsi plus de substrats à la chaîne respiratoire qui serait accélérée et produirait plus de ROS<sup>67, 68</sup>. Ces résultats ont été observés dans des cellules cardiaques, endothéliales et musculaires<sup>67, 110, 111</sup>,

---

\* François Guillaume DeBray, communication personnelle, article en préparation pour soumission.

toutefois, au meilleur de notre connaissance, ceci n'a pas été rapporté dans des fibroblastes de la peau.

Parmi les facteurs à considérer pour expliquer l'absence d'un effet inducteur de la mort dans nos lignées cellulaires, mentionnons le fait que ces cellules ont une activité métabolique plus faible, surtout au niveau mitochondrial, comparativement aux cellules musculaires, hépatiques et nerveuses. Par conséquent, il est possible qu'elles soient moins sensibles à l'effet toxique d'une augmentation de la glycémie sanguine. En outre, il convient de souligner qu'une telle augmentation n'est pas présente chez tous les patients LSFC lors des crises. Ainsi, il est possible qu'elle ne soit pas un élément prépondérant dans le déclenchement de la mort cellulaire, mais s'avère plutôt une conséquence de l'état de crise.

Quant à l'effet du lactate et du pH, nos résultats montrent que de hautes concentrations de lactate n'affectent pas la mort des cellules de témoins et de patients (Figure 13, p. 58). Chez un individu sain, le métabolisme du lactate est régulé via le cycle de Cori et une transformation réversible en pyruvate via la LDH<sup>35</sup>. La concentration plasmatique du lactate demeure donc stable, entre 0,8 et 2,0 mM. Parmi les conditions pouvant amener une augmentation de cette concentration, on retrouve l'exercice et certaines pathologies, dont les maladies mitochondriales avec un déficit en COX. Dans le cas d'un effort physique intense, le lactate sanguin peut monter jusqu'à 20 mM sans induire de la mort cellulaire<sup>36</sup>. En comparaison, il ne semble pas particulièrement surprenant de ne pas voir d'augmentation de la mort cellulaire avec une concentration de 10 mM de lactate, même en combinaison avec l'hyperglycémie (Figure 13, p. 58). Toutefois, l'hyperlactatémie est souvent associée à une hausse du ratio L/P, lequel est corrélé avec le ratio NADH/NAD<sup>+</sup>, un reflet du taux d'oxydoréduction de la cellule<sup>5</sup>. Un ratio L/P élevé ( $\geq 20$ ) a été associé à la mort cellulaire<sup>36, 112</sup>. Chez les patients atteints du LS classique, ce ratio peut atteindre 33. Chez les patients LSFC, à leur état basal, le ratio L/P n'est pas augmenté malgré une légère hausse de la concentration sanguine de lactate (4,3 mM)<sup>8, 10</sup>. Puisque les crises sont associées à une importante acidose et un taux élevé de lactate dans le sang

(15,0 mM) et le LCS (11,5 mM), il est probable que ce ratio soit augmenté dans ces cas<sup>8</sup>. Toutefois, étant donné que nos résultats montrent qu'une concentration élevée de lactate et un pH acide n'accroissent pas la mort cellulaire, il nous apparaît important de considérer que l'hyperlactatémie et l'acidose rapportée chez les enfants LSFC soient des conséquences de la crise plutôt que la cause de la mort cellulaire associée à la crise.

Au contraire des résultats obtenus avec le glucose et le lactate, ceux obtenus avec une concentration élevée de palmitate montrent une importante augmentation du taux de nécrose et d'apoptose chez les cellules de témoins et de patients LSFC. De plus, fait intéressant, ces dernières montraient une susceptibilité accrue à ce facteur (Figure 15, p. 60). Cet effet du palmitate apparaît pertinent et en accord avec le LSFC compte tenu du fait que tous les enfants atteints de cette maladie présentent une stéatose hépatique résultant d'une accumulation lipidique<sup>8, 112</sup>. Cette infiltration en triglycérides est généralement subtile mais dans certains cas, des changements macrovasculaires modérés peuvent être observés<sup>8</sup>. La stéatose microvésiculaire s'apparenterait grandement à celle observée dans le syndrome de Reye<sup>10</sup>.

Une alimentation riche en gras saturés est généralement liée, dans la littérature, à diverses perturbations, dont un dysfonctionnement cellulaire. Le palmitate, en particulier, est souvent associé à l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, bien que le mécanisme exact par lequel il induit cette apoptose soit encore l'objet de débats. Certains auteurs proposent une augmentation de la production de ROS<sup>113, 114</sup>, alors que d'autres invoquent une diminution de la synthèse de cardiolipines, des lipides de la membrane mitochondriale qui sont déterminants, entre autres, pour l'activité de la COX<sup>24, 72</sup>. Enfin, l'effet toxique de l'accumulation d'acyls-CoA dans la cellule est défendu dans d'autres articles<sup>115-119</sup>. Il est proposé que les acyls-CoA contribuent, entre autres, à la résistance à l'insuline, en favorisant l'accumulation de diacylglycérol et de triglycérides. Les acyls-CoA favoriseraient aussi la formation de corps cétoniques, de prostaglandines<sup>85, 118</sup> et de céramides, des lipides membranaires impliqués dans divers processus de signalisation cellulaire

(différentiation, prolifération, apoptose, etc.), bien que leur rôle dans l'induction de l'apoptose ne semble pas faire l'unanimité dans la littérature<sup>69, 113</sup>.

Dans notre modèle d'étude, le mécanisme par lequel le palmitate induit une mort plus importante chez les fibroblastes LSFC reste à être clarifié. Toutefois, il est possible de proposer certaines hypothèses sur la base des données de la littérature et de nos résultats.

Il apparaît probable que l'effet toxique du palmitate dans notre modèle expérimental implique, entre autres, l'accumulation d'acyls-CoA dans le cytosol. En effet, l'activité de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale étant déjà possiblement restreinte par la déficience en COX, il semble plausible qu'une augmentation de l'apport en acides gras par le biais du palmitate entraîne une accumulation de métabolites en amont, dont les acyls-CoA à chaîne longue, lesquels peuvent être à l'origine de la lipotoxicité<sup>115, 116</sup>.

L'hypothèse d'un rôle prépondérant d'une accumulation d'acyls-CoA dans la mort cellulaire serait en accord avec l'effet de potentialisation observée suite à l'ajout d'une concentration élevée de lactate (10 mM) au palmitate (1 mM) (Figures 15 et 18, p. 60 et 63). En effet, le lactate est normalement oxydé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase dans la mitochondrie. L'acétyl-CoA est un précurseur métabolique du malonyl-CoA, une réaction catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase. Le malonyl-CoA est un inhibiteur de la CPT-I, l'enzyme qui permet le transport des acides gras à chaîne longue du cytosol vers la mitochondrie<sup>68</sup>. Ainsi, il est possible que l'accumulation d'acyls-CoA dans le cytosol en présence de palmitate soit accentuée par l'ajout de lactate.

Afin de confirmer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets toxiques du palmitate, plusieurs expériences additionnelles peuvent être envisagées. L'utilisation du 2-bromopalmitate, un dérivé non métabolisable du palmitate, permettrait de confirmer si le palmitate doit être métabolisé ou pas pour jouer son rôle

dans l'apoptose<sup>120</sup>. Il serait également intéressant de tester d'autres acides gras saturés et insaturés. En effet, le palmitate étant un acide gras saturé, il serait intéressant de voir si cette caractéristique affecte son rôle dans la mort cellulaire. L'oléate par exemple, un acide gras insaturé a été démontré comme étant capable de prévenir l'apoptose induite par le palmitate<sup>71</sup>. Une étude dans ce sens permettrait aussi de mieux comprendre les mécanismes associés à la mort cellulaire observée avec le palmitate. Ensuite, le devenir métabolique du palmitate dans les cellules pourrait être évalué en utilisant du palmitate marqué au carbone 13 ou 14<sup>121-123</sup>. De plus, il serait possible de mesurer les niveaux d'acyls-CoA, de céramides, de diacylglycérols et de triglycérides dans un extrait cellulaire<sup>124, 125</sup> et/ou d'acylcarnitines, un reflet de l'accumulation des acyls-CoA dans le milieu extracellulaire<sup>85</sup>.

En outre, plusieurs autres mécanismes pourraient sous-tendre les effets du palmitate et peuvent être envisagés. Entre autres, l'effet du palmitate sur la production du NO pourrait être exploré bien que les données de la littérature semblent contradictoires quant à savoir si le palmitate augmente ou diminue la production de NO. Il semble possible que la régulation du NO par le palmitate varie selon sa concentration ou le type de cellules étudié. D'une part, certains auteurs ont démontré que le palmitate induit l'expression des protéines C-réactives qui réduiraient l'activité de l'oxyde nitrique synthase endogène<sup>120</sup>, alors que d'autres articles ont plutôt démontré que le palmitate induit une augmentation de la synthèse de NO, laquelle a été associée à la mort cellulaire<sup>126, 127</sup>. De plus, les effets du NO au niveau cellulaire sont complexes et multiples. Le NO est reconnu, entre autres, pour sa capacité à inhiber l'activité de la COX en se liant sur son site catalytique<sup>128</sup>. Il empêche ainsi le transfert des électrons, ce qui favoriserait la production de  $O_2^-$ <sup>129</sup>, lequel peut réagir avec le NO pour former le peroxinitrite qui est toxique pour les cellules. Il a aussi été proposé que le NO soit un médiateur de la mort cellulaire programmée par fragmentation de l'ADN<sup>124</sup>. Le NO serait donc une molécule impliquée dans la réponse inflammatoire, au même titre que le TNF- $\alpha$ , et dans l'apoptose. Par ailleurs, le NO joue aussi un rôle physiologique important, en activant la guanylate cyclase

soluble, au niveau de la régulation du tonus vasculaire<sup>130</sup> et de la signalisation neuronale, où il est produit suite à l'activation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate.

Le TNF- $\alpha$  est une molécule inflammatoire impliquée dans la majorité des infections et dans plusieurs maladies. Il est un inducteur important de la cascade de l'apoptose et il agit sur la différenciation cellulaire. Bien que le statut inflammatoire des patients LSFC n'a pas encore été évalué à ce jour, le fait que certains parents d'enfants malades aient rapporté que les crises surviennent parfois suite à une infection avec fièvre nous a permis de sélectionner le TNF- $\alpha$  comme cytokine inflammatoire<sup>64, 143</sup>. Fait intéressant, l'ajout de la cytokine TNF- $\alpha$  a eu des effets similaires au lactate, *i.e.* elle n'a eu aucun effet lorsqu'utilisée seule ou en combinaison avec le lactate, mais, avec une concentration élevée de palmitate, le TNF- $\alpha$  a un effet de potentialisation de la mort cellulaire induite par le palmitate (Figure 16, p. 61). Ce résultat suggère qu'une infection n'induirait pas la mort cellulaire en elle-même. Toutefois, le TNF- $\alpha$  ayant un rôle d'inhibiteur de la chaîne de transport des électrons par phosphorylation de la COX et d'activateur de la lipolyse, il pourrait possiblement accentuer la mort cellulaire induite par le palmitate<sup>61, 70</sup>. Il est également connu que la palmitate induit l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  dans les adipocytes, les cellules hépatiques et musculaires<sup>131, 132</sup>. Toutefois, ce mécanisme n'a pas été étudié dans les fibroblastes et la concentration de TNF- $\alpha$  utilisée au cours de cette étude étant déjà très élevée, il est peu probable que les fibroblastes puissent l'augmenter davantage. Toutefois, le palmitate et le TNF- $\alpha$  sont tous deux impliqués dans des cascades de signalisation impliquant diverses molécules reliées à la résistance à l'insuline et à la survie cellulaire comme Akt<sup>131, 133</sup>. Il est alors davantage probable que la potentialisation observée avec la combinaison de ces deux facteurs provienne de la régulation de ces voies de signalisation. Un autre point important à considérer est que la réponse des cellules du témoin (T2) est similaire à celles des patients (P1 et P2). Ainsi, une infection ne serait pas responsable du déclenchement des crises. Mais d'autres expériences pourraient être réalisées, sur d'autres lignées cellulaires et à d'autres temps d'incubation pour confirmer cette hypothèse. En effet, combattre une infection exige une augmentation

importante de la production d'énergie par les cellules. Les enfants atteints de LSFC pourraient avoir de la difficulté, à long terme, à fournir autant d'énergie.

L'isoprotérénol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, n'a pas induit d'augmentation de nécrose cellulaire, même en combinaison avec le palmitate (Figure 17, p. 62). Ainsi, il semble que le stress relié au système nerveux sympathique ne soit pas un élément déclencheur de la mort chez nos cellules de patients et de témoins. La déficience en COX ne semble donc pas rendre les cellules de patients plus susceptibles aux effets de l'isoprotérénol, soit l'activation de l'oxydation des acides gras par production d'AMP cyclique<sup>76, 134</sup>. Le stress émotionnel ou physique ne serait donc pas un élément primordial du déclenchement des crises d'acidose.

Il convient de souligner que l'ajout de peroxyde d'hydrogène, utilisé pour mesurer l'effet du stress oxydant sur la mort cellulaire, a induit un taux de mortalité très élevé autant chez les cellules de témoins que de patients LSFC (données non présentées), suggérant un effet toxique du stress oxydant. Toutefois, cette condition n'a pas été retenue pour la suite de nos expériences étant donné qu'elle s'apparente peu à celle retrouvée *in vivo* chez l'humain. De plus, les résultats subséquents obtenus avec les antioxydants (décrits et discutés à la section suivante) remettent en question le rôle du stress oxydant dans notre modèle.

En résumé, les résultats obtenus avec les divers facteurs suggèrent un rôle prépondérant des acides gras libres (palmitate) dans la mort cellulaire, possiblement via l'accumulation toxique des dérivés acyls-CoA. Le lactate pourrait accentuer cet effet en inhibant la CPT-I via la formation de malonyl-CoA. Les cellules de patients LSFC sont plus susceptibles à ces facteurs, suggérant qu'ils jouent possiblement un rôle dans le déclenchement des crises d'acidose. La combinaison de ces deux facteurs a donc été sélectionnée pour tester l'effet bénéfique des 10 agents thérapeutiques sur la diminution de la mort cellulaire. Il est important de prendre en considération que le milieu de culture utilisé au cours de cette étude comprenait également 30 mM de glucose. Cette concentration élevée de glucose pourrait jouer un rôle dans la mort

cellulaire observée. Une autre conclusion intéressante de ces résultats est que, pour obtenir une augmentation de la mort cellulaire, il faut souvent une combinaison de modifications au niveau des métabolites sanguins.

## 4.2- Agents thérapeutiques

Les agents thérapeutiques ont été sélectionnés sur la base des considérations suivantes. Premièrement, ces agents devaient agir au niveau des différentes conséquences potentielles de la déficience en COX, soit (i) la diminution de la production d'ATP (via le propionate) ou de l'activité métabolique mitochondriale (via le fénofibrate), (ii) l'accumulation du NADH (via le MB ou le DNP) ou autres métabolites cellulaires possiblement toxiques tels les acyls-CoA à longue chaîne (via la carnitine), (iii) l'augmentation du stress oxydant (via le resvératrol, le NAC ou l'idebenone), et (iv) l'ouverture du PTP (via la cyclosporine A ou le sildénafil). De plus, ces agents devaient au préalable avoir été utilisés dans un contexte clinique afin de faciliter la transposition éventuelle des résultats obtenus *in vitro* chez les patients. Finalement, les agents capables de traverser facilement la barrière hémato-encéphalique ont été privilégiés étant donné l'importance de l'atteinte cérébrale documentée chez les patients LSFC lors des crises <sup>8</sup>.

Tous les agents sélectionnés ont été testés pour leur capacité à diminuer ou prévenir la mort cellulaire par nécrose et apoptose induite par des concentrations élevées de palmitate et lactate dans les fibroblastes de témoins et patients LSFC. Ils ont d'abord été testés seuls puis, compte tenu des résultats obtenus, certains agents ont été étudiés en combinaison. Dans l'ensemble, les résultats obtenus mettent l'emphase sur l'importance de combiner plus d'un agent thérapeutique afin de contrer les effets toxiques du palmitate et du lactate. De fait, aucun des agents testés n'a été capable de diminuer de façon significative la mort cellulaire induite par ces facteurs lorsqu'administrés seuls, à l'exception de la carnitine.

En effet, dans notre étude, la carnitine ajoutée seule a eu un effet bénéfique très important sur la diminution de la mort cellulaire, autant au niveau de la nécrose que de l'apoptose (Figures 22A, 22B, 24A et 24B, p. 68, 69 et 72). Ceci supporte l'hypothèse du rôle des dérivés acyls-CoA toxiques dans l'induction de la mort. La carnitine serait responsable de la transformation des acyls-CoA toxiques en acylcarnitines, permettant ainsi la sortie des dérivés lipidiques de la cellule vers le plasma<sup>85</sup>. Le taux d'acylcarnitine du plasma est d'ailleurs considéré comme un reflet de l'activité de la  $\beta$ -oxydation et du catabolisme des acides gras. La mesure de ce taux est une technique utilisée pour le diagnostic des maladies métaboliques congénitales. Elle pourrait être employée ici pour confirmer le rôle de la carnitine dans l'élimination des acides gras<sup>85</sup>.

Parmi les expériences où chaque agent a été ajouté seul, nous avons obtenu un résultat plutôt inattendu avec les 3 antioxydants. De fait, que ce soit avec le resvératrol (Figure 20, p. 66), le NAC (données non présentées) ou l'idebenone, un analogue du coenzyme Q (Figures 21A et 21B, p. 66 et 67), la mort cellulaire n'a pas diminuée, mais plutôt augmentée. Ce résultat ne remet pas nécessairement en question la possible formation de ROS dans les fibroblastes incubés en présence de palmitate et de lactate. Toutefois, ces résultats suggèrent que cette production de ROS puisse être bénéfique de par sa capacité à contrebalancer un stress réducteur lié à une possible accumulation d'équivalent réduit (ou NADH) en amont de la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>135</sup>.

Les résultats obtenus, d'une part avec la carnitine et d'autre part avec les 3 antioxydants, lesquels proposent un rôle prépondérant d'une accumulation de dérivés lipidiques toxiques (acyls-CoA) et de NADH, respectivement, ont servi de base à la sélection des différentes combinaisons d'agents thérapeutiques.

L'effet du propionate en tant que tel n'a pas vraiment été mesuré puisque le but était de mimer l'effet du PLC. Le propionate, un précurseur de succinyl-CoA, favorise le fonctionnement du CAC et produit de l'ATP indépendamment de la chaîne

respiratoire mitochondriale<sup>84, 86, 87</sup>. Le PLC est un nutriment synthétique utilisé en clinique pour le traitement des troubles cardiovasculaires (phase III de développement, Sigma Tau)<sup>144</sup>. La combinaison de la carnitine et du propionate a permis une légère diminution du taux de nécrose et d'apoptose même si elle n'est pas significative comparativement à la diminution induite par la carnitine utilisée seule (Figures 24A et 24B, p. 72). Une étude plus approfondie de l'effet du PLC en tant que tel est nécessaire afin de juger de l'efficacité de ce produit.

Le MB fut testé en raison de sa capacité d'oxydoréduction et de ses nombreux rôles bénéfiques reconnus au niveau de l'activité et de la biogenèse des mitochondries (section 5.1.1). Le MB utilisé seul diminue légèrement l'apoptose et la nécrose cellulaire (Figures 19A et 19B, p. 64), mais son effet est plus important lorsqu'il est combiné à d'autres agents (Figures 22A, 22B, 24A et 24B, p. 68, 69 et 72). L'effet bénéfique du MB supporte l'hypothèse voulant que la mort cellulaire observée avec la combinaison de palmitate et de lactate implique un stress réducteur associé à une accumulation de NADH suite au blocage de la chaîne respiratoire. En effet, par sa capacité d'agir comme accepteur d'électrons, cet agent permettrait d'oxyder le NADH en  $\text{NAD}^+$  et possiblement aussi de remplacer partiellement la fonction de la COX<sup>77, 78, 81</sup>, ce qui serait particulièrement bénéfique pour les cellules de patients LSFC.

Comme mentionné précédemment, le ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  est corrélé au ratio L/P et reflète le statut énergétique de la cellule. Une augmentation de ce ratio est associée à des problèmes au niveau du métabolisme énergétique<sup>123</sup>. Afin de tester l'hypothèse d'un effet bénéfique d'une diminution du ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  dans notre modèle, le  $\beta$ -lapachone, un substrat de la NADH:quinone oxydoréductase 1 qui permet l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$ , pourrait être utilisé. Il a été démontré *in vitro*, dans une étude de Hwang et al. (2009), que cet agent oxyde rapidement le NADH dans des cellules cancéreuses. De plus, dans cette étude, l'administration de  $\beta$ -lapachone a permis une diminution de l'obésité chez des souris résistantes à l'insuline. Dans cette condition, où les substrats sont en abondance, la chaîne de

transport des électrons devient limitante et résulte en une augmentation du ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . Le  $\beta$ -lapachone, en oxydant le NADH, favorise l'oxydation des acides gras, vu par du palmitate marqué au carbone 14. Il y a alors une augmentation de la dépense énergétique par l'activation de l'AMPK, ce qui favorise une diminution de la prise de poids. Le  $\beta$ -lapachone pourrait donc avoir un effet favorable chez les cellules de patients LSFC.

L'augmentation potentielle de  $\text{NAD}^+$  dans la cellule pourrait aussi être bénéfique pour le traitement du LSFC par l'activation des sirtuines. Les sirtuines permettent la déacétylation et donc l'activation de PPAR- $\alpha$ , qui active PGC-1 $\alpha$ , AMPK et le facteur de transcription mitochondrial A. Ces facteurs permettent à leur tour d'augmenter la biogenèse et la respiration mitochondriale<sup>123</sup>. À cet égard, le fénofibrate, comme le bezafibrate<sup>136</sup>, est un agoniste de PPAR- $\alpha$  qui permettrait, entre autres, de rétablir la respiration mitochondriale, d'augmenter la capacité d'oxydoréduction et donc la production d'ATP<sup>19, 91</sup>. Toutefois, cet agent n'a eu aucun effet au niveau de la prévention de la mort des cellules LSFC (données non présentées). L'article de Cheng et al. (2009) montre que l'acétylation de PPAR- $\alpha$  due à un ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  élevé inhibe son activité. Ainsi, il serait peut-être intéressant de tester le fénofibrate en combinaison avec le  $\beta$ -lapachone. Il est également possible qu'un traitement préventif soit plus efficace, soit l'ajout du fénofibrate avant l'ajout des concentrations élevées de palmitate et de lactate. Ceci permettrait d'augmenter la masse mitochondriale avant l'ajout du stress et l'inhibition de PPAR- $\alpha$ <sup>19, 135</sup>.

Une autre preuve de l'efficacité d'une combinaison d'agents thérapeutiques est le résultat observé avec la combinaison de carnitine, de propionate et de MB. En effet, on observe une diminution significative de l'apoptose et de la nécrose avec cette combinaison par rapport à la condition inductrice de la mort cellulaire (palmitate et lactate), mais aussi par rapport à l'effet de la carnitine utilisée seule (Figures 24A et 24B, p. 72). Ainsi, même si le MB seul n'induit pas une forte diminution du taux de mortalité, il joue tout de même un rôle important pour la survie cellulaire. En outre, il convient de souligner qu'un autre agent, soit le sildénafil, a aussi été

investigué en combinaison avec la carnitine, le propionate et le MB. Le sildénafil a été utilisé pour sa capacité à inhiber le PTP<sup>39, 92</sup>, un processus impliqué dans l'apoptose et la nécrose<sup>60</sup>. Lorsqu'ajouté seul, cet agent n'a eu aucun effet sur la mort des cellules de témoins et de patients (données non présentées). Lorsqu'utilisé en combinaison, il a toutefois aidé à prévenir la nécrose cellulaire (Figures 22A, p. 68 et 69).

Un autre inhibiteur du PTP, la cyclosporine A, a été testé seul, mais n'a pas eu d'effet sur la mort cellulaire (données non présentées). Le PTP est impliqué dans le processus de la mort cellulaire suite à divers stimulus, comme une augmentation de ROS, une accumulation de calcium, une dépolarisation membranaire ou une diminution d'ATP<sup>60, 61</sup>. Étant donné les résultats obtenus, il est possible que, dans les cellules de patients LSFC, la mort cellulaire observée ne provienne pas de l'ouverture du PTP. À cet égard, il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en mesurant certains facteurs liés à l'ouverture du PTP, comme la perte du potentiel de membrane et le gonflement des mitochondries<sup>137</sup>. Toutefois, il est également possible que les inhibiteurs ne soient pas suffisants pour empêcher l'ouverture du PTP, du moins lorsqu'administrés seuls, ce que l'on constate avec le sildénafil. D'autres inhibiteurs du PTP comme la minocycline pourraient être testés pour confirmer ce résultat<sup>138</sup>.

En résumé, l'effet bénéfique significatif obtenu suite à l'utilisation de la carnitine seule suggère un rôle prépondérant de l'accumulation d'acyls-CoA toxiques dans la cellule. L'efficacité du MB conjointement avec l'inefficacité des antioxydants confirment le rôle du stress réducteur lié à l'accumulation de NADH dans la mort cellulaire et amène de nouvelles pistes de traitement ( $\beta$ -lapachone). Encore une fois, on constate que la combinaison de plusieurs facteurs est beaucoup plus efficace, suggérant que l'addition de palmitate et de lactate résulte en de multiples atteintes au niveau du fonctionnement des cellules.

### 4.3- Rôle de la COX et de l'ATP

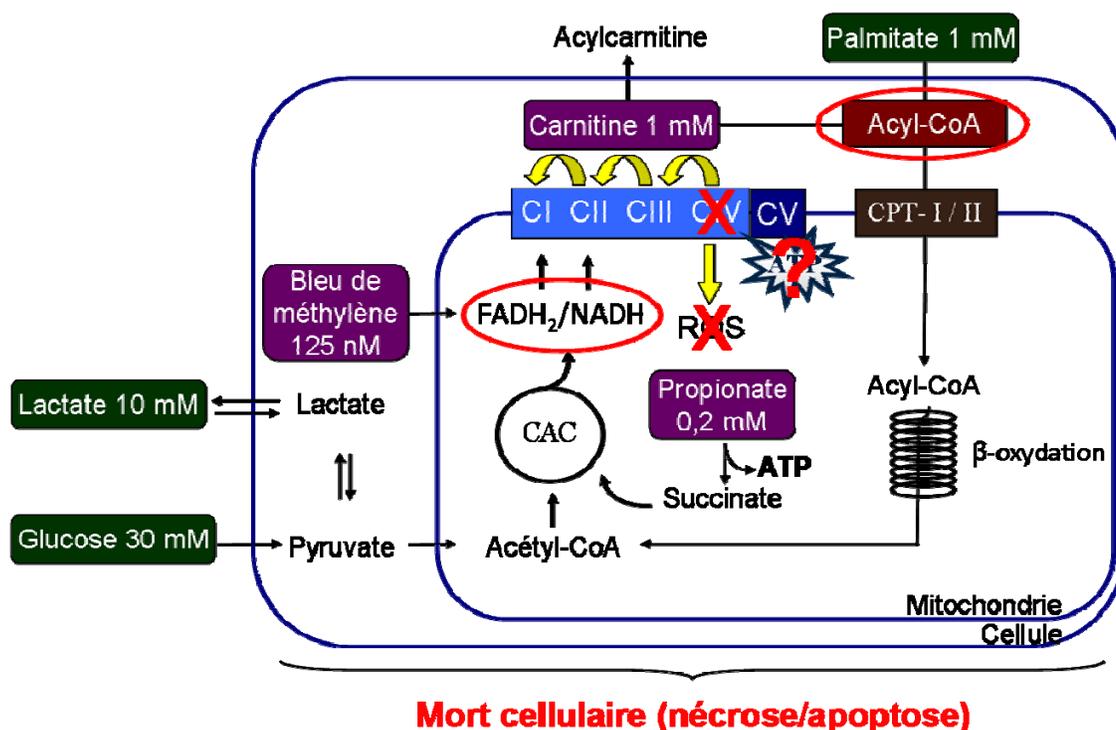
La découverte de facteurs sanguins capables d'induire la mort cellulaire et d'agents thérapeutiques pouvant la prévenir amène un questionnement sur le mécanisme qui est à l'origine de cette mortalité. Le lactate et le palmitate peuvent tout deux jouer un rôle dans la diminution de l'activité de la COX et de la production d'ATP par atteinte de la phosphorylation oxydative<sup>31, 63, 66</sup>. Ainsi, nous avons mesuré l'activité de la COX avec ces deux facteurs ainsi qu'avec la combinaison des 3 agents thérapeutiques. Chez les cellules de deux patients et deux témoins, aucune modification de l'activité de la COX n'a été observée en réponse aux agents inducteurs et thérapeutiques (Figure 26, p. 74). Ainsi, la mort cellulaire observée *in vitro* ne provient probablement pas d'une diminution accrue de l'activité de la COX.

Le taux d'ATP cellulaire est un bon indicateur de la viabilité cellulaire. Chez les cellules de patients, on observe une diminution non significative du taux d'ATP total avec la combinaison de palmitate et de lactate, qui retourne à la normale avec l'ajout de la combinaison des 3 agents thérapeutiques. À l'inverse, le taux d'ATP des cellules de témoins et de l'hétérozygote composé ne change pas avec l'ajout de palmitate et de lactate. Chez ces cellules, l'ajout des agents thérapeutiques provoque une augmentation de la quantité d'ATP cellulaire (Figure 27, p. 76). Ainsi, il apparaît possible que les cellules de patients LSFC soient plus susceptibles à une diminution d'ATP que celles de témoins étant donné la différence significative observée entre les deux avec l'ajout combiné des trois agents thérapeutiques et la combinaison de carnitine et propionate.

Le taux d'ATP, mesuré à 24 h d'incubation, n'est pas affecté par la nécrose cellulaire qui survient plutôt à 48 h d'incubation (déterminé expérimentalement). Toutefois, à 24 h d'incubation, on détecte de l'apoptose cellulaire dans notre modèle. Ainsi, la diminution du taux d'ATP mesurée avec les facteurs inducteurs de la mort chez les cellules de patients LSFC pourrait être une conséquence de la diminution du nombre de cellules vivantes. De plus, l'apoptose nécessite de l'énergie pour la

formation de l'apoptosome, pouvant aussi expliquer la diminution d'ATP mesurée à 24 h d'incubation. Il est donc difficile de déterminer si la diminution du taux d'ATP observée, résultant possiblement d'un blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale, induirait l'apoptose par déplétion de l'énergie cellulaire ou bien si c'est l'apoptose qui, en utilisant l'ATP pour la formation de l'apoptosome, provoquerait la diminution du taux d'ATP observée dans notre étude. Pour clarifier ce point, des mesures d'ATP pourraient être faites à des temps précédant le début de l'apoptose, soit entre 12 et 14 h.

La figure 28 (p. 92) résume les voies d'action des différents facteurs inducteurs de la mort cellulaire ainsi que des divers agents thérapeutiques ayant eu un effet bénéfique, utilisés au cours de cette étude, en lien avec les conséquences découlant de la diminution de l'activité de la COX chez les patients atteints du LSFC. Le schéma présente aussi les hypothèses suggérées quant aux mécanismes sous-jacents à la mortalité observée.



**Figure 28 : Schéma du métabolisme énergétique cellulaire affecté par la déficience en COX.** Représentation des trois facteurs sanguins (bulles vertes) ayant induit une augmentation de la mort cellulaire et des trois agents thérapeutiques (bulles mauves) l'ayant, en partie, prévenue dans notre modèle d'étude. Les mécanismes sous-jacents à cette mortalité ne semblent pas reliés à une déficience accrue en COX ou une augmentation de production de ROS (X). Le rôle de l'ATP doit être clarifié (?) et finalement, nos deux hypothèses principales reposent sur l'accumulation toxique de NADH et d'acyls-CoA (cercles rouges). CAC : cycle de l'acide citrique, CPT : carnitine palmitoyltransférase, CI, CII, CIII, CIV et CV : les 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le glucose à 30 mM représente la concentration de glucose présente dans le milieu de culture qui pourrait jouer un rôle dans la mort cellulaire observée.

#### 4.4- L'hétérozygote composé

La différence majeure entre le patient HC et les patients homozygotes est la capacité de résister aux crises d'acidose, même s'ils présentent tous une activité de la COX diminuée de 50 % dans leurs fibroblastes de peau (Figure 25, p. 74). Afin d'identifier d'autres différences potentielles, les cellules provenant du patient HC ont été utilisées pour la plupart des tests réalisés au cours de cette étude. De façon générale, la mort cellulaire observée pour cette lignée se situait entre celle des cellules de patients et des cellules de témoins. Parfois, le pourcentage de nécrose était plus près de celui observé pour les cellules de patients, et d'autres fois, il était plutôt similaire à celui des cellules de témoins. Il est donc difficile de déterminer ce qui distingue ce patient au niveau métabolique. La réponse au niveau de la production d'ATP avec une concentration élevée de palmitate et de lactate et avec la combinaison d'agents thérapeutiques est toutefois plus claire. Les cellules du patient HC se comportent comme celles des témoins (Figure 27, p. 76). Il est possible que les cellules de l'HC soient moins susceptibles à une diminution d'ATP, malgré une diminution similaire de l'activité de la COX, suggérant qu'une partie de la fonction de LRPPRC puisse être accomplie par l'allèle ayant la mutation C1277STOP ou que les cellules possèdent un mécanisme compensatoire leur permettant de maintenir le taux d'ATP. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la survie des patients lors des crises. Malheureusement, comme très peu de données cliniques sont disponibles, il est difficile de tirer des conclusions, d'autres expériences devront être menées sur ce patient HC.

#### 4.5- Limites de l'étude

Il convient de souligner les limites potentielles de notre étude, lesquelles doivent être considérées dans l'interprétation des données ainsi que leur extrapolation pour une éventuelle transposition en clinique. Ces limites visent autant le modèle cellulaire utilisé que le paradigme expérimental.

Le modèle cellulaire utilisé a ses limites. Les cellules de la peau n'ont pas un grand besoin énergétique. De plus, la déficience en COX est de 50 %. À l'inverse, les cellules hépatiques ou neuronales ont des besoins énergétiques beaucoup plus importants et la diminution de la COX atteint 90 %. Ainsi, l'effet de nos différents facteurs sanguins sur le métabolisme énergétique de ces cellules serait probablement plus important. Évidemment, plusieurs autres facteurs sanguins auraient pu être testés ainsi que plusieurs autres combinaisons.

Au début de notre étude, seules les lignées de fibroblastes étaient disponibles pour réaliser nos expériences. Toutefois, d'autres modèles cellulaires, seront disponibles à la biobanque de Chicoutimi sous peu (de nouvelles lignées de témoins, des cellules de patients atteints du syndrome MELAS, une autre maladie mitochondriale affectant les enfants, et des cellules provenant de 3 interruptions thérapeutiques de grossesse). Ces lignées, ainsi que le développement du modèle murin du LSFC nous permettra de vérifier si les résultats obtenus dans les fibroblastes de peau peuvent aussi s'appliquer à ces modèles.

Une autre limite de notre modèle d'étude provient de l'hétérogénéité des témoins et des patients pour l'âge, le sexe et l'origine ethnique (Tableau II, p. 43), ce qui a pour résultat un mauvais pairage entre les cellules de témoins et de patients. Il existe des différences dans le métabolisme cellulaire entre les enfants et les adultes. Par exemple, il est connu que les patients LSFC qui réussissent à atteindre l'âge adulte ont une stabilisation de la sévérité des symptômes <sup>8</sup>. Enfin, la plupart des cellules de patients qui sont disponibles à la biobanque, proviennent de patients LSFC

qui sont encore vivants et par conséquent, qui n'ont jamais fait de crises d'acidose. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les cellules de ces patients possèdent des mécanismes compensatoires qui les rendent plus résistantes à l'induction de la mort cellulaire que celles des patients LSFC qui sont décédés.

En outre, la variabilité inter individuelle est très présente dans cette étude, probablement due à l'hétérogénéité des lignées cellulaires. Celle-ci peut provenir de différences dans les facteurs génétiques et environnementaux. Cette variation est cependant constante d'une expérience à l'autre, par exemple, le pourcentage de nécrose induit par les facteurs inducteurs de la mort cellulaire est toujours plus élevé chez le patient P2 par rapport au patient P1. Pour cette raison, nous avons toujours utilisé le nombre le plus élevé de témoins et de patients disponibles afin que la moyenne nous donne la valeur la plus juste possible. Augmenter davantage le nombre de lignées cellulaires permettrait de réduire cette variabilité. Un autre moyen de stabiliser la variation serait via l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées. Toutes les lignées de patients LSFC, l'hétérozygote composé et une lignée de témoins ont déjà été immortalisées (collaboration avec le Dr. Shoubridge, McGill). Toutefois, les lignées immortalisées peuvent être différentes des lignées primaires au niveau du métabolisme. Ainsi, avant d'utiliser ces lignées, il faudra s'assurer d'avoir une réponse identique avec les facteurs sanguins et les agents thérapeutiques dans les cultures primaires.

La variabilité intra individuelle affecte aussi les résultats. Il s'agit d'une variabilité de la réponse pour un même individu d'une expérience à l'autre. Ainsi, même si le patient P2 a un pourcentage de nécrose toujours plus élevée que le patient P1, ce pourcentage change entre deux expériences. On l'observe particulièrement avec les mesures de nécrose et d'apoptose induite par les facteurs inducteurs de la mort cellulaire, mais la diminution du taux de mortalité associée aux agents thérapeutiques est toujours similaire. Cette variation peut dépendre, entre autres, du temps d'incubation, du nombre de passage cellulaire, de la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve juste avant la préparation des plaques et de la

croissance cellulaire entre le moment où les cellules sont mises en plaque et le temps où les différentes mesures sont effectuées. Tous ces éléments ont été contrôlés dans la mesure du possible, mais de légères variations peuvent survenir.

Pour cette étude, l'apoptose a été mesurée par l'activation des caspases 3 et 7 et la nécrose par la relâche de LDH. Ces deux méthodes ont été choisies pour leur rapidité et leur facilité d'exécution, nous permettant de faire un criblage important d'agents inducteurs et thérapeutiques. Par contre, l'utilisation de deux techniques uniquement amène une certaine limite. En effet, il est d'usage d'utiliser plusieurs paramètres de mesure de la mort cellulaire, afin de bien cerner le niveau ainsi que le type de mort cellulaire. Même si la littérature présente généralement l'apoptose et la nécrose comme deux voies bien distinctes, on constate de plus en plus de similitudes entre elles<sup>50</sup>. D'autres tests auraient pu être réalisés afin de confirmer le type de mort cellulaire chez les patients LSFC et les témoins, mais le but ultime de l'étude était plutôt de déterminer quels facteurs sanguins mènent à la mort cellulaire et par quel mécanisme métabolique.

Les caspases 3 et 7, sont des caspases effectrices activées par les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose<sup>53</sup>. Ce test nous permet donc de déterminer rapidement l'apoptose cellulaire, peu importe la voie d'activation. Afin de bien caractériser l'apoptose, la mesure de l'activation des caspases aurait pu être complétée par la mesure de la fragmentation de l'ADN qui est l'étape finale de ce type de mort cellulaire. L'avantage principal de la mesure de la relâche de LDH est qu'il s'agit d'une enzyme présente dans presque toutes les cellules du corps humain. Le test ne nécessite donc pas d'étape préliminaire pour faire entrer, par perméabilisation de la membrane plasmique, un composé radioactif (chromium)<sup>139</sup> ou fluorescent<sup>140</sup>, qui est par la suite mesuré dans le surnageant suite à la lyse membranaire. De plus, ce test ne nécessite pas d'appareil coûteux tel un cytomètre en flux. Le test permet également de normaliser directement la relâche de LDH en fonction de la LDH présente dans les cellules encore vivantes suite au traitement. Ainsi, malgré certaines limites, les deux tests utilisés ont permis de mesurer

rapidement et avec efficacité la mort des cellules de patients LSFC en réponse à divers agents inducteurs et thérapeutiques.

Tous les facteurs sanguins et agents thérapeutiques ont été testés selon des concentrations prédéterminées. De plus, les agents thérapeutiques doivent être facilement et rapidement transposables chez ces enfants et donc, il faut s'assurer que les concentrations testées ne soient pas toxiques. Nous avons donc opté pour des concentrations déjà utilisées en clinique pour le traitement d'autres maladies. La seule exception est au niveau de la carnitine à 1 mM. Cette concentration, qui est supérieure à celle généralement utilisée en clinique, mais qui n'est pas toxique<sup>86</sup>, a été sélectionnée pour deux raisons. D'abord, il est connu que, dans les cas de déficience au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, la carnitine est rapidement transformée sous sa forme estérifiée, réduisant ainsi la quantité de carnitine libre<sup>7, 84, 85</sup>. Ensuite, la carnitine est un composé difficilement absorbée dans les tissus, ce qui exige d'augmenter la dose pour obtenir l'effet désiré<sup>84</sup>. L'utilisation du PLC, un composé plus facilement absorbable permettrait de diminuer la dose de carnitine à administrer. Il est probable que le PLC, à des concentrations inférieures à 1 mM, puisse jouer un rôle similaire à la combinaison de carnitine 1 mM et de propionate 0,2 mM, et serait donc un composé plus intéressant pour l'application clinique<sup>22, 84</sup>. Ainsi, même si la dose de carnitine utilisée dans cette étude semble élevée par rapport à ce qui est couramment utilisé en clinique, elle nous permet tout de même de cibler le mécanisme associé à la mort cellulaire et de bonnes pistes quant au moyen de traiter efficacement les patients.

## Conclusion et perspectives futures

Dans l'ensemble, les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis d'approfondir notre compréhension des événements métaboliques associés à la diminution de l'activité de la COX chez les patients atteints du LSFC. Plus spécifiquement, ces résultats permettent de proposer des pistes quant aux facteurs sanguins qui pourraient induire la mort cellulaire chez ces patients et aux agents thérapeutiques qui pourraient l'atténuer.

D'une part, concernant les facteurs sanguins pouvant induire la mort cellulaire de façon plus notable dans les cellules de patients LSFC, les résultats obtenus mettent l'accent sur le palmitate. De fait, contrairement au glucose, au lactate, au bicarbonate, au pH acide et à l'isoprotérénol, cet acide gras saturé induit une augmentation de la mort cellulaire plus importante chez les cellules de patients LSFC comparativement à celles de témoins, lorsqu'ajouté à des concentrations élevées mais pouvant tout de même se retrouver dans le plasma suite à l'ingestion d'un repas riche en gras. En outre, il est pertinent de souligner que l'effet du palmitate est amplifié par l'ajout du lactate et du TNF- $\alpha$ , deux autres facteurs circulants augmentés dans des situations d'acidose métabolique et d'infection, respectivement. D'autre part, parmi les agents thérapeutiques pouvant pallier aux différentes conséquences résultant de la diminution de l'activité de la COX, ceux qui ont diminué la mort cellulaire autant dans les fibroblastes de patients que chez les témoins incluent la carnitine seule, ou combinée au propionate et au MB. En outre, il convient de souligner que trois antioxydants ont été testés au cours de cette étude, dans le but de contrebalancer l'effet potentiel du stress oxydant, et ont tous eu un effet néfaste, soit en augmentant la mort cellulaire.

De plus, les résultats obtenus permettent de proposer certains mécanismes qui sous-tendent les effets néfastes du palmitate et du lactate, et qui sont plus marqués dans les cellules LSFC que les cellules de sujets sains. De fait, il apparaît possible que la diminution de l'activité de la COX provoque un blocage ou un ralentissement

de la chaîne respiratoire mitochondriale, résultant en une accumulation de substrats en amont, spécifiquement le NADH. Ceci favoriserait le ralentissement de toute réaction enzymatique qui produit cet équivalent réduit, soit principalement la  $\beta$ -oxydation, résultant en une accumulation de dérivés toxiques des acides gras, les acyls-CoA. L'hypothèse d'une accumulation d'acyls-CoA est supportée par la diminution significative de la mort cellulaire observée avec l'ajout de la carnitine, un agent qui a la capacité de lier les acyls-CoA et de former des dérivés acylcarnitines, lesquels peuvent traverser la membrane plasmique. L'hypothèse d'une accumulation de NADH, quant à elle, est supportée par la diminution du taux de mortalité associée à l'ajout de MB, un accepteur d'électrons capable d'oxyder le NADH. Cette hypothèse est aussi supportée par l'effet néfaste observé avec les trois antioxydants testés au cours de cette étude, un résultat qui suggère un rôle bénéfique des ROS dans les conditions d'incubations des cellules, et ce possiblement par la capacité des ROS ou du stress oxydant à balancer le stress réducteur lié à l'accumulation du NADH.

En outre, il convient de souligner que les divers effets observés dans cette étude, que ce soit une augmentation (par le palmitate et le lactate) ou une diminution (par la carnitine, le propionate ou le MB) de la mort cellulaire, ne peuvent être expliqués par des changements de l'activité de la COX, celle-ci demeurant stable dans toutes ces conditions. En effet, l'ajout des facteurs sanguins ou des agents thérapeutiques n'occasionne aucune modification de l'activité de la COX comparativement à l'état basal. Le rôle de l'ATP n'est cependant pas aussi clair. Les cellules de patients semblent plus susceptibles à avoir une diminution de la production d'ATP en présence de palmitate et lactate. Cet aspect mériterait d'être investigué de manière plus approfondie, afin de mieux comprendre les événements cellulaires associés à la mort des cellules. Enfin, l'ouverture du PTP ne semble pas impliquée dans la mort cellulaire observée puisque les inhibiteurs de ce PTP n'ont pas pu prévenir la mort chez les cellules de patients LSFC.

Pour la suite de ce projet, plusieurs pistes pourraient être explorées. Parmi celles-ci, mentionnons d'abord des études mécanistiques, lesquelles permettraient, entre autres, de confirmer l'hypothèse émise concernant l'effet toxique de l'accumulation d'acyls-CoA provenant du palmitate. De fait, il serait utile de documenter (i) le devenir métabolique du palmitate en utilisant du palmitate marqué au carbone 13 et/ou 14 <sup>121-123</sup> ou (ii) les niveaux d'acyls-CoA, de céramides, de diacylglycérols, de triglycérides et d'acylcarnitines dans un extrait cellulaire afin de déterminer le mécanisme par lequel les acyls-CoA sont toxiques <sup>85, 124, 125</sup>.

Il serait également judicieux de mesurer le ratio L/P dans les cellules avec les facteurs inducteurs de mort, qui correspond au ratio NADH/NAD<sup>+</sup> et reflète l'état d'oxydoréduction des cellules <sup>123</sup>. Ce résultat confirmerait l'hypothèse du stress réducteur lié à l'accumulation de NADH. Il serait également avantageux de clarifier le rôle des agonistes de PPAR- $\alpha$  en ajoutant le  $\beta$ -lapachone ou en activant les sirtuines qui permettent tout deux d'activer PPAR- $\alpha$  par déacétylation <sup>123</sup>.

Le rôle du PTP dans l'induction de la mort cellulaire pourrait aussi être investigué de façon plus directe par la mesure des principales conséquences de son ouverture, soit la perte du potentiel de membrane et le gonflement de la mitochondrie <sup>62</sup>. L'ouverture du PTP pourrait aussi être vérifiée par l'ajout simultané de calcéïne, une protéine de moins de 1,5 kDa, et de la combinaison de palmitate et lactate, permettant de vérifier l'entrée de cette protéine, lors de l'ouverture du pore, dans la matrice mitochondriale par fluorescence <sup>60</sup>.

Quant aux interventions thérapeutiques, certaines études ont démontré des effets bénéfiques associés à l'administration de certains suppléments de type nutritionnel dans les cas de maladies mitochondriales, soit de ralentir ou arrêter la progression des symptômes cliniques <sup>6, 7</sup>. Dans cette étude, plusieurs de ces cofacteurs nutritionnels ont été testés, notamment la carnitine, le coenzyme Q via l'idebenone et d'autres antioxydants comme le resvératrol et le NAC. Plusieurs autres auraient pu être testés, comme la thiamine qui a souvent été associé à certains

bénéfices<sup>7</sup>. En effet, cette vitamine est un cofacteur de la pyruvate déshydrogénase pour la formation de l'acétyl-CoA et est bénéfique dans les cas de déficience au niveau de cette enzyme<sup>141</sup>. Cette déficience est généralement associée à une augmentation du taux de lactate sanguin. La thiamine pourrait donc être efficace pour l'élimination du lactate chez les patients LSFC. La créatine aussi pourrait être bénéfique pour traiter les cas de maladies mitochondriales en augmentant la quantité de phosphocréatine, une réserve d'énergie rapidement utilisable qui protégerait les cellules contre une déplétion en ATP<sup>7</sup>.

Au niveau du modèle expérimental, il serait pertinent de refaire des expériences similaires en utilisant des cellules hépatiques ou neuronales. De fait, le foie et le cerveau sont les organes les plus atteints chez les patients LSFC, avec une diminution de l'activité de la COX de 80-90 %. De plus, ces cellules présentent un métabolisme oxydatif mitochondrial plus important que les fibroblastes, puisqu'elles nécessitent plus d'énergie. Bien que les cellules hépatiques et neuronales des sujets LSFC ne soient pas disponibles, des stratégies qui pourraient être utilisées pour diminuer l'activité de la COX dans des cellules commerciales de type HEP-G2 pour les cellules de foie, ou SK-N-SH pour les cellules neuronales incluent (i) l'ajout d'un inhibiteur de la COX, comme le NO ou le cyanure, ou (ii) l'utilisation d'ARN interférent<sup>36</sup>.

Finalement, des approches de type non ciblées pourraient être envisagées pour identifier des facteurs sanguins susceptibles d'induire la mort cellulaire pouvant mener aux crises d'acidose. De fait, dans certaines maladies où le nombre de patients est plus important et plus accessible, il est possible de prélever le plasma d'un patient, qui contient les métabolites altérés, et de le placer en présence de cellules saines et malades<sup>142</sup>. Dans notre cas, les facteurs sanguins contenus dans le sérum d'un patient LSFC pourraient influencer, entre autres, la production d'ATP, de stress oxydant, de NADH et ultimement, la mort des cellules de patients et même de témoins suite à une période d'incubation donnée. Évidemment, du plasma provenant d'un témoin devrait aussi être testé pour comparer la réponse. L'identification des composants du sérum

et la mesure de leur concentration par des techniques de pointes telle la spectrométrie de masse pourrait ainsi fournir d'excellentes pistes quant aux facteurs qui induisent la mort des patients LSFC. Malheureusement, dans le cas du LSFC, les patients sont très peu nombreux et peu accessibles étant donné leur état de santé instable, limitant ainsi la possibilité d'utilisation d'une telle approche, du moins pour le moment. De plus, il est possible qu'à l'état basal, en absence de crise, les métabolites sanguins ne soient pas assez altérés pour voir un effet lors de l'incubation du plasma avec les cellules cibles. Il serait alors peut-être nécessaire d'avoir du plasma provenant d'un patient au début d'une crise, ce qui est d'autant plus difficile à obtenir.

En terminant, tout en considérant le fait que le présent travail a été effectué sur des lignées cellulaires, ce qui est loin de représenter ce qui peut se produire chez un être humain, il est possible de tirer certaines conclusions plus générales à partir des résultats obtenus, lesquels pourront être éventuellement transmis aux parents des enfants atteints du LSFC ou aux pédiatres traitant ces enfants en situation de crise. De fait, d'une part, les résultats suggèrent que chez les enfants atteints du LSFC, une attention particulière devrait être portée à l'alimentation, plus particulièrement à l'apport en acides gras saturés. D'autre part, ils apportent de bonnes pistes afin de mieux cibler un traitement éventuel pour les patients, dans le but ultime de prévenir la mort cellulaire associée aux crises. Finalement, les informations amassées au cours de cette étude, concernant les différentes conséquences métaboliques associées à la diminution de l'activité de la COX et la manière de les traiter, peuvent également s'appliquer à diverses autres maladies mitochondriales reliées à une déficience en COX ou autres complexes de la chaîne respiratoire (LS classique) ayant des symptômes cliniques semblables.

## Bibliographie

- (1) Debray FG, Lambert M, Mitchell GA. Disorders of mitochondrial function. *Curr Opin Pediatr* 2008 August;20(4):471-82.
- (2) LEIGH D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1951 August;14(3):216-21.
- (3) Cooper MP, Qu L, Rohas LM et al. Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex. *Genes Dev* 2006 November 1;20(21):2996-3009.
- (4) Lee N, Daly MJ, Delmonte T et al. A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16. *Am J Hum Genet* 2001 February;68(2):397-409.
- (5) Debray FG, Mitchell GA, Allard P, Robinson BH, Hanley JA, Lambert M. Diagnostic accuracy of blood lactate-to-pyruvate molar ratio in the differential diagnosis of congenital lactic acidosis. *Clin Chem* 2007 May;53(5):916-21.
- (6) Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol* 2008 October;39(4):223-35.
- (7) Marriage B, Clandinin MT, Glerum DM. Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders. *J Am Diet Assoc* 2003 August;103(8):1029-38.
- (8) Morin C, Mitchell G, Larochelle J et al. Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet* 1993 August;53(2):488-96.
- (9) Mootha VK, Lepage P, Miller K et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 January 21;100(2):605-10.
- (10) Merante F, Petrova-Benedict R, MacKay N et al. A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *Am J Hum Genet* 1993 August;53(2):481-7.
- (11) Glerum DM, Yanamura W, Capaldi RA, Robinson BH. Characterization of cytochrome-c oxidase mutants in human fibroblasts. *FEBS Lett* 1988 August 15;236(1):100-4.
- (12) Mili S, Pinol-Roma S. LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol* 2003 July;23(14):4972-82.

- (13) Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, Shoubridge EA. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell* 2010 April;21(8):1315-23.
- (14) Liu L, McKeehan WL. Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytoplasmic shuttling, and chromosome activity. *Genomics* 2002 January;79(1):124-36.
- (15) Gohil VM, Nilsson R, Belcher-Timme CA, Luo B, Root DE, Mootha VK. Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. *J Biol Chem* 2010 April 30;285(18):13742-7.
- (16) Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, Robinson BH. The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochem J* 2004 August 15;382(Pt 1):331-6.
- (17) Hatchell EC, Colley SM, Beveridge DJ et al. SLIRP, a small SRA binding protein, is a nuclear receptor corepressor. *Mol Cell* 2006 June 9;22(5):657-68.
- (18) Cooper MP, Uldry M, Kajimura S, Arany Z, Spiegelman BM. Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130. *J Biol Chem* 2008 November 14;283(46):31960-7.
- (19) Wenz T, Diaz F, Spiegelman BM, Moraes CT. Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab* 2008 September;8(3):249-56.
- (20) Mancuso M, Orsucci D, Logerfo A et al. Oxidative stress biomarkers in mitochondrial myopathies, basally and after cysteine donor supplementation. *J Neurol* 2010 May;257(5):774-81.
- (21) DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003 June 26;348(26):2656-68.
- (22) Matera M, Bellinghieri G, Costantino G, Santoro D, Calvani M, Savica V. History of L-carnitine: implications for renal disease. *J Ren Nutr* 2003 January;13(1):2-14.
- (23) Petrosillo G, Moro N, Ruggiero FM, Paradies G. Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Free Radic Biol Med* 2009 October 1;47(7):969-74.
- (24) Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in

- palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2001 October 12;276(41):38061-7.
- (25) Saks V, Favier R, Guzun R, Schlattner U, Wallimann T. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J Physiol* 2006 December 15;577(Pt 3):769-77.
- (26) Baughman JM, Nilsson R, Gohil VM, Arlow DH, Gauhar Z, Mootha VK. A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis. *PLoS Genet* 2009 August;5(8):e1000590.
- (27) Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004 April 12;1655(1-3):400-8.
- (28) Robinson BH. Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatr Res* 2000 November;48(5):581-5.
- (29) Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 2001;106(1):46-52.
- (30) Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes CT. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2006 July;26(13):4872-81.
- (31) Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, Avadhani NG. Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem* 2006 January 27;281(4):2061-70.
- (32) Bolanos JP, Heales SJ. Persistent mitochondrial damage by nitric oxide and its derivatives: neuropathological implications. *Front Neuroenergetics* 2010;2:1.
- (33) Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003 October 15;552(Pt 2):335-44.
- (34) Fukui H, Moraes CT. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci* 2008 May;31(5):251-6.
- (35) Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 2010 March 4;464(7285):121-5.
- (36) Robinson BH. Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 2006 September;89(1-2):3-13.

- (37) Fall PJ, Szerlip HM. Lactic acidosis: from sour milk to septic shock. *J Intensive Care Med* 2005 September;20(5):255-71.
- (38) Jo SH, Son MK, Koh HJ et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2001 May 11;276(19):16168-76.
- (39) Das A, Xi L, Kukreja RC. Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta. *J Biol Chem* 2008 October 24;283(43):29572-85.
- (40) Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007 May;12(5):913-22.
- (41) Chen J, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI. Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. *Biochim Biophys Acta* 1998 May 8;1380(3):336-44.
- (42) Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007 January;32(1):37-43.
- (43) Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006 September;1757(9-10):1371-87.
- (44) Allan LA, Clarke PR. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J* 2009 November;276(21):6063-73.
- (45) Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 2008 January 31;41(1):11-22.
- (46) Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004 July 30;305(5684):626-9.
- (47) Mirabella M, Di GS, Silvestri G, Tonali P, Servidei S. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain* 2000 January;123 ( Pt 1):93-104.
- (48) Kushnareva Y, Newmeyer DD. Bioenergetics and cell death. *Ann N Y Acad Sci* 2010 July;1201:50-7.
- (49) Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998 December 28;102-103:139-42.

- (50) Troyano A, Sancho P, Fernandez C, de BE, Bernardi P, Aller P. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. *Cell Death Differ* 2003 August;10(8):889-98.
- (51) Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999 July 15;341 ( Pt 2):233-49.
- (52) Cusimano EM, Knight AR, Slusser JG, Clancy RL, Pierce JD. Mitochondria: the hemi of the cell. *Adv Emerg Nurs J* 2009 January;31(1):54-62.
- (53) Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004 November 12;95(10):957-70.
- (54) Bayir H, Kagan VE. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care* 2008;12(1):206.
- (55) Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998 August 28;281(5381):1309-12.
- (56) Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 October;287(4):C817-C833.
- (57) McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 2006 July 25;16(14):R551-R560.
- (58) Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem* 2007 November;103(4):1355-67.
- (59) Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 1997 June 27;89(7):1145-53.
- (60) Dumas JF, Argaud L, Cottet-Rousselle C et al. Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells. *J Biol Chem* 2009 May 29;284(22):15117-25.
- (61) Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995 July 17;1241(2):139-76.
- (62) Bernardi P, Krauskopf A, Basso E et al. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* 2006 May;273(10):2077-99.

- (63) Suarez J, Hu Y, Makino A, Fricovsky E, Wang H, Dillmann WH. Alterations in mitochondrial function and cytosolic calcium induced by hyperglycemia are restored by mitochondrial transcription factor A in cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008 December;295(6):C1561-C1568.
- (64) Samavati L, Lee I, Mathes I, Lottspeich F, Huttemann M. Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 2008 July 25;283(30):21134-44.
- (65) Spear JF, Prabu SK, Galati D, Raza H, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. beta1-Adrenoreceptor activation contributes to ischemia-reperfusion damage as well as playing a role in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 May;292(5):H2459-H2466.
- (66) Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, Bell RC, Wright DC. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008 November;295(5):E1076-E1083.
- (67) Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 2008 July 15;79(2):341-51.
- (68) Clyne AM, Zhu H, Edelman ER. Elevated fibroblast growth factor-2 increases tumor necrosis factor-alpha induced endothelial cell death in high glucose. *J Cell Physiol* 2008 October;217(1):86-92.
- (69) Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997 February 7;272(6):3324-9.
- (70) Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 2002 July 19;277(29):25847-50.
- (71) Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000 March;32(3):511-9.
- (72) Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* 2003 August 22;278(34):31861-70.
- (73) Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009 April 23;458(7241):1056-60.

- (74) Kwok ES, Howes D. Use of methylene blue in sepsis: a systematic review. *J Intensive Care Med* 2006 November;21(6):359-63.
- (75) Lopez-Armada MJ, Carames B, Martin MA et al. Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2006 October;14(10):1011-22.
- (76) Cho SY, Park PJ, Shin ES, Lee JH, Chang HK, Lee TR. Proteomic analysis of mitochondrial proteins of basal and lipolytically (isoproterenol and TNF-alpha)-stimulated adipocytes. *J Cell Biochem* 2009 February 1;106(2):257-66.
- (77) Callaway NL, Riha PD, Wrubel KM, McCollum D, Gonzalez-Lima F. Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats. *Neurosci Lett* 2002 October 31;332(2):83-6.
- (78) Atamna H, Nguyen A, Schultz C et al. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J* 2008 March;22(3):703-12.
- (79) Riedel W, Lang U, Oetjen U, Schlapp U, Shibata M. Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever. *Mol Cell Biochem* 2003 May;247(1-2):83-94.
- (80) Clifton J, Leikin JB. Methylene blue. *Am J Ther* 2003 July;10(4):289-91.
- (81) Callaway NL, Riha PD, Bruchey AK, Munshi Z, Gonzalez-Lima F. Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004 January;77(1):175-81.
- (82) Harper JA, Dickinson K, Brand MD. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev* 2001 November;2(4):255-65.
- (83) Han YH, Kim SZ, Kim SH, Park WH. 2,4-Dinitrophenol induces apoptosis in As4.1 juxtaglomerular cells through rapid depletion of GSH. *Cell Biol Int* 2008 December;32(12):1536-45.
- (84) Orsucci D, Filosto M, Siciliano G, Mancuso M. Electron transfer mediators and other metabolites and cofactors in the treatment of mitochondrial dysfunction. *Nutr Rev* 2009 August;67(8):427-38.
- (85) Koves TR, Ussher JR, Noland RC et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 2008 January;7(1):45-56.

- (86) Mutomba MC, Yuan H, Konyavko M et al. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. *FEBS Lett* 2000 July 28;478(1-2):19-25.
- (87) Liedtke AJ, DeMaison L, Nellis SH. Effects of L-propionylcarnitine on mechanical recovery during reflow in intact hearts. *Am J Physiol* 1988 July;255(1 Pt 2):H169-H176.
- (88) Lysiak W, Toth PP, Suelter CH, Bieber LL. Quantitation of the efflux of acylcarnitines from rat heart, brain, and liver mitochondria. *J Biol Chem* 1986 October 15;261(29):13698-703.
- (89) Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G, Mele D, Fucili A, Ceconi C. Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. *Ann N Y Acad Sci* 2004 November;1033:79-91.
- (90) Russell RR, III, Mommessin JJ, Taegtmeyer H. Propionyl-L-carnitine-mediated improvement in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. *Am J Physiol* 1995 January;268(1 Pt 2):H441-H447.
- (91) Cree MG, Zwetsloot JJ, Herndon DN et al. Insulin sensitivity and mitochondrial function are improved in children with burn injury during a randomized controlled trial of fenofibrate. *Ann Surg* 2007 February;245(2):214-21.
- (92) Khairallah M, Khairallah RJ, Young ME et al. Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 May 13;105(19):7028-33.
- (93) Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol* 2007 November;152(6):855-69.
- (94) Jauslin ML, Meier T, Smith RA, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J* 2003 October;17(13):1972-4.
- (95) Chapela SP, Burgos HI, Salazar AI, Nieves I, Kriguer N, Stella CA. Biochemical study of idebenone effect on mitochondrial metabolism of yeast. *Cell Biol Int* 2008 January;32(1):146-50.
- (96) Tonon C, Lodi R. Idebenone in Friedreich's ataxia. *Expert Opin Pharmacother* 2008 September;9(13):2327-37.

- (97) Di Prospero NA, Baker A, Jeffries N, Fischbeck KH. Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2007 October;6(10):878-86.
- (98) DiMauro S, Mancuso M. Mitochondrial diseases: therapeutic approaches. *Biosci Rep* 2007 June;27(1-3):125-37.
- (99) Gonzalez R, Ferrin G, Hidalgo AB et al. N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by d-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 2009 September 14;181(1):95-106.
- (100) Moreira PI, Harris PL, Zhu X et al. Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. *J Alzheimers Dis* 2007 September;12(2):195-206.
- (101) De FS, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 2001 July;22(7):999-1013.
- (102) Banaclocha MM. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses* 2001 April;56(4):472-7.
- (103) Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. In vitro response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Lett* 2000 April 3;114(1-3):143-53.
- (104) Dolinsky VW, Chan AY, Robillard F, I, Light PE, Des RC, Dyck JR. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. *Circulation* 2009 March 31;119(12):1643-52.
- (105) Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 April 24;104(17):7217-22.
- (106) Pelletier A, Coderre L. Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through AMPK inhibition and oxidative stress generation in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 May;292(5):E1325-E1332.
- (107) Xie Z, Zhang J, Wu J, Viollet B, Zou MH. Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes. *Diabetes* 2008 December;57(12):3222-30.

- (108) Staiger H, Staiger K, Stefan N et al. Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes* 2004 December;53(12):3209-16.
- (109) Fraser DA, Thoen J, Rustan AC, Forre O, Kjeldsen-Kragh J. Changes in plasma free fatty acid concentrations in rheumatoid arthritis patients during fasting and their effects upon T-lymphocyte proliferation. *Rheumatology (Oxford)* 1999 October;38(10):948-52.
- (110) Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev* 2006 May;22(3):198-203.
- (111) Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 2000 June 6;101(22):2618-24.
- (112) Monnot S, Chabrol B, Cano A et al. [Cytochrome c oxidase-deficient Leigh syndrome with homozygous mutation in SURF1 gene]. *Arch Pediatr* 2005 May;12(5):568-71.
- (113) de Pablo MA, Susin SA, Jacotot E et al. Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. *Apoptosis* 1999 April;4(2):81-7.
- (114) Yamagishi S, Okamoto T, Amano S et al. Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes. *Mol Med* 2002 April;8(4):179-84.
- (115) Listenberger LL, Han X, Lewis SE et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 March 18;100(6):3077-82.
- (116) Hendrickson SC, St Louis JD, Lowe JE, Abdel-aleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1997 January;166(1-2):85-94.
- (117) Noland RC, Woodlief TL, Whitfield BR et al. Peroxisomal-mitochondrial oxidation in a rodent model of obesity-associated insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 October;293(4):E986-E1001.
- (118) Kong JY, Rabkin SW. Palmitate-induced cardiac apoptosis is mediated through CPT-1 but not influenced by glucose and insulin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 February;282(2):H717-H725.
- (119) Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004 April;10(4):355-61.

- (120) Mugabo Y, Mukaneza Y, Renier G. Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction. *Metabolism* 2010 August 18.
- (121) Lin X, Shim K, Odle J. Carnitine palmitoyltransferase I control of acetogenesis, the major pathway of fatty acid  $\beta$ -oxidation in liver of neonatal swine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010 May;298(5):R1435-R1443.
- (122) Chatham JC, Bouchard B, Des RC. A comparison between NMR and GCMS  $^{13}\text{C}$ -isotopomer analysis in cardiac metabolism. *Mol Cell Biochem* 2003 July;249(1-2):105-12.
- (123) Hwang JH, Kim DW, Jo EJ et al. Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes* 2009 April;58(4):965-74.
- (124) Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 March 3;95(5):2498-502.
- (125) Preiss J, Loomis CR, Bishop WR, Stein R, Niedel JE, Bell RM. Quantitative measurement of sn-1,2-diacylglycerols present in platelets, hepatocytes, and ras- and sis-transformed normal rat kidney cells. *J Biol Chem* 1986 July 5;261(19):8597-600.
- (126) Cvjeticanin T, Stojanovic I, Timotijevic G, Stosic-Grujicic S, Miljkovic D. T cells cooperate with palmitic acid in induction of beta cell apoptosis. *BMC Immunol* 2009;10:29.
- (127) Otton R, da Silva DO, Campoio TR et al. Non-esterified fatty acids and human lymphocyte death: a mechanism that involves calcium release and oxidative stress. *J Endocrinol* 2007 October;195(1):133-43.
- (128) Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 May;292(5):C1569-C1580.
- (129) Jacobson J, Duchen MR, Hothersall J, Clark JB, Heales SJ. Induction of mitochondrial oxidative stress in astrocytes by nitric oxide precedes disruption of energy metabolism. *J Neurochem* 2005 October;95(2):388-95.
- (130) Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* 2006 June;97(6):1676-89.
- (131) Tatebe J, Morita T. Enhancement of TNF- $\alpha$  Expression and Inhibition of Glucose Uptake by Nicotine in the Presence of a Free Fatty Acid in C2C12 Skeletal Myocytes. *Horm Metab Res* 2010 November 15.

- (132) Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 May;288(5):R1220-R1225.
- (133) Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. Decreased apoptosis in polyamine depleted IEC-6 cells depends on Akt-mediated NF-kappaB activation but not GSK3beta activity. *Apoptosis* 2005 August;10(4):759-76.
- (134) Liu X, Thangavel M, Sun SQ et al. Adenylyl cyclase type 6 overexpression selectively enhances beta-adrenergic and prostacyclin receptor-mediated inhibition of cardiac fibroblast function because of colocalization in lipid rafts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008 June;377(4-6):359-69.
- (135) Cheng Z, Guo S, Copps K et al. Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. *Nat Med* 2009 November;15(11):1307-11.
- (136) Bastin J, Aubey F, Rotig A, Munnich A, Djouadi F. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor pathway stimulates the mitochondrial respiratory chain and can correct deficiencies in patients' cells lacking its components. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 April;93(4):1433-41.
- (137) Ciminelli M, Ascah A, Bourduas K, Burelle Y. Short term training attenuates opening of the mitochondrial permeability transition pore without affecting myocardial function following ischemia-reperfusion. *Mol Cell Biochem* 2006 October;291(1-2):39-47.
- (138) Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 2002 May 2;417(6884):74-8.
- (139) Fu X, Tao L, Rivera A et al. A simple and sensitive method for measuring tumor-specific T cell cytotoxicity. *PLoS One* 2010;5(7):e11867.
- (140) Borella P, Bargellini A, Salvioli S, Medici CI, Cossarizza A. The use of non-radioactive chromium as an alternative to <sup>51</sup>Cr in NK assay. *J Immunol Methods* 1995 October 12;186(1):101-10.
- (141) Naito E, Ito M, Takeda E, Yokota I, Yoshijima S, Kuroda Y. Molecular analysis of abnormal pyruvate dehydrogenase in a patient with thiamine-responsive congenital lactic acidemia. *Pediatr Res* 1994 September;36(3):340-6.
- (142) Noh JY, Oh SH, Lee JH, Kwon YS, Ryu DJ, Lee KH. Can blood components with age-related changes influence the ageing of endothelial cells? *Exp Dermatol* 2010 April;19(4):339-46.

- (143) Association de l'acidose lactique (2010), Association de l'acidose lactique, <<http://www.aal.qc.ca/index.php?id=1>>, consulté le 21 juillet 2010.
- (144) Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc. (2010), Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc., <<http://www.sigmtau.com/>>, consulté le 10 mai 2010.
- (145) Mediatech, inc. (2010), Cellgro Cell Culture Media and Cell Culture Reagents, <<http://www.cellgro.com/>>, consulté le 30 août 2010.
- (146) Voet, Donald et Voet, Judith G., 1990, Biochemistry, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & sons, 1223 pages