

Université de Montréal

**Altérations du métabolisme cardiaque associées à des désordres
génétiques de l'oxydation des acides gras à chaîne longue chez la souris**

Par
Roselle Gélinas

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en nutrition

Août 2011

©, Roselle Gélinas, 2011

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Altérations du métabolisme cardiaque associées à des désordres
génétiques de l'oxydation des acides gras à chaîne longue chez la souris**

présentée par :

Roselle Gélinas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Stephanie Fulton, président-rapporteur

Dre Renée Ventura-Clapier, examinateur externe

Dr Denis Deblois, membre du jury

Dre Christine Des Rosiers, directeur de recherche

Dr Edgar Delvin, représentant du doyen de la FÉS

Résumé	iii
Résumé (version anglaise)	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xvii
Dédicace	xix
L'avant-propos	xxi

Résumé

Bien que le changement dans le choix des substrats énergétiques des acides gras (AGs) vers les glucides soit considéré comme bénéfique pour le cœur insuffisant, il n'est pas clair à savoir pourquoi les patients atteints de désordres de la β -oxydation (β -OX) des AGs à chaîne longue (AGCLs) développent des troubles du rythme et des cardiomyopathies. De plus, le traitement actuel ne permet pas de prévenir l'apparition du phénotype clinique chez tous les patients, spécifiquement en condition de jeûne ou de stress. Ainsi, plusieurs modèles de souris déficientes pour des enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras ont été développés de manière à améliorer les connaissances de la maladie ainsi que les traitements offerts aux patients.

À cet égard, cette étude vise à évaluer le phénotype métabolique et fonctionnel des cœurs de souris déficientes pour le récepteur activé de la prolifération des peroxydomes- α (PPAR α), un facteur de transcription des gènes impliqués notamment dans la β -OX des AGs, et pour la déshydrogénase des acyl-CoA à très longue chaîne (very-long chain acyl-CoA dehydrogenase, VLCAD), le déficit de l'oxydation des AGCLs le plus commun chez l'humain. L'approche expérimentale utilisée comprend plusieurs techniques dont (i) la perfusion *ex vivo* de cœur de souris au travail combinée à l'utilisation de substrats marqués au carbone 13 (^{13}C) et à l'analyse par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GCMS), (ii) l'analyse de l'expression génique par qPCR et (iii) l'analyse de l'activité électrique du cœur *in vivo* par télémétrie. De manière inattendue, les résultats de cette étude menée chez la souris ont permis de mettre en évidence que des déficits pour des protéines impliquées dans l'oxydation des AGCLs sont associés à des altérations du métabolisme (i) des glucides, (ii) des AGs polyinsaturés (AGPIs), et (iii) mitochondrial, incluant l'anaplérose, en plus d'être liés à des désordres de la fonction électrique du cœur, à savoir une prolongation du segment QTc. Pris dans leur ensemble, les résultats de cette thèse pourraient servir à l'élaboration de nouvelles

interventions métaboliques destinées à améliorer les traitements possibles et donc, la qualité de vie des patients atteints de désordres héréditaires de la β -OX des AGCLs.

Mots clés : métabolisme énergétique cardiaque, désordres de l'oxydation des acides gras, anaplérose, perfusion *ex vivo* de cœur de souris, segment QT

RÉSUMÉ (version anglaise)

While a shift from fatty acids to carbohydrate is considered beneficial for the failing heart, it is unclear why patients with fatty acid oxidation disorders present clinical manifestations such as cardiomyopathy, arrhythmia and conduction defects. Unfortunately, the current nutritional treatment for these patients is limited in its ability to prevent these symptoms, especially under fasting and stress conditions. Many mouse models of fatty acid oxidation deficiency have been developed to improve the knowledge of the disease and the treatment of these patients. In this regard, this study aims to characterize the metabolic and functional phenotype of hearts from mice that are deficient for the peroxisome proliferator-activated receptor α , a transcription factor for gene involved in fatty acid oxidation, and very long chain acyl-CoA dehydrogenase, the most common inherited long chain fatty acid oxidation disorder in human, under various conditions.

In this study, numerous approaches have been used, which includes validated experimental paradigms, namely, (i) *ex vivo* heart perfusion in the working mode with concomitant evaluation of myocardial contractility and metabolic fluxes, employing ^{13}C -labeled substrates combined with mass isotopomer analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry, (ii) gene expression analysis by qPCR and (iii) electrocardiogram monitoring *in vivo* by telemetry. Unexpectedly, results from the present thesis demonstrate that fatty acid oxidation disorders cause alterations in metabolism of (i) carbohydrates (ii) polyunsaturated fatty acids of the omega-3 type, specifically docosahaexanoic acid, and (iii) mitochondria including anaplerosis, in addition to lead to functional abnormalities, namely a prolongation of the QT interval. Altogether, results from this thesis could contribute to new metabolic therapy development to improve the quality of life of the patients with inherited long chain fatty acid oxidation disorder.

Key words: Cardiac metabolism, fatty acid oxidation disorders, anaplerosis, mice heart perfused *ex vivo*, QT interval

1. CHAPITRE I - REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1.1 Introduction	3
1.2 Le métabolisme énergétique cardiaque et sa régulation.....	4
1.2.1 Les différentes voies métaboliques énergétiques	5
1.2.1.1 Le CAC et la régénération de l'ATP	7
1.2.1.2 Le métabolisme des glucides.....	9
1.2.1.2.1 La captation du glucose et la glycolyse.....	9
1.2.1.2.2 Le rôle clé du pyruvate.....	11
1.2.1.3 Le métabolisme des AGs.....	14
1.2.1.3.1 Les sources d'AGs.....	15
1.2.1.3.2 La régulation de la mobilisation lipidique.....	16
1.2.1.3.3 Captation et transport des AGs.....	20
1.2.1.3.4 β -oxydation mitochondriale	23
1.2.1.4 Le métabolisme de corps cétoniques.....	26
1.2.2 La régulation transcriptionnelle.....	27
1.2.2.1 La famille des PPARs.....	27
1.2.3 La régulation du métabolisme cardiaque via les voies de signalisation..	34
1.2.3.1 La voie de l'AMPK	35
1.2.3.2 La voie d'Akt/PKB.....	38
1.2.3.3 La voie de mTOR.....	41
1.2.4 Remodelage métabolique du cœur en situation physiologique et pathologique	44
1.3 Désordres de l'oxydation des AGs	49
1.3.1 Déficit en VLCAD	51
1.3.2 Les autres ACADs impliqués dans les métabolismes des AGCLs	57
1.3.2.1 LCAD.....	57
1.3.2.2 ACAD9.....	57
1.3.3 Les différentes stratégies de traitement	58
1.3.3.1 Le traitement actuel et la prévention des symptômes.....	58
1.3.3.2 Les nouvelles pistes de traitement.....	60
1.3.3.2.1 Les AGCMs dans le traitement des désordres de la β -oxydation des AGCLs	61
1.3.3.2.2 Les AGs polyinsaturés et les désordres de l'oxydation des AGCLs	67
1.4 Modèles murins pour l'étude des désordres de l'oxydation des AGs...71	71
1.4.1 Souris déficientes pour PPAR α	73
1.4.2 Souris déficientes pour VLCAD	74
1.5 Stratégie méthodologique pour l'étude du métabolisme cardiaque	78
1.5.1 Perfusion <i>ex vivo</i> au travail de cœur de souris	78
1.5.2 Utilisation de substrats marqués au ^{13}C pour l'étude du métabolisme cardiaque	80

2. CHAPITRE II - PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	85
2.1 Les objectifs de recherche.....	87
2.2 Les objectifs spécifiques	87
2.3 Les hypothèses de départ.....	88
3. CHAPITRE III - MANUSCRIT I.....	91
4. CHAPITRE IV - MANUSCRIT II	129
5. CHAPITRE V - MANUSCRIT III	173
6. CHAPITRE VI - DISCUSSION.....	203
6.1 Rappel des principaux résultats.....	206
6.2 Considérations méthodologiques	208
6.2.1 Utilisation d'animaux transgéniques.....	208
6.2.2 Perfusion de cœurs de souris <i>ex vivo</i> en mode travaillant.....	210
6.3 Considérations conceptuelles additionnelles.....	212
6.3.1 Effets aigus des AGCMs dans les cœurs perfusés <i>ex vivo</i>	213
6.4 Altérations métaboliques et troubles du rythme	216
6.4.1 Les AGPIs	217
6.4.2 Métabolisme des glucides	221
6.4.3 Le rôle des acides aminés à chaîne branchée (AACBs).....	221
7. CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	229
8. CHAPITRE VIII : BIBLIOGRAPHIE	235
9. Annexe 1.....	xxv
10. Annexe 2.....	xli

LISTE DES TABLEAUX

Cette thèse étant présentée sous forme de « thèse par articles », les tableaux et les figures sont répertoriés selon leur ordre d'apparition, avec un numéro et une page correspondante, afin d'éviter toute ambiguïté.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Tableau I.	Substrats énergétiques du cœur.....	6
Tableau II.	Principales manifestations cliniques des désordres de l'oxydation des acides gras.....	51
Tableau III.	Consensus sur le régime alimentaire des patients atteints de déficience en VLCAD.....	59
Tableau IV.	Modèles de souris avec déficit de l'oxydation mitochondriale des AGs.....	72

CHAPITRE II : PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE

CHAPITRE III : MANUSCRIT I

« Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPAR alpha null mouse hearts »

Tableau I.	Primer and probe sequences used in comparative real time quantitative polymerase chain reaction.....	104
Tableau II.	Functional and physiological parameters of control C57BL/6 and PPAR α null mouse hearts perfused <i>ex vivo</i> in the working mode at two preloads.....	106
Tableau III.	Citric acid cycle-related parameters measured in working control C57BL/6 and PPAR α null mouse hearts perfused at 12mmHg.....	111

CHAPITRE IV : MANUSCRIT II

« Prolonged QT interval and lipid alterations beyond β -oxidation in very long-chain acyl-coa dehydrogenase null mouse hearts »

Tableau I.	Impact of nutritional status on docosahexaenoic acid (DHA) levels in various tissues and plasma from VLCAD ^{+/+} (controls) and VLCAD ^{-/-} null mice.....	152
Tableau II.	Impact of different diets on the QTc interval and other electrocardiogram parameters assessed <i>in vivo</i> in 7-month-old VLCAD ^{+/+} (controls) and VLCAD ^{-/-} mice.	154
Tableau SI.	Composition of the diets expressed in mole percent of total fatty acids.....	160
Tableau SII.	Body weights and daily food intake.....	161
Tableau SIII.	Primer and probe sequences used in comparative real time quantitative polymerase chain reaction.....	161
Tableau SIV.	Functional and physiological parameters of 3-month-old VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mouse hearts perfused <i>ex vivo</i>	162
Tableau SV.	Long chain fatty acids profile in cardiac phospholipids in freeze-clamped <i>in vivo</i> 3 and 7 month-old VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mouse hearts fed with a standard, a high fat or a fish oil diet expressed in percent of total fatty acids	163

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1.	Métabolisme cardiaque.....	7
Figure 2.	Métabolisme des AGCLs.....	15
Figure 3.	Régulation allostérique de l'oxydation des AGs par les glucides...	22
Figure 4.	β -oxydation mitochondriale.....	23
Figure 5.	Affinité des différentes ACADs.....	24
Figure 6.	PPAR α et sa régulation du métabolisme cardiaque dans des conditions physiologiques et pathologiques.....	29
Figure 7.	Régulation en fonction de PGC-1 α	34
Figure 8.	Voie de signalisation de l'AMPK dans le cœur.....	36
Figure 9.	Régulation de la captation du glucose et des AGCLs par l'insuline et la contraction musculaire, implication des voies de signalisation de l'AMPK et d'Akt.....	38
Figure 10.	Voie de signalisation de mTOR.....	41
Figure 11.	Choix des substrats énergétiques du cœur dans des conditions normales ou pathologiques.....	45
Figure 12.	Évolution de la découverte des désordres de l'oxydation des AG.	49
Figure 13.	Structure de VLCAD et sites de mutations connues.....	53
Figure 14.	Métabolisme des acides gras à chaîne moyenne à nombre pair et impair.....	65
Figure 15.	Schéma général des élongations et des désaturations des AGs n-3 et n-6.....	68
Figure 16.	Photographie d'un cœur de souris perfusé <i>ex vivo</i>	79
Figure 17.	Représentation schématisée du système de perfusion de cœur de souris au travail.....	80
Figure 18.	Représentation schématique des quelques exemples d'isotopomères du citrate obtenus suite au métabolisme des traceurs [U- ¹³ C ₃] lactate et [U- ¹³ C ₃] pyruvate.....	82

CHAPITRE II : PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE

CHAPITRE III : MANUSCRIT I

« Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPAR alpha null mouse hearts »

Figure 1.	Relative contribution of various substrates to mitochondrial acetyl-CoA in working hearts from control C57BL/6 and PPAR α null mice.....	107
Figure 2.	Lactate production (A) and estimated production of glycolytically-derived acetyl-CoA (B) in working hearts of control C57BL/6 and PPAR α null mice perfused at two preloads.....	109
Figure 3.	Impact of nutritional state on plasma and myocardial metabolite levels in control C57BL/6 and PPAR α null mice.....	114
Figure 4.	Impact of nutritional state on myocardial messenger RNA levels of selected metabolic genes in control C57BL/6 and PPAR α null mice.....	116

CHAPITRE IV : MANUSCRIT II

« Prolonged QT interval and lipid alterations beyond β -oxidation in very long-chain acyl-coa dehydrogenase null mouse hearts»

Figure 1.	Rate pressure product (A) and relative contribution of exogenous palmitate to mitochondrial acetyl-CoA (B) in control VLCAD $^{+/+}$ and VLCAD $^{-/-}$ working mouse hearts perfused <i>ex vivo</i> under various conditions.....	144
Figure 2.	Impact of nutritional status on long-chain fatty acid (LCFA) levels in triglycerides (TGs) of VLCAD $^{+/+}$ and VLCAD $^{-/-}$ mouse hearts (A-B) and livers (C-D) freeze-clamped <i>in situ</i>	146
Figure 3.	Impact of nutritional status on mRNA levels of selected metabolic genes in VLCAD $^{+/+}$ and VLCAD $^{-/-}$ mouse hearts (A-D) and livers (E-H) freeze-clamped <i>in situ</i>	157
Figure 4.	Mechanisms regulating lipolysis: phosphorylation status of ERK1/2 in perfused hearts from 3- and 7-month-old VLCAD $^{+/+}$ and VLCAD $^{-/-}$	

	perfused hearts (A-B) and mRNA levels for gene encoding for enzymes involved in TG hydrolysis (C-D).....	149
Figure 5.	Levels of docosahexaenoic acid (DHA) in phospholipids (PLs) (A-B) and mRNA levels for gene encoding enzymes involved in DHA biosynthesis (C-D) in VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mouse hearts freeze-clamped <i>in situ</i> under various conditions.....	151
Figure 6.	Impact of a fish oil diet on the level of docosahexaenoic acid (DHA) in phospholipids (PLs) of VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mouse hearts freeze-clamped <i>in situ</i>	153
Figure S1.	Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of selected metabolic genes in 3-month-old VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mice....	164
Figure S2.	Potential mechanisms regulating lipolysis: levels of proteins involved in autophagy in livers from 24-h fasted 3-month-old VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mice.....	164
Figure S3.	Potential mechanisms regulating lipolysis: phosphorylation status of Akt in perfused hearts from 3- and 7-month-old VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mice.....	165

CHAPITRE V : MANUSCRIT III

« Mitochondrial alterations in VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) deficient mouse hearts »

Figure 1.	Relative contribution of substrates to mitochondrial acetyl-CoA formation at 3 and 7 months.....	199
Figure 2.	Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of enzymes involved in carbohydrates metabolism in 3 and 7 month-old VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mice fed a standard or a high fat die.....	185
Figure 3.	Pyruvate carboxylation and CAC intermediates levels in <i>ex vivo</i> perfused hearts from 3 month-old VLCAD ^{+/+} and VLCAD ^{-/-} mice..	186
Figure 4.	Effects of VLCAD deficiency on CAC intermediate cardiac concentrations (A), and total CAC intermediate cardiac concentrations <i>in vivo</i> at 7 months.....	188
Figure 5.	Effects of VLCAD deficiency on aconitase (A), and citrate synthase activities <i>in vivo</i> at 7 months.....	189

- Figure 6. Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of enzymes involved in anaplerosis in 3 and 7 month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice fed a standard or a high fat diet..... 190
- Figure 7. Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of proteins involved in mitochondrial function and biogenesis in 7 month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice fed a high fat diet..... 191

CHAPITRE VI : DISCUSSION

- Figure 1. Durée du segment QTc dans les cœurs VLCAD^{-/-} et VLCAD^{+/+} de 7 mois perfusés *ex vivo*..... 212
- Figure 2. Contribution des différents substrats dans les cœurs de souris VLCAD^{-/-} de 3 mois perfusés *ex vivo* en présence ou en absence d'AGCMs..... 214
- Figure 3. Profil des AGs dans les TGs des cœurs VLCAD et VLCAD de 3 mois perfusés *ex vivo* en absence ou en présence d'AGCMs..... 215
- Figure 4. Altérations possibles de la voie des AACBs qui pourraient être impliquées dans l'apparition des manifestations cliniques chez les souris déficientes pour VLCAD..... 223

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4E-BP : protéine de liaison au facteur d'initiation eucaryotique 4E
 AcAc : acétoacétate
 ACAD : déshydrogénase des acyl-CoA
 ACC : acétyl-CoA carboxylase
 ADP : adénosine diphosphate
 AGs : acides gras
 AGCLs : acides gras à chaîne longue
 AGCMs : acides gras à chaîne courte
 AGPIs : acides gras polyinsaturés
 AL : l'acide linoléique
 ALN : acide alpha-linolénique
 AMP : adénosine monophosphate
 AMPc : AMP cyclique
 AMPK : protéine kinase activée par l'AMP
 AP : acidémie propionique
 AP-2 : protéine régulatrice-2
 ARA : acide arachidonique
 ATGL : lipase des triglycérides du tissu adipeux
 ATP : adénosine triphosphate
 β -HB : β -hydroxybutyrate
 β -OX : β -oxydation
 Ca^{2+} : calcium
 CAC : cycle de l'acide citrique, cycle de Krebs
 CACT : déficience en carnitine/acylcarnitine translocase
 CC : corps cétoniques
 CGI-58 : comparative gene identification-58
 CL : chaîne longue
 CPT-I : carnitine palmytoyltransférase I
 CPT-II : carnitine palmytoyltransférase II
 CoA : coenzyme A
 DCP : déficience primaire en carnitine
 DAGs : diglycérides
 DGAT1 : diacylglycérol acyltransférase
 DHA : acide docosahexaénoïque
 eNOS : synthase endothéliale de l'oxyde nitrique
 ERK : extra-cellular-signal-regulated kinase
 ERR : récepteurs reliés à l'œstrogène
 F2,6BP : fructose-2,6-bisphosphate
 FABP : fatty acid binding protein;
 FADH₂ : flavine adénine dinucléotide
 FoxO : *forkhead box sous-classe O*
 GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
 GCMS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
 GLUT1 : transporteur de glucose 1
 GLUT4 : transporteur de glucose 4
 HSL : lipase hormono-sensible
 IGF-1 : *insulin-like growth factor*
 IRS-1 : *insulin receptor substrate 1*
 LCAD : déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne longue
 LCKAT : thiolase des 3-oxoacyl-CoA chaîne longue
 LDH : lactate déshydrogénase

LPL : lipoprotéine lipase
 MCAD : désydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne
 MCD : malonyl-CoA décarboxylase
 MCT-1 : transporteur de l'acide monocarboxylique
 mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères
 mTORC1 : mTOR complexe 1
 mTORC2 : mTOR complexe 2
 MTP : protéine trifonctionnelle mitochondriale
 MPE : pourcentage d'enrichissement molaire
 n-3 : oméga 3
 n-6 : oméga 6
 NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
 NRF-1 : Facteur nucléaire de la chaîne respiratoire 1
 NRF-2 : Facteur nucléaire de la chaîne respiratoire 2
 OAA : oxaloacétate
 OXPHOS : phosphorylation oxydative
 PC : pyruvate carboxylase
 PCC : propionyl-CoA carboxylase
 PDH : pyruvate désydrogénase
 PDK : pyruvate désydrogénase kinase
 PDK1 : « phosphoinositide-dependent kinase-1 »
 PGC-1 : coactivateurs-1 de PPAR γ
 PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
 PKA : protéine kinase A
 PKB : protéine kinase B
 PKC : protéine kinase C
 PFK-1 : phosphofructokinase-1
 PFK-2 : phosphofructokinase-2
 PLs : phospholipides
 PPAR : récepteurs activés de la prolifération des peroxysomes
 PRAS40 : substrat d'Akt/PKB de 40 kDa riche en proline
 PPRE : *PPAR response element*
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 RR-MAD : *riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation*
 RXR : récepteur nucléaire activé par l'acide rétinoïque
 S6K : kinase S6
 SCAD : désydrogénase des acyl-CoA à courte chaîne
 SCKAT : thiolase des 3-oxoacyl-CoA chaîne courte
 SCOT : succinyl-CoA oxoacide transférase
 TA : tissu adipeux
 TCS1 : **complexe de sclérose tubéreuse 2**
 TCS2 : **complexe de sclérose tubéreuse 2**
TFP : protéine trifonctionnelle
 TGs : triglycérides
 TCM : triglycérides à chaîne moyenne
 TGF β : transforming growth factor β
 TZDs : thiazolidinediones
 UDP-GlcNAc : d'uridine diphosphate N-acétyl-glucosamine
 VBH : voie de biosynthèse des hexosamines
 VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
 VLCAD : désydrogénase des acyl-CoA à très longue chaîne
 VLCAD^{+/+} : contrôles « littermates »
 VLCAD^{-/-} : déficience en VLCAD
 VLDL : lipoprotéine de très faible densité

REMERCIEMENTS

Je sais que j'ai la chance d'être bien entourée dans la vie. Plusieurs personnes sont intervenues auprès de moi tout au long de la réalisation de cette thèse, elles ont toutes, à leur façon, influencé mon parcours et je tiens à les remercier personnellement.

En premier lieu, je tiens à remercier du plus profond de mon coeur ma directrice de thèse, Dre Christine Des Rosiers, pour avoir été, depuis les 7 dernières années, bien plus qu'une superviseure pour moi. Il va sans dire que la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans son aide, son encadrement et son support quotidien. Elle m'a transmis aussi bien sa passion pour la science que sa rigueur dans le travail et son grand sens de la justice. Christine, merci d'avoir toujours été là pour moi, aussi bien au niveau académique que personnel. Malgré ton emploi du temps chargé, tu as toujours été disponible pour m'écouter et me conseiller. Par le partage de tes expériences et ta grande compréhension, tu as joué un rôle très important dans ma vie. Tu es pour moi un modèle et une immense source d'inspiration et pour ça je te dis merci.

Je veux aussi remercier toutes les personnes qui sont passées dans le laboratoire au cours des 7 dernières années et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Chacun de vous, par votre présence et vos grandes qualités, avez influencé mon parcours. Caroline A, la fonceuse, que j'ai rencontrée par hasard dans un cours avant même de savoir que je viendrais dans le labo. Maya, la méticuleuse, qui m'a ouvert la voie de la perfusion de coeur de souris. Ramzi, le complice, avec qui j'ai bien rigolé et qui est devenu un ami. Janie, la patiente, avec qui j'ai partagé les supplices de la biologie moléculaire. Julie, la studieuse, qui a été la meilleure première stagiaire que l'on peut espérer. Marie-Eve, la délicate, qui veut toujours faire du mieux qu'elle peut. Benjamin, le sensible, qui est toujours prêt à donner son temps pour les autres. Fanny, la discrète, qui est toujours calme, modérée et disponible pour discuter. Isabelle P, la courageuse, qui a donné pour moi, un nouveau sens au mot détermination. Dominic, l'authentique, qui, en tant que dernier venu au labo, m'a apporté la motivation qu'il me manquait. Sans oublier ceux qui ont été là pour moi, pour m'aider avec mon projet et mes problèmes, mais aussi partager de beaux moments de la vie de labo. Isabelle, merci pour ton expertise de chimiste, ton amabilité et pour tous les potins du show-business ainsi que la découverte d'IMDB. Caroline D, merci d'avoir été si dévouée, d'avoir toujours été là pour rire et détendre l'atmosphère et bien sur pour les mémorables soirées au Dieu du Ciel, j'espère vraiment qu'il y en aura d'autres. Guy, merci d'avoir partagé avec moi aussi bien tes outils scientifiques que tes joies et tes peines. J'ai énormément appris avec toi et au

fil du temps on est devenus des amis. Et finalement, un très gros merci à Bertrand, avec toi, en 7 ans, j'ai appris, j'ai travaillé, j'ai pleuré et j'ai ri, beaucoup ri. Tu as été au coeur de chaque étape de mon séjour dans le labo, et tu as été pour moi beaucoup plus qu'un collègue, presque un grand frère par moment. Merci du fond du cœur à vous tous, vous allez me manquer.

Un merci aussi à tou(te)s mes ami(e)s qui m'ont toujours encouragée. J'ai une pensée spéciale pour Paule et Chloé que j'ai rencontrées au tout début de l'université et qui sont toujours très importantes dans ma vie. Merci à Mariane, qui m'a toujours aidée depuis le secondaire à comprendre quand j'étais confuse dans les cours. Il y a de toi dans la scientifique que je suis devenue. Un gros merci à Émilie, mon amie de toujours qui a été là pour moi dans les moments difficiles, c'est rassurant de savoir que je peux compter sur toi. Et finalement, un merci du fond du cœur à Mélanie, ma presque soeur qui ne me juge jamais et qui est toujours là pour les bons coups, comme les moins bons, depuis plus de 20 ans. Merci d'être là, inconditionnellement.

Un merci à tous les membres de ma famille. À mes beaux-parents, Céline et Michel et mon beau-frère Philippe de m'avoir accueillie chaleureusement dans la famille il y a presque 13 ans et d'avoir fait de moi une des vôtres. Merci à Maz, Odrée, d'avoir joué le rôle de grande soeur en plus de celui de cousine. Merci à ma mère, Martine, de m'avoir enseigné la rigueur dès l'école primaire. Cette force de caractère m'a aidée à me rendre où je suis. Merci à Serge de nous avoir, Gab et moi, toujours reçues chez-toi. Merci à mon père, Christian, d'avoir été, et d'être encore aujourd'hui, malgré mes 30 ans, toujours derrière moi. Ta présence discrète et ton support ont fait la différence dans ma vie. Merci à Nicole pour tout ce que tu as fait pour moi au fil des ans. Un immense merci à mon frère et mes sœurs, pour moi le mot « famille » prend un sens grâce à vous 3. Renaud, par ton rire tu m'as toujours fait oublier mes soucis. Frédérique, par tous tes câlins et tes « je t'aime » tu as toujours réussi à me reconforter. Gabrielle, les mots me manquent pour exprimer à quel point tu es importante pour moi.

Merci à ma belle Ella, mon bébé bonheur grâce à qui la vie est plus belle chaque jour. Et finalement, merci à mon amoureux, l'homme de ma vie sans qui tout ça n'aurait pas été possible. David, tu fais partie de ma vie depuis toujours, tu me donnes force et courage dans les moments difficiles et tu m'obliges à me dépasser. Sans toi, la vie ne serait pas la même et je ne serais pas celle que je suis.

À David et Ella

**Patience dans l'azur !
Chaque atome de silence
Est la chance d'un fruit mûr !
-Paul Valéry**

L'AVANT-PROPOS

Les AGCLs sont le substrat énergétique prioritairement utilisé par le cœur sain pour la production d'ATP, nécessaire au maintien de sa fonction. Dans certaines conditions pathologiques, telles que l'hypertrophie cardiaque, il y a une modification dans le choix des substrats des lipides vers les glucides. Le lien entre ces changements métaboliques, la progression des cardiomyopathies et le développement de l'insuffisance cardiaque n'est pas encore clair, il est encore impossible à ce jour de savoir si cette modification dans le choix des substrats énergétiques du cœur est une réponse adaptative à la maladie ou non. Toutefois, le fait que les patients atteints de désordres de la β -OX des AGCLs développent des troubles du rythme et des cardiomyopathies (273), souligne l'importance de l'oxydation des AGs pour le maintien d'une fonction cardiaque adéquate. Chez ces patients, le déficit énergétique et l'accumulation de dérivés des AGCLs toxiques, les acyl-CoA et les acylcarnitines à chaîne longue, en amont du site de restriction sont les causes les plus documentées de l'apparition des symptômes. Malheureusement le traitement actuel ciblant ces deux phénomènes ne permet de prévenir l'apparition du phénotype clinique chez tous les patients. Toutefois, en 2002, une étude a rapporté que l'administration d'une diète contenant un AG à chaîne moyenne (AGCM) à nombre impair, l'heptanoate, améliore l'état clinique des patients avec déficit en VLCAD de façon surprenante (259). Bien qu'il ne s'agisse que d'une étude de cas, ces résultats sont prometteurs et ouvrent la porte vers une nouvelle approche pour la thérapie nutritionnelle. Les AGCMs à chaîne moyenne à nombre impair sont oxydés en acétyl-CoA et en propionyl-CoA, contrairement aux AGCMs à nombre pair qui sont seulement oxydés en acétyl-CoA. Ainsi, en plus de fournir de l'énergie au cœur sous forme d'acétyl-CoA, l'oxydation de l'heptanoate permet une augmentation de l'anaplérose, laquelle se définit comme étant le processus métabolique qui fournit des carbones catalytiques au cycle de Krebs (ou cycle l'acide citrique : CAC), via la production de propionyl-CoA. Il est proposé que l'anaplérose joue un rôle important dans le maintien des fonctions contractiles du cœur (106).

Dans cette optique, les objectifs généraux de ce projet de doctorat s'inscrivaient dans le cadre d'une étude multidisciplinaire qui vise à améliorer les connaissances sur les causes des cardiomyopathies et des troubles du rythme chez les patients atteints d'un désordre génétique de la β -OX des AGCLs, dans le but à long terme d'optimiser le support nutritionnel composé d'AGCMs à nombre impair afin de prévenir l'apparition des symptômes chez les patients.

Plus précisément, l'objectif des travaux de cette thèse visait : (i) le phénotypage métabolique du cœur déficient en VLCAD, le déficit de l'oxydation des AGCLs le plus commun chez l'humain et (ii) la description des effets au niveau du métabolisme cardiaque de l'administration aiguë et chronique d'AGCMs. L'hypothèse de départ était que les cœurs déficients pour VLCAD allaient présenter des altérations du métabolisme lipidique qui seraient liées au développement des troubles du rythme, lesquelles seraient renversées par l'administration d'AGCMs.

Toutefois, étant donné des problèmes rencontrés lors de l'établissement de la colonie de souris déficientes pour VLCAD, la première étude a été menée avec un autre modèle animal de désordres de l'oxydation des AGs, la souris déficiente pour PPAR α . Les résultats de cette recherche ont été publiés dans le journal «*American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*» dans un article ayant pour titre : «*Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPAR α null mouse hearts.*» cet article est présenté au Chapitre III de cette thèse.

La seconde partie des travaux de cette thèse a été réalisée avec les souris déficientes en VLCAD, qui représentent la déficience génétique de l'oxydation des AGCLs la plus commune chez l'humain. La première étude réalisée avec ces souris a permis de montrer que de manière surprenante, lorsque perfusés *ex vivo*, les cœurs de souris déficientes pour VLCAD ont la capacité d'oxyder de manière efficace les AGCLs. Toutefois, ces souris présentent d'autres altérations inattendues du métabolisme cardiaque ainsi qu'une prolongation de l'intervalle QT *in vivo*, un facteur de risque pour la mort subite. Un volet des résultats obtenus sont publiés dans le journal «*American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*» dans un

article ayant pour titre : « *Prolonged QT interval and lipid alterations beyond β -oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts.* » cet article est présenté au Chapitre IV de cette thèse.

Suite aux conclusions de la première partie de l'étude avec les souris déficientes en VLCAD, la troisième partie des recherches de cette thèse s'est penchée principalement sur les altérations du métabolisme mitochondrial et du métabolisme glucidique qui pourraient être liées au développement des troubles du rythme. Les résultats de ce volet sont présentés dans un manuscrit en préparation au chapitre V de cette thèse.

L'étude du métabolisme cardiaque rapportée dans la présente thèse se démarque de par la combinaison des outils d'investigation utilisés. De façon globale, les fondements de cette recherche reposent sur l'utilisation de la perfusion *ex vivo* de cœur de souris en mode travaillant combinée à l'utilisation de substrats marqués au carbone 13 (^{13}C), suivie de l'analyse des isotopomères de masse par GCMS. De façon générale, chacune des études comporte une analyse (i) de l'état fonctionnel et physiologique du cœur perfusé *ex vivo*, (ii) de la contribution relative des substrats énergétiques à la synthèse du citrate, notamment l'oxydation des acides gras et des glucides, ainsi que la décarboxylation et la carboxylation du pyruvate et (iii) de la réponse à différentes conditions nutritionnelles via l'expression génique d'enzymes/protéines clés du métabolisme cardiaque. Dans l'ensemble, bien que ces travaux aient été menés avec des modèles animaux différents, les résultats de cette étude pourraient servir à l'élaboration de nouvelles interventions métaboliques destinées à améliorer les traitements possibles et donc, la qualité de vie des patients atteints de désordres héréditaires de la β -OX des AGCLs.

1. CHAPITRE I - REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Les cardiomyopathies sont des causes importantes de morbidité et de mortalité aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (92). Elles sont des maladies du muscle cardiaque menant à la dysfonction du myocarde et ainsi à l'apparition d'arythmies et d'insuffisance cardiaque. Chez les enfants, les études cliniques ont montré une cause héréditaire dans 20-30% des cardiomyopathies. Parmi les déficiences génétiques identifiées dans ces études, on retrouve les mutations sur des gènes codant pour des protéines essentielles au métabolisme énergétique cardiaque. Les protéines impliquées dans l'utilisation des AGs sont parmi les plus importantes (206). Les désordres génétiques de l'oxydation des AGCLs et leurs impacts aux niveaux métabolique et fonctionnel sont au centre des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. En effet, les patients atteints de ce type de désordres génétiques développent des maladies cardiaques et des troubles du rythme, ce qui souligne l'importance des AGCLs pour le maintien d'une fonction cardiaque adéquate. Malheureusement, le traitement actuel offert aux patients ne permet pas de prévenir les manifestations cliniques. Ainsi, depuis quelques années, différents modèles animaux présentant des déficits de l'oxydation des AGs ont été développés afin d'approfondir les connaissances de ce type de désordre et, ainsi, d'améliorer le traitement et le support nutritionnel offerts aux patients de manière à diminuer la morbidité et la mortalité. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse, qui vise le phénotypage métabolique et fonctionnel du cœur de souris présentant des déficits enzymatiques de l'oxydation des AGCLs, s'avère pertinent.

À la lumière des résultats obtenus, nous démontrons que les désordres de l'oxydation des AGCLs ont des conséquences complexes, non anticipées, lesquelles incluent des altérations au niveau d'autres voies métaboliques, telles que celles impliquées dans le métabolisme des glucides, des AGPIs et de l'anaplérose. Toutes ces altérations peuvent avoir un impact sur l'évolution des symptômes cliniques au niveau cardiaque. Les différents résultats seront présentés dans les chapitres III, IV et V et seront discutés dans le chapitre VI.

En premier lieu, les connaissances actuelles sur le métabolisme énergétique du cœur et de sa régulation dans des conditions physiologiques et pathologiques seront discutées. Par la suite, suivra une section sur les désordres de l'oxydation des AGs, puis une section plus spécifique sur l'état des connaissances sur le déficit en VLCAD, le désordre des AGCLs le plus commun chez l'humain, sujet principal de cette recherche. Finalement, les modèles animaux et les approches méthodologiques utilisés pour la réalisation des travaux de cette thèse seront discutés.

1.2 Le métabolisme énergétique cardiaque et sa régulation

La section suivante est un survol du métabolisme cardiaque et de sa régulation allostérique dans des conditions physiologiques et pathologiques. Les informations présentées ici sont tirées de nombreux ouvrages et articles de revues (72; 73; 108; 194; 238; 299; 300).

À la fin du 19^{ième} siècle, Oscar Langendorff a mis en évidence le fait que le myocarde reçoit les nutriments énergétiques et l'oxygène nécessaires au maintien de sa fonction par la circulation coronarienne (238). Les découvertes de Langendorff ont permis d'établir un lien étroit entre la fonction contractile, la circulation coronarienne et le métabolisme oxydatif du cœur. Dans les années 1930, Evans et al. conclurent, à l'aide du modèle de perfusion de cœur de rat *ex vivo* selon le mode Langendorff, que le cœur utilise des glucides et des AGs comme substrats énergétiques. Quelques années plus tard, les études de Richard Bing ont permis de démontrer que ces résultats pouvaient être transposés au cœur humain (238). Le lien entre le métabolisme cardiaque des lipides et celui des glucides a été renforcé par les travaux de Randle et collaborateurs qui ont montré, dans les années 1960, qu'une augmentation de la contribution des AGs par le cœur inhibe l'utilisation des glucides (254). Initialement étudiée dans les tissus lipogéniques, tels que le foie et les tissus adipeux, l'inhibition de l'utilisation des lipides en présence de glucides a été mise en évidence par McGarry et al. en 1978 (209).

Jusqu'au début des années 1990, les mécanismes de régulation concertée du métabolisme des glucides et des lipides identifiés étaient du type allostérique, à court terme. Toutefois, au début des années 2000, une hypothèse nouvelle reliant, d'une part, le métabolisme énergétique et sa régulation génique à long terme, et, d'autre part, la fonction contractile du cœur, a été proposée (306). Cette hypothèse qui repose sur les données accumulées au cours des années 90 stipule qu'une altération du métabolisme énergétique secondaire à des changements dans l'expression génique ou protéique d'une enzyme métabolique provoque aussi des altérations de la fonction contractile du cœur.

Il est aujourd'hui connu et accepté que le cœur est un organe omnivore et flexible, c'est-à-dire qu'il utilise une grande gamme de substrats pour sa production d'énergie et qu'il modifie ses choix en fonction des conditions physiologiques (307). Cette modification dans le choix des substrats résulte de différents stimuli à court terme, tels que la disponibilité des substrats, l'apport en oxygène et la charge de travail, mais aussi à long terme, tels que le changement d'expression de gènes métaboliques.

Cette flexibilité métabolique est primordiale pour le cœur sain, car elle s'avère intimement liée au maintien d'une fonction contractile adaptée à la demande en énergie. Bien que plusieurs études aient mis en évidence le lien entre les déficits énergétiques et le développement de cardiomyopathies, les mécanismes exacts impliqués restent à être clarifiés.

1.2.1 Les différentes voies métaboliques énergétiques

Le travail quotidien du cœur est colossal; il bat plus de 100 000 fois et pompe ainsi plus de 10 tonnes de sang par jour, et, pour y arriver, il consomme plus d'énergie que n'importe quel autre organe (226). En effet, le cœur hydrolyse une importante quantité d'ATP ($\sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{g de poids humide}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ au repos), toutefois, puisque les réserves cardiaques sont assez faibles ($5 \mu\text{mol/g de poids humide}$), les besoins énergétiques du myocarde sont très élevés (238). Le turnover du pool d'ATP du

myocarde dans des conditions normales est d'environ 10 secondes, ainsi le cœur doit produire suffisamment d'ATP pour maintenir sa fonction contractile. Comme la fonction cardiaque repose sur la capacité des cellules du myocarde à convertir les différents substrats en énergie, il est important pour le muscle cardiaque de s'adapter rapidement aux changements physiologiques et à la disponibilité des différents substrats. En conditions normoxiques, la β -OX mitochondriale des AGCLs contribue pour 60-90% de la production totale d'énergie dans le cœur sain. Toutefois, les glucides, tels que le glucose, le lactate et le pyruvate, les corps cétoniques, et, dans une moindre mesure, les acides aminés sont aussi oxydés par le cœur comme sources d'énergie (Tableau I, page 6).

Tableau I : Substrats énergétiques du cœur (adapté de (164))

Substrat énergétique	Contribution à la production totale d'énergie (%)	Situations dans lesquelles ce substrat est préféré	Principales enzymes impliquées dans le métabolisme
Acides gras	60-90	Augmentation des besoins énergétiques, Conditions de jeûne	Transporteurs d'acides gras (FAT/CD36); Carnitine palmitoyltransférase-1; Enzymes de la β -oxydation
Glucose	10-40	Insuffisance cardiaque, Cardiomyopathies, Ischémie	GLUT-1 et 4; Phosphofrutokinase-1; Pyruvate déshydrogénase
Lactate	<1-40	Exercice	Lactate déshydrogénase
Acides aminés	<1-5	Catabolisme de protéines	Aminotransférases
Corps cétoniques	<1-40	Jeûne	β -hydroxybutyrate déshydrogénase
Éthanol	<1-5	Aucune	Acétyl-CoA synthase

L'oxydation des différents substrats, via différentes voies métaboliques, lesquelles seront discutées ci-après, produit de l'acétyl-CoA, une molécule de 2 carbones, qui entre ensuite dans le CAC pour y être oxydée (Figure 1, page 7). Les équivalents réduits, le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et le flavine adénine dinucléotide (FADH₂), produits par le CAC, la β -OX des AGs, la glycolyse et

l'oxydation du pyruvate et du lactate transportent des électrons à la chaîne respiratoire où est produit l'ATP à partir de l'ADP par phosphorylation oxydative.

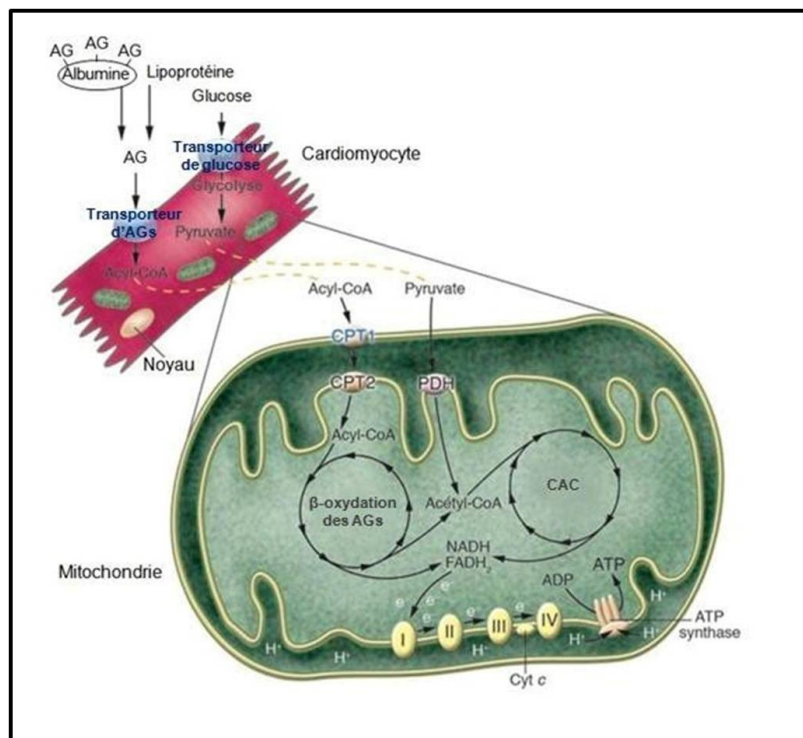


Figure 1 : Métabolisme cardiaque. (Adaptée de (143))

ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, AG : acide gras, CAC : cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, CPT1 : carnitine palmitoyltransférase 1, CPT-II : canitine palmitoyltransférase II, PDH : pyruvate déshydrogénase, FADH₂ : flavine adénine dinucléotide, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

1.2.1.1 Le CAC et la régénération de l'ATP

Le CAC, décrit initialement par Krebs et Johnson en 1937, a pour fonction principale d'oxyder le groupement acétyle de l'acétyl-CoA, provenant de l'oxydation des différents substrats, afin de produire du NADH et FADH₂. Le cycle est composé de 8 étapes, chacune catalysée par une enzyme spécifique. La première étape du cycle est le transfert d'une molécule d'acétyl-CoA (2 carbones) sur l'oxaloacétate (OAA ; 4 carbones), pour former du citrate (6 carbones), via l'enzyme citrate synthase. L'oxydation de cette molécule de citrate produira, en plus des équivalents réduits et

du CO_2 , une molécule d'OAA qui sera recyclée et servira à « transporter » une nouvelle molécule d'acétyl-CoA à chaque tour de cycle. L'activité du CAC est régulée par les ratios ADP/ATP et NAD^+/NADH , qui, eux, dépendent du statut et de la demande énergétique de la cellule. Les niveaux des intermédiaires du CAC sont modulés par différents facteurs, tels que la charge de travail, l'abondance des substrats et l'apport en oxygène.

Le niveau d'activité du CAC est un facteur important du contrôle de la régénération de l'ATP à partir de l'ADP. La chaîne de transport des électrons, située dans la membrane interne de la mitochondrie, est composée d'un ensemble de complexes protéiques (complexes I à IV), le coenzyme Q, le cytochrome c et le complexe V (ATP synthase). En présence d'oxygène, la chaîne respiratoire oxyde les équivalents réduits produits par les différentes voies métaboliques. Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydo-réductase) accepte des électrons du NADH et le complexe II (succinate déshydrogénase) accepte des électrons du FADH_2 . Ces électrons sont ensuite transférés, grâce à un gradient électrochimique, au CoQ (ubiquinone) vers le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase), vers le cytochrome c puis vers le complexe IV (cytochrome oxydase). Un gradient de protons est ainsi formé qui est utilisé pour la conversion de l'ADP en ATP par l'ATP synthase.

Les AGs sont des substrats plus efficaces d'un point de vue énergétique comparativement au glucose, puisque, pour une même quantité de substrats oxydés, les AGs produisent une plus grande quantité d'ATP. Les AGs nécessitent toutefois 10% plus d'oxygène que le glucose pour être oxydés, ainsi le glucose est un substrat plus efficace en terme de d'oxygène nécessaire pour son oxydation (193). En conditions normoxiques, plus de 90% de l'ATP est produit par la phosphorylation oxydative. L'ATP ainsi régénéré est transporté dans le cytosol et 60-70% est utilisé pour la contraction cardiaque. Les 30 à 40% restant sont utilisés par les pompes ioniques, comme la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique.

1.2.1.2 Le métabolisme des glucides

Le glucose est une source importante d'énergie pour le cœur et son oxydation peut se faire selon deux voies métaboliques, i) la glycolyse ou l'oxydation anaérobie et ii) l'oxydation mitochondriale en aérobie. Les différentes étapes du métabolisme glucidique décrites dans la prochaine section sont tirées de différents articles de revue (2; 72; 73; 300; 332)

1.2.1.2.1 La captation du glucose et la glycolyse

L'entrée du glucose dans les cardiomyocytes est régulée par un gradient transmembranaire, résultant du fait que la concentration intracellulaire du glucose est inférieure à celle du sang, (199) et est médiée par des transporteurs sur la membrane du sarcolème. Ces transporteurs de glucose appartiennent à la famille des GLUT. Le cœur possède principalement deux isoformes des transporteurs de glucose, le transporteur de glucose 1 (GLUT1), un transporteur indépendant de l'insuline, et le transporteur de glucose 4 (GLUT4), un transporteur sensible à l'insuline. GLUT1 a une plus faible affinité pour le glucose que GLUT4 ($K_m \sim 20-27$ mM pour GLUT1 vs. 5-7 mM pour GLUT4) (140). GLUT1, l'isotype prédominant lors de la vie fœtale qui est de moins en moins exprimé au cours de la vie adulte, est situé principalement à la surface de la membrane plasmique. GLUT4, qui subit le processus inverse et devient le transporteur dominant dans le cœur adulte, est contenu dans des vésicules à l'intérieur de la cellule. Ces vésicules sont transloquées à la surface de la membrane en réponse à diverses stimulations, telles qu'une augmentation de la charge de travail, une diminution de la disponibilité en oxygène ou la présence d'insuline, lesquelles favorisent l'entrée de glucose dans la cellule (164). L'insuline, de par son implication dans le métabolisme du glucose, joue un rôle de premier ordre dans la régulation de la sélection des substrats énergétiques et la fonction contractile du myocarde (38; 162).

Il existe trois sites importants de régulation du métabolisme glucidique, la première étape limitante est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate de manière ATP-dépendante. Cette réaction est catalysée par des hexokinases tissu-spécifiques, dont deux isoformes sont présentes dans le cœur. L'hexokinase II, sensible à

l'insuline, est présente dans le cœur adulte, tandis que l'hexokinase I se retrouve principalement dans le cœur fœtal. Une part du glucose-6-phosphate peut temporairement être mise sous réserve sous forme de glycogène dans certaines conditions, bien que les niveaux des réserves de glycogènes dans le cœur soient assez faibles (~30 versus ~150 $\mu\text{mol/g}$ de poids humide dans le muscle squelettique). Une augmentation de l'oxydation des AGs, lors d'un jeûne par exemple, favorise l'augmentation de l'activité de la glycogène synthase, enzyme responsable de la formation du glycogène. La dégradation du glycogène, la glycogénolyse, est activée par une stimulation adrénérgique ou la diminution de la disponibilité en oxygène. S'il n'est pas mis sous réserve le glucose-6-phosphate est transformé en fructose-6-phosphate, lequel peut entrer dans la voie de biosynthèse des hexosamines (VBH) afin d'être utilisé pour la glycosylation des protéines, un type de modification post-traductionnelle. En effet, en situation d'hyperglycémie, le glucose, en plus d'être utilisé dans la production d'énergie, est métabolisé dans la VBH menant à la formation d'uridine diphosphate N-acétyl-glucosamine (UDP-GlcNAc) qui peut être ensuite utilisé comme substrat pour l'ajout d'un groupement N-acétylglucosamine, via une liaison-O (O-GlcNAc), sur un résidu sérine ou thréonine des protéines cytoplasmiques ou nucléaires (48). Cette voie, qui implique la glucosamine comme donneur, semble aussi jouer un rôle dans la régulation de l'utilisation des substrats énergétique par le glucose. En effet, Laczy et collaborateurs ont montré qu'*ex vivo* la stimulation de cette voie par l'ajout de glucosamine provoque une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines dans le cœur et de l'oxydation des AGs possiblement par une augmentation de l'expression d'un transporteur d'AGs, à la membrane (170). Ce nouveau mécanisme de régulation du métabolisme énergétique cardiaque pourrait être important non seulement dans la régulation du choix des substrats énergétiques, mais aussi dans le développement des altérations métaboliques, principalement en condition diabétique (170). Toutefois, au niveau du métabolisme des glucides, la VBH n'est qu'une cascade métabolique secondaire (représentant au plus 5% du glucose métabolisé). Le principal devenir métabolique du

fructose-6-phosphate demeure son entrée dans la glycolyse, le processus biochimique qui transforme le glucose en pyruvate.

Le deuxième site de régulation du métabolisme des glucides se situe au niveau de la phosphofructokinase-1 (PFK-1), l'enzyme clé de la glycolyse. Elle utilise une molécule d'ATP pour former du fructose 1,6-bisphosphate (300). L'ATP et le citrate sont connus pour être des inhibiteurs de cette enzyme, alors que l'ADP, l'AMP et le phosphate inorganique (P_i) sont connus comme étant des activateurs de PFK-1. Toutefois, le plus puissant activateur allostérique de PFK-1 est le fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP), synthétisé par PFK-2 à partir du fructose-6-phosphate. Le F2,6BP agit sur PFK-1 en augmentant l'affinité de l'enzyme pour le fructose-6-phosphate et en réduisant les effets inhibiteurs de l'ATP.

Finalement, une autre étape de régulation de la glycolyse est la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui convertit la glyceraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate et produit du NADH. Une accumulation de NADH dans la cellule inhibe GAPDH.

La dernière réaction de la glycolyse est la formation de pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate, processus exergonique au cours duquel le phosphate de haute énergie du phosphonépyruvate est conservé pour former de l'ATP.

1.2.1.2.2 Le rôle clé du pyruvate

Le pyruvate issu de la glycolyse ou provenant du milieu extracellulaire via le transporteur de l'acide monocarboxylique (MCT-1) a trois principaux devenir métaboliques : i) sa conversion en lactate, ii) sa décarboxylation en acétyl-CoA et iii) sa carboxylation en malate ou en OAA. Le devenir métabolique du pyruvate dépend de l'état d'oxydation de la cellule, c'est-à-dire de son ratio $NAD^+/NADH$.

La réduction du pyruvate en lactate sous l'action de la lactate déshydrogénase (LDH) en même temps que la ré-oxydation du NADH cytosolique en NAD^+ est particulièrement importante dans une condition d'hypoxie (72). Dans le cœur, il y a une compartimentation du lactate, si bien que le lactate qui provient de la glycolyse

n'utilise pas la même voie métabolique que le lactate exogène destiné à l'oxydation mitochondriale pour la production d'énergie (46). La sortie de lactate est facilitée par le MCT-1. L'entrée dans la cellule du lactate produit par le cœur, les muscles et les érythrocytes se fait à l'aide de transporteurs membranaires, ou de manière passive. Une fois à l'intérieur de la cellule, le lactate réagit avec le NAD^+ et est oxydé en pyruvate par la LDH. Cette réaction réversible dépend de la concentration des substrats (164). Bien que la contribution du lactate au métabolisme énergétique du cœur soit souvent sous-estimée (49), le lactate est pourtant un des glucides qui contribue le plus à la production de pyruvate dans le cœur sain. (46). Dans des cœurs de rats perfusés *ex vivo* en présence de glucose et de lactate, il a été montré que la contribution du lactate exogène à la production d'acétyl-CoA est deux fois plus importante que celle du pyruvate dérivé de la glycolyse (47). Au repos, les niveaux de lactate circulants sont de 1 mM, mais ils peuvent atteindre des niveaux de 3-5 mM suite à l'exercice (154). De plus, il a été démontré dans les cœurs de chiens que la captation du lactate par le cœur est proportionnelle à sa concentration en circulation (80).

Dans des conditions où l'oxygène n'est pas limité, le pyruvate entre dans la mitochondrie pour y être transformé en acétyl-CoA. La décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA est l'étape irréversible clé de l'oxydation des glucides, laquelle est catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDH), un complexe multienzymatique situé dans la matrice mitochondriale. L'activité de cette enzyme est au cœur du «cycle glucose-AGs» décrit par Philip Randle en 1963 (254). Randle et ses collègues ont démontré, à l'aide de préparations de muscles et de cœur isolés, que l'utilisation d'un substrat pour la production d'énergie inhibait l'utilisation de l'autre. De plus, plusieurs études ont montré que ce mécanisme est non seulement présent dans le cœur mais aussi dans le foie et les cellules β du pancréas, confirmant ainsi que le cycle de Randle fonctionne au niveau de l'organisme en entier (pour une revue récente (140). Depuis les 40 dernières années, plusieurs mécanismes biochimiques impliqués dans

cette régulation allostérique concertée du métabolisme des glucides et celui des lipides dans le muscle cardiaque ont été décrits (pour revue (140; 194)).

Ainsi, le taux d'oxydation du pyruvate dépend du degré de phosphorylation de PDH qui est déterminé par une PDH kinase (PDK) spécifique et des PDH phosphatases. La PDH peut être inhibée par la phosphorylation de la sous-unité E_1 du complexe par la PDK4, l'isoforme de la PDK le plus exprimé dans le cœur (347). Plusieurs facteurs favorisent l'activité de la PDK4 et donc inhibent l'oxydation des glucides. PDK est inhibée par le pyruvate et par des changements au niveau du statut énergétique de la cellule, c'est-à-dire une diminution des ratios acétyl-CoA/CoA libre et NADH/NAD⁺.

En outre, une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire augmente l'activité des PDH phosphatases et, ainsi, induit l'activation de PDH. En conséquence, une diminution de l'oxydation des AGs aura l'effet inverse sur l'activité de la PDK4 et donc favorisera l'oxydation des glucides. Cette inhibition de l'oxydation des glucides due à PDK4 et à l'augmentation de l'oxydation des AGs est aussi observée dans les cellules du muscle squelettique (346) ainsi que dans plusieurs autres types cellulaires comme les cellules rénales et hépatiques (345).

Finalement, en plus de pouvoir être converti en lactate ou en acétyl-CoA, le pyruvate peut être transformé en deux intermédiaires du CAC, le malate et l'OAA, par l'enzyme malique cytosolique NADP⁺-dépendante et la pyruvate carboxylase (PC) respectivement (164). Ces réactions sont dites anaplérotiques et sont utiles afin de maintenir les niveaux des intermédiaires catalytiques du CAC (106). L'anaplérose est un processus biochimique important qui compense pour la « cataplérose », un terme référant à l'efflux d'intermédiaires du CAC comme le citrate et, dans une moindre mesure, le succinate, l' α -cétoglutarate et le fumarate (240). L'équilibre entre ces deux processus, qui assurent le maintien des intermédiaires du CAC, est une condition essentielle à l'homéostasie et à la survie de la cellule (39). Le rôle de l'anaplérose et son importance sont davantage reconnus dans le foie, où elle est essentielle pour maintenir la néoglucogenèse hépatique, ainsi que pour le cycle de l'urée. Dans le cerveau, l'anaplérose intervient dans la régulation des neurotransmetteurs (39). De

plus, un rôle crucial pour l'anaplérose a aussi été rapporté dans les cellules β du pancréas pour la sécrétion de l'insuline (90; 198). Son rôle crucial pour la contraction optimale du cœur a été démontré dans des études où la performance mécanique du cœur perfusé *ex vivo* en absence de glucose diminuait rapidement lorsque le perfusât contenait seulement des précurseurs d'acétyl-CoA et était améliorée par l'ajout de substrats anaplérotiques (267; 268). La disponibilité en oxygène, la charge de travail et l'abondance des substrats sont des facteurs qui modulent l'anaplérose ainsi que la cataplérose (326; 328). Dans le cœur en conditions normoxiques, la carboxylation du pyruvate en OAA ne compte que pour 2 à 6% du flux du CAC, cette voie semble essentielle au maintien de l'intégrité cellulaire. L'importance de l'anaplérose au niveau cardiaque dans des conditions pathophysiologies reste toutefois à être démontrée (pour revue (74)).

1.2.1.3 Le métabolisme des AGs

Le métabolisme lipidique est complexe et requiert plusieurs étapes importantes, telles que la captation des AGs dans la cellule, l'activation, le transport vers la mitochondrie et l'oxydation. L'essentiel de ce métabolisme est illustré dans la figure 2 (page 15).

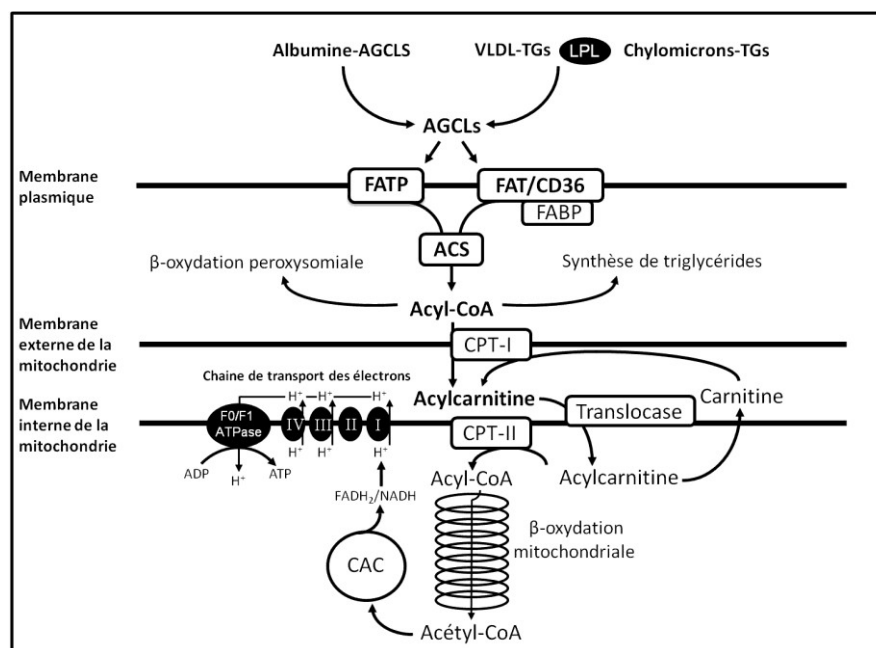


Figure 2 : Métabolisme des acides gras à chaîne longue (adaptée de (97)).

ACS : acyl-CoA synthétase, FAT : *fatty acid translocase*, FATP : protéine de liaison des acides gras, LPL : lipoprotéine lipase, TGs : triglycérides, VLDL : lipoprotéine de très faible densité.

Les différentes étapes du métabolisme lipidique décrites dans la section suivante sont tirées de plusieurs articles de revue (84; 108; 194; 336).

1.2.1.3.1 Les sources d'AGs

Le cœur est incapable de synthétiser des AGs *de novo* et, de plus, il ne possède que des quantités restreintes de réserves sous forme de triglycérides (TGs). Par conséquent, les AGs exogènes, provenant de l'alimentation, de la synthèse hépatique et des réserves de TGs dans les tissus adipeux (TA), sont d'importants substrats pour les cellules du muscle cardiaque. Les AGs sous forme de TGs provenant de la diète doivent être hydrolysés par les lipases pancréatique et linguale puis absorbés par les cellules du jéjunum et de l'iléon avant d'être ré-estérifiés et incorporés dans les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Les niveaux d'AGs libres circulants sont normalement de 0,2 à 0,6 mM (300), mais peuvent varier

considérablement selon les conditions, comme dans certaines pathologies, telles que le diabète, et à la suite d'une augmentation de la lipolyse des TA via la stimulation adrénergique de différentes enzymes lipolytiques, comme la lipase hormono-sensible (HSL) et la lipase des TGs du TA (ATGL) sous l'action du système nerveux sympathique. Les variations des niveaux circulants d'AGs libres ont un impact important sur l'activité de la voie de la β -OX. La majorité des AGs circulants se retrouvent sous forme de TGs contenus dans les chylomicrons et les VLDLs, en quantité moins importante (131). La captation de ces AGs nécessite l'hydrolyse des TGs par la lipoprotéine lipase (LPL). Les TGs intracellulaires, via l'action d'ATGL et d'HSL s'avèrent aussi une source d'AGs pour le cœur. Les enzymes lipolytiques, LPL et HSL, sont contrôlées par le système hormonal et le statut nutritionnel, et donc par l'apport en AGs. Les mécanismes ainsi que les rôles de la mobilisation lipidique et de la lipolyse seront abordés plus en détails dans le prochain paragraphe.

1.2.1.3.2 La régulation de la mobilisation lipidique

L'inhibition de la LPL par des moyens pharmacologiques est responsable d'une diminution importante de la captation des AGs issus des TGs, alors que celle des AGs libres n'est pas modifiée, suggérant ainsi un rôle indispensable de la LPL dans la captation des AGs *in vivo* (14). La LPL est fabriquée par les cardiomyocytes avant d'être sécrétée à leur surface puis transloquée à la face interne de l'endothélium des capillaires sous sa forme active (211). Ainsi la quantité d'AGs disponibles pour la β -OX dépend de l'hydrolyse de ces TGs par la LPL endothéliale (180). La LPL est dégradée soit par sa libération dans la circulation sanguine et dégradation hépatique, soit par son internalisation dans des vésicules d'endocytose dans les cellules endothéliales (252). Étant donné la stimulation de son activité par l'insuline, la LPL est très active à l'état nourri. Toutefois, lors du jeûne, son activité est diminuée au niveau du TA, mais augmentée au niveau cardiaque de manière à favoriser l'utilisation des TGs (252). Ainsi, l'activité de la LPL est un facteur qui contribue à la régulation de l'utilisation des lipides par le cœur. Toutefois, les niveaux d'AGs circulants s'avèrent aussi un facteur très important de cette régulation.

Chez le mammifère, les TGs des TA forment la réserve la plus importante d'énergie dans les périodes de jeûne. La balance énergétique de l'organisme dépend non seulement de l'oxydation des substrats pour la production d'énergie, mais aussi de la mobilisation des lipides qui se retrouvent dans ces réserves. Un débalancement entre la synthèse et l'hydrolyse des TGs mène au développement de désordres métaboliques, comme l'obésité, le syndrome métabolique et la lipodystrophie (280).

La mobilisation des lipides est régulée par des enzymes lipolytiques, ATGL et HSL. Les souris déficientes pour une de ces 2 enzymes ont une capacité réduite à mobiliser les AGs des réserves du TA (119; 120). De plus, Schweiger et collaborateurs ont montré, à l'aide de ces deux types de souris transgéniques qu'aucune autre enzyme ne semble être en mesure de compenser pour leur absence (280). HSL a longtemps été considérée comme étant la principale enzyme impliquée dans l'hydrolyse des TGs dans les TA, cependant il a finalement été montré qu'ATGL est l'enzyme principale (358). Les souris déficientes pour HSL ne développent pas d'obésité et hydrolysent de manière efficace les TGs, mais accumulent des diglycérides (DAGs), dans différents tissus. Il est donc maintenant accepté que l'activité d'HSL se situe d'avantage au niveau de l'hydrolyse des DAGs (120). L'activité de cette enzyme serait en effet ~10 fois plus importante envers les DAGs que les TGs (357).

ATGL, quant à elle, est présente dans le TA, mais aussi dans le cœur, dans les muscles squelettiques ainsi que dans d'autres types cellulaires. Cette enzyme est responsable de la première étape de l'hydrolyse des TGs produisant ainsi des DAGs et des AGs libres. Les souris déficientes pour ATGL montrent un phénotype beaucoup plus sévère que celui des souris déficientes pour HSL. Ces souris ont des dépôts lipidiques beaucoup plus importants que la souris HSL et montrent une diminution importante (~80%) de l'hydrolyse des TGs dans le TA blanc (119). De plus, elles sont extrêmement sensibles au froid et leur température corporelle chute de manière importante suite à un jeûne, ce qui indique qu'en absence d'ATGL, les TAs sont incapables de fournir suffisamment d'AGs pour maintenir l'homéostasie

énergétique (357). Au niveau cardiaque, les souris déficientes pour ATGL montrent une infiltration lipidique environ 20 fois plus importante que celle des souris témoins pour une consommation alimentaire identique. Cette infiltration lipidique est âge-dépendante et les analyses histologiques révèlent d'importantes accumulations sous forme de gouttelettes lipidiques entre 6 et 18 semaines. Cette accumulation de gras dans le muscle cardiaque mène à une insuffisance cardiaque, à une augmentation de la fibrose dans le cœur et à l'induction d'apoptose. Cette sévère dysfonction cardiaque cause une mort prématurée des animaux à partir de seulement 12 semaines de vie (119). De plus, une étude comparant le métabolisme énergétique et la performance physique des souris déficientes pour HSL ou ATGL a montré que seules les souris déficientes pour ATGL ont une capacité d'endurance réduite (141). L'accumulation lipidique au niveau cardiaque et le développement de la cardiomyopathie peuvent contribuer à cette diminution de la capacité d'endurance lors de périodes d'exercice. Par ailleurs, une étude menée avec des souris transgéniques déficientes en totalité pour ATGL à l'exception du cœur montre que ces animaux sont protégés contre l'accumulation des TGs dans le cœur et ont une espérance de vie normale. En contrepartie, dans ce modèle animal, l'absence d'ATGL au niveau systémique, à l'exception du cœur, a des effets sévères sur le métabolisme, de manière semblable à ce qui est observé chez la souris entièrement déficiente en ATGL. Ces effets sont illustrés par une capacité d'endurance diminuée et des niveaux hépatiques de glycogène diminués à la suite d'un exercice modéré, suggérant ainsi une augmentation de l'utilisation des glucides liée à l'incapacité à mobiliser les AGs du TA (275).

Une déficience en ATGL est aussi connue chez l'humain. À ce jour, seulement 5 individus ont pu être identifiés avec ce désordre génétique. Ces patients, bien qu'ils ne soient pas obèses, présentent une hypertriglycémie et souffrent de myopathie, d'anomalies cardiaques et d'hépatomégalie (3). Il n'est pas clair à ce jour que l'importance d'ATGL soit la même chez l'homme que chez la souris. Certaines études suggèrent que cette enzyme ne soit pas impliquée dans la lipolyse des

adipocytes chez l'homme, tandis que d'autres lui assignent un rôle crucial (357). Les mécanismes qui sous-tendent la régulation de la lipolyse sont de mieux en mieux décrits. HSL et ATGL sont toutes deux régulées de manière hormono-sensible, c'est-à-dire qu'elles relâchent dans la circulation des AGs libres provenant des adipocytes sous l'action de différentes hormones, dont les catécholamines, et leur activité est inhibée sous l'action de l'insuline (137; 357). Malgré tout, ces deux enzymes sont activées de manière différente. D'une part, pour HSL, la liaison d'agonistes à des récepteurs β -adrénergiques associée à une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase via la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G induit une augmentation des niveaux d'AMP cyclique et l'activation de la protéine kinase A (PKA). PKA est impliquée dans l'augmentation de la lipolyse via la phosphorylation de HSL et des périlipines (137), des protéines liées à la surface des gouttelettes lipidiques et nécessaires à la lipolyse (357). Il a aussi été montré que HSL peut aussi être phosphorylée et activée par ERK1/2 (extra-cellular-signal-regulated kinase), via la stimulation des récepteurs β_3 -adrénergiques (137). Une étude menée dans notre laboratoire a permis de montrer une implication de la voie de signalisation du cGMP dans la stimulation de la lipolyse via HSL et la prévention de l'accumulation de TGs dans les cardiomyocytes à la suite d'un jeûne (159).

ATGL ne nécessite pour sa part pas de phosphorylation pour être activée. Toutefois, l'activité d'ATGL est grandement stimulée par sa liaison avec protéine activatrice, le CGI-58 (*comparative gene identification-58*) (174). L'activité d'ATGL est augmentée de 20 fois chez la souris et de 5 fois chez l'homme en présence de CGI-58 et son activité est 5 fois plus importante chez l'homme, toutefois, le mécanisme qui régule la liaison d'ATGL avec CGI-58 est encore inconnu (pour revue (357)). Chez l'homme, une mutation de CGI-58 cause le même type de symptômes que les déficits en ATGL, additionné d'une ichtyose (101). Le même genre de phénotype est observé chez la souris déficientes pour CGI-58, suggérant un rôle pour CGI-58 au niveau de la peau (253).

1.2.1.3.3 Captation et transport des AGs

Les AGs issus de l'hydrolyse des TGs ou liés à l'albumine entrent dans la cellule par diffusion passive ou via une protéine de transport. Trois protéines sont connues pour être impliquées dans la captation des AGs : i) l'isoforme membranaire de la protéine de liaison des AGs (*fatty acid binding protein* ; FABP), ii) les protéines de transport des AGs (*fatty acid transport proteins* ; FATPs) et iii) les translocases qui, dans le cœur, sont connues sous la forme du CD36 (*fatty acid translocase* ; FAT/CD36). Bien que non essentielle, FATP/CD36 semble être la protéine la plus importante dans la translocation des AGs à travers la membrane du sarcolème dans les cardiomyocytes puisqu'elle est responsable de l'entrée de 50 à 80% d'AGs dans le cœur (36; 166). À ce jour, les mécanismes précis de la captation des AGs par le CD36 et la spécificité des différents AGs pour les transporteurs ne sont pas complètement élucidés. La captation des AGs est régulée par le gradient à travers la membrane du sarcolème (320). Une fois entrés dans la cellule, les AGs sont rapidement estérifiés au coenzyme A (CoA), formant ainsi un acyl-CoA à chaîne longue, une réaction catalysée par l'acyl-CoA synthétase. Ce mécanisme permet d'éviter l'élévation des niveaux d'AGs libres dans la cellule et de maintenir le gradient propice à la captation de nouveaux AGs (196). Les acyl-CoA ainsi formés peuvent être utilisés pour la synthèse de lipides complexes comme les phospholipides (PLs) et les TGs. Toutefois, une fois dans la cellule cardiaque, environ 80 % des AGs sont plutôt rapidement transportés dans la mitochondrie pour y être oxydés via la β -OX mitochondriale, bien que les AGs à chaînes très longues (>22 carbones) doivent d'abord être oxydés par la β -OX peroxysomale, qui représente environ 10% de la β -OX totale. Le but de cette oxydation peroxysomale, qui n'aboutit pas à la production d'ATP, est de produire des AGs de chaîne plus courte qui pourront ensuite être acheminés vers la mitochondrie sous forme de carnitine-esters ou sous forme libre pour une oxydation finale (335). Les 20 % d'AGs qui ne sont pas oxydés peuvent être convertis en TGs par la glycérophosphate acyltransférase (54). L'enzyme limitante de la synthèse de TGs dans le cœur est la diacylglycérol acyltransférase (DGAT1) qui convertit les DAGs en TGs. L'activité de cette enzyme peut être modifiée selon les

conditions. Par exemple, chez la souris, 2 semaines d'exercice induisent une hypertrophie du myocarde liée à une augmentation du contenu en TGs et une augmentation de l'expression génique de DGAT1. Cette augmentation de l'expression de DGAT1 semble être une adaptation métabolique bénéfique qui permet une meilleure capacité d'exercice (191). Les TGs contribuent au dynamisme du métabolisme cardiaque et sont des substrats qui peuvent être mobilisés facilement pour la production d'énergie (300). Il a été montré *ex vivo* qu'en présence d'AGs le turnover des TGs peut produire ~10% de l'ATP dans des cœurs perfusés en présence d'oxygène et que cette contribution peut augmenter jusqu'à 50% lorsque les niveaux d'AGs sont réduits (270).

Pour être oxydé et ainsi contribuer à la production énergétique, l'acyl-CoA à longue chaîne doit traverser les deux membranes de la mitochondrie, lesquelles leur sont imperméables. Pour y parvenir, les acyl-CoA doivent utiliser la navette liée à la carnitine, le système de la carnitine palmytoyltransférase. Ce système comprend des protéines de transfert : la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT-I), la carnitine acyltranslocase et la carnitine palmitoyltransférase II (CPT-II). CPT-I catalyse la formation d'un acylcarnitine à longue chaîne à partir d'un acyl-CoA entre les membranes externe et interne de la mitochondrie, la carnitine acyltranslocase transporte cet acylcarnitine à longue chaîne à travers la membrane interne de la mitochondrie en échange de carnitine libre, puis CPT-II régénère l'acyl-CoA à longue chaîne à l'intérieur de la mitochondrie où il sera β -oxydé (164). CPT-I, qui est un site de régulation très important du métabolisme lipidique, existe sous 2 isoformes. CPT-I α (ou L-CPT-I) est la forme prédominante dans le foie, tandis que CPT-I β (ou M-CPT-I), qui est aussi beaucoup plus sensible au malonyl-CoA, son principal inhibiteur physiologique, est la forme prédominante dans cœur et le muscle squelettique (138). Lorsque les niveaux circulants de glucose augmentent, il y a une augmentation de la production de pyruvate et une augmentation de son oxydation en acétyl-CoA ou de sa carboxylation en OAA, deux processus menant à la production de citrate. Certaines évidences suggèrent qu'une partie du citrate ainsi produit est

exporté à l'extérieur de la mitochondrie vers le cytosol pour régénérer de l'OAA et de l'acétyl-CoA via l'action de l'ATP citrate lyase (246). Cet acétyl-CoA sera à tour carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Figure 3, page 22).

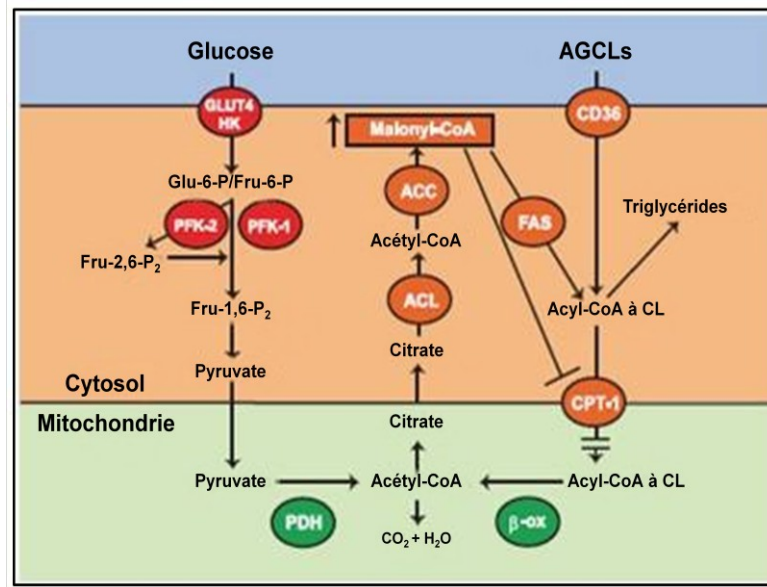


Figure 3 : Régulation allostérique de l'oxydation des AGs par les glucides (Adaptée de (140)).

ACC : acétyl-CoA carboxylase, ACL : ATP citrate lyase

À l'opposé, la dégradation du malonyl-CoA est régulée par l'activité de la malonyl-CoA décarboxylase (MCD), qui convertit le malonyl-CoA en acétyl-CoA et en CO_2 dans la mitochondrie et le cytosol (138). Ainsi, si l'activité d'ACC est faible et que la MCD est assez active, les niveaux de malonyl-CoA seront bas, levant son inhibition de CPT-1 et favorisant l'entrée des AGCLs à l'intérieur de la mitochondrie pour y être oxydés. Plusieurs études ont montré que dans des conditions associées à une augmentation des niveaux d'oxydation des AGs, comme le jeûne, le diabète ou l'ischémie, l'activité de la MCD est augmentée. De plus, plusieurs évidences directes montrent que l'activité d'ACC est inversement liée à l'oxydation des AGs dans le cœur (pour revue (194)).

1.2.1.3.4 β -oxydation mitochondriale

La β -OX mitochondriale (Figure 4, page 23) peut être illustrée comme une spirale comprenant 4 étapes importantes dont chaque tour de cycle raccourcit la chaîne de carbone de l'acyl-CoA de 2 carbones et produit une molécule d'acétyl-CoA destinée à entrer dans le CAC ainsi qu'une molécule de NADH et de FADH₂. Ces équivalents réduits sont directement transférés à la chaîne respiratoire par un système de flavoprotéines (ETF et ETF-DH).

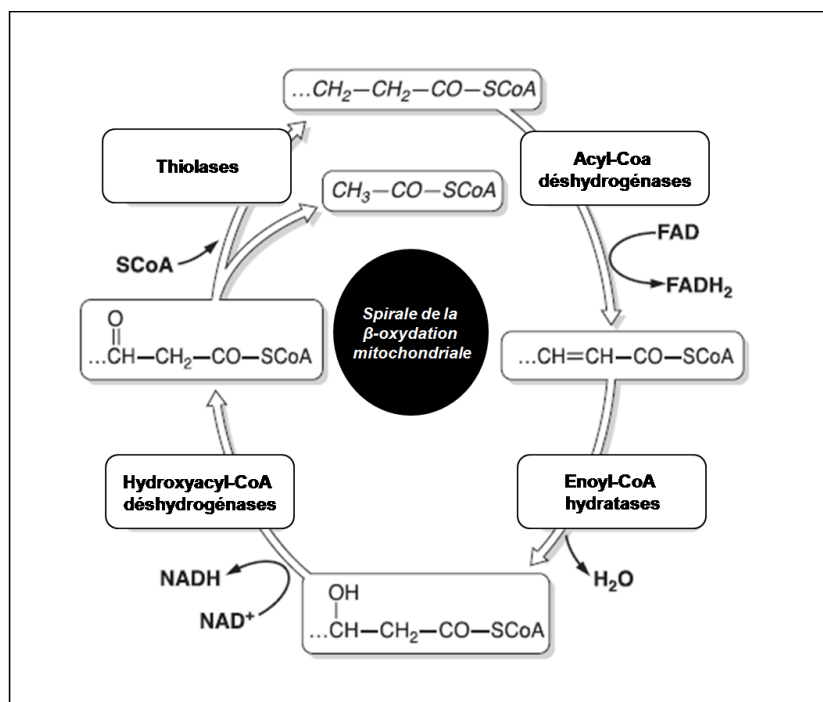


Figure 4 : β -oxydation mitochondriale (Adaptée de (194)).

Les quatre réactions enzymatiques de la β -oxydation mitochondriale nécessaires pour aboutir à la production d'une molécule d'acétyl-CoA sont les suivantes (336) (Figure 4, page 23):

(1) Déshydrogénases des acyl-CoA (ACADs). Les ACADs catalysent la première étape limitante de la β -OX mitochondriale des AGs et des AGs   chaîne branchée, elles sont responsables de la première déshydrogénation que l'acyl-CoA devra subir ainsi que de la production d'une molécule de $FADH_2$. L'activité de ces enzymes varie en fonction de la longueur de la chaîne de carbone de l'acyl-CoA (Figure 5. Page 24). Le génome humain compte plusieurs membres de la famille des ACADs, dont plusieurs sont connues comme étant directement impliquées dans la β -OX des AGs (305) ; i) pour les très longues chaînes (*very long chain acyl-CoA dehydrogenase*, VLCAD) ii) pour les longues chaînes (*long chain acyl-CoA dehydrogenase*, LCAD), iii) pour les chaînes moyennes (*medium chain acyl-CoA dehydrogenase*, MCAD) et iv) pour les chaînes courtes (*short chain acyl-CoA dehydrogenase*, SCAD).

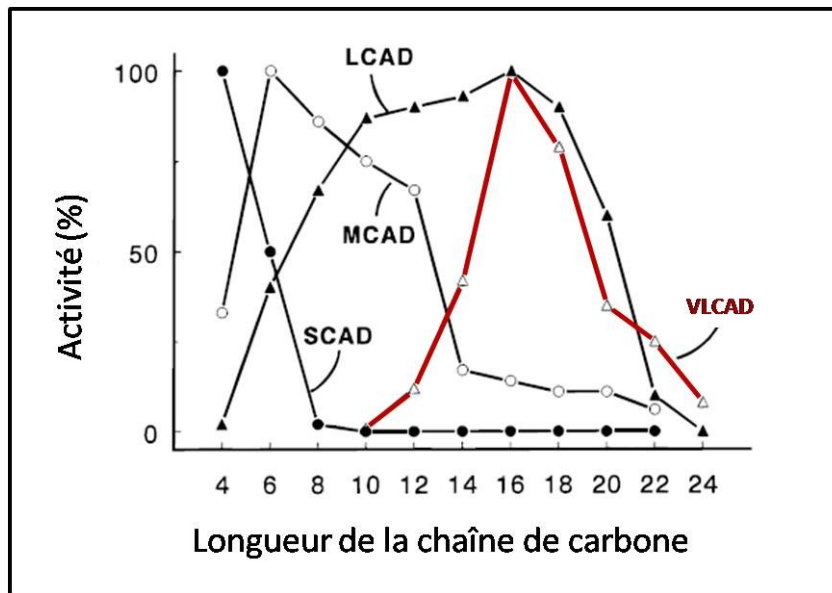


Figure 5 : Activité des différentes ACADs isolées de cellules hépatiques de rat (adaptée de (336)).

LCAD : déshydrogénase des acyl-coA   chaîne longue, MCAD : déshydrogénase des acyl-coA   chaîne moyenne, SCAD : déshydrogénase des acyl-coA   chaîne courte, VLCAD : déshydrogénase des acyl-coA   chaîne très longue.

Plus récemment, ACAD9, une nouvelle enzyme membre dans la famille des déshydrogénases des acyl-CoA, a été identifiée (355). Cette nouvelle enzyme a une affinité plus particulière pour les AGs insaturés à longue chaîne (85). Dernièrement, 2 nouvelles ACADs, ACAD10 et ACAD11 ont été caractérisées. Bien qu'elles soient présentes dans le cœur, ces nouvelles ACADs semblent jouer un rôle plus important au niveau du système nerveux central. De plus, elles ne semblent pas être impliquées dans la production d'énergie, mais plutôt dans la synthèse et la dégradation des certaines classes de lipides (133).

(2) Enoyl-CoA hydratases. Il en existe deux types, I) la crotonase, qui est active sur les chaînes moyennes et les chaînes courtes, et II) l'hydratase des enoyl-CoA à chaîne longue, active sur les chaînes longues. Ces enzymes sont responsables de l'hydratation des 2-trans-enoil-CoA en L-3-hydroxyacyl-CoA. Ces enzymes ne sont pas connues comme ayant un rôle particulier dans le contrôle du flux de la β -OX (84).

(3) Déshydrogénases des hydroxyacyl-CoA. Ces enzymes sont responsables de la seconde déshydrogénation du cycle, elles transforment les 3-hydroxyacyl-CoA en 3-oxoacyl-CoA. Encore une fois, il en existe deux types, une active sur les chaînes longues (LCHAD) et l'autre sur les chaînes courtes (SCHAD).

(4) Thiolases. Ces enzymes permettent le clivage du 3-oxoacyl-CoA en acétyl-CoA et en acyl-CoA réduit de 2 carbones, il s'agit de la dernière étape du cycle. Il en existe 3 types connus, la méthylacétoacétyl-CoA thiolase mitochondriale, une thiolase spécifique pour les chaînes moyennes (MCKAT) et une pour les chaînes longues (LCKAT).

L'acétyl-CoA ainsi produit va entrer dans le CAC et l'acyl-CoA réduit de deux carbones reprendra un autre cycle de β -OX. L'acétyl-CoA produira 3 molécules additionnelles de NADH et une de FADH₂ dans le CAC. La production d'ATP par la β -oxydation ne se fait pas seulement directement par la production d'acétyl-CoA, mais aussi par la production d'équivalents réduits qui sont produits à chaque tour de

cycle. Ainsi, la β -OX dans un organe ayant des grands besoins énergétiques, comme le cœur, est aussi contrôlée par les niveaux d'ATP et l'état rédox de la cellule, c'est-à-dire le ratio NAD^+/NADH (84). De plus, les activités de certains enzymes, et donc le flux de la β -OX, sont aussi contrôlées par la rétroaction de certains produits. Par exemple, les déshydrogénases des acyl-CoA peuvent être inhibées par leurs produits 2-enoyl-CoA (66; 249).

1.2.1.4 Le métabolisme de corps cétoniques

Les corps cétoniques (CC), l'acétoacétate (AcAc) et le β -hydroxybutyrate (β -HB), sont des composés dérivés de la β -OX hépatique des AGs qui sont exportés vers les tissus périphériques. L'insuline est un puissant inhibiteur de la cétogenèse ; la synthèse des CC est donc régulée par le ratio insuline/glucagon (215). Ainsi, lors d'un jeûne, période pendant laquelle la lipolyse est activée afin de fournir des AGs aux différents tissus, la cétogenèse est augmentée. Cette synthèse de CC est aussi stimulée lors d'un diabète mal contrôlé, en raison du faible niveau d'insuline et de l'augmentation des concentrations des AGs (124). Dans ces conditions, les CC sont particulièrement importants pour les tissus extra-hépatiques, comme le myocarde, mais aussi pour le cerveau, lequel est incapable d'oxyder complètement les AGs (164). En diminuant l'utilisation du glucose, les CC avec les AGs contribuent donc à l'économie du glucose, un mécanisme essentiel à la survie au niveau cérébral en période de jeûne prolongé.

Les CC circulent dans le sang jusqu'à la mitochondrie dans les cellules cardiaque de manière passive. Ils appartiennent à la famille des monocarboxylates, comme le lactate et le pyruvate, et donc entrent dans la cellule et dans la mitochondrie en utilisant le MCT (123). L'oxydation des CC en acétyl-CoA nécessite 2 enzymes, la succinyl-CoA oxoacide transférase (SCOT) et l'acétoacétyl-CoA thiolase mitochondriale.

1.2.2 La régulation transcriptionnelle

La flexibilité métabolique du cœur est primordiale au maintien de sa fonction contractile. La modification à long terme dans le choix des substrats énergétiques implique une régulation transcriptionnelle des différentes enzymes du métabolisme cardiaque. Les récepteurs activés de la prolifération des peroxyosomes (PPARs) et les coactivateurs-1 de PPAR γ (PGC-1 α/β) sont les premiers facteurs de transcription qui ont été identifiés pour leur implication dans la régulation du métabolisme cardiaque dans les années 90 (333). D'autres facteurs de transcription sont connus pour avoir un rôle dans la régulation du métabolisme cardiaque, tel que le facteur induit par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor 1 α*), impliqué entre autre dans la régulation de GLUT1 et d'autres enzymes glycolytiques. Étant donné le rôle majeur des PPARs et de PGC-1 α dans la régulation génique des enzymes de la β -OX, ils seront décrits en détails dans les sections suivantes.

1.2.2.1 La famille des PPARs

Les 3 membres de la famille des PPAR (PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Une fois activés par leur liaison avec un ligand spécifique, les membres des PPARs forment un hétérodimère avec un membre de la famille des récepteurs nucléaires activés par l'acide rétinoïque (RXR), puis se lient à une région promotrice spécifique d'ADN (PPAR *response element* ; PPRE) sur des gènes cibles induisant ainsi leur expression. Les PPARs sont reconnus comme ayant des rôles dans le métabolisme des AGs, la différenciation cellulaire, l'athérosclérose, le contrôle du cycle cellulaire et la fonction immunitaire. Les différentes fonctions biologiques des PPARs ont d'ailleurs fait l'objet de plusieurs articles de revue (76; 82; 107; 148; 321; 322).

PPAR α

Les AGCLs comptent parmi les principaux ligands de PPAR α . Une fois activé, PPAR α induit la transcription des gènes impliqués aussi bien dans la captation (FAT/CD36, FATP1), le transport et l'estérification (FABP, glycérol-3-phosphate acyltransférase, CPT-1) que dans la β -OX mitochondriale (VLCAD, LCAD, MCAD) des AGs. PPAR α régule aussi l'expression de protéines impliquées dans l'oxydation des glucides (PDK4) et dans le couplage mitochondrial (UCP2 et UCP3) (97; 142; 350; 352). Ce facteur de transcription est particulièrement abondant dans les tissus qui ont un important métabolisme oxydatif, comme le foie, les muscles squelettiques et le cœur (35). Certaines études ont aussi mis en évidence le lien existant entre PPAR α et les altérations métaboliques connues dans certaines conditions physiologiques, comme le jeûne (156), et pathologiques, comme l'hypertrophie cardiaque et le diabète (pour revue voir (82; 194) (Figure 6, page 29). Plus récemment, une étude menée chez la souris a permis de mettre en évidence un lien entre le vieillissement et l'expression de PPAR α au niveau cardiaque. Cette étude rapporte une diminution de l'expression protéique de PPAR α associée à une diminution de l'expression de PDK4 et des modifications dans la contribution des différents substrats à la production d'acétyl-CoA avec l'âge, sans toutefois être liée à une diminution de la fonction cardiaque (144).

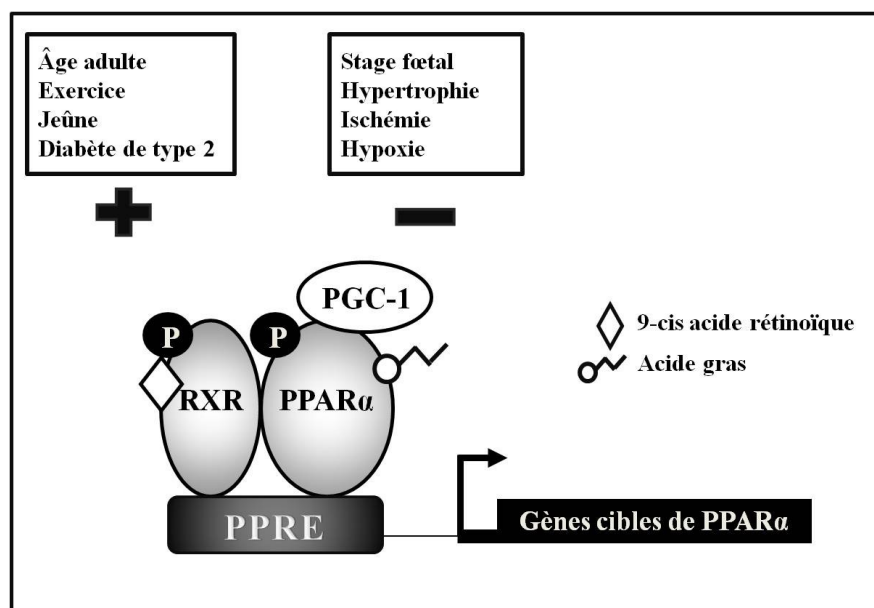


Figure 6 : PPAR α et sa régulation du métabolisme cardiaque dans des conditions physiologiques et pathologiques. (adaptée de (18)).

PGC-1 α : coactivateur de PPAR γ 1 α , PPAR α : récepteur activé de la prolifération des peroxysomes, PPRE : PPAR *response element*, RXR : récepteur nucléaire activé par l'acide rétinoïque

En outre, le rôle important de PPAR α dans la régulation du métabolisme cardiaque a été le sujet de nombreuses études utilisant différents modèles de souris transgéniques, dont la souris qui surexprime PPAR α de manière spécifique au cœur (MHC-PPAR α), un modèle largement utilisé dans l'étude du métabolisme cardiaque. Des études conduites chez cette souris montrent qu'une surexpression de PPAR α de manière cardio-spécifique induit une augmentation de la captation et de la β -OX des AGs, une surcharge lipidique, ainsi qu'une diminution du métabolisme glucidique, qui s'explique par des modifications transcriptionnelles (95). En effet, l'expression de PDK4, un inhibiteur de PDH et donc de l'oxydation des glucides, régulée par PPAR α , est augmentée dans les cœurs qui surexpriment ce facteurs de transcription. De plus, l'expression de GLUT4 et de PFK1 est diminuée. Ces changements métaboliques observés chez les souris MHC-PPAR α sont similaires à ceux observés dans le cœur diabétique et en font un bon modèle d'étude de la cardiomyopathie diabétique (96;

100). De plus, les différents effets métaboliques de l'augmentation de l'expression de PPAR α peuvent être accentués par l'utilisation de ligands synthétiques induisant son activité (100). À cet effet, une étude rapporte que l'administration *in vivo* d'un ligand synthétique de PPAR α induit une augmentation des niveaux d'ARNm de ses gènes cibles et ainsi de l'oxydation des AGs, associée à une diminution de l'efficacité cardiaque et de la fonction suite à l'ischémie (121).

Au-delà des changements métaboliques, ces souris présentent un remodelage de certains canaux K⁺ impliqués dans la repolarisation ventriculaire, plus précisément au niveau de la densité des canaux I_{to,f} (204). Des altérations de la repolarisation ventriculaire qui se présentent sous forme de prolongation de l'onde QT font partie du phénotype du cœur diabétique et sont impliqués dans la mort subite des patients diabétiques et non-diabétiques (323). Les souris MHC-PPAR α présentent une augmentation de l'intervalle QT. Par contre, comme ces animaux ont aussi une fréquence cardiaque plus basse que les témoins, cette augmentation de l'intervalle QT disparaît lorsqu'il est corrigé pour la fréquence (204). Malgré cela, il semble bien que les modifications métaboliques, telles que l'inhibition de l'utilisation du glucose, soient impliquées dans le remodelage de la densité de certains canaux et puissent être liées à l'apparition de troubles du rythme (204). D'autres études sont cependant nécessaires afin d'établir un lien direct entre ces deux phénomènes.

Par ailleurs, les effets d'une augmentation de l'expression de PPAR α ne se limitent pas au cœur. En effet, l'activation *in vivo* de PPAR α via l'administration de fénofibrates, des agonistes de PPAR α , induit une augmentation de l'oxydation peroxysomale et mitochondriale des AGs au niveau du foie et ainsi une diminution des niveaux plasmatiques d'AGs chez des souris obèses (1). Les fibrates, présentement utilisés dans le traitement des désordres métaboliques comme l'hyperlipidémie, sont des ligands synthétiques de PPAR α .

En contre partie, l'ablation du gène de PPAR α induit une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la voie métabolique de l'oxydation des AGs (42). La souris déficiente pour PPAR α est un modèle d'étude qui a suscité beaucoup d'intérêt (183).

Étant donné son rôle important dans l'élaboration des travaux de recherche de cette thèse, ce modèle animal sera décrit en détails dans une autre section.

PPAR β/δ

PPAR β/δ , dont le rôle est moins bien décrit que celui de PPAR α , est exprimé de façon ubiquitaire et de manière particulièrement importante dans le cœur néonatal et adulte (52). De manière semblable à ce qui est observé pour PPAR α , l'activation de PPAR β/δ suite à la liaison de son ligand provoque l'augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans l'oxydation des AGs dans des cardiomyocytes néonataux et adultes; et ce, même d'une manière indépendante de PPAR α (52). De plus, Cheng et al. ont montré qu'en plus de la diminution de l'expression de certaines enzymes de l'oxydation des AGs, l'ablation de manière cardio-spécifique de PPAR β/δ chez la souris induit le développement de cardiomyopathie sévère associée à une accumulation de lipides (51). En 2009, le même groupe a montré en utilisant le même modèle que, suite à une charge lipidique, il y a une augmentation de l'expression de certains gènes de l'oxydation des AGs, mais que cette augmentation ne suffit pas à prévenir le développement de la pathologie cardiaque associée à la déficience en PPAR β/δ . De plus, l'augmentation de l'expression de ces gènes métaboliques est reliée à l'augmentation de la voie PPAR α / PGC-1 α via la diminution des voies de signalisation d'Akt et de p42/44 MAPK (186). Finalement, étant donné son rôle dans la fonction immunitaire, le catabolisme lipidique dans le cœur, le muscle squelettique et le foie ainsi que dans la sensibilité à l'insuline, PPAR β/δ est envisagé comme cible thérapeutique possible pour le syndrome métabolique (55).

PPAR γ

PPAR γ est le troisième membre de la famille des PPARs. Exprimé principalement dans le TA, et très peu au niveau cardiaque, PPAR γ joue un rôle important dans la

différenciation des adipocytes (263) et son activation induit une diminution des niveaux circulants d'AGs (350). Malgré le fait que son implication directe sur le métabolisme cardiaque ait longtemps été considérée comme négligeable, plusieurs études ont montré que PPAR γ joue un rôle important au niveau du système cardiovasculaire (325). À cet égard, les thiazolidinediones (TZDs), des activateurs spécifiques de PPAR γ , ont été décrits comme ayant des propriétés pour améliorer la sensibilité à l'insuline et ont montré des effets bénéfiques dans le traitement du diabète de type 2 (45). D'autres montrent que les effets des agonistes de PPAR γ agissent au niveau vasculaire en diminuant l'expression des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales (243). Langenfeld et collaborateurs ont aussi montré que, malgré la forte corrélation avec l'action de sensibilisation à l'insuline, la protection vasculaire observée avec PPAR γ et ses ligands est indépendante des changements métaboliques et du contrôle glycémique (173). Au niveau cardiaque, plus spécifiquement, Son et collaborateurs ont montré que des souris transgéniques qui surexpriment PPAR γ dans les cardiomyocytes développent des cardiomyopathies dues à l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des AGs et une augmentation de la captation des TGs (290). De fait, l'utilisation des TZDs présente des effets secondaires, tels le gain de poids et l'apparition d'œdème, qui sont responsables de la détérioration de l'insuffisance cardiaque, une condition cardiaque souvent préexistante chez les patients au prise avec le diabète de type 2 (225; 244).

PGC-1

PGC-1 α et PGC-1 β sont deux coactivateurs transcriptionnels importants de la biogenèse mitochondriale. PGC-1 α est exprimé sélectivement dans les organes ayant un métabolisme oxydatif élevé, comme le cœur et les muscles squelettiques. Il a été impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique, incluant non seulement la biogenèse mitochondriale et la β -OX dans ces tissus, mais aussi la gluconéogenèse hépatique et la captation du glucose dans les muscles squelettiques (143). Les 2 isoformes de PGC-1 interagissent avec d'autres facteurs de transcription liés à des

éléments d'ADN sur des régions promotrices spécifiques pour certains gènes (98). PGC-1, un co-activateur essentiel à PPAR α , se lie à l'hétérodimère et recrute les autres cofacteurs qui sont essentiels à la régulation de la transcription génique (Figure 6, page 29) (18). Il active des gènes impliqués à plusieurs niveaux dans le métabolisme énergétique, que ce soit dans la captation des AGs, la β -OX des AGs, le CAC, le transport des électrons et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (143). Son expression est activée par différents stimuli qui induisent une augmentation de la demande en ATP. Ainsi, une stimulation de PGC-1 α par des stimuli physiologiques, comme l'exercice, ou pathophysiologiques, comme le jeûne et le diabète, produit des changements métaboliques importants, tels qu'une augmentation de la biogenèse mitochondriale, de l'oxydation des AGs et de l'OXPHOS. La surexpression de PGC-1 α de manière cardio-spécifique chez la souris adulte provoque la prolifération mitochondriale non contrôlée et des altérations dans la structure des mitochondries dans les cardiomyocytes (184). À l'opposé, une diminution de l'expression de PGC-1 α , observée dans le cœur fœtal, dans l'hypertrophie et dans l'insuffisance cardiaque, provoque l'effet contraire, c'est-à-dire une diminution de la biogenèse mitochondriale et de l'oxydation des AGs (99). Différentes voies de signalisation reliées au statut et à la demande énergétique sont aussi impliquées dans la régulation de PGC-1 α .

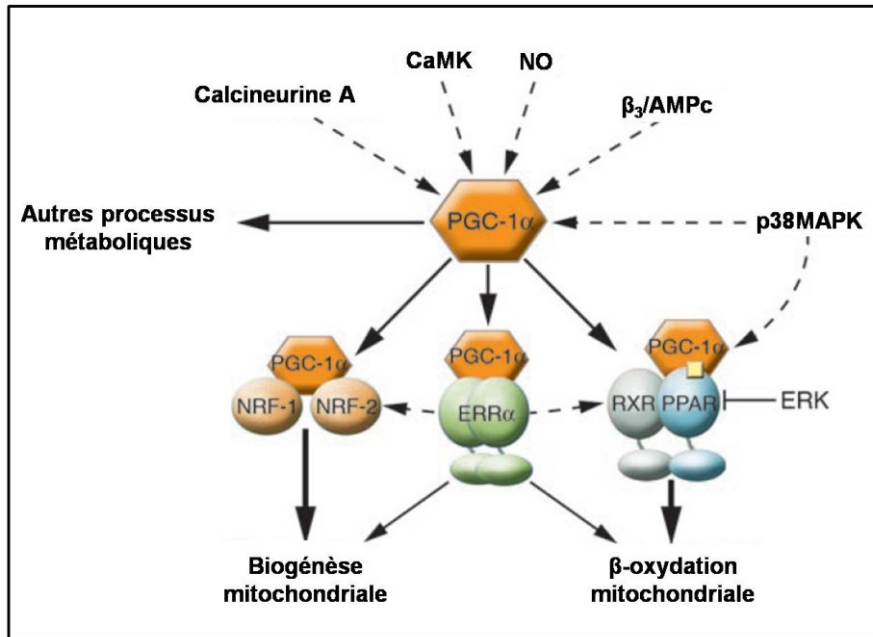


Figure 7 : Régulation en fonction de PGC-1 α (adaptée de (143))

AMPC : AMP cyclique, CaMK : calmoduline kinase, ERK : extra-cellular-signal-regulated kinase, ERR : récepteurs reliés à l'oestrogène, NRF-1 : nuclear respiratory factor-1, NRF-2 : nuclear respiratory factor-2

Les flèches achurées indiquent une activation via des voies signalisation, tandis que les flèches pleines indique une coactivation par PGC-1 α .

Outre les membres de la famille des PPARs, PGC-1 coactive des récepteurs nucléaires de la famille des récepteurs reliés à l'oestrogène (ERR) et des facteurs nucléaires 1 et 2 de la chaîne respiratoire (NRF-1 et NRF-2) (Figure 7, page 34). NRF1 et NRF2 sont impliqués dans la réplication et la transcription du génome mitochondrial via leur rôle dans la régulation de l'expression du facteur de transcription mitochondrial A.

1.2.3 La régulation du métabolisme cardiaque via les voies de signalisation

Parmi les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique cardiaque on retrouve aussi les différentes voies de signalisation. Les voies de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), de l'Akt et de mTOR figurent parmi les plus étudiées à ce jour. Les rôles de ces trois kinases, qui ont été le sujet de plusieurs travaux de

recherche ainsi que d'articles de revue (22; 27; 83; 127; 138; 232; 329), sont discutés dans la prochaine section.

1.2.3.1 La voie de l'AMPK

L'AMPK est un complexe hétérodimérique composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices (β et γ). Son activation dépend de la phosphorylation d'un résidu thréonine (Thr 172) contenu dans la sous-unité α par des kinases en amont (128). Il existe plusieurs isoformes pour chacune des sous-unités (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 , γ_3) donnant 12 combinaisons possibles d'holoenzymes qui sont distribuées différemment selon les tissus. L'isoforme contenant la sous-unité catalytique α_2 est la forme prédominante (60-80%) dans le cœur murin, tandis que dans le cœur humain, les sous-unités catalytiques α_1 et α_2 sont retrouvées en quantités égales (53). Plusieurs facteurs influencent l'activité de l'AMPK (Figure 8, page 36). Il s'agit d'une protéine sensible à l'état énergétique du cœur et elle est activée lorsque la production d'ATP est insuffisante pour combler la demande énergétique (augmentation du ratio ADP/ATP). Une augmentation des concentrations d'insuline et de l'activité de contraction musculaire provoque des changements importants au niveau de la signalisation intracellulaire. Ces changements incluent une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMP, AMPc, de Ca^{2+} et d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ; ROS), qui vont à leur tour activer AMPK (108). L'activité de l'AMPK peut aussi être modulée par des hormones, telles que la noradrénaline et leptine, et des agents pharmacologiques, comme la metformine (22). Plus récemment, il a été démontré que l'AMPK est au centre des effets métaboliques du resvératrol, un polyphénol naturel (317). Dans le cœur, l'AMPK est aussi phosphorylée et activée par LKB1, une kinase sérine/thréonine (271). La présence de LKB1 en amont de l'AMPK est essentielle au maintien de la fonction contractile du cœur (149).

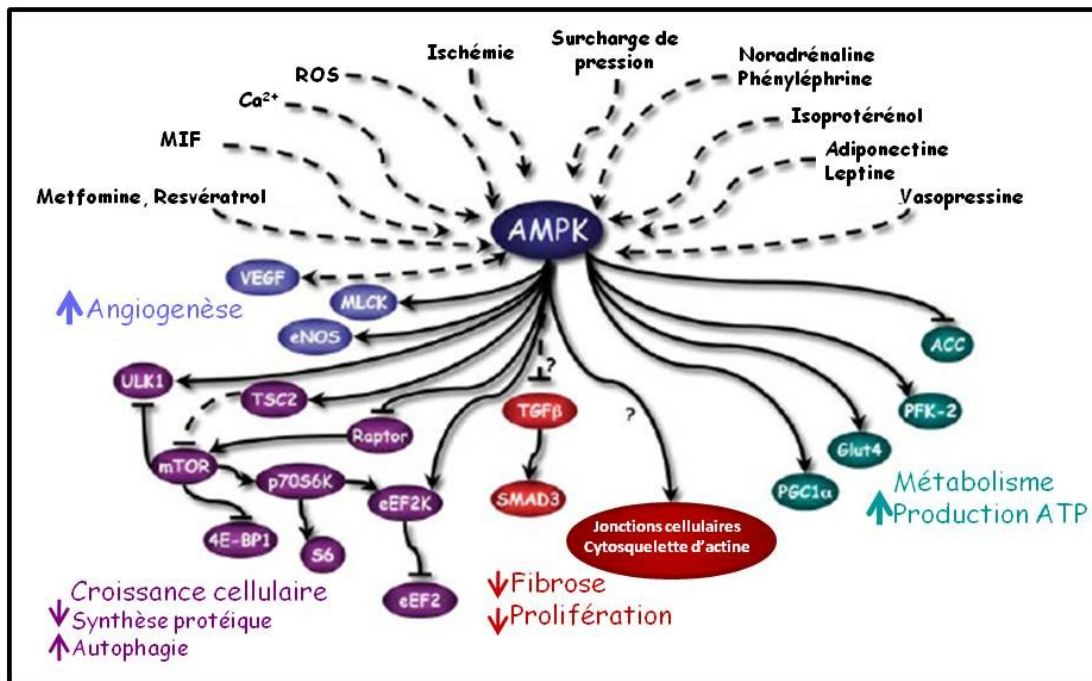


Figure 8 : Voie de signalisation de l'AMPK dans le cœur (adaptée de (22)).

4E-BP : protéine de liaison au facteur d'initiation eucaryotique 4E, AMPK : *AMP-activated protein kinase*, eNOS : synthase endothéliale de l'oxyde nitrique, mTOR : *mammalian target of rapamycin*, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TGFβ : *transforming growth factor β*, TSC2 : complexe de sclérose tubéreuse 2, VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Les lignes achurées correspondent à des mécanismes indirects.

À la suite de son activation, l'AMPK agit sur plusieurs cibles de manière à stimuler la production d'énergie et à limiter les processus anaboliques (Figure 8, page 36). De fait, l'activation de cette voie de signalisation stimule l'oxydation des glucides et des lipides et diminue la synthèse de glycogène, de TGs et de protéines. Les mécanismes qui sous-tendent ces effets de l'AMPK incluent autant la régulation à court terme, via la régulation de l'activité de canaux ioniques et d'enzymes métaboliques, mais aussi la régulation à long terme, via la modulation de l'expression de certains gènes, métaboliques ou autres, et la synthèse protéique. Par exemple, l'AMPK activée favorise le transport du glucose et des AGCLs en stimulant la translocation de GLUT4 et de CD36 des compartiments intracellulaires à la membrane. Plusieurs cibles d'AMPK, pouvant jouer un rôle dans la translocation des protéines de

transport, ont été identifiées à ce jour. Parmi celles-ci, AS160 semble être le point de rencontre des voies de signalisation de l'insuline et de la contraction musculaire pour la translocation des protéines de transport membranaires (281).

L'AMPK est aussi impliquée dans l'entrée des AGCLs dans la mitochondrie via son action dans la régulation de l'activité d'ACC. L'AMPK activée est capable de phosphoryler les 2 isoformes d'ACC (α ACC et β ACC) et ainsi de les inactiver. Ceci induit une diminution des niveaux de malonyl-CoA, levant son effet inhibiteur sur CPT-I, et ainsi augmente l'oxydation des AGCLs. À long terme, l'activation chronique de l'AMPK a des effets au niveau de la régulation de certains facteurs de transcription, de la stabilité des ARNm, de la traduction de protéine et de l'expression de certains gènes métaboliques, dont plusieurs impliquent l'activation de PGC-1 α .

Le rôle cardioprotecteur de l'AMPK dépasse ses effets au niveau métabolique. En effet, il a été démontré, il y a quelques années, que l'activation de l'AMPK inhibe la synthèse protéique associée à l'hypertrophie (44), action qui a pour effet de préserver l'ATP dans le but de maintenir la fonction contractile du cœur. Cette propriété de la voie LKB1/AMPK est intéressante au point de vue clinique puisque son activation, par exemple par le resvératrol, influence la synthèse protéique pour prévenir l'hypertrophie cardiaque (43; 79). L'action de la voie LKB1/AMPK passe via son inhibition la voie de la mTOR (cible de la rapamycine chez les mammifères) impliquée entre autre dans la croissance cellulaire, la synthèse protéique et l'autophagie. Un rôle plus direct de l'AMPK, sans l'intermédiaire de mTOR, dans la régulation de l'autophagie a été mis en évidence via son action sur la phosphorylation de ULK1, une kinase sérine/thréonine qui initie l'autophagie (129; 182). La sous-unité β de l'AMPK possède un site de liaison au glycogène, supportant aussi un rôle de cette voie de signalisation dans le métabolisme du glycogène, par contre le mécanisme exact n'a pas encore été élucidé (208).

1.2.3.2 La voie d'Akt/PKB

Akt (ou protéine Kinase B; PKB) est une kinase sérine/thréonine impliquée dans diverses fonctions cellulaires comme la synthèse protéique, la survie cellulaire et la régulation métabolique. Akt est un membre essentiel de la voie de signalisation de l'insuline et est impliquée dans la régulation de la flexibilité métabolique du cœur. La liaison de l'insuline à la sous-unité α de son récepteur induit un changement de conformation se traduisant par une autophosphorylation des résidus tyrosine de la sous-unité β du récepteur induisant le recrutement intracellulaire et la phosphorylation d'IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*). L'activation d'IRS-1 permet le recrutement subséquent et l'activation de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et ainsi la production de phosphoinositide-3,4,5 triphosphate qui active Akt (232) et ainsi induit la translocation de GLUT4 et FAT/CD36 au niveau du sarcolème (108; 195) (Figure 9, page 38).

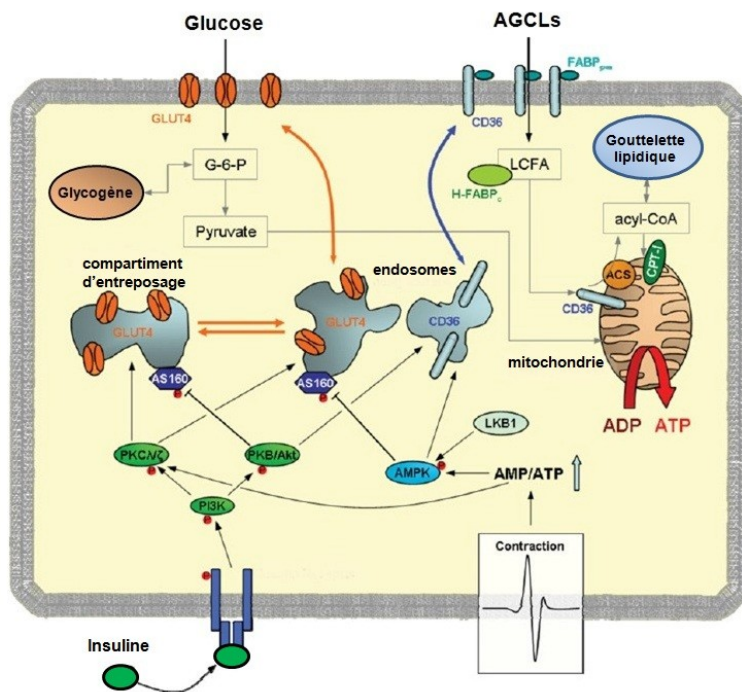


Figure 9 : Régulation de la captation du glucose et des AGCLs par l'insuline et la contraction musculaire, implication des voies de signalisation de l'AMPK et d'Akt. (Adaptée de (281))

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, PKB : protéines kinase B, PKC : protéine kinase C

De plus, Akt peut être activée par différents facteurs de croissance et hormones, tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et l'IGF-1 (*insulin growth factor-1*). Il existe 3 isoformes d'Akt dans le cœur (Akt1, Akt2, Akt3) qui présentent des fonctions biologiques différentes. Par exemple, bien qu'Akt1 et Akt2, les isoformes les plus abondants dans le myocarde, soient activés par l'insuline, il semble qu'Akt1 soit impliqué dans la croissance physiologique du cœur (70) et qu'Akt2 soit essentiel à la régulation de la captation du glucose. En effet, la captation et le transport du glucose stimulés par l'insuline sont bloqués dans des cardiomyocytes de souris déficientes pour Akt2 mais pas chez celles déficientes pour Akt1 (69). Cette diminution du métabolisme du glucose est compensée par une augmentation de la captation et de l'oxydation du palmitate dans les cardiomyocytes déficients pour Akt2. Parmi les cibles de phosphorylation connues d'Akt, notons les facteurs de transcription de la classe des FoxO (*forkhead box sous-classe O*), lesquels régulent l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire, le cycle cellulaire et le métabolisme, tels que PDK4 et LPL (319). En plus de leur effet direct sur la transcription génique, les FoxO ont un impact sur la régulation du métabolisme via leur association à d'autres facteurs de transcription, comme PGC-1 α . Un autre rôle important d'Akt est son implication au niveau de la prévention de l'apoptose des cardiomyocytes dans des situations pathologiques comme l'ischémie/reperfusion, l'hypoxie et l'hypoglycémie.

Tout comme pour l'APMK, les propriétés cardioprotectrices de l'Akt dépassent ses effets métaboliques. De plus, bien que dans la littérature les rôles d'Akt soient plus connus au niveau du cytoplasme et de la membrane, il est de plus en plus clair que l'accumulation d'Akt dans des compartiments cellulaires, indirectement via sa translocation ou directement via son activation dans les divers compartiments, comme le noyau et la mitochondrie, est un facteur clé de ses différentes activités biologiques (pour revue voir (218)). L'activation d'Akt dans le noyau dépend du réseau nucléaire de signalisation de PI3K/PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) présent dans les cardiomyocytes et qui peut être augmenté à la suite d'une stimulation par des facteurs cardioprotecteurs. Les différents mécanismes nucléaires impliqués dans

l'activation d'Akt dans les cardiomyocytes restent par contre à être confirmés. Cependant, il est connu que l'accumulation d'Akt dans le noyau produit une activité anti-apoptotique et induit l'activité de la Pim-1 kinase, une kinase sérine/thréonine appartenant au groupe des protéines kinases dépendantes de la calmoduline, qui a été décrite comme étant responsable des propriétés cardioprotectrices de Akt. En effet, l'accumulation d'Akt au niveau nucléaire ainsi que l'expression de Pim-1 sont induites dans des cardiomyocytes *in vitro* par des agents cardioprotecteurs comme IGF-1 (*insulin-like growth factor*) (221). *In vivo*, la délétion génétique de Pim-1 induit une augmentation de la taille de la zone infarctée et des altérations dans la voie de signalisation d'Akt suite à un infarctus du myocarde. À l'opposé, la surexpression de Pim-1 au niveau cardiaque permet le maintien de la fonction contractile suite à un infarctus du myocarde. Ces résultats chez la souris soulignent le rôle de Pim-1 dans les propriétés cardioprotectrices d'Akt.

En plus de ses effets au niveau du cytoplasme et du noyau, Akt a des effets directs au niveau mitochondrial. En effet, la translocation d'Akt vers la mitochondrie a été démontrée dans les cardiomyocytes à la suite d'une stimulation avec LIF ou au préconditionnement (pour revue (218) et (217)). Akt est impliquée à plusieurs niveaux dans la protection contre l'apoptose et la préservation de l'intégrité mitochondriale. L'activité anti-apoptotique de Akt passe aussi via plusieurs mécanismes, dont i) son implication dans la phosphorylation de Bad et Bax, des protéines pro-apoptotiques de la famille de la protéine Bcl-2; ii) son action au niveau de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), dont l'inhibition est cardioprotectrice en situation d'ischémie/reperfusion, via sa phosphorylation en Ser9, critique pour l'inhibition de l'ouverture du pore de transition mitochondrial; et iii) son action au niveau de la phosphorylation de l'hexokinase-II, aussi impliquée dans l'ouverture du pore mitochondrial.

1.2.3.3 La voie de mTOR

mTOR est une grosse protéine (280 kDa) kinase sérine/thréonine qui a des effets au niveau de l'organisme en entier. Cette enzyme contrôle entre autre la croissance cellulaire en réponse à la présence de nutriments (acides aminés) à des stimuli hormonaux (insuline et l'IGF-1) et le statut énergétique (AMP/ATP) (Figure 10, page 41).

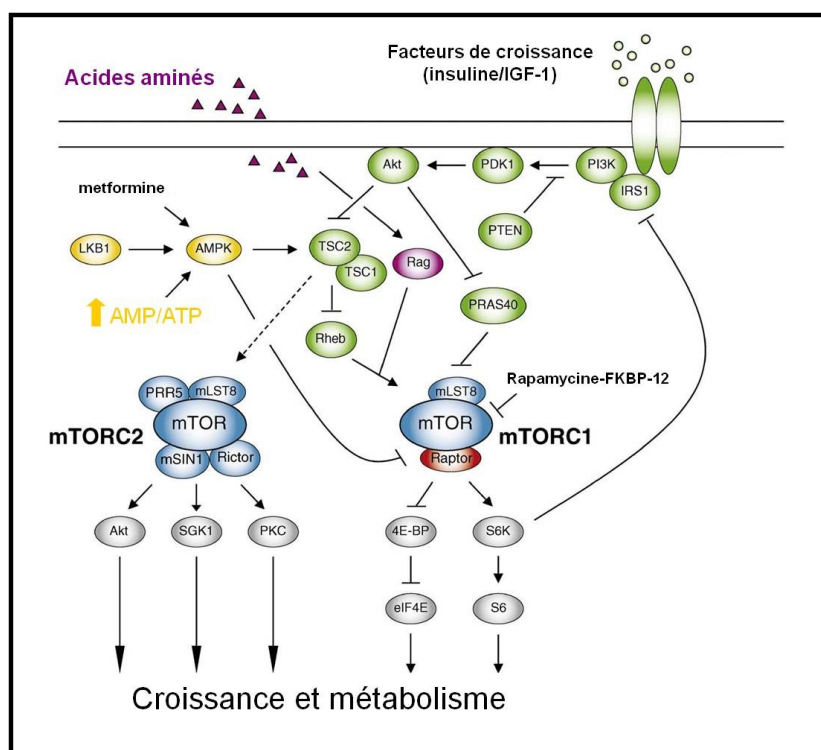


Figure 10 : Voie de signalisation de mTOR (adaptée de (247)).

IRS1 : *insulin receptor substrate 1*, mTORC1 : mTOR complexe 1, mTORC2 : mTOR complexe 2, PDK1 : *phosphoinositide-dependent kinase-1*, PRAS40 : substrat d'Akt/PKB de 40 kDa riche en proline, S6K : kinase S6, TSC1 : complexe de sclérose tubéreuse 1

Les nutriments sont les activateurs préférentiels de mTOR et ils peuvent l'activer en l'absence d'un autre signal (pour revue (125; 247)). mTOR se retrouve sous forme de 2 complexes multiprotéiques, le mTOR complexe 1 (mTORC1) et le mTOR complexe 2 (mTORC2), qui ont des effecteurs différents et qui contrôlent des

processus cellulaires distincts. En effet, mTORC1, composé de raptor, mLST8 et mTOR, est sensible à la rapamycine, un médicament immunosuppresseur, tandis que mTORC2, composé de rictor, mLST8 et mTOR, est insensible à ce composé. L'activation de la voie Akt/PKB par la liaison de l'insuline à son récepteur induit la phosphorylation et l'inactivation du complexe TSC2-TSC1 (complexes de sclérose tubéreuse 2 et 1) et PRAS40 (substrat d'Akt/PKB de 40 kDa riche en proline), deux protéines qui inhibent mTORC1. PRAS40 se lie directement à mTOR pour l'inhiber, tandis que TSC2 avec TSC1 permet l'inactivation de Rheb nécessaire à l'activité de mTOR. Ainsi, l'activation d'Akt induit l'activation de mTOR via 2 processus, i) en activant Rheb et ii) en induisant la phosphorylation de PRAS40 avec 14-3-3, levant ainsi son inhibition de mTOR (125). L'activation de mTOR par l'insuline et la voie d'Akt/PKB est corrélée à son niveau de phosphorylation en Ser2448. L'activité de mTORC1 est aussi régulée par le statut énergétique. Une fois activée, mTORC1 a deux cibles bien caractérisées, 4E-BP (protéine de liaison au facteur d'initiation eucaryotique 4E) et S6K (kinase S6), qui sont impliquées dans la régulation de processus cellulaires comme la traduction, la transcription, la biogenèse des ribosomes, l'autophagie et la sensibilité à l'insuline (Figure 10, page 41). Une augmentation de l'activité de la voie LKB1/AMPK suite à une augmentation du ratio AMP/ATP induit l'activation de TSC2 et l'inhibition de mTORC1. En 2008, il a aussi été démontré au niveau cellulaire que l'AMPK inhibe mTORC1 indépendamment de TSC2 en phosphorylant directement raptor et en induisant la liaison de 14-3-3 avec mTORC1. Cet effet de l'AMPK sur l'activité de mTORC1 est un point de contrôle et un lien entre le métabolisme et la prolifération cellulaire. Cet effet est très important, principalement en situation de stress énergétique, comme en condition d'hypoxie (117).

Bien que les activateurs et les cibles de mTOR soient de plus en plus décrits, le rôle exact de mTOR au niveau du cœur, et plus spécifiquement de son métabolisme, demeure peu connu. Quelques études menées chez la souris et le rat SHR ont montré que l'administration de rapamycine provoque une régression ou une prévention

partielle de l'hypertrophie induite par l'activation d'Akt ou à la suite d'une surcharge de pression, supportant un rôle de mTOR dans ce processus pathologique (210; 284; 288). Dernièrement, il a aussi été montré que mTORC1 est essentiel au maintien de la fonction cardiaque *in vivo* en situation de surcharge de pression (283). De plus, les souris invalidées pour raptor de manière cardio-spécifique développent non seulement une dysfonction cardiaque, mais aussi des altérations du métabolisme, telles qu'une diminution de l'oxydation du palmitate et une augmentation du glucose. De plus, dans ce modèle murin, l'expression génique de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme cardiaque est modifiée. Par exemple, les niveaux de transcrits pour CPT-I, MCD-I et GLUT4 sont réduits tandis que ceux de GLUT1 sont augmentés dans les cœurs déficients pour raptor. De plus, l'expression génique de PGC-1 α est diminuée de même que le nombre de mitochondries. Le mécanisme exact qui soutient ces changements métaboliques est encore inconnu, toutefois, ces résultats sont supportés par les travaux réalisés dans le muscle squelettique par Cunningham et collaborateurs en 2007, qui ont montré que mTOR agit au niveau de la régulation de la capacité oxydative de la mitochondrie via son action sur la régulation d'un complexe YY1-PGC-1 α (63). Les auteurs de cette étude montrent une diminution des niveaux d'ARNm pour PGC-1 α et de protéines impliquées dans l'OXPPOS (cytochrome c, ATP synthase (F₀)), le CAC (isocitrate déshydrogénase) et la protéine découplante 2 (UCP2), dans des cellules de muscle squelettique traitées à la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1. De plus, ces auteurs rapportent une augmentation des niveaux d'ARNm de ces mêmes protéines dans des cellules déficientes pour TSC2, dans lesquelles mTOR est active de manière constitutive (63).

En résumé, AMPK, Akt et mTOR sont des protéines clés qui régulent l'homéostasie énergétique du myocarde en plus d'avoir plusieurs autres rôles biologiques. De plus, elles sont considérées comme étant des cibles pharmacologiques importantes entre autres pour le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique. Bien que ces voies de signalisation soient très importantes pour la régulation du métabolisme

énergétique, elles sont principalement étudiées pour leurs autres rôles cardioprotecteurs. Les liens exacts entre leurs effets métaboliques et leurs propriétés cardioprotectrices restent toutefois à être clarifiés.

1.2.4 Remodelage métabolique du cœur en situation physiologique et pathologique

La flexibilité métabolique du cœur est primordiale pour son adaptation à différentes conditions physiologiques. Il a été proposé par le Dr Taegtmeyer que l'absence ou la surabondance d'un de ces substrats peut produire de la toxicité et ainsi conduire à des dysfonctions du muscle cardiaque (Figure 11, page 45). Selon cette théorie, dans des conditions physiologiques et pathologiques, le cœur modifie ses préférences énergétiques et ces modifications peuvent avoir des conséquences positives et/ou néfastes sur sa fonction. Il existerait donc une sélection optimale des substrats énergétiques en fonction de chaque situation (308).

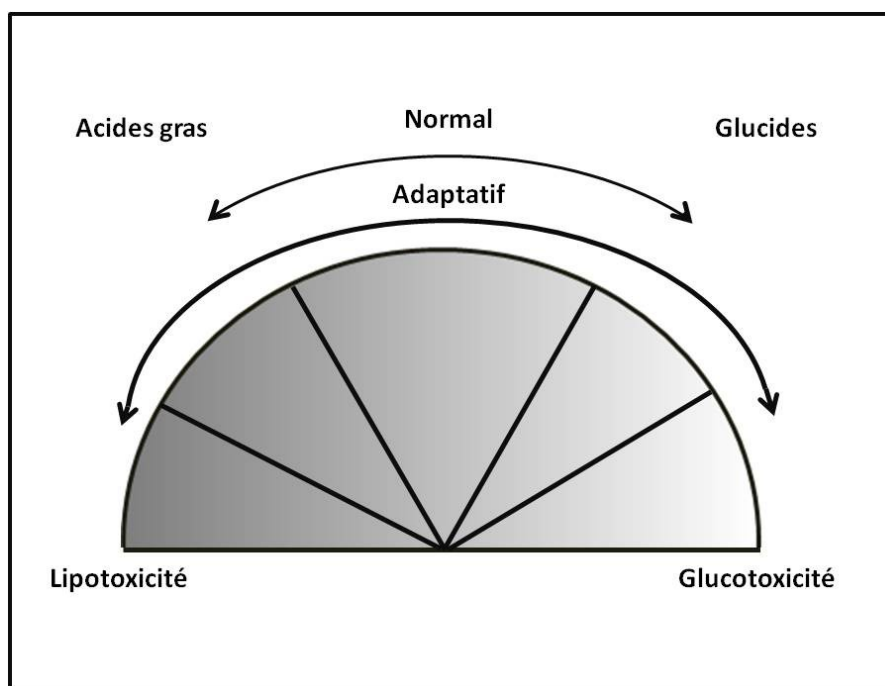


Figure 11 : Choix des substrats énergétiques du cœur dans des conditions normales ou pathologiques (adaptée de (308)).

Cette régulation à long terme dans le choix des substrats énergétiques comprend les changements liés à des conditions physiologiques, comme le passage du cœur fœtal au cœur adulte, période marquée par une augmentation importante de la disponibilité en oxygène et en AGs pendant laquelle le cœur modifie les choix de ses substrats énergétiques des glucides vers les AGs (194).

La présence de conditions pathologiques s'accompagne aussi de modifications du métabolisme cardiaque qui induisent une altération chronique de la flexibilité métabolique du myocarde. Ces changements métaboliques sont modulés par des modifications de la régulation du métabolisme cardiaque tant à court terme, au niveau allostérique et post-traductionnel, comme en situation d'ischémie, qu'à long terme, au niveau de l'expression génique de différentes protéines/enzymes, comme en conditions de diabète et d'hypertrophie (164).

En situation d'ischémie myocardique, le flux sanguin via la circulation coronarienne est inadéquat et l'apport en oxygène est réduit. Conséquemment, le métabolisme oxydatif est affecté causant une diminution de l'activité de la β -OX mitochondriale des AGs, du CAC et de la production d'ATP par la chaîne de transport des électrons. Étant donné l'importance du métabolisme oxydatif dans le cœur, les conséquences de l'ischémie y sont très importantes. Le rôle de l'APMK est crucial en condition d'ischémie, puisque son activation stimule la glycolyse, la voie la plus importante de production d'énergie par des processus de phosphorylation au niveau des substrats, qui sont indépendants de l'oxygène, en stimulant indirectement l'activité de PFK-1 en agissant au niveau de PFK-2. L'AMPK favorise aussi les niveaux d'oxydation des AGCLs en inhibant l'activité d'ACC et en stimulant l'activité de MCD, ce qui a pour effet de diminuer les niveaux de malonyl-CoA et de lever l'inhibition de CPT-1, favorisant ainsi l'entrée d'AGCLs dans la mitochondrie. Cette augmentation de l'oxydation des AGCLs s'accompagne d'une diminution de la décarboxylation du pyruvate. Cet effet positif de l'APMK à long terme est par contre considéré comme étant délétère tôt en début de reperfusion, puisque l'activation concomitante de l'oxydation des AGCLs et de la glycolyse anaérobie cause un découplage entre la glycolyse et l'oxydation du glucose via PDH, causant l'accumulation de produits dérivés de la glycolyse (lactate et NADH) (83). De plus, le découplage entre l'entrée des AGCLs dans la mitochondrie et la réduction de la capacité oxydative due au manque d'oxygène cause une accumulation d'acyl-CoA et d'acylcarnitines à chaîne longue (CL). L'accumulation de ces dérivés toxiques favorise des dysfonctionnements électrophysiologiques et contractiles qui contribuent à la défaillance cardiaque, du moins de façon aigüe dans un modèle de cœur perfusé *ex vivo* (58). Dans cette condition, l'augmentation de la contribution énergétique des lipides est considérée maladaptative et responsable des altérations de la contraction. Ainsi, il apparaît que le traitement avec des agents pharmacologiques qui modulent l'utilisation des AGCLs et favorisent le métabolisme glucidique améliore la réponse du myocarde à l'ischémie. De fait, l'administration *ex vivo* et parfois *in vivo* chez l'animal ou chez l'humain d'étomoxir, un inhibiteur de la CPT-1, de trimétazidine, un

inhibiteur partiel de la β -OX des AGCLs, ou de dichloroacétate, un agent qui stimule PDH, a montré une amélioration du rendement énergétique et de la fonction ventriculaire suite à l'ischémie (pour revue (194)).

Le diabète est un facteur de risque, indépendant des autres facteurs de risque comme l'hypertension et l'hypercholestérolémie, pour le développement de la cardiomyopathie. Les cœurs des patients diabétiques sont caractérisés par une diminution de la captation du glucose et leur production d'énergie repose essentiellement sur l'utilisation des AGCLs. Ce changement métabolique s'accompagne du développement d'une cardiomyopathie à long terme (pour revue (5)). Des changements de la biodisponibilité des substrats circulants se traduisant par une hyperglycémie et une augmentation des niveaux d'AGs libres et des TGs circulants sont observés chez les patients avec un diabète de type 2. L'utilisation du glucose est déficiente étant donné les altérations de la voie de signalisation de l'insuline. En compensation, l'utilisation des lipides est accrue possiblement via une activation de la voie de PPAR α (96). Ces altérations du métabolisme énergétique s'accompagnent d'une diminution du ratio phospho-créatine/ATP, un index de mortalité par cardiomyopathie (227). Le lien entre le dysfonctionnement contractile et les altérations métaboliques est difficile à faire, toutefois, les études menées chez la souris qui surexprime PPAR α , un modèle animal présentant un profil métabolique similaire à celui des patients diabétiques, développent une cardiomyopathie suggérant un lien entre les altérations métaboliques et fonctionnelles (100).

L'hypertrophie ventriculaire gauche consiste en un remodelage du muscle cardiaque à la suite d'une augmentation de la tension des parois du cœur. Dans cette condition, à long terme, un remodelage métabolique se développe en parallèle du remodelage structurel du cœur, par contre, le lien entre la progression de la maladie vers le développement de l'insuffisance cardiaque et les changements métaboliques observés est encore incertain (pour revue (189; 194)). Ainsi, en condition d'hypertrophie cardiaque, l'expression de PPAR α est réduite à son niveau fœtal (269). Cette diminution de PPAR α a été liée, en stade décompensé, à une modification dans le

choix des substrats énergétiques du myocarde, le cœur préférant utiliser les glucides au dépend des AGs (97). On rapporte aussi dans les cœurs hypertrophiques une diminution de l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans la β -OX mitochondriale des AGs, comme MCAD, LCHAD, bien qu'une diminution des niveaux protéiques et de l'activité des enzymes n'ait été montrée qu'en condition d'insuffisance cardiaque (17). Il n'est pas clair à ce jour si ces changements dans la sélection des substrats énergétiques sont adaptatifs ou non pour le muscle cardiaque. Il semble cependant que la désactivation de PPAR α se produise en réponse à l'hypertrophie puisque la réactivation de PPAR α dans des cœurs hypertrophiques provoque des dysfonctions contractiles du cœur et des altérations du rendement énergétique cardiaque (351). De plus, les travaux de l'équipe de Dre Tian ont montré que l'augmentation de l'utilisation de glucides, via la surexpression de GLUT1 diminue le développement de l'insuffisance cardiaque dans un modèle murin (187) et corrige les altérations fonctionnelles et métaboliques dans des cœurs de souris déficientes pour PPAR α (197). De manière comparable à ce qui est décrit dans le cœur ischémique, certaines études ont montré que l'utilisation prioritaire des glucides aux dépens des AGCLs pour la production d'énergie, via l'utilisation d'agents pharmacologiques, est bénéfique pour les cœurs insuffisants (299).

D'un autre côté, l'utilisation des lipides est indispensable pour maintenir une fonction contractile adéquate. En effet, l'inhibition de CPT-1 par l'étomoxir est responsable du développement d'une cardiomyopathie chez le rat sain (265). D'autres études montrent aussi qu'il y a des effets néfastes liés à une réduction de l'utilisation des AGCLs, comme une lipotoxicité due à l'accumulation de lipides intracellulaires et/ou une carence énergétique (169; 226). Certaines études ont aussi mis en évidence l'importance des AGCLs comme étant un facteur déterminant de la fonction contractile, du remodelage structurel et du métabolisme énergétique mitochondrial dans les cœurs hypertrophiques, post-infarctiés et insuffisants, aussi bien chez l'animal que chez l'humain (237; 256; 257; 316).

En outre, l'importance de la flexibilité métabolique du cœur et l'effet potentiellement néfaste de la diminution de l'oxydation des AGCLs et de l'augmentation de l'utilisation des glucides sont mis en évidence principalement chez les patients atteints de désordres de l'oxydation des acides gras; ces patients étant très sujets à la décompensation cardiaque dans des situations de stress (33; 274). Les déficits génétiques de l'oxydation des AGCLs sont au cœur des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse de doctorat. Ainsi, leur étiologie, leur diagnostic, leurs conséquences tant au niveau métabolique que fonctionnel et les différents traitements offerts aux patients à ce jour seront revus en détails dans la section suivante.

1.3 Désordres de l'oxydation des AGs

Les désordres génétiques de l'oxydation des AGs sont reconnus pour être des causes importantes de morbidité et de mortalité. Le premier cas de déficience de l'oxydation des AGs, un déficit en CPT-II, a été identifié en 1973 par DiMauro et DiMauro. Depuis, tel qu'illustré à la figure 12 (page 49), plusieurs autres désordres génétiques de l'utilisation des AGs ont été identifiés, tout aussi bien au niveau de la captation, du transport des AGs que de leur β -OX mitochondriale (258). De plus, tout laisse croire que d'autres déficits génétiques pour d'autres enzymes impliquées dans l'oxydation mitochondriale pourraient être identifiés dans les années à venir (113).

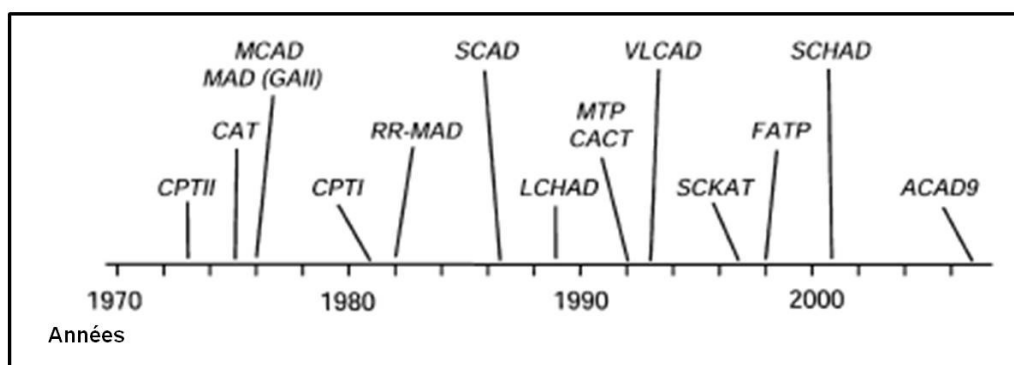


Figure 12 : Évolution de la découverte des désordres de l'oxydation des AGs (adaptée de (113)).

CACT : déficience en carnitine/acylcarnitine translocase, MAD (GAII): multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency, MTP : protéine trifonctionnelle mitochondriale, RR-MAD : *riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation*, SCHAD : déshydrogénase des hydroxyacyl-CoA à chaîne courte, SCKAT: thiolase des 3-oxoacyl-CoA chaîne courte

Tel que vu précédemment, le métabolisme des AGCLs est complexe et nécessite plusieurs enzymes ou protéines de transport, dont plus de 22 sont connues pour être impliquées dans des désordres génétiques pouvant causer des maladies chez l'humain (331). Parmi celles-ci se retrouvent entre autres les déficiences qui affectent les enzymes suivantes : CPT-I, CPT-II, LCHAD, déficience primaire en carnitine (DPC), la protéine trifonctionnelle mitochondriale (MTP) et les déshydrogénases des acyl-CoA, SCAD, MCAD et VLCAD, qui est le désordre ciblé par la présente étude. De plus, quelques cas de déficience en ACAD9, une enzyme possiblement impliquée dans la β -OX des AGCLs, ont été rapportés en 2007 (134).

Les symptômes de ces désordres héréditaires sont très hétérogènes et affectent plusieurs organes (Tableau II, page 51). De plus, des déficits affectant différentes protéines causent des symptômes similaires ce qui contribue à rendre le diagnostic et le traitement très difficiles (25). Les manifestations cliniques de ces désordres génétiques sont souvent les plus sévères pendant l'enfance et peuvent se présenter chez des patients âgés de seulement quelques jours. Les désordres qui touchent les enzymes pour l'oxydation des AGCLs sont plus susceptibles de causer des cardiomyopathies que ceux qui affectent l'oxydation des AGs à chaîne moyenne ou courte. De fait, jusqu'à tout récemment, aucune cardiomyopathie n'avait été rapportée chez les patients déficients en MCAD (201). Les désordres de l'oxydation des AGCLs constituent une des principales causes de cardiomyopathies héréditaires, de troubles métaboliques et de mort subite pendant l'enfance (153; 336). En effet, les désordres de l'oxydation des AGCLs et de l'OXPPOS mitochondriale comptent pour 15% des cardiomyopathies chez le jeune enfant (32). Les mécanismes qui expliquent le syndrome de la mort subite chez ces enfants sont peu décrits, mais les différentes

formes d'arythmies causées par ces déficiences sont souvent soupçonnées d'en être une des principales causes (33).

Tableau II : Principales manifestations cliniques des désordres de l'oxydation des AGs (adapté de (165)).

Manifestations cliniques	Détails	Protéines impliquées
Symptômes hépatiques	<ul style="list-style-type: none"> • Stéatose (syndrome de Reye) • Hypoglycémie • Hypocétonique 	CPT-I, CPT-II, LCAD, MCAD, SCAD, MTP, VLCAD, ACAD9, DPC
Symptômes des muscles squelettiques	<ul style="list-style-type: none"> • Myopathie • Rhabdomyolyse 	CPT-II, VLCAD, ACAD9, LCHAD, MTP
Symptômes cardiaques	<ul style="list-style-type: none"> • Arythmies • Cardiomyopathies 	CPT-II, VLCAD, ACAD9, MTP, LCKAT
Symptômes neurologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Neuropathie périphérique 	LCHAD, MTP
Syndrome de la mort subite		+++

DPC : déficience primaire en carnitine, LCKAT : thiolase des 3-oxoacyl-CoA chaîne longue

1.3.1 Déficit en VLCAD

Comme il a été mentionné plus haut, les ACADs catalysent la première étape de la β -OX des AGs et leur activité varie selon la longueur des chaînes des acyl-CoA (Figure 5, page 24). VLCAD, découverte en 1992 (147), catalyse la première étape de la β -OX mitochondriale des AGCLs et semble être essentielle à l'oxydation des AGs de 16 carbones et plus dans les muscles, le cœur et le foie chez l'humain. Quoique peu fréquente, la déficience en VLCAD est le désordre de l'oxydation des AGCLs le plus commun avec une incidence variant de 1/40 000 à 1/120 000 (188; 212). Le phénotype sévère de la déficience en VLCAD a été pour la première fois décrit en 1985 par Hale et al. (122). Cependant puisque l'enzyme VLCAD n'avait pas encore été identifiée à cette époque, le phénotype clinique a d'abord été associé à une déficience en LCAD. Ainsi, ce n'est qu'en 1993 que le phénotype clinique sévère a été relié correctement à une déficience en VLCAD (11; 26). De plus, à la suite du clonage de l'ADN complémentaire humain de VLCAD en 1995 (302) et d'analyses plus précises, les

patients qui avaient été initialement diagnostiqués comme étant déficients pour LCAD ont été caractérisés comme ayant une déficience pour VLCAD.

Contrairement à SCAD, MCAD et LCAD qui sont localisées dans la matrice mitochondriale et qui présentent une structure homotétramérique (dimère de dimère) d'approximativement 45 kDa, VLCAD est une protéine de 70 kDa de forme homodimérique associée à la membrane interne de la mitochondrie (147; 291). La région amino-terminale de VLCAD contient des séquences homologues aux autres ACADs, ce qui n'est pas le cas pour son domaine c-terminale de 180 acides aminés. Ce domaine c-terminale semble être essentiel à sa liaison à la membrane interne de la mitochondrie (111). Bien qu'il ait été montré que 86-99 % de la déshydrogénation du palmitoyl-CoA soit catalysée par VLCAD dans le tissu cardiaque humain (10), il semble exister un chevauchement dans l'affinité de LCAD et VLCAD. Cependant, étant donné leurs localisations différentes dans la mitochondrie, il semble que ces deux ACADs présenteraient des fonctions distinctes. Au niveau de sa régulation transcriptionnelle, VLCAD diffère aussi des autres ACADs. En effet, en plus d'être régulée par PPAR α , comme les autres ACADs (116), VLCAD contient aussi un élément régulateur sur sa région promotrice, identifié comme pouvant se lier à la protéine régulatrice 2 (AP-2) (356). En plus de la régulation au niveau transcriptionnel, il a récemment été démontré que l'activité des ACADs, du moins de LCAD, pouvait être régulée de manière post-traductionnelle via l'effet de sirtuine-3 (Sirt-3) sur la désacétylation des enzymes (135).

Chez l'humain le gène codant pour VLCAD, ACADVL (OMIM #609575), se situe sur le chromosome 17p11-p13 (7; 12). Il s'agit d'un gène nucléaire de 5341 paires de bases contenant 20 exons qui est synthétisé dans le cytosol sous forme de précurseur et ensuite importé dans la mitochondrie pour subir un processus protéolytique menant à sa forme mature (239). Tel que rapporté par Mathur et collaborateurs en 1999, les déficiences pour VLCAD sont très hétérogènes au niveau moléculaire ; en effet, 32 mutations totalisant 49 allèles chez 31 patients ont été identifiées (206). Ces observations quant à l'hétérogénéité moléculaire de la déficience en VLCAD ont

aussi été rapportées par Andresen et collaborateurs qui décrivent 58 mutations différentes chez 55 patients (Figure 13, page 53) (8). Chez l'humain, une mutation complète du gène ACADVL est associée à des niveaux indétectables de l'enzyme et au phénotype clinique le plus sévère. La transmission de cette déficience se fait de manière autosomique récessive. De plus, des mutations anti-sens et des délétions *in-frame* produisent une enzyme avec une activité résiduelle et sont liés à des manifestations cliniques moins sévères (8; 112). Néanmoins, quelques mutations anti-sens, comme R429W et R573W, sont aussi connues pour causer un phénotype clinique sévère (8; 291). Plus récemment, Goetzman et collaborateurs ont montré que ces mutations n'affectent pas l'activité de l'enzyme, mais plutôt sa structure, principalement au niveau de l'assemblage et la stabilité de la protéine (111).

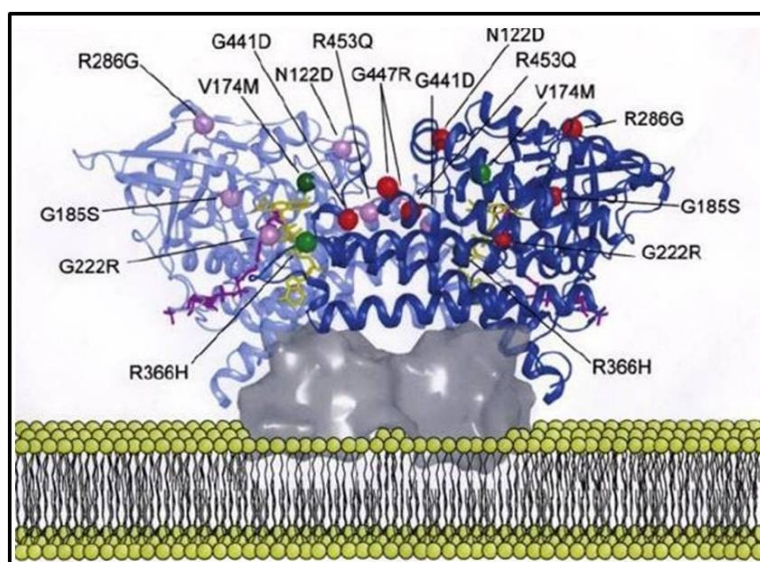


Figure 13 : Structure de VLCAD et sites de mutations connues (adaptée de (109)).

Il y a de plus en plus d'évidences qui suggèrent une relation génotype-phénotype chez les patients atteints de déficience en VLCAD, contrairement à ce qui est observé dans les déficits en SCAD ou en MCAD (113). Certaines mutations du gène ACADVL ont clairement été démontrées comme étant responsables de manifestations cliniques

moins sévères et plus tardives, dont 637G>A une mutation de transition menant à une substitution d'un acide aminé, soit thréonine pour alanine (303). En contrepartie, pour certaines mutations la relation génotype-phénotype est difficile à établir puisque des mutations anti-sens connues comme étant impliquées dans un phénotype clinique atténué causent chez certains patients un phénotype très sévère. Par exemple, la mutation c.848T>C, identifiée en 1996, pour laquelle une activité résiduelle de VLCAD avait été rapportée (7; 111), a été identifiée chez un patient décédé à 38h de vie suite à une hypoglycémie grave (59). Chez ce patient, hétérozygote pour cette mutation et une autre plus sévère (c.342+1G<C), l'activité résiduelle de VLCAD n'a pas été suffisante à la prévention des symptômes. Malgré ces différences importantes au niveau moléculaire, les patients atteints de déficience en VLCAD présentent des symptômes cardiaques assez similaires.

Les principaux signes cliniques d'une déficience en VLCAD sont les mêmes que pour les désordres des AGs en général (Tableau II, page 51). Les symptômes se présentent selon 3 phénotypes bien différents : i) une forme infantile fatale caractérisée par une cardiomyopathie hypertrophique et une hypoglycémie hypocétosique de jeûne (324), ii) une forme moins sévère chez l'enfant accompagnée du syndrome de Reye et d'une légère hypoglycémie (324) et iii) une forme beaucoup moins sévère qui se présente chez l'adolescent ou l'adulte caractérisée par de la douleur musculaire, de la rhabdomyolyse et de la myoglobulinurie associées à des périodes de jeûne ou d'exercice (163; 214). De plus, étant donné le rôle important des AGCLs comme substrats énergétiques lors d'exercice physique soutenu, une période d'exercice sévère provoque l'apparition de symptômes chez des patients adultes asymptomatiques (136; 171), il est donc conseillé aux patients atteints de désordre de l'oxydation des AGCLs de faire de l'exercice physique selon leur niveau individuel de tolérance.

La forme qui présente un phénotype sévère chez l'enfant est de loin la plus fréquente et elle nécessite des traitements importants dans les premiers mois ou les premières semaines de vie. Bien que la présence d'une cardiomyopathie hypertrophique soit

observée chez la moitié des patients déficients pour VLCAD et soit responsable de la plupart des cas de mortalité, certains patients ne développent jamais de symptômes cardiaques. L'activité de VLCAD semble plus faible dans les fibroblastes de patients qui présentent une cardiomyopathie comparativement à ceux qui ne manifestent pas de symptômes cardiaques, ces différences ne sont toutefois pas significatives (324).

Les hypothèses actuelles quant aux explications des symptômes se réfèrent essentiellement à deux phénomènes, soit : 1) un déficit énergétique, dû à l'impossibilité d'oxyder les AGCLs, et 2) l'accumulation de métabolites toxiques en amont du déficit enzymatique, les acylcarnitines et les acyl-CoA à CL (33; 274). Les acyl-CoA à CL agissent au niveau de la régulation des canaux K_{ATP} (103) en plus de leurs capacités d'agir sur différentes voies de signalisation, dont la voie de la PKC (102), et d'inhiber *ex vivo* l'expression de certaines enzymes du métabolisme énergétique et du CAC (168). Les acylcarnitines à CL peuvent, quant à elles, agir comme des détergents et interagir avec les lipides de la membrane du sarcolème et ainsi être impliquées dans le dysfonctionnement électrophysiologiques et dans la survenue des troubles du rythme (25; 58; 65). Les bases électrophysiologiques des effets pro-arythmiques des acylcarnitines à CL sont multifactorielles. Ces composés amphipathiques altèrent les propriétés membranaires et la structure protéique de certains canaux comme les canaux potassiques, les canaux sodiques, les canaux calciques voltage-dépendants et les jonctions GAP, créant des altérations du rythme variables (273; 348). Les acylcarnitines à courte ou moyenne chaîne n'ont pas ces effets toxiques sur les canaux ioniques (33). L'implication des acylcarnitines à CL dans la survenue des troubles du rythme est supportée par l'absence de ces manifestations cliniques chez les patients qui ont des déficits en CPT-I ou en amont, déficits qui ne causent pas d'accumulation des ces composés (33). De plus, de manière intéressante, l'analyse des profils d'acylcarnitines dans les fibroblastes de patients incubés avec du palmitate et de la carnitine a révélé deux profils d'accumulation différents selon le phénotype clinique des patients (324). Ainsi, les patients avec une cardiomyopathie présentent une accumulation de myristoylcarnitine

(C14) et de palmitoylcarnitine (C16), tandis que les patients sans cardiomyopathie présentent surtout une accumulation de dodécanoylcarnitine (C12). Cette différence implique des voies métaboliques non-mitochondriales pour l'oxydation des AGCLs, telles que l'oxydation peroxysomale, qui contribue à 15% de l'oxydation du palmitate dans les fibroblastes humains (324).

Au-delà du dépistage génétique, les méthodes les plus couramment utilisées pour diagnostiquer les désordres de l'oxydation des AGs sont la détermination du profil en acides organiques dans l'urine, la détermination des concentrations plasmatiques et urinaires en carnitine totale et libre ainsi que le profil d'acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem (33). Ces techniques de diagnostic permettent d'identifier ces désordres génétiques très tôt suivant la naissance ou de diagnostiquer des patients asymptomatiques et ainsi contribuent à la prévention de la morbidité et de la mortalité qui y sont reliées (295). Néanmoins, Ficicioglu et collaborateurs rapportent le cas récent d'une jeune enfant de 9 mois décédée des complications dues à une déficience en VLCAD malgré un résultat de spectrométrie de masse en tandem normal (93). Par conséquent, il est fortement suggéré que tous les patients présentant des symptômes et des signes cliniques d'un déficit en VLCAD, comme de l'hypoglycémie suite au jeûne, des cardiomyopathies ou des dysfonctions hépatiques, subissent des examens plus approfondis même si aucun déficit génétique n'a été identifié à la naissance (93; 165). Une déficience en VLCAD doit être suspectée chez un adulte qui présente des caractéristiques semblables à la manifestation plus sévère, surtout s'il y a un historique familial positif pour ce genre de déficience (163). L'identification des acylcarnitines plasmatiques et des AGs circulants est une méthode non-invasive et efficace de diagnostic des déficiences en VLCAD lors d'une période de décompensation (324). De plus, la déficience en VLCAD peut être détectée chez un fœtus avant la fin du premier trimestre de grossesse, à l'aide de mesure d'activité de VLCAD dans des cellules trophoblastiques ou des amniocytes (324).

1.3.2 Les autres ACADs impliqués dans les métabolismes des AGCLs

1.3.2.1 LCAD

Des études sur la spécificité de LCAD ont montré que cette enzyme serait plus importante dans l'oxydation des AGs à chaîne branchée (200; 334) et des AGs avec une insaturation en positions 4,5 ou 5,6 (comme l'acide oléique) (178) que pour l'oxydation des AGs saturés. La distribution tissulaire spécifique de LCAD au niveau génique et protéique est différente de celle de VLCAD. En effet, de faibles quantités de LCAD sont présentes dans le cœur, tandis que la protéine est très abondante dans le rein (7). Toutefois, la destruction de ce gène dans un modèle murin cause des symptômes importants similaires à ceux de la déficience en VLCAD chez l'humain. Ces observations laissent donc croire à un rôle plus important pour LCAD chez la souris que chez l'humain (167). Dans une étude comparant le métabolisme lipidique des fibroblastes de souris déficientes en LCAD ou en VLCAD avec celui des fibroblastes de patients avec une déficience en VLCAD, Chegary et collaborateurs montrent qu'il existe des différences importantes dans l'expression génique des différentes ACADs entre l'humain et la souris. Les auteurs suggèrent donc que LCAD compense pour l'absence de VLCAD chez la souris, mais pas chez l'humain (50). Cette observation a été confirmée par l'analyse de l'expression protéique de LCAD dans les fibroblastes de souris et non chez l'humain. Ce qui confirme les résultats obtenus par Ayoma et collaborateurs (11) ainsi que Vianey Saban et collaborateurs (324) qui ont montré à l'aide d'anticorps anti-VLCAD, anti-LCAD et anti-MCAD que l'activité de LCAD est très faible dans les fibroblastes de peau chez l'humain. Les auteurs de ces études suggèrent qu'un déficit en LCAD chez l'humain est tout de même possible, mais posent l'hypothèse que son phénotype clinique serait peut-être moins sévère étant son rôle limité dans la production d'énergie (324).

1.3.2.2 ACAD9

ACAD9 a été identifiée en 2002 par Zhang et al. (355). La séquence d'acides aminés d'ACAD9 est identique à 47% et similaire à 65 % à celle de VLCAD (305). De plus, elles sont toutes deux exprimées de manière ubiquitaire dans les tissus humains, mais

principalement au niveau du cœur, du foie et des muscles squelettiques. La sévérité des symptômes chez les patients déficients en VLCAD suggère que malgré cette grande homologie entre les deux enzymes, la présence d'ACAD9 ne semble pas pouvoir compenser pour l'absence de VLCAD. Il a aussi été montré que ACAD9 est très exprimée dans le cerveau adulte, mais aussi au stade embryonnaire et fœtal (234), suggérant un rôle de cette enzyme dans le développement cérébral (85). Le rôle exact d'ACAD9 dans le métabolisme lipidique n'est pas encore clair, toutefois, une étude récente montre qu'ACAD9 jouerait un rôle non pas au niveau de l'oxydation des AGs, mais plutôt au niveau de l'OXPPOS et plus spécifiquement au niveau de l'assemblage du complexe I (229). De fait, ACAD9 est, tout comme VLCAD, un homodimère associé à la membrane interne de la mitochondrie (85). Cette différence de localisation leur confère un rôle particulier entre autres dans la formation d'un super-complexe d'OXPPOS avec les complexes de la chaîne de transport de électrons dans la membrane interne de la mitochondrie (339). Les rôles fonctionnels exacts de ces super-complexes ne sont toutefois pas encore connus.

1.3.3 Les différentes stratégies de traitement

1.3.3.1 Le traitement actuel et la prévention des symptômes

Le traitement actuel des patients atteints de désordres de l'oxydation des AGCLs, comme VLCAD, vise principalement la prévention de l'apparition des symptômes. De plus, il est important que les patients qui présentent le phénotype sévère soient pris en charge rapidement en cas de crise. Par exemple, l'administration de glucose intraveineux comme source d'énergie et le suivi des troubles du rythme sont nécessaires afin de renverser la dysfonction cardiaque. Chez les patients déficients pour VLCAD, différentes stratégies, selon l'âge du patient ou le phénotype, sont utilisées pour prévenir les manifestations cliniques primaires (Tableau III, page 59).

Tableau III: Consensus sur le régime alimentaire des patients atteints de déficience en VLCAD (adapté de (293)).

Phénotype	Âge	Lipides alimentaires
Asymptomatique (créatine kinase et fonction hépatique normale)	0-4 mois	<ul style="list-style-type: none"> • 50% lait maternel • 50% formule pauvre en gras
	Après 4 mois (introduction de la nourriture solide)	<ul style="list-style-type: none"> • Lipides représentent 30-40% de l'énergie totale • 10-15% de l'énergie provenant des lipides devrait venir de triglycérides à chaîne moyenne
Symptomatique	0-4 mois	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de lait maternel • 100% de formule pauvre en gras • Supplément d'acides gras essentiels 3.5 g/jour
	Après 4 mois (introduction de la nourriture solide)	<ul style="list-style-type: none"> • Lipides représentent 25-30% (< 40%) de l'énergie totale. • 20% de l'énergie provenant des lipides devrait venir de triglycérides à chaîne moyenne. • 3-4% de l'énergie devrait venir des suppléments d'AGs essentiels.

Le support nutritionnel offert aux patients atteints de désordres de l'oxydation des AGCLs est au centre de la stratégie de traitement actuelle. Il est impératif pour ces patients de consommer fréquemment des petits repas afin d'éviter les périodes de jeûne. Un régime pauvre en gras ainsi que l'administration suffisante de glucose sont recommandés pour éviter la lipolyse (155). Le traitement nutritionnel actuellement recommandé comprend aussi l'administration de TGs à chaîne moyenne (TCMs) et la consommation d'amidon avant le sommeil (33). La composition des diètes pauvres en gras peut varier de manière à fournir un apport calorique provenant des lipides totaux variant de 13 à 39 % en plus de 15 à 18 % supplémentaires venant des TCMs sous forme d'huile (289). Les patients répondent de manière très hétérogène aux différentes diètes et des symptômes peuvent se manifester quelques jours après l'administration accidentelle d'une surcharge lipidique (94). Les diètes pauvres en lipides doivent absolument être supplémentées en AGs essentiels de manière à couvrir les besoins quotidiens. Un rapport d'experts affirme que pour maintenir un ratio d'AGs oméga 3(n-3) sur oméga 6 (n-6) optimal, il est préférable d'utiliser entre

3,5 et 10 g/jour d'huile de noix, de soya et de germe de blé tout dépendant de l'âge des patients (293). Ce type de diète, additionnée d'une quantité suffisante d'AGs essentiels pourrait répondre aux besoins des patients atteints de désordre de l'oxydation des AGCLs, malheureusement elle ne permet pas de prévenir ou de contrôler les symptômes chez tous les patients (260). De plus, chez la souris déficiente pour VLCAD, la diète avec des TCMs induit une stéatose hépatique sévère et des altérations du métabolisme lipidique, soulignant des impacts délétères possibles de cette diète et du besoin de développer un nouveau support nutritionnel aux patients (315).

La prise de suppléments de L-carnitine, afin de limiter l'accumulation des dérivés acylcarnitines à CL, était aussi habituellement recommandée pour les patients atteints de déficits de l'oxydation des AGCLs (33). Par contre, cette recommandation est controversée puisqu'aucune étude ne montre l'efficacité des suppléments de carnitine à long terme chez les patients atteints de désordres de l'oxydation des AGCLs (293). En effet, des études chez la souris déficiente en VLCAD ont montré, d'une part, que les suppléments de carnitine induisent la production d'acylcarnitines à CL sans modifier les niveaux de carnitine libre dans les tissus (250) et, d'autre part, que les niveaux plasmatiques de carnitine libre ne sont pas un bon reflet des concentrations tissulaires et que la biosynthèse hépatique semble suffire aux besoins (297). De fait, il a récemment été suggéré de limiter la prise des suppléments de carnitine seulement pendant les périodes de crise, de manière à éviter l'apparition des effets secondaires indésirables (293).

1.3.3.2 Les nouvelles pistes de traitement

Plus récemment, des études ont soulevé le potentiel thérapeutique de nouvelles stratégies d'intervention afin d'améliorer le phénotype clinique des patients atteints d'un déficit de l'oxydation des AGCLs. Au niveau pharmacologique, l'administration de bezafibrate, un agoniste de PPAR α , a permis de d'augmenter l'activité de VLCAD dans des fibroblastes de patients avec des mutations *missenses* sur le gène ACADVL

causant une activité résiduelle de l'enzyme (78; 109). Les effets bénéfiques des bezafibates ont été mis en évidence dans une étude pilote réalisée chez 6 patients déficients pour CPT-II et présentant des myopathies (29; 30), ces patients ayant une grande similitude avec les patients déficients pour VLCAD tant au niveau biochimique que clinique (31). Les résultats de cette étude, à savoir une amélioration de la tolérance à l'exercice et une augmentation de l'oxydation du palmitoyl-CoA dans le muscle, suggèrent que cette approche pharmacologique pourrait être bénéfique *in vivo*. La même équipe a récemment montré dans une étude *ex vivo* avec des fibroblastes de patients déficients pour VLCAD ou CPT-II que l'administration de resvératrol induit une augmentation du métabolisme oxydatif chez les patients porteurs de mutations causant une forme moins sévère de la maladie (20). Dans cette étude, les auteurs attribuent l'effet positif du resvératrol à son action sur la désacétylation, et donc l'activation, de PGC-1 α via sirtuine-1. Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin de connaître le pouvoir thérapeutique des bezafibrates et du resvératrol et leur capacité à prévenir le développement de symptômes cardiaques chez les patients avec des déficits génétique de l'oxydation des AGs.

Au niveau nutritionnel, une autre étude de cas par Roe et al. rapporte des améliorations importantes des symptômes musculaires et cardiaques chez 3 patients atteints de déficience en VLCAD après le remplacement de la trioctanoïne, TCM à nombre pair (8 carbones), avec de la triheptanoïne, TCM à nombre impair (7 carbones) (260). Les mécanismes d'action qui pourraient sous-tendre les effets bénéfiques des AGCMs à nombres pair et impair sont développés dans les sections suivantes. De plus, l'importance des AGs essentiels, particulièrement l'apport en AGPIs de type n-3 sera discutée principalement en lien avec les symptômes cardiaques.

1.3.3.2.1 Les AGCMs dans le traitement des désordres de la β -oxydation des AGCLs

Les AGCMs sont très rares dans la diète, la source la plus importante étant l'huile de noix de coco, qui contient environ 50% d'AGCMs (152). Le lait maternel humain

contient que très peu d'AGCMs (105), contrairement aux laits des autres mammifères, comme le lapin et le rat, qui peuvent en contenir jusqu'à 50% (287). Étant donné leur métabolisme particulier, ces AGs sont utilisés depuis longtemps pour le traitement de certaines conditions pathologiques sous forme de TCM ajoutés à la diète. Ces diètes ont été utilisées chez des patients qui présentaient des besoins énergétiques accrus, comme des enfants prématurés (15).

Les AGCMs présentent un métabolisme particulier qui les diffère des AGCLs. Les AGCMs sont des AGs hydrosolubles et saturés avec des chaînes de 6 à 12 carbones, comparativement aux AGCLs qui possèdent des chaînes de plus de 14 carbones et qui présentent souvent une ou plusieurs insaturations. Ces différentes particularités des AGCMs ont de conséquences sur leur métabolisme qui diffère de celui des AGCLs décrit précédemment (15).

1.3.3.2.1.1 Métabolisme des AGCMs

Comme il a été décrit ci-dessus, le métabolisme des AGCLs est assez complexe et requiert l'utilisation de plusieurs protéines de transport afin de permettre l'entrée des AGCLs dans la cellule puis dans la matrice mitochondriale pour y être β -oxydés. Les AGCMs, quant à eux, ne nécessitent pas toutes ces étapes de transport et ils entrent rapidement dans la cellule puis dans la mitochondrie par diffusion sans avoir recours au système de la carnitine (15). Une fois dans la mitochondrie, les AGCMs sont activés par la synthétase des acyl-CoA à chaîne moyenne et leur entrée dans la β -OX est régulée par leur biodisponibilité, qui est le reflet des concentrations sanguines (Figure 14, page 63). Chez les patients atteints de désordres de l'oxydation des AGCLs, les TCM offrent un potentiel thérapeutique intéressant via leur métabolisme particulier. Les AGCMs passent au-delà du déficit enzymatique du métabolisme des AGCLs et améliore le statut énergétique des patients tout en évitant l'accumulation des dérivés toxiques, identifiés comme responsables des troubles du rythme. Ces AGs ont montré des effets bénéfiques et ont contribué à l'amélioration des symptômes cliniques chez plusieurs patients (37; 313).

De plus, contrairement aux AGCLs qui sont emmagasinés dans les chylomicrons pour ensuite se rendre aux tissus extra-hépatiques via la circulation lymphatique, les TCMs, lorsqu'ils sont administrés oralement, sont rapidement hydrolysés en AGCMs qui sont absorbés dans la veine porte et amenés rapidement au foie pour y être oxydés. Leur absorption est donc beaucoup plus rapide que celle des AGCLs (242). Les AGCMs sont très cétogéniques par rapport aux AGCLs et une grande partie de l'acétyl-CoA formée dans le foie après l'oxydation des AGCMs est dirigée vers la synthèse de CC qui sont par la suite acheminés aux tissus extra-hépatiques (15).

De manière intéressante, il a aussi été montré que les AGCMs et certains de leurs métabolites en plus des CC et du lactate sont des ligands endogènes pour des récepteurs couplés aux protéines G, HCA₁ (GPR81), HCA₂ (GPR109A) et HCA₃ (GPR109B), membres de la famille des récepteurs de l'acide hydroxycarboxylique, connus comme étant des récepteurs de l'acide nicotinique (pour revue voir (235)). Chez des individus sains, en situation physiologique, comme le jeûne ou l'exercice intense, l'accumulation de lactate, de BHB ou d'intermédiaires de la β -OX, comme le 3-hydroxy-octanoate, activent ces récepteurs qui induisent une inhibition de la lipolyse dans les adipocytes. Toutefois, les patients atteints de désordre génétique de la β -OX des AGCLs présentent une hypoglycémie hypocétosique lors du jeûne, qui semble impliquée dans l'apparition des symptômes. En condition physiologique, les niveaux plasmatiques d'AGCMs sont trop faibles pour permettre l'activation de ces récepteurs. Toutefois, une partie des effets bénéfiques de l'administration d'AGCMs via la diète pourrait s'expliquer par leur capacité à activer ces récepteurs et ainsi inhiber de la lipolyse des TGs contenus dans les adipocytes. Ce mécanisme reste toutefois à être démontré chez ces patients.

1.3.3.2.1.2 Les AGCMs à nombre impair

Des TCM à nombre impair, principalement la triheptanoïne, ont récemment été introduits dans le traitement des patients atteints de déficit en VLCAD (260). Ces AGCMs possèdent un métabolisme qui diffère de celui des AGCMs à nombre pair, ce

qui semble leur conférer certains bénéfices intéressants (Figure 14, page 65). En effet, en plus de fournir de l'acétyl-CoA pour la production d'énergie, l'oxydation de la triheptanoïne fournit du propionyl-CoA, un substrat anaplérotique, qui, sous l'action de la propionyl-CoA carboxylase (PCC), est transformé en méthylmalonyl-CoA qui, à son tour, est métabolisé par la méthylmalonyl-CoA mutase en succinyl-CoA. Ce dernier entre dans le cycle de Krebs et ainsi contribue à maintenir les niveaux des intermédiaires (39).

Après ingestion dans la diète sous forme d'huile, l'heptanoate est capté par le foie. Son métabolisme hépatique varie aussi de celui des AGCMs à nombre pair, comme l'octanoate, puisque en plus de fournir des CC à 4 carbones à partir de l'acétyl-CoA, l'heptanoate fournit, à partir du propionyl-CoA, des CC à 5 carbones, le β -cétopentanoate et le β -hydroxypentanoate. Ces molécules sont très anaplérotiques dans le cerveau, le cœur et les reins, 3 organes qui présentent des activités enzymatiques très élevées pour les enzymes nécessaires pour l'utilisation des corps cétoniques (39).

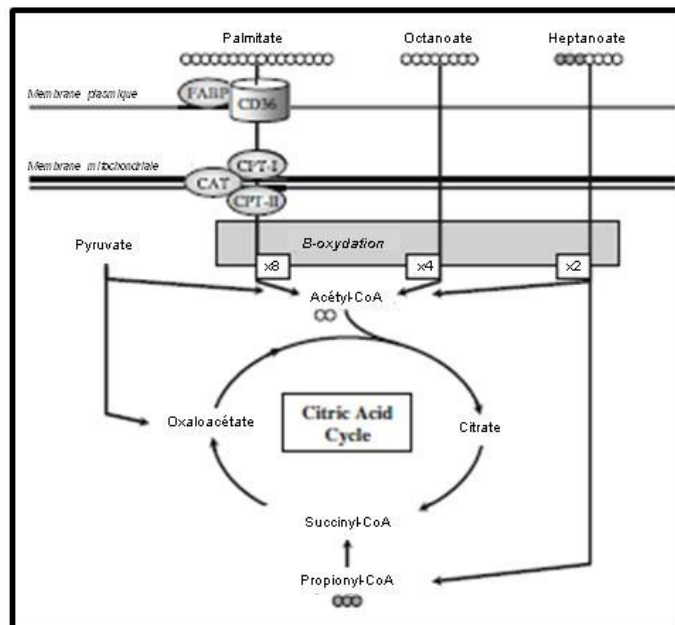


Figure 14 : Métabolisme des acides gras à chaîne moyenne à nombre pair et impair (adaptée de (168)).

Une équipe a aussi montré les effets du traitement avec la triheptanoïne chez une jeune patiente atteinte de déficience en PC, une enzyme clé de la néoglucogenèse et qui joue un rôle très important dans l'anaplérose (219). Les patients atteints de ce défaut génétique présentent des déficits importants en OAA dans le CAC, ce qui induit une carence énergétique importante (245). À court terme, l'administration de la triheptanoïne chez cette patiente a montré des effets importants aussi bien sur son statut énergétique que sur son métabolisme cérébral (219). Malheureusement, 4 mois après le début du traitement, la jeune patiente a montré une diminution progressive des niveaux d'intermédiaires du CAC associés à une accumulation de lactate et de CC. Cette diminution a pu être renversée par l'administration de citrate et la réduction de la consommation de glucose. La patiente est tout de même décédée des suites d'une infection à l'âge de 6 mois (203). Plus d'études sont donc nécessaires afin de mieux connaître les effets de ce type de diète à long terme.

Les niveaux plasmatiques de propionate et d'autres AGs à nombre impair sont faibles chez l'humain (248). Cette voie métabolique semble pourtant très importante, puisque certains patients atteints d'une déficience génétique pour PCC développent une acidémie propionique (AP) associée à plusieurs symptômes incluant des neuropathies (118; 230), des myopathies et des cardiomyopathies hypertrophiques ou dilatées (67; 205). Les patients déficients pour PCC présentent une dysfonction mitochondriale secondaire à l'accumulation de propionate, de 3-hydroxy-propionate, de 2-méthylcitrate et de propionylglycine (279). Les causes des symptômes cardiaques ne sont pas encore totalement connues, mais les hypothèses incluent une accumulation de ces composés toxiques, connus comme étant des inhibiteurs des voies métaboliques *in vitro*. En effet, le propionyl-CoA inhibe l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, la PDH et la succinyl-CoA synthétase et le méthylcitrate, formés à la suite de l'accumulation de propionyl-CoA, sont des inhibiteurs des enzymes du CAC (279). Romano et collaborateurs suggèrent que d'autres mécanismes pourraient être impliqués, puisque, chez des patients atteints d'AP, il y a une absence de corrélation entre l'accumulation de métabolites urinaires du

propionate et la sévérité des symptômes cardiaques (262). Fait intéressant, les mêmes auteurs rapportent que chez 2 patients atteints d'AP et présentant une cardiomyopathie, une transplantation hépatique a eu pour effet de renverser les symptômes cardiaques (262). Puisque la transplantation hépatique n'affecte pas l'accumulation de métabolites toxiques directement dans le cœur, les mécanismes qui sous-tendent les effets bénéfiques d'une telle intervention au niveau cardiaque demeurent peu connus. Bien qu'un meilleur contrôle métabolique ne semble pas influencer la survenue de cardiomyopathie dilatée chez les patients atteints d'AP, les auteurs de l'étude suggèrent qu'une diminution des niveaux circulants des métabolites du propionate, attribuée à une fonction adéquate de PCC dans le foie à la suite de la transplantation, pourrait être impliquée dans cet effet positif de la transplantation hépatique (262).

1.3.3.2.1.3 AGCMs à nombre impair et désordres de l'oxydation des AGCLs

Comme il a été mentionné plus haut, une grande partie des symptômes cardiaques reliés aux désordres de l'oxydation des AGCLs vient des effets pro-arythmiques des acylcarnitines à CL. De par leur métabolisme particulier, les AGCMs à nombre pair préviennent l'accumulation de ces composés toxiques et sont une source rapide d'acétyl-CoA. De plus, il a été proposé que, chez les patients atteints de désordres génétiques de l'oxydation des AGCLs, l'oxydation de l'acétyl-CoA soit limitée par un déséquilibre entre l'anaplérose et la cataplérose, soit l'entrée et la sortie d'intermédiaires du CAC, respectivement. Suivant cette hypothèse, l'utilisation de substrats anaplérotiques sous forme d'AGCMs à nombre impair a été proposée comme étant complémentaire au traitement déjà administré (260). Dans l'étude de cas réalisée par Roe et collaborateurs et menée chez 3 patients âgés de moins de 10 ans atteints de déficits en VLCAD, les différents symptômes comme la cardiomyopathie hypertrophique, l'hépatomégalie et la faiblesse musculaire ont complètement été soulagés suite à une consommation de 30-35% de l'apport calorique total sous forme de triheptanoïne. Les auteurs de cette étude ont postulé que les effets bénéfiques de la

triheptanoïne sont dus à ses propriétés anaplérotiques qui compensent pour la diminution des niveaux d'intermédiaires du CAC (260). Selon les auteurs de cette étude de cas, un autre concept qui sous-tend les effets bénéfiques de la thérapie anaplérotique à l'aide de la triheptanoïne chez des patients déficients en VLCAD comprend l'inhibition de la voie de l'AMPK (259). La diète avec la triheptanoïne fournit des intermédiaires du cycle de Krebs pour maintenir la production d'équivalents réduits nécessaires à la formation d'ATP et ainsi contribue à l'inhibition de l'AMPK. Puisque l'activation de l'AMPK mène à une augmentation de l'oxydation des AGs et donc à une plus grande accumulation de dérivés toxiques chez les patients déficients en VLCAD, cet effet de la triheptanoïne sur la voie de l'AMPK peut être important afin de prévenir l'apparition des symptômes. Une autre étude a aussi montré une régression des symptômes musculaires avec la triheptanoïne chez 7 patients atteints de déficience en CPT-II (261). Malheureusement, les mécanismes impliqués n'ont pas encore été démontrés clairement et d'autres études sont nécessaires chez un plus grand nombre de patients afin de présenter clairement les bénéfices potentiels d'une telle diète pour les patients avec des désordres de l'oxydation des AGCLs.

1.3.3.2.2 Les AGs polyinsaturés et les désordres de l'oxydation des AGCLs

L'acide alpha-linolénique (ALN ; C18 :3n-3) et l'acide linoléique (AL ; C18:2n-6) sont des AGs essentiels puisque l'organisme ne peut pas les synthétiser *de novo*. Les AGPIs n-3, dont l'acide éicosapentaénoïque (EPA ; C20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6n-3) et n-6, dont l'acide arachidonique (ARA ; C20:4n-6) sont dérivés des ces AGs. En effet, les mammifères n'ont pas la capacité d'insérer une double liaison en amont du carbone 9 à partir du groupement méthyle, conséquemment, ces AGs doivent provenir de la diète. La cascade métabolique menant à la formation d'AGPIs à partir de l'ALN ou de l'AL dans le foie est bien connue (Figure 15, page 68). La conversion de l'ALN en EPA puis en DHA et de l'AL en acide arachidonique (ARA ; C20:4n-6) nécessite les mêmes enzymes, les $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases et différentes élongases (Figure 15, page 68).

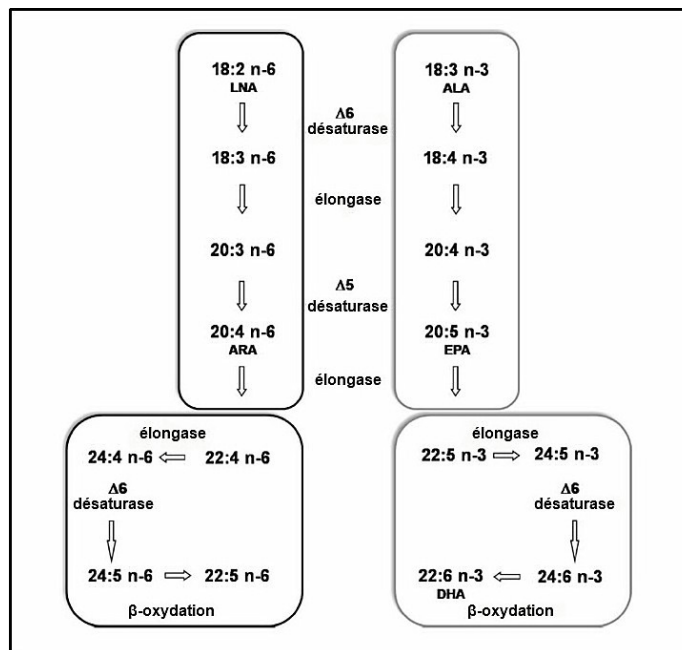


Figure 15 : Schéma général des élongations et des désaturations des AGs n-3 et n-6 (adaptée de (16)).

L'ALN, l'AL et leurs dérivés sont des composantes essentielles des membranes cellulaires animales et végétales et ont des effets biologiques importants. Les niveaux d'EPA et de DHA dans le sérum ou les membranes des érythrocytes dépendent non seulement de l'apport alimentaire, mais aussi du métabolisme endogène des différents AGs. L'EPA et le DHA se retrouvent principalement dans les aliments marins tels que les poissons gras, comme le maquereau, le saumon et les sardines, ainsi que dans certaines algues et dans l'huile de poisson (23). Les faibles niveaux d'ALA dans les cellules chez l'humain, à l'exception des cellules de la peau, suggèrent que son importance n'est pas tant au niveau de ses rôles directs, mais bien plus via son élongation en EPA et DHA (41). La biosynthèse des AGPIs n-3 a été associée, pendant plusieurs années, au réticulum endoplasmique, le site majeur de la synthèse des PLs. Ferdinandusse et collaborateurs ont démontré que la dernière étape menant à la synthèse du DHA à partir du C24:6n-3 a lieu dans le peroxyosome (91). Très peu de

choses sont connues quant à l'absorption et la biodisponibilité de l'ALA chez l'homme. Par contre, il semble maintenant clair que son importante oxydation pour la production d'énergie modifie sa biodisponibilité pour sa conversion en AGPIs à plus longue chaîne. Une étude menée chez l'homme montre que suite à l'ingestion de d'ALN marqué au carbone 13 (^{13}C), la fraction retrouvée sous forme de $^{13}\text{CO}_2$ dans l'expiration est deux fois plus importante que celle du palmitate, du stéarate et de l'oléate (71).

1.3.3.2.2.1 Les effets cardioprotecteurs des AGPIs

La section suivante porte principalement sur le métabolisme de l'EPA et du DHA, les AGPIs n-3, ainsi que sur leurs effets, principalement au niveau du système cardiovasculaire. L'essentiel des informations contenues dans cette section provient des articles de revues suivants (6; 16; 177; 181; 285) et (286).

Plusieurs études ont montré que la consommation modérée d'huile de poisson diminue le risque d'évènements cardiovasculaires graves comme l'infarctus du myocarde, la fibrillation auriculaire, la maladie coronarienne et la mort subite (pour revue voir (177)). Ainsi, l'*American Heart Association* et l'*European Society of Cardiology* recommandent une augmentation de la consommation de poisson et un apport quotidien d'au moins 1g d'AGPI n-3 pour la prévention primaire et secondaire de certaines pathologies, comme les maladies cardiovasculaires (342). Parmi les effets bénéfiques rapportés des AGPIs n-3 notons : i) la baisse des niveaux de TGs et de cholestérol, ii) leurs propriétés anti-inflammatoires, iii) la réduction de l'agrégation plaquettaire ainsi que iv) la protection des dommages dus à l'ischémie-reperfusion. Les mécanismes exacts qui sous-tendent ces effets ne sont pas encore tous élucidés, il semble pourtant clair que ces AGPIs agissent entre autres au niveau de la transcription génique. De fait, la supplémentation en EPA et DHA dans des cardiomyocytes de rat module l'expression de plus de 100 gènes, dont plusieurs sont reliés à l'hypertrophie cardiaque (34). De plus, une autre étude a permis de mettre en

évidence le lien entre les changements de composition des AGs dans la cellule et l'activation des PPARs à la suite d'une supplémentation en EPA et DHA (77).

Une revue de Anand et collaborateurs publiée en 2008 montre les différents effets des AGs contenus dans l'huile de poisson sur la protection des arythmies (6). Les effets potentiels soulignés dans cet article de revue incluent entre autres une implication du DHA au niveau de la fonction des canaux ioniques et du tonus du système nerveux autonome. D'autres mécanismes impliquant les AGPIs n-3 ont aussi été identifiés. Par exemple, les cellules à proximité de la zone ischémique à la suite d'un infarctus du myocarde peuvent être dépolarisées et ainsi être plus facilement excitables. Dans cet état, le potentiel de repos est plus élevé et il est plus facile de déclencher des potentiels d'action menant à des arythmies. Dans ces conditions, les AGPIs n-3 pourraient agir au niveau membranaire en hyperpolarisant les membranes de ces cellules, de manière à rendre le seuil de potentiel d'action plus difficile à atteindre et donc de prévenir l'apparition d'arythmies. (6; 179). Les propriétés anti-arythmiques des AGs n-3 pourraient aussi inclure une prévention de la surcharge calcique dans le réticulum sarcoplasmique (192). Plus spécifiquement, une étude récente de *patch-clamp* montre que l'administration de différentes concentrations de DHA prolonge la durée des potentiels d'action et inhibe le courant I_{to} , le courant potassique sortant transitoire responsable de la repolarisation cellulaire, dans des cardiomyocytes de rat. Cette action dose-dépendante du DHA sur l'augmentation de PA et l'inhibition du courant I_{to} pourrait être un de ses mécanismes anti-arythmiques (337). Les auteurs soulignent toutefois que le DHA pourrait avoir un rôle important sur d'autres types de courants.

Dans les dernières années, les bénéfices des AGPIs ont été montrés dans la prévention et le traitement de l'insuffisance cardiaque, résultats qui demeurent toutefois encore controversés. L'étude GISSI-HF menée chez plus de 7000 patients avec une insuffisance cardiaque de classe II à IV a permis de montrer les bénéfices de la prise de suppléments d'AGPIs n-3 sur la réduction de la mortalité et des hospitalisations pour cause de maladies cardiovasculaires (311). Encore une fois, les

mécanismes qui sous-tendent les effets bénéfiques des AGPIs n-3, au-delà de leurs rôles dans la régulation génique, principalement au niveau des différents PPARs, sur l'insuffisance cardiaque restent à être démontrés. Outre son effet sur la transcription génique, la supplémentation en EPA et DHA chez des rats induit un remodelage de la composition en AGs des PLs membranaires du cœur, plus précisément une augmentation des niveaux de DHA et d'EPA et une diminution des niveaux d'ARA (233). Il a par la suite été montré que cet effet sur la composition membranaire est essentiellement dû au DHA et non à l'EPA et que le remodelage de la composition des PLs membranaires dans la mitochondrie a pour effet de retarder l'ouverture du pore mitochondrial, suggérant encore une fois un meilleur effet du DHA seul (160).

1.4 Modèles murins pour l'étude des désordres de l'oxydation des AGs

Au cours des dernières années, des modèles murins avec des déficiences de l'oxydation mitochondriale des AGs ont été développés afin d'améliorer les connaissances de ce type de désordres génétiques. Bien que chez l'humain, les phénotypes associés aux différentes déficiences diffèrent un peu de ceux observés chez la souris, plusieurs de ces animaux présentent un phénotype induit par le stress similaire à celui des patients avec des déficits de l'oxydation des AGs. De plus, certains déficits enzymatiques n'ont pas encore été identifiés chez l'humain, c'est le cas de la déficience en CPT-1b et en LCAD.

Les différents modèles de souris présentant des désordres de l'oxydation mitochondriale des AGs sont le sujet d'un article de revue paru en 2010 (298) et sont décrits dans le tableau suivant (tableau IV, page 72).

Tableau IV : Modèles de souris avec déficit de l'oxydation mitochondriale des AGs (adapté de (298)).

Enzyme déficiente	Phénotype chez la souris	Références
CPT-1a (OMIM 600528)	Homozygote : létal en gestation Hétérozygote : phénotype normal	(231)
CPT-1b (OMIM 601987)	Homozygote : létal en gestation Hétérozygote : phénotype normal	(150)
VLCAD (OMIM 609575)	Phénotype hépatique et myopathique suite à un stress, intolérance au froid, Phénotype cardiaque : moins sévère que celui des souris LCAD ^{-/-}	2 modèles indépendants (60; 62) (89) (296; 297)
LCAD (OMIM 609576)	Mort subite, altérations lipidiques aux niveaux hépatique et cardiaque	(115; 167)
MCAD (OMIM 607008)	Intolérance au froid et au jeûne, mort néonatale	(312)
TFP sous-unité α (OMIM 600890)	Homozygote : hypoglycémie néonatale, nécrose et dégénération des myocytes cardiaques et du diaphragme, changement du profil lipidique dans le foie, mort subite. Hétérozygote : stéatose hépatique et résistance à l'insuline avec l'âge.	(145; 146)
TFP- sous-unité β (OMIM 143450)	Viable	Communication personnelle, Arnold Strauss, Cincinnati, OH, USA
M/SCHAD (OMIM 601609)	Intolérance au jeûne et au froid et accumulation de lipides dans le foie et les reins.	Communication personnelle, Arnold Strauss, Cincinnati, OH, USA
SCAD (OMIM 606885)	Intolérance au jeûne et au froid et accumulation de lipides dans le foie et les reins.	(13; 344)

Pour la réalisation des travaux de cette thèse, deux modèles de souris avec des déficits de l'oxydation des AGCLs ont été utilisés. Il s'agit de la souris invalidée pour PPAR α et la souris déficiente pour VLCAD. Ces deux modèles animaux sont décrits en détails dans les sections suivantes.

1.4.1 Souris déficientes pour PPAR α

Bien que ce génotype ne soit pas connu à ce jour chez l'humain, la souris déficiente pour PPAR α est un modèle animal de désordre de l'oxydation des AGCLs et présente des altérations métaboliques semblables à celles observées chez les individus atteints d'un déficit enzymatique connu. Les données recueillies à l'aide de ce modèle animal contribuent depuis plusieurs années à une meilleure compréhension du rôle des AGs dans le métabolisme cardiaque ainsi qu'au niveau de l'organisme en entier (9; 183; 340). Les souris déficientes pour PPAR α ne présentent pas de réponse suite à une stimulation avec des agonistes de PPAR α ou suite à un jeûne, condition connue pour activer PPAR α et induire la transcription des gènes du métabolisme des AGs (183). En situation de jeûne, par rapport à des souris témoins, les souris déficientes pour PPAR α présentent plutôt une hypoglycémie, une céto-genèse altérée ainsi qu'une accumulation lipidique hépatique, ce qui reflète des altérations du métabolisme hépatique (185; 266).

Quelques études ont documenté le rôle de PPAR α au niveau de la régulation de l'utilisation des substrats par le cœur (42; 272). De plus, des études utilisant le modèle de perfusion cardiaque en mode Langendorff ont montré que ces cœurs ont une capacité réduite à oxyder les AGs exogènes associée à une augmentation de l'oxydation des glucides et de la glycolyse. Ce phénotype métabolique rappelle celui du cœur hypertrophié ou insuffisant. Cette augmentation de l'utilisation du glucose dans les cœurs PPAR α semble être bénéfique au maintien d'une fonction contractile adéquate suite à une période d'ischémie (241), mais, en contre partie, celle-ci semble limiter la production d'énergie lorsque les cœurs sont soumis à une augmentation de la charge de travail (197).

1.4.2 Souris déficientes pour VLCAD

Le gène *Acadvl* chez la souris se retrouve sur le chromosome 11, dans une zone d'homologie avec la région Chr17p13-p11 chez l'homme (61). La souris déficiente pour VLCAD a été développée afin d'approfondir les connaissances sur le développement des cardiomyopathies et la décompensation cardiaque en situation de stress chez les patients atteints de déficience en VLCAD (60; 89). Depuis la création de ce modèle animal, plusieurs études ont été menées afin d'investiguer les conséquences de l'absence de VLCAD chez la souris.

Au niveau cardiaque, Exil et collaborateurs ont été les premiers à montrer que les souris VLCAD âgées de 2 mois développent une cardiomyopathie caractérisée par une histologie du myocarde anormale ainsi que par une susceptibilité accrue à une tachycardie ventriculaire malgré la présence d'une fonction systolique normale, et ce, en absence d'un stress extérieur imposé (89). Parmi les autres altérations cardiaques qui ont été documentées, mentionnons celles au niveau du métabolisme et du transport lipidique, lesquelles sont présentes dès de la naissance, tandis que les modifications de l'ultrastructure, comme une augmentation des fibres dégénératives et du nombre de mitochondries et la présence de dépôts lipidiques, apparaissent plus tardivement soit chez des souris âgées de 2 mois (89). De plus, il a été démontré que la destruction du gène *Acadvl* chez la souris est associée à des altérations du métabolisme intracellulaire du calcium, comme une surcharge calcique dans le réticulum sarcoplasmique de cardiomyocytes isolés, en plus des altérations au niveau cardiaque de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme calcique, par exemple une augmentation des niveaux de calséquestrine et de phospholamban dans sa forme pentamérique (343). Les souris VLCAD présentent différentes altérations au niveau moléculaire, variant selon l'âge et les conditions. Par exemple, à la naissance, les souris VLCAD montrent une augmentation des niveaux protéiques pour PGC-1 au niveau cardiaque (89) puis un retour à la normale à 2 mois. Ce qui pourrait refléter une carence énergétique chez ces animaux dès la naissance.

L'expression génique de PPAR α est diminuée au niveau cardiaque (88), tandis que celle de LCAD n'est pas modifiée dans le cœur et dans le foie (88; 110).

Bien que le phénotype clinique des souris déficientes pour VLCAD semble beaucoup moins sévère que celui chez l'humain en condition basale, ces souris développent, en situation de stress, un phénotype similaire à celui observé chez l'homme. En effet, les souris VLCAD développent une hypoglycémie modérée suite au jeûne seul ou combiné à une exposition au froid (88; 296), et ce, potentiellement dû à une déficience de gluconéogenèse hépatique (294). Ces souris présentent aussi une sensibilité accrue au froid associée à une absence de frisson (296), ce qui est commun à différents modèles animaux de déficience en oxydation des AGs (278). Ce phénomène peut être associé à un défaut de la thermogénèse, soit une diminution de la production de chaleur dans le tissu adipeux brun via un mécanisme impliquant UCP1 (115). En outre, les souris déficientes pour VLCAD présentent aussi une diminution de leur capacité d'exercice qui se traduit par une vitesse et une distance maximale de course réduites (296).

Au niveau cardiaque, en plus de développer une tachycardie en absence de stress, les souris VLCAD développent une bradycardie profonde menant à une asystolie ventriculaire suite à l'exposition à un stress physiologique, comme le froid ou le jeûne (88). L'hypoglycémie causée par le jeûne ne peut pas à elle seule expliquer l'apparition de ces troubles du rythme, puisqu'une infusion de glucose ne permet pas de les prévenir. Toutefois, l'hypothermie semble être un facteur très important, puisque lorsque la température corporelle est de retour à des valeurs adéquates, les souris retrouvent une fréquence cardiaque normale (88). Les souris hétérozygotes pour VLCAD présentent aussi un phénotype intermédiaire, bien que potentiellement létal, moins sévère que celui des souris VLCAD (88).

Néanmoins, tout comme les patients déficients pour VLCAD, les souris accumulent des acylcarnitines à CL en conditions normales de stress et ont de niveaux sanguins de carnitine libre plus bas (296; 297). Les niveaux de carnitine libre sont diminués dans les muscles squelettiques et cardiaque des souris déficientes pour VLCAD après

1 heure d'exercice (297), avec ou sans prise de suppléments de L-carnitine, mais sont de retour à des niveaux normaux 24h plus tard, ce qui est principalement dû à une biosynthèse hépatique accrue (250). Finalement, le jeûne combiné à une exposition au froid a aussi pour effet de diminuer les niveaux sanguins de carnitine libre chez les souris VLCAD, mais pas dans les tissus (297), ce qui suggère que les niveaux circulants de carnitine libre ne peuvent pas être utilisés comme indicateurs des niveaux tissulaires.

Le phénotype beaucoup moins sévère retrouvé chez les souris déficientes pour VLCAD comparativement aux patients pourrait s'expliquer principalement par les différents rôles de LCAD (167). Cette hypothèse est fortement supportée par les résultats de l'étude de Chegary et collaborateurs, dans laquelle ils ont démontré une activité LCAD dans les fibroblastes murins mais pas dans ceux d'origine humaine (50). Ainsi, LCAD est exprimée de manière importante dans les tissus de souris et semble responsable d'une grande part de l'oxydation du palmitoyl-CoA, laquelle est catalysée seulement par VLCAD chez l'humain. De plus, le fait que les souris déficientes à la fois pour LCAD et VLCAD ne soient pas viables après la naissance souligne aussi l'importance du chevauchement dans l'activité de ces enzymes chez la souris (60).

La souris déficiente en LCAD (167) présente un phénotype plus sévère que celui de la souris VLCAD. Toutefois, le choix d'utiliser la souris déficiente pour VLCAD dans la réalisation des travaux de cette thèse s'explique par le fait que la déficience en LCAD n'est pas connue chez l'humain. Néanmoins ces deux modèles animaux présentent des phénotypes caractéristiques des patients atteints de désordres de l'oxydation des AGCLs. De fait, Cox et collaborateurs ont montré que les souris LCAD et VLCAD développent une stéatose hépatique suite au jeûne bien que l'infiltration lipidique soit plus sévère chez les souris LCAD (60). De plus, ces auteurs rapportent une accumulation plus importante d'acylcarnitines dans le sérum des souris LCAD que des souris VLCAD. Les profils d'accumulation de ces acylcarnitines varient aussi selon le génotype des souris. En effet, les souris LCAD

accumulent des acylcarnitines avec une chaîne de 10, 12 ou 14 carbones tandis que les souris VLCAD accumulent d'avantage des acylcarnitines avec des chaînes de 16 et 18 carbones (60). Bien que les deux types de souris développent de l'hypertrophie cardiaque, quoique plus faible que celle observée chez les patients déficients en VLCAD, les souris LCAD présentent encore une fois un phénotype plus sévère et non réversible avec l'âge, par rapport à celui des souris VLCAD, tel que révélé par une analyse d'échocardiographie (62). La présence d'hypertrophie cardiaque dans ces modèles animaux mâles, principalement les souris LCAD, semble être modulée par la présence d'isoflavones dans la diète, les femelles étant protégées de cet effet. Cette observation souligne la complexité de l'évolution de l'hypertrophie cardiaque (62). Selon Zhang et collaborateurs, les souris VLCAD sont résistantes à l'obésité et à la résistance à l'insuline induite par la diète étant donné une activation chronique d'AMPK et de PPAR α menant à une augmentation de l'oxydation des AGs et une diminution du contenu en DAGs dans les cellules hépatiques et musculaires (353). Les mêmes auteurs ont montré, qu'au contraire, la souris LCAD développe une stéatose hépatique et une résistance à l'insuline hépatique suite à un clamp hyperinsulinémique-euglycémique causées par des dysfonctions mitochondriales, dont une diminution de l'oxydation des AGs et accumulation de DAGs (354).

En résumé, bien que le phénotype des souris déficientes pour VLCAD soit beaucoup moins sévère que celui des patients, ce modèle murin est très intéressant pour étudier le phénotype induit par le stress chez les patients avec des désordres de l'oxydation des AGCLs. Au début de cette thèse, au meilleur de ma connaissance, il n'y avait pas d'étude qui s'était penchée sur l'étude du métabolisme cardiaque chez la souris déficiente en VLCAD. De plus, depuis, peu d'études se sont penchées en détails sur l'impact d'un tel déficit sur le métabolisme d'un organe hautement oxydatif comme le cœur.

1.5 Stratégie méthodologique pour l'étude du métabolisme cardiaque

Pour aborder ce sujet, le modèle expérimental choisi est la perfusion *ex vivo* au travail de cœurs de souris combinée à l'utilisation de substrats marqués au ^{13}C et à l'analyse par GCMS. Ces techniques sont utilisées depuis plusieurs années dans notre laboratoire, elles permettent le phénotypage fonctionnel et métabolique des cœurs de rat (328) et de souris (158). L'utilisation de ces deux techniques fournit des informations dynamiques du métabolisme, qui ne sont pas disponibles par l'analyse seule de l'expression protéique ou des mesures d'activités enzymatiques.

1.5.1 Perfusion *ex vivo* au travail de cœur de souris

La perfusion du cœur de souris en mode travaillant offre un potentiel très intéressant pour l'étude du métabolisme cardiaque, mais aussi pour l'étude de la physiologie cardiaque, dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Cette technique d'isolation et de perfusion de cœur diffère de la perfusion en Langendorff, plus simple au niveau technique, dans laquelle le cœur n'est soumis à aucune pré- ou post-charge physiologique. Cette technique développée à la fin des années 1960 par Neely et collaborateurs (224), puis modifiée au début des années 1980 par Taegtmeyer et collaborateurs (309), est largement utilisée de nos jours que ce soit pour l'étude du métabolisme, de la mécanique, de la physiologie ou encore de la biochimie cardiaque. Un avantage important de cette technique est qu'elle permet d'étudier l'effet d'un paramètre à la fois sur le métabolisme et la fonction cardiaque en éliminant l'impact de certains facteurs systémiques, comme la fonction endocrine (87).

Lors de la mise en place du cœur sur le système de perfusion, l'aorte et l'oreillette gauche sont canulées, de telle sorte que la moitié gauche de l'organe est perfusée (Figure 16, page 79).

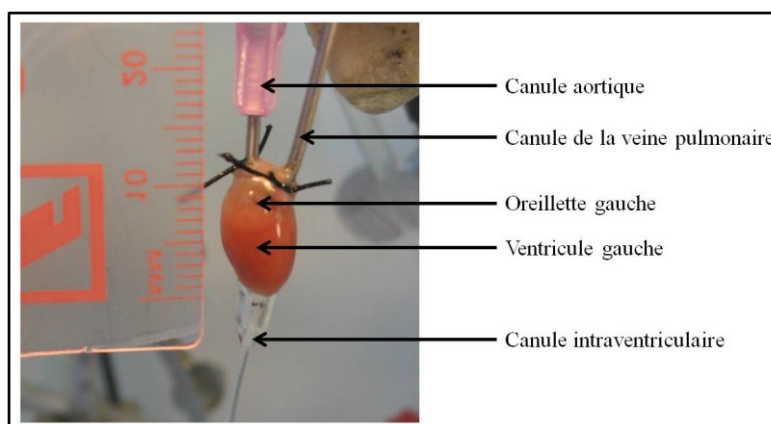


Figure 16 : Photographie d'un cœur de souris perfusé *ex vivo*.

Au moment de la diastole, le tampon de perfusion pénètre le cœur par l'oreillette gauche puis remplit le ventricule gauche via l'ouverture de la valve mitrale. Le débit de liquide pénétrant dans l'oreillette gauche est contrôlé par la pression de pré-charge (Figure 17, page 80). La contraction du myocarde au moment de la systole entraîne l'éjection du tampon, via l'aorte, jusqu'au sommet de la colonne de perfusion à une pression de post-charge déterminée. Ainsi, à chaque contraction, un travail mécanique est effectué par le muscle cardiaque, qui est perfusé via son système d'artères coronaires au moment de la diastole. Le tampon de perfusion contient, en plus de l'oxygène, des substrats énergétiques et des ions à des concentrations physiologiques qui permettent au cœur de maintenir son métabolisme. Il est important de noter que, dans notre modèle, tout au long de la perfusion, le glucose est administré à des concentrations variables selon les protocoles avec du lactate et du pyruvate en présence d'insuline afin d'assurer un apport en glucides adéquat et de maintenir l'état rédox des cellules.

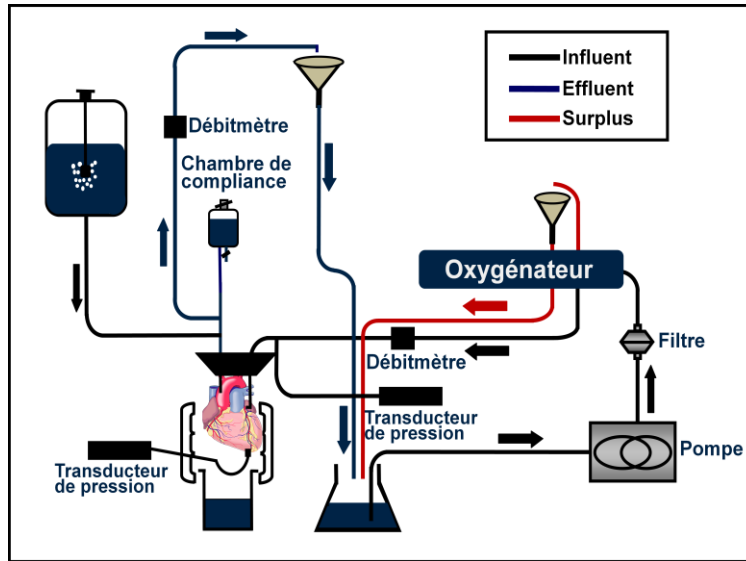


Figure 17 : Représentation schématisée du système de perfusion de cœur de souris au travail.

De plus, les cœurs sont perfusés dans un mode semi-recirculant, c'est-à-dire que les substrats métabolisés ne sont pas réutilisés par le cœur. Ce qui est primordial afin de maintenir stable le milieu de perfusion et ainsi la contribution des différents substrats énergétiques à la formation de l'acétyl-CoA mitochondrial (327). De plus, le système de perfusion comprend plusieurs appareils, tels que des débitmètres et des transducteurs de pression, dont un relié à une fine canule insérée à l'apex du ventricule gauche, qui permettent de suivre en continu les débits cardiaques et la fonction contractile du cœur.

1.5.2 Utilisation de substrats marqués au ^{13}C pour l'étude du métabolisme cardiaque

L'utilisation de substrats marqués avec des isotopes stables permet de suivre le devenir métabolique des différents substrats dans les cellules cardiaques, puisque le devenir métabolique d'un traceur est le même que celui de la molécule tracée. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation des isotopes stables couplée à l'analyse

d'isotopomères de masse est un outil puissant d'investigations métaboliques *in vivo* et *ex vivo* dans divers préparations d'organes isolés, incluant le cœur (56; 57; 75; 132; 161). De plus, les différentes techniques utilisées pour déterminer l'enrichissement isotopiques des intermédiaires du CAC dans des cœurs de rat perfusé *ex vivo* ont été décrites par Vincent et collaborateurs (326; 328) et modifiées pour l'analyse des cœurs de souris par Khairallah et collaborateurs (158).

L'enrichissement isotopique d'une molécule est exprimé en pourcentage d'enrichissement molaire (MPE), c'est-à-dire la proportion de molécules marquées par rapport à la somme totale des molécules. Brièvement, les isotopomères de masse des métabolites contenant de 1 à n atomes marqués au ^{13}C sont identifiés M_i , où $i = 1, 2, 3, \dots, n$, et le MPE absolu d'un M_i d'un métabolite donné est calculé de la manière suivante :

$$\text{MPE } (M_i) = \% \text{ } A_{M_i} / [A_M + \Sigma A_{M_i}]$$

Où A_{M_i} et A_M représentent les aires sous la courbe du pic de chaque ion d'une molécule suite à sa correction pour l'abondance naturelle de chacun des isotopes stables, présents en faible proportion. Par exemple, pour le carbone, l'abondance naturelle de l'isotope stable varie entre 1.01% et 1.15% du carbone total.

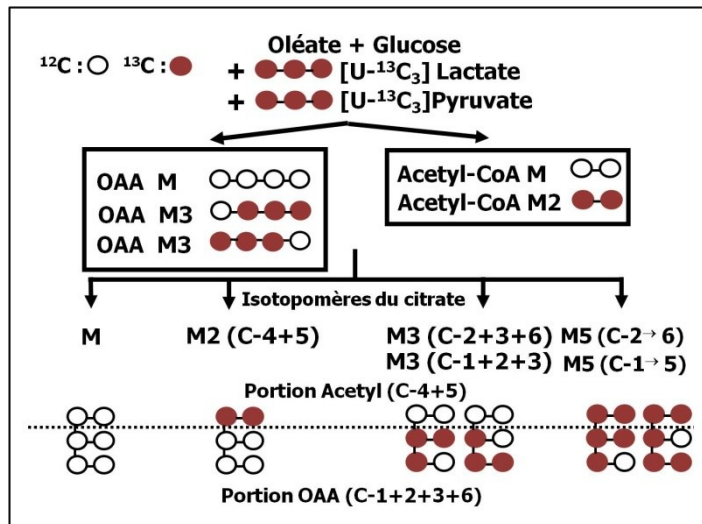


Figure 18 : Représentation schématique de quelques exemples d'isotopomères du citrate obtenus suite au métabolisme des traceurs [U-¹³C₃] lactate et [U-¹³C₃] pyruvate

La contribution relative des voies métaboliques permettant la formation d'OAA et d'acétyl-CoA, les deux substrats de la citrate synthase, est déterminée par l'analyse des cœurs perfusés en présence de divers mélanges de substrats marqués au ¹³C, lorsque l'équilibre isotopique est atteint (Figure 18, page 82). Dans notre étude, nous avons utilisé les substrats marqués au ¹³C suivants, du [U-¹³C₃]lactate, du [U-¹³C₃]pyruvate, du [U-¹³C₁₈]oléate, du [U-¹³C₁₈]linoléate, du [U-¹³C₁₆]palmitate, du [1-¹³C]octanoate et le [5-6-7-¹³C₃]heptanoate.

Les calculs faits à partir des MPE des intermédiaires du CAC dans les cœurs perfusés avec des substrats marqués au ¹³C permettent de déterminer les contributions des différents substrats énergétiques et la carboxylation du pyruvate sont adaptés de ce qui a été décrit précédemment dans d'autres études menées dans notre laboratoire (56; 57; 158; 326) et sont décrits en dans les différents manuscrits.

En résumé, le cœur perfusé *ex vivo* en mode travaillant combiné à l'utilisation de substrats marqués au ^{13}C s'avère un modèle de choix pour la mesure des fonctions contractiles et l'étude des diverses facettes du métabolisme cardiaque. Le montage de perfusion finement élaboré permet de reproduire et de respecter davantage la physiologie de l'animal. Ainsi, l'utilisation en combinaison de diverses approches et mesures, comme l'analyse de flux métaboliques, le profil des concentrations de métabolites, l'expression de gènes et de protéines métaboliques en plus des paramètres reflétant la fonction contractile permettent d'évaluer la pertinence physiologique des données métaboliques dans un contexte physiologique ou pathologique.

2. CHAPITRE II - PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

La mise en contexte de cette étude et des trois publications qui en découlent a été présentée en avant-propos. De ce fait, ce chapitre présente brièvement les objectifs de recherche, le but spécifique commun aux trois publications et les hypothèses qui ont motivé les différents volets de cette étude.

2.1 Les objectifs de recherche

Les patients atteints de désordres de l'oxydation des AGCLs développent des troubles du rythme et des cardiomyopathies. Le déficit énergétique et l'accumulation de dérivés toxiques en amont du site de restriction sont les causes les plus documentées de l'apparition des symptômes. Malheureusement, le traitement actuel ciblant ces deux phénomènes ne permet pas de prévenir l'apparition du phénotype clinique ou la détérioration de la santé du patient. Dans cette optique, le présent projet vise à améliorer les connaissances sur les causes des cardiomyopathies et des troubles du rythme chez les patients atteints d'un désordre génétique de la β -OX des AGCLs, dans le but, à long terme, d'optimiser le support nutritionnel et le traitement de ces patients afin de prévenir l'apparition des symptômes cardiaques.

2.2 Les objectifs spécifiques

Afin de répondre à l'objectif à long terme, les objectifs spécifiques de cette étude étaient de caractériser le métabolisme cardiaque des souris avec un désordre génétique de l'oxydation des AGCLs dans des conditions normales et de stress, c'est-à-dire lorsque la demande énergétique est augmentée. De plus, l'objectif de cette étude comprend la description des effets *ex vivo* et *in vivo* des AGCMs à nombre pair et impair sur le métabolisme cardiaque de ces souris.

2.3 *Les hypothèses de départ*

Les recherches réalisées dans les trois manuscrits présentés dans les chapitres suivants, dont deux ont été publiés et le troisième est en préparation, ont été motivées par les hypothèses suivantes :

- (i) Les cœurs de souris avec des désordres de l'oxydation des AGCLs présentent une dysfonction contractile suite à une augmentation de la demande énergétique associée à des altérations du métabolisme énergétique cardiaque, incluant une diminution des niveaux des intermédiaires du CAC.
- (ii) Ces altérations fonctionnelles et métaboliques seront renversées par l'administration de manière aiguë (*ex vivo*) et chronique (*in vivo*) d'AGCMs à nombre impair, mais pas à nombre pair.

Certaines difficultés de gestion de la colonie de souris déficientes pour VLCAD ont été rencontrées tôt en début d'étude, ainsi certaines mesures ont dû être prises, engendrant ainsi des retards dans la production des animaux pour les expérimentations. En effet, nous avons dû pratiquer des césariennes sur les animaux contaminés par l'*Helicobacter pilori* afin de s'assurer que les souris soient exemptes de pathogènes. De plus, nous avons dû faire quelques cycles supplémentaires de reproduction avec des souris témoins afin d'obtenir un fond génétique plus standardisé, de ce fait, nous avons donc dû effectuer des génotypages pour chaque animal afin de nous assurer de la présence du transgène. Compte tenu de toutes ces manipulations supplémentaires et du retard qu'elles ont engendré, la première étude a été entreprise avec un modèle animal différent de désordre de l'oxydation des AGs, soit la souris invalidée pour PPAR α , qui est disponible commercialement. Les études subséquentes ont été menées tel que prévu avec les souris déficientes pour VLCAD.

Collectivement, les résultats obtenus dans la première étude menée avec la souris déficiente pour PPAR α , publiée en 2008 dans *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* (Chapitre III) supportent notre hypothèse initiale. En effet, les cœurs de ces souris

montrent une diminution de leur capacité à oxyder les AGCLs et à maintenir une fonction contractile adéquate lorsque la demande énergétique est augmentée. Toutefois, utilisant le même paradigme expérimental, les études menées avec la souris déficientes pour VLCAD ont montré des résultats complètement inattendus rendant ainsi impossible la vérification des hypothèses initiales. Une modification des objectifs a donc dû être effectuée en court d'étude. Le travail accompli avec ces souris est le sujet d'un article publié récemment en ligne en juin 2011 dans *Am J Physiol Heart Circ. Physiol –In Press* (Chapitre IV) et d'un manuscrit en préparation (Chapitre V).

De plus, un article de revue portant sur l'utilisation des AGCMs comme agents thérapeutiques pour les maladies cardiaques a été écrit dans le cadre des travaux de cette thèse. Cet article se trouve en annexe I.

3. CHAPITRE III - MANUSCRIT I

ALTERATIONS IN CARBOHYDRATE METABOLISM AND ITS REGULATION IN PPAR ALPHA NULL MOUSE HEARTS

Roselle Gélinas, François, Labarthe, Bertrand Bouchard, Janie McDuff

Guy Charron, Martin E. Young et Christine Des Rosiers

American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology

2008 Apr ;294(4):H1571-80

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Roselle Gélinas a contribué à l'élaboration du projet de recherche à tous les niveaux, incluant la définition de l'hypothèse et des objectifs, le choix des protocoles et la mise au point des techniques en plus d'avoir réalisé toutes les expérimentations présentées dans ce manuscrit et assumé la responsabilité de rédiger le manuscrit.

Le présent projet de recherche est en continuité avec un projet réalisé dans le passé par Dr François Labarthe. Ce dernier a donc contribué à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Bertrand Bouchard et Janie McDuff ont participé à la réalisation des expérimentations, plus précisément au niveau des perfusions de cœur au travail *ex vivo* et l'analyse par GCMS ainsi qu'aux analyses de l'expression génique par qPCR, respectivement.

Dr Guy Charron a participé à la mise sur pied de la plate-forme de qPCR ainsi qu'au design des amorces pour les analyses d'expression génique en plus de participer à l'écriture du manuscrit. L'analyse de l'expression génique pour certaines protéines a été effectuée par Dr Martin Young.

Dr Christine Des Rosiers a directement supervisé et contribué à toutes les étapes de la réalisation de ce manuscrit.

ALTERATIONS IN CARBOHYDRATE METABOLISM AND ITS REGULATION IN PPAR ALPHA NULL MOUSE HEARTS

Roselle Gélinas¹, François Labarthe², Bertrand Bouchard¹, Janie Mc Duff¹

Guy Charron¹, Martin E. Young³, and Christine Des Rosiers¹

¹Department of Nutrition, University of Montreal, and Montreal Heart Institute; Montreal, Quebec, Canada, HIT 1C8, ²CHRU de Tours, Université François Rabelais, INSERM E211, Tours, France, and ³Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, 77030, USA

Running head: Metabolic alterations in PPAR α null mouse hearts

ABSTRACT

While a shift from fatty acid (FA) to carbohydrates (CHO) is considered beneficial for the diseased heart, it is unclear why subjects with FA β -oxidation defects are prone to cardiac decompensation under stress conditions. The present study investigated potential alterations in myocardial utilization of CHO for energy production and anaplerosis in 12-week-old peroxisomal proliferator-activating receptor- α (PPAR α) null mice (a model of FA β -oxidation defects). ¹³C-methodology was used to assess substrate flux through energy yielding pathways in hearts perfused *ex vivo* at two workloads with a physiological substrate mixture mimicking the fed state, and real-time quantitative polymerase chain reaction was used to document the expression of selected metabolic genes. Compared to control C57BL/6 mice, isolated

working hearts from PPAR α null mice displayed an impaired capacity to withstand a rise in preload (mimicking an increased venous return as it occurs during exercise) as reflected by a 20% decline in the aortic flow rate. At the metabolic level, beyond the expected shift from FA (5-fold down) to CHO (1.5-fold up) ($p < 0.001$) at both preloads, PPAR α null hearts displayed also (i) a significantly greater contribution of exogenous lactate and glucose and/or glycogen (2-fold up) to endogenous pyruvate formation, while that of exogenous pyruvate remained unchanged; and (ii) marginal alterations in citric acid cycle-related parameters. The lactate production rate was the only measured parameter that was differently affected by preloads in control and PPAR α null mouse hearts, suggesting a restricted reserve for the latter hearts to enhance glycolysis when the energy demand is increased. Alterations in the expression of some glycolysis-related genes suggest potential mechanisms involved in this defective CHO metabolism. Collectively, our data highlight the importance of metabolic alterations in CHO metabolism associated with FA oxidation defects as a factor that may predispose the heart to decompensation under stress conditions even in the fed state.

Keywords: isolated working mouse heart perfusion, citric acid cycle, ^{13}C -isotopomer analysis, glycolysis, ATP-citrate lyase

INTRODUCTION

In the healthy adult heart, the concerted regulation of long chain fatty acid (LCFA) and carbohydrate (CHO) metabolism ensures optimal energy production, in which LCFA are often considered to be the predominant energy substrate under most conditions. This contrasts with the hypertrophied and/or failing heart, which displays a shift from LCFA towards CHO utilization that has been attributed to, at least in part, the deactivation of peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) (5; 12;

28; 36; 41). This nuclear transcription factor, which is highly expressed in the heart, is known to be activated by FAs and to regulate the expression of genes encoding for LCFA uptake and oxidation (7). While this shift from LCFA to CHO for energy production has been shown to be beneficial for the ischemic and failing heart (26; 40), and reactivation of PPAR α in hypertrophied heart was shown to result in contractile dysfunction (50), there are also potential detrimental consequences associated with decreased LCFA oxidation. These include intracellular lipid accumulation and its associated lipotoxic sequelae (26) as well as energy starvation (22; 28). This is best illustrated by patients with inherited LCFA oxidation disorders, who are known to be prone to cardiac decompensation under stress and fasting conditions (6; 39). Additional studies in humans and animals also emphasize the importance of LCFA as a determinant of contractile function, structural remodelling, and mitochondrial energy metabolism in the failing, post-infarct or hypertrophied heart (29; 33; 46). Hence, a better understanding of the potential consequences of a shift from LCFA to CHO appears relevant to the development of metabolic therapies for both patients with heart failure or with inherited LCFA oxidation defects.

Over the past decade, one animal model that has greatly contributed towards improving our understanding of the role of LCFA metabolism in the heart, as well as at the whole-body level, is the PPAR α null mice (2; 23; 49). Similar to patients with inherited LCFA β -oxidation defects, these mice were shown to display hypoglycemia and hypoketonemia under fasting conditions (24; 35). Furthermore, using the *ex vivo* perfused heart model, a number of studies have substantiated their lower capacity to oxidize LCFA, which is associated with increased CHO oxidation and glycolysis, a metabolic phenotype that resembles the hypertrophied and failing heart. This increased glucose utilization appears to improve the recovery of PPAR α null mouse hearts following ischemia (30), but to limit energy production when these hearts are subjected to increased workload (induced by raising the calcium concentration from 2 to 4 mM) (27). This effect was shown to be corrected by overexpressing the glucose transporter GLUT 1, suggesting a potential avenue for metabolic therapy via increased carbohydrate utilization. However, these studies were performed in

Langendorff perfused hearts in the presence of a low glucose concentration (5mM), as opposed to working hearts perfused in the presence of 11mM glucose (i.e. conditions of greater similarity to the mouse *in vivo*). Dysregulation of CHO metabolism has been documented in the liver of PPAR α null mice (43), though little is known about the acute and chronic regulation of energy substrates beyond LCFA in these hearts (9). In addition, these hearts may display alterations in CHO-related pathways such as anaplerotic pyruvate carboxylation, a process which supplies oxaloacetate (OAA) for citrate synthesis and was previously shown to be essential for maintenance of contractile function(13). The latter aspect appears worth considering given that nutritional interventions with anaplerotic substrates were shown to improve the cardiomyopathy of one patient with genetic LCFA oxidation deficiency (34).

The purpose of the present study was to investigate whether PPAR α null mice display alterations in the utilization and/or regulation of CHO for energy production or anaplerosis, which may impair their capacity to respond to an increased workload even in the fed state. To test this hypothesis, we used 10-12 week-old control and PPAR α null mice and assessed substrate fluxes through energy yielding and anaplerotic pathways in hearts perfused *ex vivo* with a physiologic substrate mixture mimicking the fed state through carbon 13 (¹³C)-labeling methodology (19). We documented the impact of an increase in preload, mimicking a raise in venous return as it occurs during exercise. In parallel, indices of cardiac performance and of membrane integrity were continuously monitored. Further to our novel observation that lactate production rate was the only metabolic parameter that may explain the impaired capacity of PPAR α null mouse hearts to maintain their function following an increase in workload, we investigated potential sites of altered regulation of CHO metabolism by documenting the impact of a 24-hour fast on the expression of selected metabolic genes and metabolites involved in CHO metabolism and its regulation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Sources of chemicals, biological products and ^{13}C -labeled substrates, as well of the procedures for the dialysis of BSA (BSA fraction V, Intergen) have been reported previously (47).

Heart perfusion in a semi-recirculating mode

Animal experiments were approved by the local animal care committee in agreement with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Male PPAR α null mice on a C57BL/6 genetic background (Taconic, USA) and their control, C57BL/6NTac (C57BL/6, Taconic, USA; 10-12 weeks old; 26.4 ± 0.4 g and 24.4 ± 0.4 g; respectively, $p < 0.05$), which had free access to water and food, were anesthetized (1 $\mu\text{l/g}$ ip) with a mixture of ketamine (100 mg/ml) and xylazine (20 mg/ml) and heparinised (5000 U/kg sc) 15 min before surgery. The procedure for mouse heart isolation and its *ex vivo* perfusion in a working mode have been described in detail previously (19). The only modification was a change in the preload pressure as described below. The composition of the Krebs-Hensleit perfusion buffer, which was maintained at 37.5°C and gassed with 95% O_2 -5% CO_2 was: 110 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.1 mM CaCl_2 , 0.24 mM KH_2PO_4 , 0.48 mM K_2HPO_4 , 0.48 mM Na_2HPO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 0.1 mM EDTA. The free calcium concentration was 1.55 ± 0.3 mM. Functional and physiological parameters were monitored throughout the perfusion period as described previously (19). Myocardial oxygen consumption (MVO_2), intracellular pH, rate pressure product, cardiac power and cardiac efficiency were calculated from equations reported previously (19).

Perfusion Protocols

Working mouse hearts were perfused for 30 min with a semi-recirculating Krebs-Heinselet buffer containing the following substrates, co-factors and hormones: 11 mM glucose, 1.5 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.4 mM oleate complexed to 3% albumin, 0.8 nM insulin, 50 μ M L-carnitine, 0.5 nM epinephrine. The rationale for this choice of substrate and hormones concentrations, which are within the range of reported values of mouse plasma concentrations in the non-fasting state, was previously reported (19). It is noteworthy that we chose a concentration of lactate of 1.5 mM, because in blood drawn by cardiac puncture in a syringe containing sulfosalicylic acid to precipitate proteins and prevent anaerobic glycolysis, we evaluated lactate concentration to be 1.8 ± 0.3 mM (19). Two different perfusion protocols were used to document the impact of an increase in the preload pressure, which remained within the physiological range. ***Protocol 1.*** Hearts from C57BL/6 (n=13) and PPAR α null (n=12) mice were perfused for 30 min at a preload and afterload pressure of 12 and 50 mmHg, respectively. ***Protocol 2.*** Hearts from PPAR α null and C57BL/6 (n=7 for both groups) were perfused for 30 min with an afterload pressure of 50 mmHg as in protocol 1. However, the preload pressure was kept at 12 mmHg for the first 10 min and increased to 15 mmHg for the remaining 20 min. For any given perfusion, one or two of the unlabeled substrates was replaced by its corresponding labeled substrate(s). Three different ^{13}C -labeled substrate mixtures were used: (A) [$\text{U}^{13}\text{-C}_{18}$]oleate [initial molar percent enrichment (MPE): 25%], (B) [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]lactate-[$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate (initial MPE: 99%) and (C) [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate (initial MPE: 50%)-[$3\text{-}^{13}\text{C}$]pyruvate (initial MPE: 50%)-[$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]lactate (initial MPE 99%). All three substrate mixtures were used for Protocol 1, but only mixtures B & C were used for Protocol 2.

As previously described (19), throughout the perfusion, influent and effluent samples were collected to (i) control pO_2 , pCO_2 , pH, Ca^{2+} and other ion concentrations, (ii) assess lactate dehydrogenase (LDH) release, an index of membrane integrity, (iii) document the lactate and citrate release rates. At the end of the perfusion period,

hearts were freeze-clamped with metal tongs chilled in liquid nitrogen, weighed, and stored at -80°C for further analyses

Effect of a twenty-four hour fast

Male C57BL/6 and PPAR α null mice (10-12 weeks old; Taconic) fed *ad libidum* (n=5 in each group) or fasted for 24 h (n=10 in each group), which were kept in individual cages in the same room, had free access to water. Fasting was initiated at 9:00 a.m. and all mice were sacrificed 24 h later under anesthesia induced by injection of a solution (1 $\mu\text{l/g}$ i.p.) of ketamine (100 mg/ml) and xylazine (20 mg/ml). Mean body weights of fed and fasted PPAR α null mice ($26.6 \pm 1.0\text{g}$ and $23.5 \pm 0.5\text{g}$, respectively; $p < 0.05$) were different from C57BL/6 mice ($21.9 \pm 0.4\text{g}$ and $20.0 \pm 0.5\text{g}$, respectively; $p < 0.01$), but the weight loss due to fasting was similar in both groups ($\sim 17.5\%$). Hearts were rapidly excised, freeze-clamped with metal tongs chilled in liquid nitrogen, and stored in liquid nitrogen until further analyses. Concomitantly, blood samples were collected from the abdominal cavity using a syringe containing 10.8 mg EDTA, immediately centrifuged for 10 min at 15 000 $\times g$, and plasma samples were stored at -80°C until further analyses.

Analytical procedures

Our previously published study (19) provides detailed descriptions for the followings: (i) measurements of the ^{13}C -enrichment and concentrations of CAC intermediates (citrate, succinate, fumarate and malate) by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GCMS; Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a HP-5 column coupled to a 5973N mass spectrometer), and (ii) activities of selected CAC enzymes (citrate synthase (CS), aconitase and NADP $^{+}$ -isocitrate dehydrogenase) by spectrophotometry. Plasma concentrations of glucose and lactate were quantified using enzymatic assays and ketone bodies by GCMS as previously described (19; 48).

Flux parameters

Our previously published studies (19; 47) provide definitions of the ^{13}C terminology and detailed description for the calculations of (i) flux ratios relevant to substrate selection for citrate synthesis from ^{13}C -enrichment of the acetyl (carbons 4 and 5) and oxaloacetate (OAA; carbons 1,2,3,6) moiety of citrate, (ii) efflux rates of unlabeled lactate and pyruvate reflecting glycolysis from exogenous glucose and/or glycogen (for perfusions with ^{13}C -labeled lactate and pyruvate, mixture B and C), as well as (iii) absolute flux rates for pyruvate decarboxylation (PDC) and ATP production from the stoichiometric relationship between oxygen consumption and citrate formation from the various substrates as assessed from the determined flux ratios. In this study, we also report the fractional contribution (FC) of individual CHO to pyruvate formation, which was calculated from the MPE M1 and M3 of tissue pyruvate measured in hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$ (initial MPE: 50%)- $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{pyruvate}$ (initial MPE: 50%)- $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$ (initial MPE 99%) using the following equations: (i) FC of exogenous pyruvate = $\text{FC}_{\text{exogenous pyruvate}} = \text{MPE M1 tissue pyruvate} / \text{MPE M1 exogenous pyruvate}$; (ii) FC of exogenous lactate = $\text{FC}_{\text{exogenous lactate}} = [\text{MPE M3} - \text{MPE M1}] \text{ tissue pyruvate} / \text{MPE M3 exogenous lactate}$, and (iii) FC of other carbohydrates such as exogenous glucose or glycogen = $\text{FC}_{\text{other CHO}} = 1 - \text{FC}_{\text{exogenous pyruvate}} - \text{FC}_{\text{exogenous lactate}}$. Furthermore, we estimated the absolute flux rates for acetyl-CoA formation for citrate synthesis coming specifically from exogenous glucose and/or endogenous glycogen, which was calculated by multiplying the absolute PDC flux rates by $\text{FC}_{\text{other CHO}}$.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (qPCR) gene expression analysis

The following metabolic genes were selected: 1) PPAR α -regulated genes, medium chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadm*) and uncoupling protein (*Ucp3*); 2) genes related to carbohydrate metabolism or its regulation: glucose transporter 4 (*Slc2a4*), phosphofructokinase-1 (*Pfkm*), and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*Pdk4*); 3) genes related to anaplerosis: pyruvate carboxylase (*Pcx*), propionyl-CoA carboxylase B (*Pccb*) and cytosolic NADP⁺-linked malic enzyme (*Me2*), 4) gene related to cytosolic citrate metabolism, ATP-citrate lyase (*Acly*). All gene primer pairs shown in Table I have been designed with the Beacon Designer version 5.0 program using mouse sequences available in *GenBank*. We used amplicons of 126-219 bp overlapping exon-exon boundary. Total RNA was isolated from pulverized frozen heart tissue using RNeasy mini-kit for fibrous tissue following the manufacturer's standard protocol (Qiagen). The purity, integrity, and quantity of RNA were evaluated using a BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). Total RNA (2.5 μ g) for each sample, which were run in duplicates, has been reverse transcribed at 55°C using 15 Units of cloned AMV reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) and 8 pmol of antisense specific primers (Integrated DNA Technologies Corporate, Iowa). Only primer pairs giving $\geq 90\%$ efficiency over a 6 log serial dilution of a control RT reaction from sample highly expressing the specific target gene of interest were used. Total RT products (3-5 ng equivalent mRNA) were analyzed by qPCR using the 2X Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG according to the manufacturer's specifications (Invitrogen Life Technologies). Cycling was achieved in a MX3005p cycler (Stratagene; conditions: 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C 30 sec, 50°C 45 sec, and 72°C 45 sec). At the end of each run, the absence of primer-dimer formation and the presence of a unique amplicon was confirmed using the dissociation curves. Quantification was accomplished with MxPro software v3 (Stratagene) using ROX normalization and the $\Delta\Delta C_T$ correction (25). Levels of selected gene transcripts for each samples, were averaged and normalized to the housekeeping gene, namely glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). This gene was selected because among all tested housekeeping genes (*Gapdh*, *Hprt1*, *Actb*), it displayed the lowest variations between the various experimental conditions.

To validate method, we independently analyze two genes (*Pdk4* and *Ucp3*) using Taqman quantitative RT-PCR, as described previously (51; 52). Furthermore, NADP⁺-linked malic enzyme (*Me2*) and pyruvate carboxylase (*Pcx*) was also analyzed using Taqman assays, as described previously(13). Briefly, standard RNA was made for these assays by the T7 polymerase method (Ambion, Austin, Texas), using total RNA isolated from mouse hearts; the use of standard RNA allows absolute quantification of gene expression. The correlation between the C_t (the number of PCR cycles required for the fluorescent signal to reach a detection threshold) and the amount of standard was linear over at least a 5-log range of RNA for all assays (data not shown). Quantitative RT-PCR data are represented as mRNA molecules relative to that of cyclophilin A (*Ppia*).

Table I: Primer and probe sequences used in comparative real time quantitative polymerase chain reaction.

Symbols	Name	Gene bank	Forward	Reverse
<i>Acly</i>	ATP-citrate lyase	NM_134037	GGCAAGATCCTCATCATTGG	CCACCTCTTCGGACAAAG
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_008084	TCAACGGCACAGTCAAGG	ACTCCACGACATACTCAGC
<i>Slc2a4</i>	Glucose transporter 4	NM_009204	GCTTCTGTTGCCCTTCTG	ACTTCCGTTTCTCATCCTTC
<i>Acadm</i>	Medium chain acyl-CoA dehydrogenase	NM_007382	ACCGAAGAGTTGGCGTATGG	ATTGGCTGCTCCGTCATCC
<i>Pccb</i>	Propionyl-CoA carboxylase B	NM_025835	ATCCGAGAGTGCCATGACC	GCTGGTTCGCCACAATTCC
<i>Pdk4</i>	PDH Kinase, isoenzyme-4	NM_013743	GTGATGTGGTAGCAGTAGTC	ATGTGGTGAAGGTGTGAAGG
<i>Pfkm</i>	Phosphofructokinase-1 muscle	NM_021514	TGATGGAAGGCAGGAAGC	CCAGGTAGCCACAGTAGC
<i>Ucp3</i>	Uncoupling protein 3	NM_009464	TCCGATTTCAAGCCATGATACG	GTCACCATCTCAGCACAGTTG

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm SEM of n= 4-12 heart or plasma samples. Statistical significance was reached at $p < 0.05$ using an unpaired *t*-test or a two-way ANOVA followed by the Bonferroni selected-comparison-test.

RESULTS

Isolated working PPAR α null hearts displayed an impaired capacity to withstand a physiological raise in preload

We used our isolated working mouse heart model (19) to compare the metabolic and functional responses of PPAR α null and control mice to a physiological raise in preload from 12 to 15 mmHg, which mimics an increased venous return as it occurs during exercise. Upon *ex vivo* perfusion at a physiological afterload of 50 mmHg with a buffer containing a substrate mixtures mimicking the fed state (19), control hearts maintained constant values for the various functional and physiological parameters shown in Table II during the entire 30 min perfusion at the two preload pressures. While at a preload of 12 mmHg, PPAR α null hearts maintained functional parameters similar to control hearts for all parameters, except for a significantly 20% lower dP/dt_{max} value (Table II). In contrast, at 15 mmHg these hearts showed additional impairments in left ventricular function (Table II). This was evidenced by a 20 % decline of aortic flow, and a 40% increased in coronary flow, which correlated with a 25 % higher MVO₂ ($r^2=0.86$; $p < 0.001$) and resulted in a 22% lower cardiac efficiency. Finally, there was also a greater rate of LDH release from PPAR α null hearts, reflecting diminished membrane integrity. Altogether, the aforementioned results illustrate the impaired capacity for young PPAR α null mouse hearts to maintain normal functions when energy demand is increased by a small raise in preload.

Table II. Functional and physiological parameters of control C57BL/6 and PPAR α null mouse hearts perfused *ex vivo* in the working mode at two preloads.

	Preload pressure							
	12 mmHg				15 mmHg			
	C57BL/6		PPAR α null		C57BL/6		PPAR α null	
Heart rate, beats/min	8,5	\pm 28	481	\pm 21	455	\pm 37	500	\pm 46
LVSP _{max} , mmHg	110	\pm 5	102	\pm 3	101	\pm 4	96	\pm 6
LVEDP _{max} , mmHg	15	\pm 1	16	\pm 1	19	\pm 0.7	17	\pm 1
Rate pressure product, mmHg·min ⁻¹ ·10 ⁻³	41586	1967	41466	1968	37051	2256	38239	2350
dP/dt _{max} , mmHg/sec	6470	\pm 335	5419	\pm 276 *	6425	\pm 481	5127	\pm 380*
Cardiac Output, ml/min	8.64	\pm 0.51	7.75	\pm 0.38	8.17	\pm 0.43	7.90	\pm 1.20
Aortic Flow, ml/min	6.13	\pm 0.52	5.63	\pm 0.27	5.26	\pm 0.47	3.75	\pm 0.68 ^s
Coronary flow, ml/min	2.51	\pm 0.31	2.11	\pm 0.24	2.91	\pm 0.25	4.15	\pm 1.00 ^s
MVO ₂ , μ mol/min	1.59	\pm 0.12	1.39	\pm 0.18	1.76	\pm 0.08	2.09	\pm 0.29 ^s
Cardiac Power, mW	2.14	\pm 0.18	1.76	\pm 0.09	1.85	\pm 0.01	1.86	\pm 0.25
Cardiac efficiency, mW· μ mol ⁻¹ ·min ⁻¹	1.50	\pm 0.13	1.64	\pm 0.20	1.19	\pm 0.09	0.98	\pm 0.16 ^s
pH _i	7.35	\pm 0.01	7.36	\pm 0.01	7.36	\pm 0.01	7.36	\pm 0.01
LDH release, mU/min	23	\pm 3	23	\pm 3	29	\pm 1	47	\pm 6 ^s

Data are means \pm SE of 7-12 heart perfusion experiments. Values shown represent averages (expressed per heart) for the 25-30 min perfusion period, except for myocardial oxygen consumption (MVO₂) and intracellular pH (pH_i), which were calculated from pO₂ and pCO₂ values determined in influent and effluent perfusate collected at 20 min. LVSP_{max}, maximum left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure; dP/dt_{max}, maximum value for the first derivative of left ventricular pressure; LDH, lactate dehydrogenase. * P < 0.05 PPAR α null vs control mouse hearts; and ^s P < 0.05 12 vs 15 mmHg.

Isolated working PPAR α null mouse hearts display alterations in carbohydrate utilization that are affected by preload

Compared to controls, PPAR α null hearts depicted a five-fold (p < 0.001) lower contribution of exogenous LCFA (OLE/CS) to energy production associated with a ~52% increase in that of CHO via pyruvate decarboxylation (PDC/CS: 74 \pm 3 % vs 48 \pm 5 %, p < 0.001) (Figure 1). The higher contribution of CHO was attributed to a two-fold increase in the contribution of exogenous lactate and glucose and/or endogenous glycogen, while that of exogenous pyruvate remained unchanged.

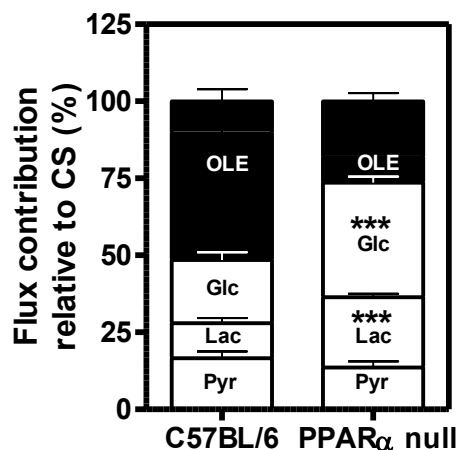


Figure 1. Relative contribution of various substrates to mitochondrial acetyl-CoA in working hearts from control C57BL/6 and PPAR α null mice.

Data are mean \pm SE of 5-9 perfusion experiments with [U- 13 C $_8$]oleate, [U- 13 C $_3$]lactate/[U- 13 C $_3$]pyruvate, or [U- 13 C $_3$]pyruvate/[3- 13 C]pyruvate/[U- 13 C $_3$]lactate. The contribution of (i) carbohydrates: exogenous pyruvate (Pyr), exogenous lactate (Lac), and glucose/glycogen (Glc) via pyruvate decarboxylation (open bars), (ii) fatty acids via β -oxidation (OLE, solid bars) and (iii) other substrates (OS, grey bars) to acetyl-CoA formation are expressed relative to citrate synthesis (CS) and calculated from the measured tissue mass isotopomers distribution of (i) citrate and its oxaloacetate (OAA) moiety from which we extrapolate the acetyl moiety of citrate (AC^{CIT}), and (ii) succinate. *** $P < 0.001$ PPAR α null vs C57BL/6 mouse hearts.

It is noteworthy that in both groups of mice, similar PDC/CS flux ratios were estimated from either (i) M1 tissue pyruvate and M1 acetyl moiety of citrate (coming from [3- 13 C]pyruvate, or (ii) M3 tissue pyruvate and M2 acetyl moiety of citrate (coming from [U13C3]lactate) (data not shown), suggesting that exogenous lactate and pyruvate are incorporated into the same intracellular pyruvate pool. However, the percent contribution of the various carbohydrates to intracellular pyruvate formation differed also between the two groups of mice. Specifically, in PPAR α null hearts, the percent contribution of lactate (33 ± 2 % vs 23 ± 2 %, $p < 0.05$) and glucose and/or endogenous glycogen (48 ± 1 % vs 42 ± 1 %, $p < 0.05$) were higher, while that of pyruvate was lower (19 ± 1 % vs 35 ± 3 %, $p < 0.003$), compared to controls. Similar

metabolic alterations were observed at the higher preload (data not shown). The lactate production rate, which reflects the partitioning of pyruvate produced from glycolysis between cytosolic reduction by LDH and its mitochondrial uptake and oxidation, was the only metabolic parameter that differed at the two preloads between the two groups of mice. Specifically, PPAR α null mouse hearts displayed a significantly 3-fold higher lactate release rate at the lower preload (Figure 2A). However, while a raise in preload significantly increased the lactate production rate in C57BL/6 mouse hearts, it had no effect on that of hearts from PPAR α null mice. This contrasts with the estimated rate of formation of glycolytically-derived acetyl-CoA from glucose and/or glycogen (Figure 2B), which was ~two-fold higher in PPAR α null mouse hearts at the two preload pressures. A similar pattern was also observed for the absolute PDC flux rate (Lower preload: PPAR α 1.65 ± 0.13 vs C57BL/6 0.95 ± 0.130 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$, $p < 0.001$; higher preload: PPAR α 1.87 ± 0.25 vs C57BL/6 1.14 ± 0.150 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$, $p < 0.05$). Hence, collectively, these results emphasize the importance of CHO utilization and specifically of the glycolytic flux in PPAR α null hearts under condition of increased energy demand even in the fed state. Specifically, they suggest that in PPAR α null mouse hearts, lactate release rates are already maximal at the lower preload and cannot increase further following a rise in workload even when glucose is supplied at 11 mM.

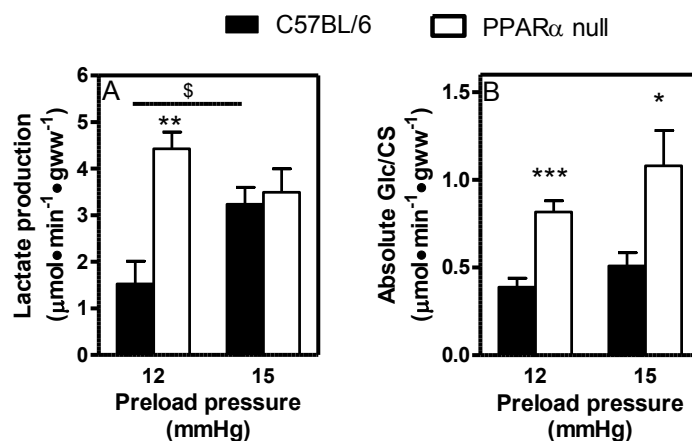


Figure 2. Lactate production (A) and estimated production of glycolytically-derived acetyl-CoA (B) in working hearts of control C57BL/6 and PPAR α null mice perfused at two preloads.

Data are mean \pm SE of 7-9 heart perfusion experiments using C57BL/6 (solid bars) and PPAR α null mice (open bars). Lactate production rates were calculated from the product of coronary flow rates and lactate concentration differences between influent and effluent perfusates determined by gas chromatography-mass spectrometry and enzymatic assays. Glycolytically-derived acetyl-CoA (Glc/CS) was estimated from the fractional contribution of glucose/glycogen to pyruvate formation, the pyruvate decarboxylation flux ratio, and the CAC flux rate reported in Table III. Results are expressed related to heart weight (in gram wet weight, gww). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P < 0.001$ PPAR α null vs C57BL/6 mouse hearts; $^{\S} P < 0.05$ 15 vs 12 mmHg.

Isolated working PPAR α null mouse hearts display modest changes in CAC-related parameters at both preloads.

To substantiate the potential consequences of a metabolic shift from LCFA to CHO in hearts from PPAR α null mouse hearts, we compared CAC-related parameters of hearts freeze-clamped after 30 min of *ex vivo* perfusion (Table III). The levels of CAC intermediates, which are crucial for the functioning of the CAC and hence energy production, are regulated by two metabolic processes, namely the re-fueling of CAC catalytic carbons by anaplerosis, and mitochondrial CAC intermediate efflux (8). They may also be affected by CAC enzymatic activities. Table III reports data

from hearts perfused at 12 mmHg, but similar results were obtained at 15 mmHg (data not shown).

Despite their metabolic shift from LCFA to CHO, PPAR α null mouse hearts showed values similar to control hearts for the following parameters: (i) The relative and absolute PC/CS flux rate, which represents the anaplerosis flux via pyruvate carboxylase and/or malic enzyme, (ii) tissue levels of individual and total CAC intermediates (i.e. citrate, succinate, fumarate and malate), and (iii) the absolute CAC flux rate calculated from measured MVO₂ value and the stoichiometric relationships between oxygen consumption and citrate formation from CHO and FA. Similar values for the estimated CAC flux rate imply that in PPAR α null mouse hearts, the decrease in acetyl-CoA production from LCFA ($1102 \pm 100 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$) appears to be compensated by an increased production from CHO ($906 \pm 146 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$, $p=0.33$).

Table III. Citric acid cycle-related parameters measured in working control C57BL/6 and PPAR α null mouse hearts perfused at 12mmHg.

		C57BL/6	PPAR α null
PC flux			
	Relative to CS (%)	5.4 \pm 0.5	8.6 \pm 2.0
	Absolute ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$)	0.11 \pm 0.02	0.21 \pm 0.05
CAC flux			
	Absolute ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$)	2.0 \pm 0.2	2.3 \pm 0.1
CAC intermediate levels ($\text{nmol}\cdot\text{gww}^{-1}$)			
	Citrate	177 \pm 11	186 \pm 19
	Succinate	93.0 \pm 8.2	128 \pm 13
	Fumarate	17.5 \pm 0.5	22.3 \pm 1.9
	Malate	143 \pm 18	172 \pm 6
	Total	451 \pm 29	522 \pm 19
Citrate release ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$)			
		0.16 \pm 0.02	0.49 \pm 0.11*
CAC enzymes activity ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ of protein)			
	Citrate synthase	2.12 \pm 0.27	2.72 \pm 0.30
	Aconitase	0.126 \pm 0.008	0.153 \pm 0.021
	NADP ⁺ -isocitrate dehydrogenase	1.05 \pm 0.10	1.29 \pm 0.05*

Data are means \pm SE of 6-9 heart perfusion experiments. Pyruvate carboxylation (PC) flux was calculated from the measured mass isotopomer distribution (MID) of succinate, pyruvate, citrate and its OAA moiety. The MPE of OAA^{CIT} was corrected for the formation of M3 OAA from citric acid cycle (CAC) metabolism of citrate isotopomers. Absolute CAC flux was calculated from MVO₂ and the stoichiometric relationships between citrate formation and MVO₂ from carbohydrates and fatty acids. Myocardial CAC intermediate levels were assessed by GCMS and enzymes activities by spectrophotometric assays. The citrate release rate was calculated from the product of coronary flow and concentration differences in influent and effluent perfusates. * $P < 0.05$ PPAR α null vs control mouse hearts.

However, PPAR α null mouse hearts depicted some changes in other CAC-related parameters compared to control hearts. Indeed, we found that when perfused at 12 mmHg, PPAR α null mouse hearts displayed a ~3-fold greater citrate release rates compared to controls ($p < 0.05$; Table III). This measurement has previously been used as a surrogate of cytosolic levels of citrate (19; 22; 47), which is difficult to assess with precisions given that it represents $< 5\%$ of the total cellular pool of citrate.

Hence, a greater citrate release rate in PPAR α null mouse hearts suggests a higher cytosolic citrate level. However, the presence of a significant concentration of citrate in the albumin solution ($\sim 10 \mu\text{M}$) resulted in some imprecision in the measured values at 12 mm Hg and prevented the precise measurements of citrate in influent and effluent perfusates of hearts perfused at 15 mmHg. Finally, we also found that the maximal enzyme activity of NADP $^+$ -linked isocitrate dehydrogenase was $\sim 25\%$ increase in PPAR α null mouse hearts (Table III), although that of citrate synthase ($p=0.17$) and aconitase ($p=0.30$) was similar to controls.

Taken together, those results indicate that PPAR α null mouse hearts show marginal changes in CAC-related parameters compared to control hearts, except for increased citrate release and NADP $^+$ -linked isocitrate dehydrogenase activity. However, the latter changes were not affected by the preload pressure.

PPAR α null mouse hearts show marked differences in myocardial CAC intermediates and expression of genes related to carbohydrate metabolism and its regulation, which are affected by nutritional status

In order to identify potential sites of altered regulation of CHO metabolism, particularly glycolysis, we documented plasma levels of energy substrates as well as the myocardial CAC intermediate levels and expression of selected metabolic genes involved in CHO metabolism and its regulation in the fed state as well as following a 24h-fasting period. The latter condition, which can induce cardiac decompensation in subjects with LCFA oxidation, was chosen because it is known to up-regulate PPAR α -regulated gene expression. Hence, changes in gene expression in fed versus fasted control hearts provided us with information as to whether a specific gene is regulated by PPAR α .

Circulating and tissue levels of energy-related metabolites. In the fed state, a condition corresponding to our heart perfusion experiments, only minor differences in circulating substrate levels were observed between the 2 groups of mice, except for lactate. (Figure 3 A-E). Note that in both groups of mice, values measured for ketone

body concentrations, particularly acetoacetate, were lower than that previously reported for C57/BL6 mice by Stowe et al. (42). In contrast, measured values for plasma metabolites following a 24h fast, which concur and expand on previously published studies (18; 20; 27), and demonstrate drastically lowers levels of plasma glucose, lactate, the ketone body β -hydroxybutyrate for PPAR α null mice than controls. Hence, one would expect that this shortage of substrate supply to the heart during fasting would only exacerbate the aforementioned alterations in CHO metabolism, and the associated contractile dysfunction, in PPAR α null mouse hearts. In fact, at the myocardial level, our results demonstrate that the total pool of CAC intermediates, which is known to vary with substrate availability and to increase with fasting (53), was significantly decreased in PPAR α null mice compared to controls, but only in the fasted state (Figure 3F). The difference in total CAC levels between the two groups in the fasted state is mainly explained by a lower level of succinate in the PPAR α null hearts compared to C57BL/6 (271 ± 57 nmol/gww vs 630 ± 42 nmol/gww, respectively, data not shown).

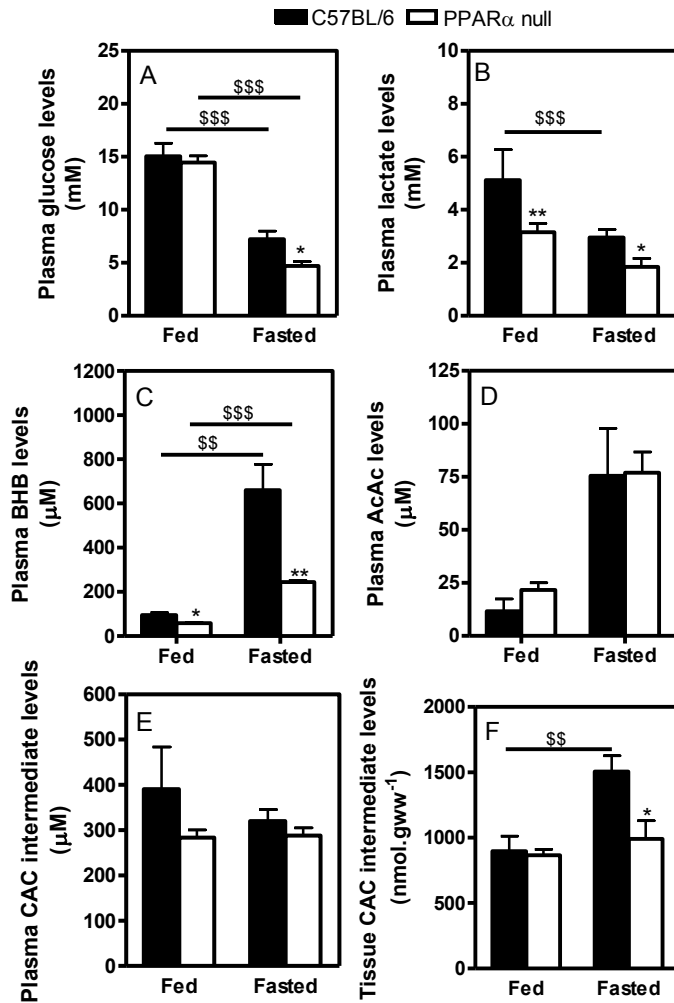


Figure 3: Impact of nutritional state on plasma and myocardial metabolite levels in control C57BL/6 and PPAR α null mice.

Data are mean \pm SE of 4-5 fed and 10 24h-fasted C57BL/6 (solid bars) and PPAR α null (open bars) mice. Glucose and lactate levels were quantified by enzymatic assays, while ketone bodies and CAC intermediates were quantified by GCMS. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ PPAR α null vs C57BL/6 mouse hearts; \$\$ $P < 0.01$ and \$\$\$ $P < 0.001$ fasted vs fed.

Metabolic gene expression profiling. As expected, PPAR α null hearts depict markedly lower mRNA levels for known PPAR α -regulated metabolic genes *Acadm*

and *Ucp3*, both in the fed and fasted state (Figure 4A-B). In addition, the effect of fasting, which greatly increased the expression of these PPAR α target genes in control C57BL/6 mouse heart, concurring with literature data (24), was greatly attenuated in PPAR α null mouse hearts. The mRNA levels of most selected genes implicated in glucose metabolism and its regulation differed also between control and PPAR α null mice. Concurring with literature data (17), the mRNA levels of pyruvate dehydrogenase-regulating kinase (*Pdk4*) showed a pattern similar to other PPAR α -regulated metabolic genes (Figure 4C). None of the other genes showed such a pattern of expression (Figure 4D-I). However, in the fed state, the following genes depicted markedly lower levels of transcripts in PPAR α null mouse hearts: (i) ATP-citrate lyase (*Acly*; 70%), a protein that may determine levels of cytosolic citrate, which is an inhibitor of glycolytic phosphofructokinase-1, and (ii) the NADP⁺-linked malic enzyme (*Me2*; 50%), whose role in the heart remains to be clarified though it has been proposed to be involved in anaplerosis (44). As for the other transcripts measured, the following genes showed the greatest increases in fasted PPAR α null mouse hearts: the glucose transporter *Slc2a4* (55%), the glycolytic enzyme phosphofructokinase (*Pfk-1*; 30%), and the anaplerotic enzyme pyruvate carboxylase (*Pcx*; 50%). Note that our finding of an enhanced expression of gene encoding for GLUT4 in fasted PPAR α null mouse hearts concurs with the higher GLUT 4 protein expression and glucose uptake reported in these hearts by Panagia *et al.* (30).

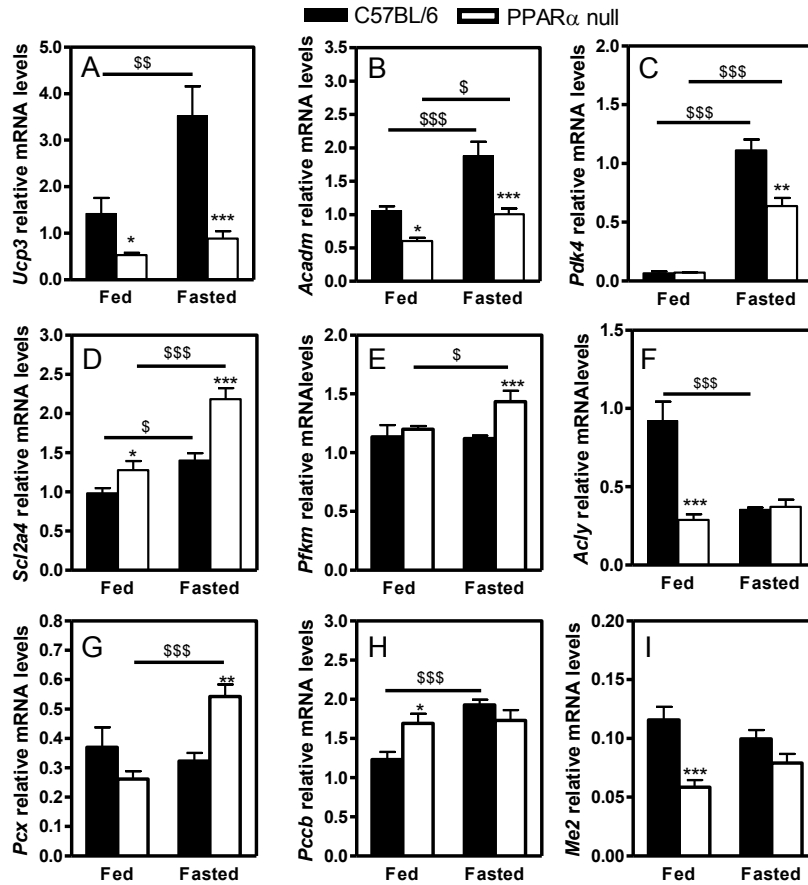


Figure 4: Impact of nutritional state on myocardial messenger RNA levels of selected metabolic genes in control C57BL/6 and PPAR α null mice.

Data are mean \pm SE of 4-10 non-perfused freeze-clamped hearts from fed or 24-h fasted C57BL/6 (solid bars) and PPAR α null (open bars) mice. Messenger RNA (mRNA) levels of uncoupling protein 3 (*Ucp3*; A), medium chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadm*; B), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*Pdk4*, C), glucose transporter 4 (*Slc2a4*; D), phosphofruktokinase-1 (*Pfkf*; E), ATP-citrate lyase (*Acly*; F) and propionyl-CoA carboxylase B (*Pccb*; H), are normalized to the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), while those of pyruvate carboxylase (*Pcx*; G) and of NADP⁺-linked malic enzyme (*Me2*; I) are normalized to cyclophilin (*Ppia*). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ PPAR α null vs C57BL/6 mouse hearts; $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$ and $^{\$ \$ \$}P < 0.001$ fasted vs fed.

DISCUSSION

Prior to this study, there had been only a few studies that had investigated substrate fuel utilization and its regulation in PPAR α null mouse hearts (3; 9; 27; 30; 37), none of which had specifically examined the utilization and/or regulation of CHO for energy production or anaplerosis. Using our *ex vivo* working heart model, we documented the impact of an increase in workload induced by raising the preload from 12 to 15 mmHg, which remains in the physiological range. This mimics an increased venous return as it occurs during exercise. While at the lower preload, PPAR α null mouse hearts maintain cardiac function similar to controls, except for a ~20 % lower dP/dt_{max}, these hearts displayed a markedly impaired capacity to withstand a rise in preload, despite providing what are generally accepted to be physiological levels of calcium, hormones (insulin), cofactors (carnitine) and nutrients, including concentrations of glucose mimicking the fed state (11 mM).

At the metabolic level, beyond the expected decrease (~80%) in the contribution of exogenous oleate β -oxidation and increase (~52%) in that of CHO to acetyl-CoA production for citrate synthesis (Figure 1), which concur with previous studies (9; 27), our metabolic data highlight the following additional metabolic alterations in PPAR α null hearts. Firstly, these hearts depict a modified contribution of the various CHO to acetyl-CoA formation, namely an increased contribution of lactate, glucose and/or glycogen, while that of pyruvate remained unchanged. The lack of increase in the contribution of exogenous pyruvate to acetyl-CoA formation in PPAR α null mouse hearts appears to result from a lower contribution to intracellular pyruvate formation (2-fold), suggesting that exogenous pyruvate uptake cannot be increased in these hearts. Another potential explanation would be compartmentation of cytosolic pyruvate, as suggested by literature evidence (10; 19). However, the latter explanation is not supported by our finding of similar PDC/Cs flux ratios calculated from exogenous [3-¹³C]pyruvate and [U-¹³C₃]lactate, suggesting their incorporation into the same intracellular pyruvate pool. While, this issue remains to be further investigated, the increased contribution of lactate, but not of pyruvate, to acetyl-CoA

formation in PPAR α null mouse hearts may be viewed as an adaptive mechanism aimed at optimizing energy production. Indeed, using a revised estimate for the stoichiometry of oxidative phosphorylation (16), the ATP/O₂ ratio calculated for complete oxidation of glycogen (5.7), glucose (5.2) and lactate (4.8) are higher than for pyruvate (4.1). Incidentally, the estimated CAC flux rates and, hence, the calculated ATP production rates were similar in control and PPAR α null mouse hearts (PPAR α 39.2 ± 0.8 vs C57BL/6 37.7 ± 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$, $p=0.18$ at the lower preload). However, in the latter hearts, ATP is produced almost exclusively from CHO metabolism ($97 \pm 7\%$) compared to $49 \pm 5\%$ in controls. Secondly, perfused PPAR α null mouse hearts displayed a ~three-fold increase in citrate efflux and in the maximal activity of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, which reflects predominantly the mitochondrial isoform (32), although other measured CAC-related parameters were similar to controls, including the anaplerotic PC/CS flux ratio and tissue levels of CAC intermediates.

The aforementioned metabolic alterations were documented at both preloads and cannot explain the altered response of PPAR α null hearts to a raise in workload. In fact, the rate of lactate production from exogenous glucose and/or endogenous glycogen was the only measured metabolic parameter that differed between perfused PPAR α null and control mouse hearts and was modified by preload. Specifically, our data indicate that in PPAR α null mouse hearts, lactate production rates are already maximal at the lower preload, being 3-fold higher than controls, and cannot increase further following a rise in workload even when glucose is supplied at 11 mM. In fact, at the lower preload, the contribution of CHO to ATP production appears to be already maximal in PPAR α null mouse hearts ($97 \pm 7\%$ compared to $49 \pm 5\%$ in controls). This may suggest a restricted reserve for these hearts to further enhance glycolysis when the energy demand is increased, which may lead to a state of “energy starvation”.

Potential sites of dysregulation of CHO metabolism were also investigated by conducting experiments in which we documented the impact of nutritional status (fed

or 24h-fasted) on the levels of plasma and tissue metabolites and gene expression of selected metabolic genes. The use of a 24h-fast challenge enables ones to discriminate PPAR α -regulated genes. For example, gene expression performed in the fed condition demonstrated the predictable decreased expression of PPAR α -regulated genes coding for MCAD and UCP3 in PPAR α null mouse hearts. Further, the expression of these genes was increased several-fold by fasting in control hearts, an effect that was attenuated in PPAR α null mice (20). Nevertheless, these mice did show a residual expression of these genes, which is likely to be linked to additional transcription factors (e.g. PPAR β/δ) (14). Among other measured transcripts, PDK4 was the only other gene for which we observed a pattern of response that suggested an involvement of PPAR α , which concurs with current literature data (17).

However, more importantly, we also report data on the expression of genes that had not been previously reported in fed PPAR α null mouse hearts. Firstly, regarding genes coding for selected key protein or enzymes implicated in the utilization of CHO, we found that these hearts displayed an enhanced expression of gene encoding for GLUT4, a mechanism that can favour glucose uptake and utilization. In contrast, gene expression of glycolytic PFK-1 was unchanged, although an increased expression may have been expected in order to compensate the decreased expression of genes related to FA utilization. Secondly, the transcript levels for the anaplerotic genes *Pcx* and *Pccb* in fed PPAR α null mouse hearts showed marginal differences compared to controls, concurring with the absence of significant differences for the measured rates of anaplerotic pyruvate carboxylation between these two groups of hearts. Finally, we observed markedly reduced mRNA levels (~ 70%) for cytosolic ATP-citrate lyase (*Acly*) and (50%) NADP⁺-linked malic enzyme. It is noteworthy that in the liver, these genes has been shown to be regulated by the transcription factor sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) (1; 38) and PPAR α was found to play a permissive role (31).

Our findings of a lower expression of ATP-citrate lyase in the fed state together with the higher citrate release rate documented in perfused PPAR α null mouse hearts suggest one potential mechanism contributing to the restricted capacity to enhance glycolysis at the higher preload, namely higher cytosolic citrate level in these hearts. The cytosolic ATP-citrate lyase, whose activity in the heart is evaluated to be $\sim 0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gww}^{-1}$ (4), cleaves citrate to acetyl-CoA and OAA. Hence, this activity may be determinant for the cytosolic level of citrate (47) and, for glycolysis given that citrate is a potent allosteric inhibitor of PFK-1 (see ref. (41) for review).

Additional potential mechanisms may be responsible for the restricted capacity of PPAR α null mouse hearts to enhance its lactate production rates in response to a raise in preload should also be considered. These include increased production of nitric oxide, which is known to negatively impact on myocardial glucose uptake and utilization (11; 45). This explanation would be compatible with the higher coronary flow of PPAR α null mouse hearts at the higher preload. Incidentally, a recent study by Guellich *et al.* demonstrated oxidative damage to contractile proteins, specifically tyrosine nitration of myosin, in these hearts suggesting increased production of free radicals and nitric oxide (15). This may also offer an explanation for the change in activity of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, an enzyme that is affected by oxidative stress-related molecules. It is noteworthy, however, that an enhanced free radical production in PPAR α null mouse heart may result in overestimation of the reported absolute CAC flux rates, which are calculated from MVO₂ values. In fact, we cannot evaluate the percentage of oxygen leak associated with free radical production.

In conclusion, results from this study support the notion that beyond their low capacity to oxidize LCFA, young PPAR α null mice display alterations in the myocardial metabolism and regulation of CHO, particularly glucose and glycogen, which may impair their capacity to withstand an increase in energy demand induced by a physiological raise in workload even in the fed state. In fact, *ex vivo* perfusion experiments revealed that PPAR α null mouse hearts were unable to increase their glycolytic rate following a raise in preload, which mimics an increased venous return

as it occurs during exercise, despite providing what are generally accepted to be physiological levels of calcium, hormones (insulin), cofactors (carnitine) and nutrients, including concentrations of glucose mimicking the fed state (11 mM). These results suggest that dysregulation of CHO metabolism may also impact on energy production and contractility of hearts that display low LCFA oxidation either due to inherited gene defects or subsequent to deactivation of PPAR α such as it may occur in hypertrophied and failing hearts. Based on our findings, we suggest that one type of metabolic intervention that could benefit the latter hearts would be medium-chain FA, particularly odd-carbon medium chain FA which are succinate precursors (34). These FA are more readily β -oxidized and their hepatic metabolism would favour gluconeogenesis while forming ketone bodies that will become available to the heart for energy production (21).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was presented at the Experimental Biology Meeting held in Washington in April 2007, at the Society Heart and Vascular Metabolism held in Semihamoo, in September 2006, and in Maastricht in June 2007, and at the World Congress of the International Society of Heart Research held in Bologna in June 2007. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Grant # 9575 to C.D.R.), the National Institute of Health (RO1 DK069752 to C.D.R.) and studentships to R.G. (Department of Nutrition, University of Montreal).

ABBREVIATIONS

CAC: citric acid cycle

CHO: carbohydrate

CS: citrate synthesis

FA: fatty acid

LDH: lactate dehydrogenase

LCFA: long-chain fatty acid

MPE: molar percent enrichment

MVO₂: myocardial oxygen consumption

OAA: oxaloacetate

OLE: exogenous oleate oxidation

PC: pyruvate carboxylation

PDC: pyruvate decarboxylation

PPAR: peroxisomal proliferator-activating receptor

REFERENCES

1. **Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S and Yamada N.** Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res* 43: 1220-1235, 2002.
2. **Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T and Gonzalez FJ.** Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 273: 5678-5684, 1998.
3. **Atherton HJ, Bailey NJ, Zhang W, Taylor J, Major H, Shockcor J, Clarke K and Griffin JL.** A combined 1H-NMR spectroscopy- and mass spectrometry-based metabolomic study of the PPAR-alpha null mutant mouse defines profound systemic changes in metabolism linked to the metabolic syndrome. *Physiol Genomics* 27: 178-186, 2006.

4. **Awan MM and Saggerson ED.** Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295 (Pt 1): 61-66, 1993.
5. **Barger PM and Kelly DP.** Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms. *Am J Med Sci* 318: 36-42, 1999.
6. **Bonnet D, Martin D, Pascale DL, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M and Saudubray JM.** Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation* 100: 2248-2253, 1999.
7. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M and Wahli W.** Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366, 1996.
8. **Brunengraber H and Roe CR.** Anaplerotic molecules: current and future. *J Inherit Metab Dis* 29: 327-331, 2006.
9. **Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, Severson DL, Kelly DP and Lopaschuk GD.** A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 277: 4098-4103, 2002.
10. **Chatham JC, Des RC and Forder JR.** Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E794-E802, 2001.
11. **Depre C, Vanoverschelde JL, Goudemant JF, Mottet I and Hue L.** Protection against ischemic injury by nonvasoactive concentrations of nitric oxide synthase inhibitors in the perfused rabbit heart. *Circulation* 92: 1911-1918, 1995.
12. **Finck BN and Kelly DP.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) signaling in the gene regulatory control of energy metabolism in the normal and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1249-1257, 2002.
13. **Gibala MJ, Young ME and Taegtmeyer H.** Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 168: 657-665, 2000.
14. **Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van d, V, Staels B and van BM.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* 92: 518-524, 2003.
15. **Guellich A, Damy T, Lecarpentier Y, Conti M, Claes V, Samuel JL, Quillard J, Hebert JL, Pineau T and Coirault C.** Role of Oxidative Stress in Cardiac Dysfunction of PPAR{alpha}-/- Mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007.

16. **Hinkle PC, Kumar MA, Resetar A and Harris DL.** Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* 30: 3576-3582, 1991.
17. **Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM and Harris RA.** Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes* 51: 276-283, 2002.
18. **Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B and Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489-1498, 1999.
19. **Khairallah M, Labarthe F, Bouchard B, Danialou G, Petrof BJ and Des RC.** Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using ¹³C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1461-H1470, 2004.
20. **Knauf C, Rieusset J, Foretz M, Cani PD, Uldry M, Hosokawa M, Martinez E, Bringart M, Waget A, Kersten S, Desvergne B, Gremlich S, Wahli W, Seydoux J, Delzenne NM, Thorens B and Burcelin R.** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain. *Endocrinology* 147: 4067-4078, 2006.
21. Labarthe, F., Gélinas, R., and Des Rosiers, C. Medium chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease. *Cardiovasc. Drugs & Therapeutics* in press. 2007.
22. **Labarthe F, Khairallah M, Bouchard B, Stanley WC and Des RC.** Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1425-H1436, 2005.
23. **Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H and Gonzalez FJ.** Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15: 3012-3022, 1995.
24. **Leone TC, Weinheimer CJ and Kelly DP.** A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7473-7478, 1999.
25. **Livak KJ and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
26. **Lopaschuk GD, Barr R, Thomas PD and Dyck JR.** Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose

oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. *Circ Res* 93: e33-e37, 2003.

27. **Luptak I, Balschi JA, Xing Y, Leone TC, Kelly DP and Tian R.** Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. *Circulation* 112: 2339-2346, 2005.
28. **Neubauer S.** The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356: 1140-1151, 2007.
29. **Okere IC, McElfresh TA, Brunengraber DZ, Martini W, Sterk JP, Huang H, Chandler MP, Brunengraber H and Stanley WC.** Differential effects of heptanoate and hexanoate on myocardial citric acid cycle intermediates following ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 100: 76-82, 2006.
30. **Panagia M, Gibbons GF, Radda GK and Clarke K.** PPAR-alpha activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2677-H2683, 2005.
31. **Patel DD, Knight BL, Wiggins D, Humphreys SM and Gibbons GF.** Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR alpha-deficient mice. *J Lipid Res* 42: 328-337, 2001.
32. **Plaut GW, Cook M and Aogaichi T.** The subcellular location of isozymes of NADP-isocitrate dehydrogenase in tissues from pig, ox and rat. *Biochim Biophys Acta* 760: 300-308, 1983.
33. **Rennison JH, McElfresh TA, Okere IC, Vazquez EJ, Patel HV, Foster AB, Patel KK, Chen Q, Hoit BD, Tserng KY, Hassan MO, Hoppel CL and Chandler MP.** High-fat diet postinfarction enhances mitochondrial function and does not exacerbate left ventricular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1498-H1506, 2007.
34. **Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F and Brunengraber H.** Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest* 110: 259-269, 2002.
35. **Russell LK, Finck BN and Kelly DP.** Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 38: 81-91, 2005.
36. **Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA and Kelly DP.** Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 94: 2837-2842, 1996.
37. **Sambandam N, Morabito D, Wagg C, Finck BN, Kelly DP and Lopaschuk GD.** Chronic activation of PPARalpha is detrimental to cardiac recovery after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H87-H95, 2006.

38. **Sato R, Okamoto A, Inoue J, Miyamoto W, Sakai Y, Emoto N, Shimano H and Maeda M.** Transcriptional regulation of the ATP citrate-lyase gene by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 275: 12497-12502, 2000.
39. **Saudubray JM, Martin D, de LP, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P and Brivet M.** Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis* 22: 488-502, 1999.
40. **Stanley WC and Chandler MP.** Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev* 7: 115-130, 2002.
41. **Stanley WC, Recchia FA and Lopaschuk GD.** Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093-1129, 2005.
42. **Stowe KA, Burgess SC, Merritt M, Sherry AD and Malloy CR.** Storage and oxidation of long-chain fatty acids in the C57/BL6 mouse heart as measured by NMR spectroscopy. *FEBS Lett* 580: 4282-4287, 2006.
43. **Sugden MC, Bulmer K, Gibbons GF, Knight BL and Holness MJ.** Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *Biochem J* 364: 361-368, 2002.
44. **Sundqvist KE, Heikkila J, Hassinen IE and Hiltunen JK.** Role of NADP⁺ (corrected)-linked malic enzymes as regulators of the pool size of tricarboxylic acid-cycle intermediates in the perfused rat heart. *Biochem J* 243: 853-857, 1987.
45. **Tada H, Thompson CI, Recchia FA, Loke KE, Ochoa M, Smith CJ, Shesely EG, Kaley G and Hintze TH.** Myocardial glucose uptake is regulated by nitric oxide via endothelial nitric oxide synthase in Langendorff mouse heart. *Circ Res* 86: 270-274, 2000.
46. **Tuunanen H, Engblom E, Naum A, Nagren K, Hesse B, Airaksinen KE, Nuutila P, Iozzo P, Ukkonen H, Opie LH and Knuuti J.** Free fatty acid depletion acutely decreases cardiac work and efficiency in cardiomyopathic heart failure. *Circulation* 114: 2130-2137, 2006.
47. **Vincent G, Bouchard B, Khairallah M and Des Rosiers C.** Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H257-H266, 2004.
48. **Vincent G, Comte B, Poirier M and Des Rosiers C.** Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E846-E856, 2000.
49. **Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, Kodama M, Aizawa Y, Ohta Y, Ono T, Hasegawa G, Naito M, Nakajima T, Kamijo Y, Gonzalez FJ and Aoyama T.** Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome

proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *J Biol Chem* 275: 22293-22299, 2000.

50. **Young ME, Laws FA, Goodwin GW and Taegtmeier H.** Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem* 276: 44390-44395, 2001.
51. **Young ME, Patil S, Ying J, Depre C, Ahuja HS, Shipley GL, Stepkowski SM, Davies PJ and Taegtmeier H.** Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) in the adult rodent heart. *FASEB J* 15: 833-845, 2001.
52. **Young ME, Razeghi P, Cedars AM, Guthrie PH and Taegtmeier H.** Intrinsic diurnal variations in cardiac metabolism and contractile function. *Circ Res* 89: 1199-1208, 2001.
53. **Zorzano A, Balon TW, Brady LJ, Rivera P, Garetto LP, Young JC, Goodman MN and Ruderman NB.** Effects of starvation and exercise on concentrations of citrate, hexose phosphates and glycogen in skeletal muscle and heart. Evidence for selective operation of the glucose-fatty acid cycle. *Biochem J* 232: 585-591, 1985.

4. CHAPITRE IV - MANUSCRIT II

PROLONGED QT INTERVAL AND LIPID ALTERATIONS BEYOND β -OXIDATION IN VERY LONG-CHAIN ACYL-CoA DEHYDROGENASE NULL MOUSE HEARTS.

Roselle Gélinas, Julie Thompson-Legault, Bertrand Bouchard, Caroline Daneault,

Marc-Antoine Gillis, Guy Charron, Victor Gavino, François Labarthe,

and Christine Des Rosiers

American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology

2011 Jun 17.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Roselle Gélinas a contribué à l'élaboration du projet de recherche à tous les niveaux, incluant la définition de l'hypothèse et des objectifs, le choix des protocoles et la mise au point des techniques en plus d'avoir réalisé toutes les expérimentations présentées dans ce manuscrit, et assumé la responsabilité de rédiger le manuscrit.

Bertrand Bouchard a participé à la réalisation des expérimentations, plus précisément au niveau des perfusions de cœur au travail *ex vivo* et l'analyse par GCMS. Julie Thompson-Legault et Caroline Daneault ont participé à la réalisation des travaux de cet article dans le cadre, respectivement, de leur stage de fin d'étude au premier cycle et de maîtrise. Marc-Antoine Gillis a, quant à lui, réaliser les analyses des données de télémétrie et a participer à leur interprétation. Le Dr Guy Charron a participé à l'établissement de la colonie de souris déficientes pour VLCAD ainsi que sur la mise au point de la technique de génotypage des souris par qPCR. Le Dr Victor Gavino a participé à la mise au point de la technique pour l'analyse du profil des acides gras dans les triglycérides et les phospholipides.

Le présent projet de recherche est en continuité avec un projet réalisé dans le passé par Dr François Labarthe. Ce dernier a donc contribué à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Finalement, Dre Christine Des Rosiers a directement supervisé et contribué à toutes les étapes de la réalisation de ce manuscrit.

**PROLONGED QT INTERVAL AND LIPID ALTERATIONS BEYOND β -
OXIDATION IN VERY LONG-CHAIN ACYL-CoA DEHYDROGENASE
NULL MOUSE HEARTS**

Roselle Gélinas^{1,2}, Julie Thompson-Legault^{1,2}, Bertrand Bouchard², Caroline
Daneault², Marc-Antoine Gillis², Guy Charron², Victor Gavino¹, François Labarthe³,
and Christine Des Rosiers^{1,2}

*¹Department of Nutrition, Université de Montréal, and ²Montreal Heart Institute,
Montreal, Quebec, Canada HIT 1C8; and ³Centre Hospitalier Régional et
Universitaire de Tours, Université François Rabelais, Institut National de la Santé et
de la Recherche Médicale U921, Tours, France*

Running title: Metabolic and QT alterations in VLCAD-deficient hearts

ABSTRACT

Patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency frequently present cardiomyopathy and heart beat disorders. However, the underlying factors, which may be of cardiac or extra-cardiac origins, remain to be elucidated. In this study, we tested for metabolic and functional alterations in the heart from 3- and 7-month-old VLCAD null mice and their littermate counterparts, using validated

experimental paradigms, namely, (i) *ex vivo* perfusion in working mode, with concomitant evaluation of myocardial contractility and metabolic flux using ^{13}C -labeled substrates under various conditions, as well as (ii) *in vivo* targeted lipidomics, gene expression analysis as well as electrocardiogram monitoring by telemetry in mice fed various diets. Unexpectedly, when perfused *ex vivo*, working VLCAD null mouse hearts maintained values similar to those of the controls for functional parameters and for the contribution of exogenous palmitate β -oxidation (energy production), even at high palmitate concentration (1 mM) and increased energy demand (with 1 μM epinephrine) or after fasting. However, *in vivo*, these hearts displayed a prolonged QTc interval *in vivo* under all conditions examined, as well as the following lipid alterations: (i) age- and condition-dependent accumulation of triglycerides; and (ii) 20% lower docosahexaenoic acid (DHA, an omega-3 polyunsaturated fatty acid) in membrane phospholipids. The latter was independent of liver, but affected by feeding a diet enriched in saturated fat (exacerbated) or fish oil (attenuated). Our finding of a longer QTc interval in VLCAD null mice appears to be most relevant given that such condition increases the risk of sudden cardiac death.

Keywords: isolated working mouse heart perfusion; metabolic fluxes; β -oxidation; triglycerides; docosahexaenoic acid

INTRODUCTION

Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) catalyzes the first reaction of mitochondrial β -oxidation. This enzyme utilizes fatty acyl-CoA of chain lengths varying between 14 and 24 carbons, but shows its highest activity with palmitoyl-CoA (25). In humans, VLCAD deficiency, first reported in 1993 (2; 4; 62), is the most common inherited long-chain fatty acid (LCFA) oxidation disorder, with an

incidence currently estimated to be between 1/42,500 and 1/120,000 (34; 52). Because VLCAD is highly expressed in the liver, heart and skeletal muscles, VLCAD-deficiency evokes multiple clinical symptoms, including cardiomyopathy and heart beat disorders (6). The cardiac symptoms are currently believed to arise from an energy deficit due to impaired β -oxidation of LCFAs (which normally supply ~70% of energy to the normal beating heart) and/or accumulation of toxic metabolites, such as long-chain (LC)-acylcarnitines or LC-CoAs (6). In the most severe cases, without appropriate treatments, VLCAD-deficient infants will succumb from sudden cardiac death, mainly caused by severe arrhythmias between 2 and 5 months of age, often after fasting or an infectious illness (30; 47; 57). However, about 30% of these patients never develop cardiac symptoms and display a milder clinical phenotype characterized by hypoketotic hypoglycaemia, indicating metabolic derangements in the liver (57). This diversity in clinical phenotype severity as well as the large variety of mutations known to cause VLCAD-deficiency make the diagnosis and treatment of patients particularly difficult (21; 37).

VLCAD-null mice were created in 2003 (15) to improve our understanding of the clinical phenotype of VLCAD-deficient patients and, hopefully, suggest more efficient treatments. VLCAD-null mice recapitulate the human phenotype to some extent. Specifically, they display cold intolerance, arrhythmia, and LC-acylcarnitine accumulation in the liver, serum and skeletal muscles when exposed to exercise or cold under fasting conditions (10; 14; 15; 53; 54; 56). Furthermore, newborn VLCAD null mice display alterations in metabolic protein and gene expression in the heart, liver and brown adipose tissues (14; 15; 20) as well as in calcium homeostasis in the heart (60). However, in general, VLCAD null mice present a milder phenotype than humans. In this regard, Chegary et al. recently reported that fibroblasts from VLCAD-deficient mice and humans differ in their capacity to oxidize LCFA, and their finding was explained by the functional overlap of VLCAD with LC-acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) an enzyme that is active in mice but apparently not in humans (9). However, much remains to be elucidated about the causes underlying the wide variety of symptoms manifested by patients with VLCAD deficiency. To the

best of our knowledge, the impact of VLCAD deficiency on lipid metabolism, particularly in the heart, has not yet been specifically examined, nor has its metabolic or functional capacity to withstand a fat challenge been tested.

Hence, we investigated whether VLCAD null mice hearts display alterations in their metabolic, contractile and electrical functions when subjected to conditions that mimic those believed to induce decompensation in human patients, namely, fasting, adrenergic stress and high-fat loading. These parameters were assessed in 3- and/or 7-month-old VLCAD null mice and their littermates, in validated experimental paradigms, namely, (i) *ex vivo* perfusion in working mode with concomitant evaluation of myocardial contractility and metabolic flux, employing ^{13}C -labeled LCFA (28), and (ii) *in vivo* telemetry. While *ex vivo* working VLCAD null mouse hearts unexpectedly maintained normal contractile function and utilization of exogenous LCFAs for β -oxidation under all conditions examined, other *in vivo* analysis revealed that these mice displayed other cardiac-specific lipid and functional alterations beyond β -oxidation, namely age- and condition-dependent accumulation of LCFAs in triglycerides (TGs), lower docosahexaenoic acid (DHA) level in phospholipids (PLs), as well as a prolonged QTc interval, a condition that increases the risk of sudden cardiac death.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and animals.

The sources of chemicals, biological products and ^{13}C -labeled substrates as well as the BSA dialysis procedure (BSA fraction V, Intergen, Purchase, NY) have been identified previously (58). Antibodies against phosphorylated and total extracellular-regulated kinase (ERK) forms 1 and 2 (ERK1/2), Akt, and beclin-1, Atg7 and Atg12 were purchased from Cell Signalling Technologies (Danvers, MA). Animal

experiments were all approved by the local animal care committee in agreement with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. *Acadvl*^{-/-} (VLCAD^{-/-}) mice (129svJ X C57BL/6J genetic background) were kindly provided by Dr. Arnold Strauss, University of Cincinnati, College of Medicine (15). Male VLCAD^{-/-} mice were backcrossed with C57Bl/6J females to produce heterozygous VLCAD^{+/-} mice, which were then bred to generate VLCAD^{-/-} and control littermate (VLCAD^{+/+}) offspring. The latter were genotyped, as described below. All animals, housed in a specific pathogen free facility with a 12-h:12-h light-dark cycle starting at 7:00 AM, had free access to water and standard chow (except if specified otherwise, as described below).

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) genotyping assay. All animals were genotyped at weaning via tail biopsies (20 mg/ml), which were incubated at 55°C for 4 h in buffer (50 mM Tris, 30 mM EDTA, 0.25% SDS) containing (1,000 µg/ml) proteinase K (Sigma, St-Louis, MO). After digestion, the samples were diluted 1:250 in DNase/RNase free water along with 15 mg chelex-resin (BioRaD Laboratories, Hercules, CA) and heated at 95°C for 5 min. They were then analysed in duplicate by qPCR with 2X Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG, according to the manufacturer's specifications (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Cycling was achieved in a MX3005p cycler (Stratagene, Mississauga, Ontario, Canada); conditions: 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 30 s, 47°C for 45 s, and 72°C for 45 s). The primers for qPCR were designed to target the NEO^r gene cassette (reverse: TGGCTACCCGTGATATTGC; forward: GGCATAGAAGGCGATGC), and the corresponding PCR signal was expressed relative to cyclophilin A (*Ppia*) genomic DNA (reverse: GCCGCCAGTGCCATTATG; forward: CCGATGACGAGCCCTTGG).

Effect of a 24-h fast and various diets. Male VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice fed, either a standard diet (3- and 7-month-old; Harlan Teklab #2018, 3.1 kcal/g), a high-fat diet (HFD: Harlan Teklab #03584, 5.4kcal/g) or a fish oil diet (FOD: Harlan Teklab #10789, 3.4 kcal/g) *ad libitum*, and were kept for 2 (HFD) or 5 (FOD) weeks in the same room. Percent calories from carbohydrates, lipids and proteins for the

various diets are, respectively: (i) Standard: 58:18:24; (ii) HFD: 26.6:58.4:15; and (iii) FOD: 54.2:25.4:20.4 (for the FA profile of these diets, see Supplemental Table I). To document the impact of fasting, selected animals from all groups were housed individually in cages, with fasting initiated at 9:00 a.m. and lasting 24 h. All animals were weighed before sacrifice under anaesthesia induced by injection of a solution (1 μ l/g i.p.) of ketamine (100 mg/ml) and xylazine (20 mg/ml). Body weights were not different between groups of mice fed different diets, under all conditions and at all ages (Supplemental Table II). In 1 group of 3-month-old mice from both genotypes, hearts were perfused *ex vivo* in working mode, as described below. In other groups, hearts, livers and skeletal muscle (gastrocnemius) were excised rapidly, freeze-clamped with metal tongs chilled in liquid nitrogen, and stored in liquid nitrogen. At the same time, blood samples were collected (18) and stored at -80°C for further analyses.

Heart perfusion in semi-recirculating mode.

Male VLCAD^{-/-} and VLCAD^{+/+} mice, which had free access to water and food unless specified otherwise, were anaesthetized (1 μ l/g ip) with a mixture of ketamine (100 mg/ml) and xylazine (20 mg/ml) and heparinised (5,000 U/kg sc) 15 min before surgery. Previous publications describe the procedure: (i) for mouse heart isolation and its *ex vivo* perfusion in working mode as well as for continuous monitoring of functional and physiological parameters throughout perfusion as well as of concentrations in influent (arterial) and effluent (coronary) of pO₂, pCO₂, pH, Ca²⁺ and other ions (18; 28), and (ii) for calculating myocardial oxygen consumption (MVO₂), intracellular pH, rate pressure product (RPP), cardiac power and cardiac efficiency from previously-reported equations (28). At the end of the perfusion period, hearts were freeze-clamped with metal tongs chilled in liquid nitrogen, weighed, and stored at -80°C for further analyses.

Perfusion protocols. Working mouse hearts were perfused for 30 min with semi-recirculating Krebs-Heinselet buffer containing various substrates, co-factors and

hormones according to 4 different protocols. For all perfusions, the buffer contained 1.5 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.8 nM insulin, 50 μ M L-carnitine and 0.5 nM epinephrine, while glucose and palmitate (complexed to 3% albumin) concentrations were varied to mimic fed or fasting conditions. For any given perfusion, we included [U¹³-C₁₆]palmitate [initial molar percent enrichment: 25%] as the labelled substrate, and assessed its metabolism through β -oxidation and triglyceride (TG) formation. Protocol 1. Hearts from 3- and 7-month-old VLCAD^{+/+} (n=6) and VLCAD^{-/-} (n=5) mice were perfused at preload and afterload pressures of 15 and 50 mmHg, respectively, in the presence of 11 mM glucose and 0.4 mM palmitate to mimic the fed state. Protocol 2. Hearts from 3-month-old VLCAD^{+/+} (n=6) and VLCAD^{-/-} (n=6) mice were perfused, as in Protocol 1 except for the presence of 7 mM glucose and 1 mM palmitate to mimic the fasted state. Protocol 3. Hearts from 3-month-old VLCAD^{+/+} (n=6) and VLCAD^{-/-} mice (n=5) were perfused with 7 mM glucose and 1 mM palmitate as in Protocol 2 for the first 5 min. Thereafter, afterload pressure was increased from 50 to 60 mmHg, and 1 μ M of epinephrine was added to mimic adrenergic stress. Protocol 4. Hearts isolated from 24-h fasted, 3-month-old VLCAD^{+/+} (n=5) and VLCAD^{-/-} (n=6) mice were perfused as described in Protocol 2.

Electrocardiogram (ECG) analysis in vivo.

ECG parameters were monitored continuously in live mice via *in vivo* telemetry, as described previously (8; 12) in 7-month-old control and VLCAD-null mice ($n=6$ in each group). In brief, 12 mice were simultaneously instrumented under isoflurane anaesthesia, with OpenHeart radiofrequency transmitters (Data Sciences International, Arden Hills, MN). After a 1-week recovery period, during which the mice were fed the standard diet, ECG parameters were recorded for 24 h to track the complete circadian rhythm. Then, the standard diet was replaced by a HFD for 2 weeks, and ECG parameters were recorded for another 24 h. 12 signals corresponding to 12 mice were acquired simultaneously with IOX 2.5.1.13 (EMKA Technologies, Falls Church, VA) at a sample rate of 1 kHz. Recordings were analysed with ECG Auto 2.6.0.20 (EMKA Technologies) for heart rate as well as for RR, QRS and QT

intervals. The data reported represent the means of values recorded during the first 10 min of each h over the 24-h recording period.

Analytical procedures.

Gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) assay and flux parameters. Our previously-published studies (28; 58) provide: (i) detailed descriptions of ^{13}C -enrichment of Krebs cycle intermediates (citrate, succinate, fumarate and malate) by GCMS (Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a HP-5 column coupled to a 5973N mass selective detector); (ii) definitions of ^{13}C terminology and calculations of flux ratios relevant to substrate selection for citrate synthesis (CS) from ^{13}C -enrichment of the acetyl (carbons 4 and 5) and oxaloacetate (carbons 1,2,3,6) moiety of citrate; and (iii) determinations of glucose and lactate concentrations by enzymatic assays.

Fatty acid (FA) profiling in TGs and PLs. Fatty acids from heart, liver, and skeletal muscle tissue homogenates (TGs and PLs) were quantified using a previously-described modified method (29) which included tissue lipid extraction (16) and separation into classes with an aminoisopropyl column (Varian, Harbor City, CA) (46). Briefly, pulverized tissues (25 mg) were incubated overnight at 4°C in a solution of chloroform/methanol (2:1) containing 0.004% butylated hydroxytoluene (BHT), filtered through gauze and dried under nitrogen gas. The samples were re-suspended in 2 ml of hexane/chloroform/methanol (95:3:2). TGs and PLs were separated on the aminoisopropyl column (which had been activated with hexane) by the addition of (i) 4 ml chloroform (for TGs), followed by (ii) 2.5 ml methanol/chloroform (6:1) and 2.5 ml 0.05 M sodium acetate in methanol/chloroform (6:1) (for PLs). All samples were dried under nitrogen gas after the addition of 50 μl of 2 mM nonadecanoic acid as external standard. FAs were trans-methylated according to a modified method described by Lepage and Roy (33). Briefly, FAs were re-suspended in 2 ml of hexane/methanol (1:4) with 0.004% BHT and 200 μl of acetyl chloride added; the samples were then heated at 100°C for 1 h. The remaining

acetyl chloride was neutralized by incorporating 5 ml of 6% potassium carbonate; thereafter, the upper hexane phase containing fatty acid methyl esters (FAMES) was collected and subjected to GC-FID or GCMS. GC-FID analyses were achieved in an Agilent DB-WAX polar capillary column (60 m; 0.25 mm ID; 0.25 μm thickness) with high-purity hydrogen as carrier gas at a constant flow of 1.9 ml/min under the following conditions: 40°C for 7 min, increased by 10°C/min until 120°C, then by 1°C/min until 180°C, and, finally, by 0.5°C/min until 218°C. GCMS was operated in chemical ionization mode with methane as reagent gas. LCFAs were analysed as their $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion by selective ion monitoring, after separation in a Varian CP7420 FAME polar capillary column (100 m; 0.25 mm ID; 0.23 μm thickness) with high-purity helium as carrier gas at a constant flow rate of 0.5 ml/min under the following conditions: 190°C for 25 min and increased by 2°C/min until 245°C. GC-FID and GCMS have been internally validated, and similar results were obtained for samples analysed by both techniques. FAs were identified according to their retention time, and concentrations were calculated using standard curves and the external standard.

¹³C-enrichment of palmitate in TGs. Palmitate from perfused heart tissue TGs was extracted and processed, as described above, except that it was analysed by GCMS (29) with selective ion monitoring at m/z of 270 (for unlabelled palmitate) and 286 (for $[\text{U}-^{13}\text{C}_{16}]$ palmitate).

Reverse transcription-qPCR gene expression analysis. Supplemental Table III enumerates the qPCR primer pairs for the selected genes, crafted with the Beacon Designer program (version 5.0), using mouse sequences available in *GenBank*, and not reported previously (18). Only qPCR primer pairs giving >90% efficiency were retained. qPCR analyses were conducted as described previously (18). We documented the gene expression of enzymes/proteins involved in (i) β -oxidation, namely, VLCAD (*Acadvl*), LCAD (*Acadl*), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD: *Acadm*) as well as the recently-discovered ACAD9 (*Acad9*), as well as (iii) hormone-sensitive lipase (HSL: *Lipe*) and adipose triglyceride lipase (ATGL: *Pnpla2*), which are implicated in TG hydrolysis, and finally (vi) two enzymes

involved in PUFAs metabolism, delta-5 (*Fads1*) and delta-6 desaturase (*Fads2*) . Gene transcript levels in each sample were averaged and normalized to the housekeeping gene, namely, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*), after $\Delta\Delta C_t$ correction. This gene was selected because among all tested housekeeping genes (*Gapdh*, *Hprt1*, *Ppia*), it displayed the lowest variations between different experimental conditions.

Protein expression and phosphorylation status. The abundance and phosphorylation of several proteins were evaluated by standard Western blotting in hearts and livers clamped *in vivo* or in perfused hearts. We used primary antibodies against phospho-ERK1/2, total ERK1/2, phospho-Akt (ser 473), total Akt, beclin-1, Atg7, Atg12 (mouse-specific) or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a loading control. Thereafter, the blots were washed and incubated with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000). Note that, for all measurements, we obtained similar results twice with different animals.

Statistical analyses.

The data are expressed as mean \pm standard error (S.E.) of n=4-20 hearts, livers or plasma samples. Statistical significance was reached at $P < 0.05$ by unpaired t-test or two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. The 2-way ANOVA was used to compare the effects of conditions (fasting or diet) within the control and VLCAD null groups and to assess the interaction between these groups.

RESULTS

Ex vivo working VLCAD null mouse hearts maintain physiological parameters and exogenous LCFA β -oxidation similar to control values, even when LCFA concentrations and energy demand are increased.

To test the hypothesis that VLCAD-deficient hearts manifest alterations in contractile function and LCFA β -oxidation, particularly in the presence of high LCFA concentrations, we perfused well-established *ex vivo* working hearts with a mixture of substrates (28), including ^{13}C -labeled LCFA. This provides indicators of the dynamics of cardiac energy substrate metabolism, information that is not accessible from static measurements of mRNA, protein expression or enzyme activity. Surprisingly, when perfused *ex vivo*, working hearts from 3- and 7-month-old VLCAD null mice maintained physiological parameters similar to their age-matched littermate counterparts during the entire 30-min perfusion under all conditions examined. These included the presence of 1 mM palmitate, acute adrenergic stimulation, or hearts isolated from mice after a 24-h fast, a condition that has been linked to cardiac decompensation in patients with LCFA β -oxidation defects. Figure 1A reports RPP values under all perfusion conditions. Other functional data on working hearts isolated from 3-month-old fed or 24-h fasted mice, which are representative of data obtained under all conditions, are listed in Supplemental Table IV.

At the metabolic level, flux through β -oxidation, which is reflected by the contribution of exogenous palmitate to acetyl-CoA formation for CS (PAL/CS), was also similar between control and VLCAD null hearts under all conditions (Fig. 1B). In addition, ^{13}C -enrichment of palmitate in TGs was low, variable (between 1 and 3%, data not included) and did not significantly differ between the 2 groups, indicating similar partitioning of this LCFA between β -oxidation (energy production) and esterification to TGs (storage). It is noteworthy that when exogenous palmitate concentration was augmented to 1 mM, there was a 3- to 4-fold increase in the LCFA's contribution to acetyl-CoA formation in both control and VLCAD-null hearts. This result clearly illustrates the capacity of VLCAD null hearts to respond to a LCFA challenge, at least *ex vivo*. Finally, we also discerned no decrease in the contribution of LCFA to β -oxidation flux when 0.4 mM palmitate, a saturated LCFA,

was replaced by 0.4 of unsaturated LCFA, either oleate or linoleate (data not included).

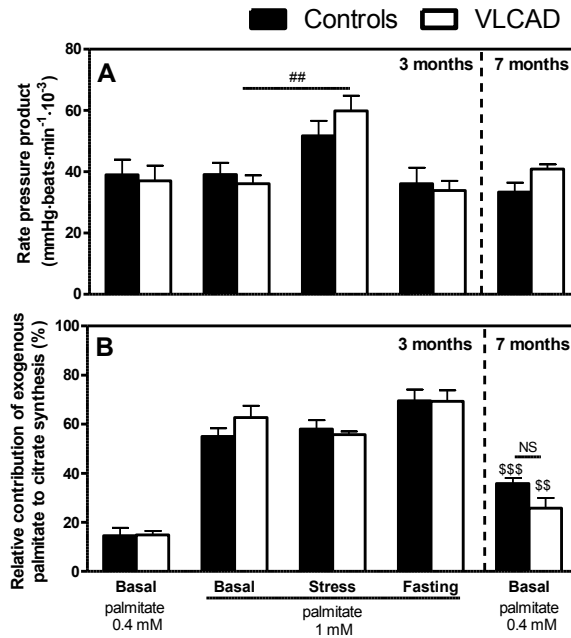


Figure 1: Rate pressure product (A) and relative contribution of exogenous palmitate to mitochondrial acetyl-CoA (B) in control VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} working mouse hearts perfused *ex vivo* under various conditions.

Data are means \pm S.E. of 6 perfusion experiments with [U¹³-C₁₆]palmitate on VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mouse hearts under various conditions. (A) Values shown for the rate pressure product (RPP) represent averages for the 25-30-min perfusion period. (B) The contribution of exogenous palmitate to acetyl-CoA formation is expressed relative to citrate synthesis (PAL/CS) and calculated from the measured tissue mass isotopomer distribution of citrate and its oxaloacetate moiety, from which we extrapolate the acetyl moiety of citrate. Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. ^{##} $P < 0.01$ stress vs. basal state, ^{\$\$} $P < 0.01$ and ^{\$\$\$} $P < 0.001$ 7 vs. 3 months. NS: not significant.

Further to our findings of normal β -oxidation fluxes and contractile function *ex vivo*, we expanded our lipidomic analyses to test for the presence of alterations (i) in LCFA partitioning between oxidation and storage *in vivo*, as evidenced by LCFA accumulation in TGs, and (ii) the LCFA composition of PLs, specifically DHA, which is known to be anti-arrhythmogenic (35). These analyses were conducted

under various nutritional conditions in freeze-clamped hearts, but also in other tissues, to test whether the observed changes were cardiac specific.

VLCAD null mice present age- and condition-dependent changes in LCFA accumulation in TG in heart and liver

Analyses of LCFA accumulation in TGs were conducted in 3- and 7-month-old VLCAD mouse hearts freeze-clamped after *ex vivo* perfusion under the aforementioned conditions or *in situ* in the fed state or after a 24-h fast or 2 weeks of feeding of the HFD consisting of lard (58.4% calories from fat, predominantly palmitate, to mimic our *ex vivo* perfusion conditions). Compared to the controls, 7-month-old VLCAD mouse hearts freeze-clamped *in situ* manifested significantly higher levels (~80%) of the most abundant LCFAs (oleate: C18:1n9 and linoleate: C18:2n6) in TGs in the fed state. Figure 2 reports data acquired with the standard diet, which are also representative of those obtained with the HFD (Fig. 2A-B). At 3 months of age, however, there was no difference in LCFAs between the 2 groups unless the hearts were freeze-clamped after *ex vivo* perfusion with 0.4 mM palmitate (data not included).

In contrast to heart, we found a ~2-fold accumulation of LCFAs (C18:1n9; C18:2n6, and also palmitate: C16:0) in TGs from VLCAD null mouse livers compared to the controls, which occurred following fasting already at 3 months of age (Fig. 2C-D).

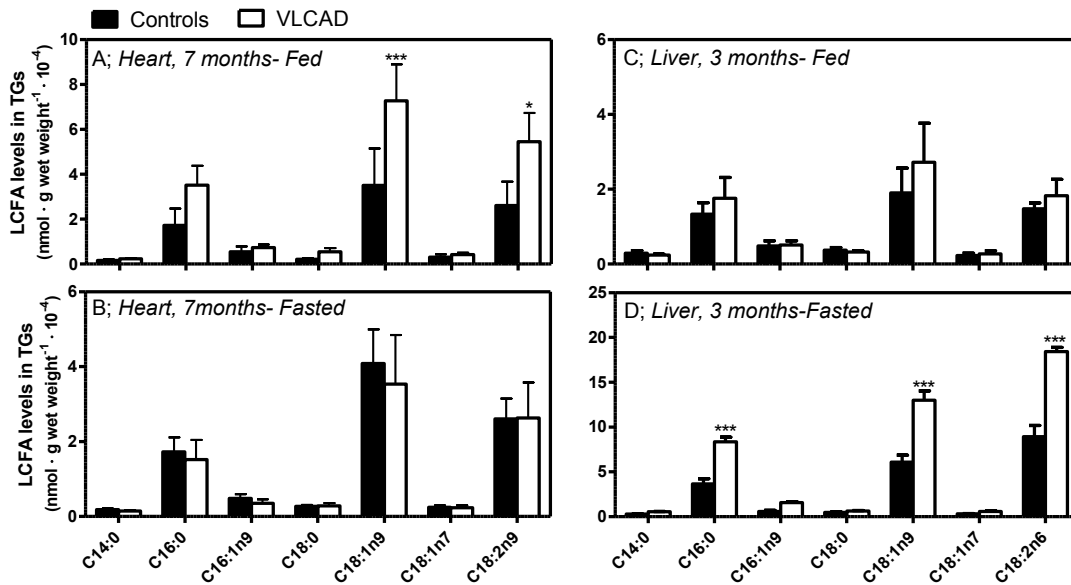


Figure 2: Impact of nutritional status on long-chain fatty acid (LCFA) levels in triglycerides (TGs) of VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mouse hearts (A-B) and livers (C-D) freeze-clamped *in situ*.

Data are means \pm SE of 4-7 non-perfused freeze-clamped hearts (A-B) and livers (C-D) from fed (A-C) or 24-h fasted (B-D) 3- or 7-month old (VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice, and are expressed in nmol/g wet weight. Statistics: Unpaired *t*-test. **P*<0.05 and ****P*<0.001 VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+}. Note the different scales for the two conditions and tissues.

Factors underlying the various lipid alterations in VLCAD null mice: We investigated a number of potential explanations for the observed condition-dependent changes in TGs, respectively, in the heart as well as differences in LCFA accumulation in TGs between the heart (at 7 months in the fed state) and liver (at 3 months in the fasted state) of VLCAD null mice. Firstly, in the heart, these values cannot be ascribed to transcriptional changes (*i.e. decrease*) of genes encoding for enzymes that may potentially compensate for VLCAD activity, namely, LCAD, ACAD9 or ACOX. In fact, although we noted a lower transcript level (25%) of *Acadl* in VLCAD null compared to littermate control mice at 7 (Fig. 3A-D) and not at 3 (Supplemental Fig.

1) months of age, this was observed for the fasting condition both on the standard (Fig.3A-D) and HFD (data not included). In contrast, already at 3 months of age, VLCAD mouse livers displayed differences in *Acadl* transcript levels in the fasting condition (~25% decreased; $P<0.001$), albeit not for *Acad9* (Fig. 3E-H).

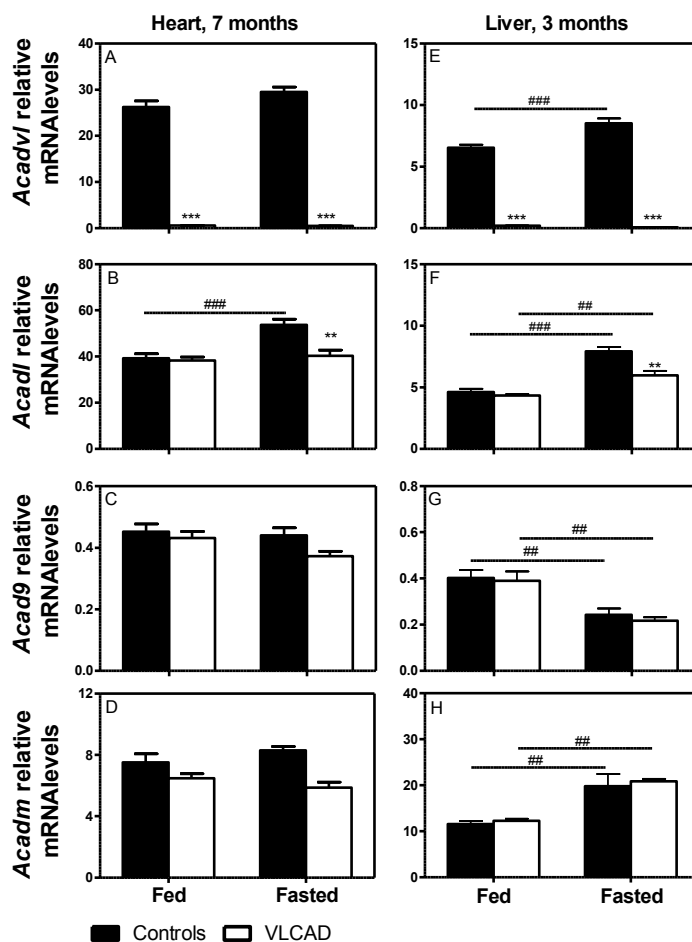


Figure 3: Impact of nutritional status on mRNA levels of selected metabolic genes in VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mouse hearts (A-D) and livers (E-H) freeze-clamped *in situ*.

Data are means \pm S.E. on 4-5 non-perfused freeze-clamped hearts or livers from fed or 24-h fasted 3- (for liver) or 7-month-old (for hearts) VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. mRNA levels of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadvl*; A,E), long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadl*; B,F), acyl-CoA dehydrogenase 9 (*Acad9*, C,G), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadm*; D,H) are normalized to the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*). Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+}; ## $P<0.01$ and ### $P<0.001$ fasted vs. fed.

Secondly, we tested for alterations in signalling and metabolic pathways regulating TG accumulation. We observed no difference in the expression levels of several proteins (beclin-1, Atg12-Atg5 and Atg7) involved in autophagy, a process suggested to affect lipid metabolism (31; 48; 49) in livers from 3-month-old fasted VLCAD^{-/-} and control mice clamped *in situ* (Supplemental Fig. 2). Furthermore, we uncovered no evidence of ERK1/2 activation, 2 kinases that may regulate cardiac TG lipolysis through HSL activation by ser600 phosphorylation (22; 29) in freeze-clamped livers from fed mice, and hearts from fed and fasted mice (data not presented). However, the ratio of phosphorylated-to-total ERK1/2 was measurable in hearts perfused with 0.4 mM palmitate and found to be significantly reduced from 150% and 200%, respectively, in 7 month-old, albeit not in 3-month-old VLCAD null hearts compared to the controls ($P < 0.05$, Fig. 4A-B). It is noteworthy, however, that in these perfused hearts, phosphorylated Akt (ser473) level (Supplemental Fig. 3) was similar in all groups. Supporting the notion of a potential decrease in TG hydrolysis in VLCAD null mouse hearts, we found that among gene encoding for enzymes involved in TG hydrolysis (*Lipe* and *Pnpla2*), the mRNA level for HSL (*Lipe*) was significantly decreased in 7-month-old VLCAD null mouse hearts, albeit only in the fasted condition (Fig. 4C-D).

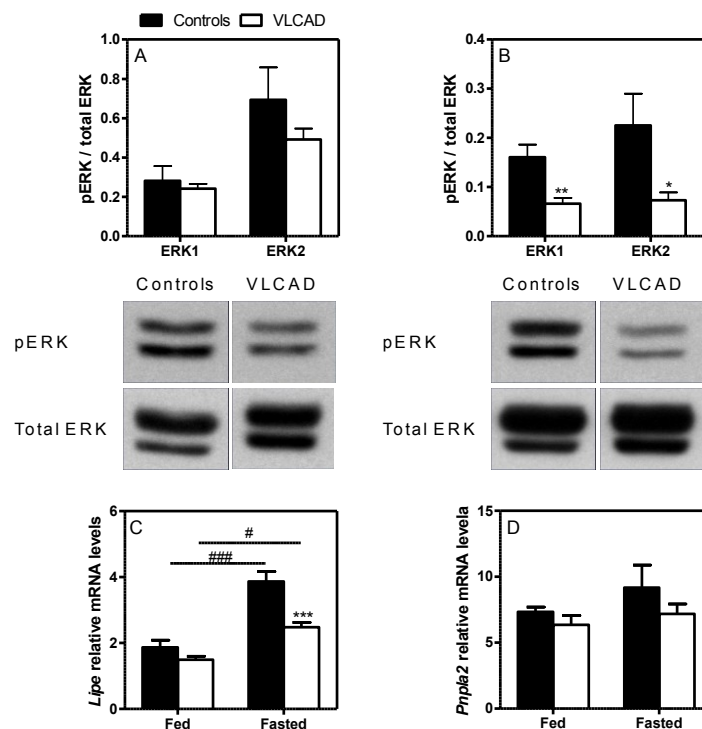


Figure 4: Mechanisms regulating lipolysis: phosphorylation status of ERK1/2 in perfused hearts from 3- and 7-month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} perfused hearts (A-B) and mRNA levels for gene encoding for enzymes involved in TG hydrolysis (C-D).

A-B: Data are means \pm S.E. of 4-5 perfused hearts with 0.4 mM palmitate from VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. Representative immunoblots using anti-phospho ERK1/2 (1:1,000) with anti-ERK1/2 (1:1,000) serving as loading control for total ERK1/2 protein. Densitometry of phosphorylated protein to total protein ratios in perfused heart tissue extracts is reported for (A) 3- and (B) 7-month-old mice. C-D: Data are means \pm S.E. on 4-5 non-perfused freeze-clamped hearts from fed or 24-h fasted 7-month-old VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. mRNA levels for hormone-sensitive lipase (*Lipe*; C), adipose triglyceride lipase (*Pnpla2*; D), are normalized to the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*). Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+} and # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ fasted vs. fed.

VLCAD mice display a cardiac specific decrease of DHA in PLs

One consistent finding of our targeted lipidomic analysis is a ~20-31% lower proportion of DHA in PLs of VLCAD-deficient hearts *in vivo* after feeding the standard diet as well as after perfusion *ex vivo* and at all ages. Representative data on 3-month-old mice are reported in Figure 5A. Interestingly, HFD of 7-month-old mice decreased DHA in PLs from 20 to 14% in VLCAD null mice (Fig. 5B). The proportion of other LCFAs in PLs displayed marginal age- and condition-dependent differences between groups of mice, despite marked changes in the proportion of some LCFAs, specifically stearate and arachidonate, following HFD in both groups (Supplemental Table V). It is noteworthy that transcript levels of enzymes involved DHA biosynthesis from linolenic acid (*Fads1* and *Fads2*) were similar between groups of mice fed the HF diet, except for a ~45% increase for *Fads2* in the fed state for VLCAD group (Fig. 5C-D).

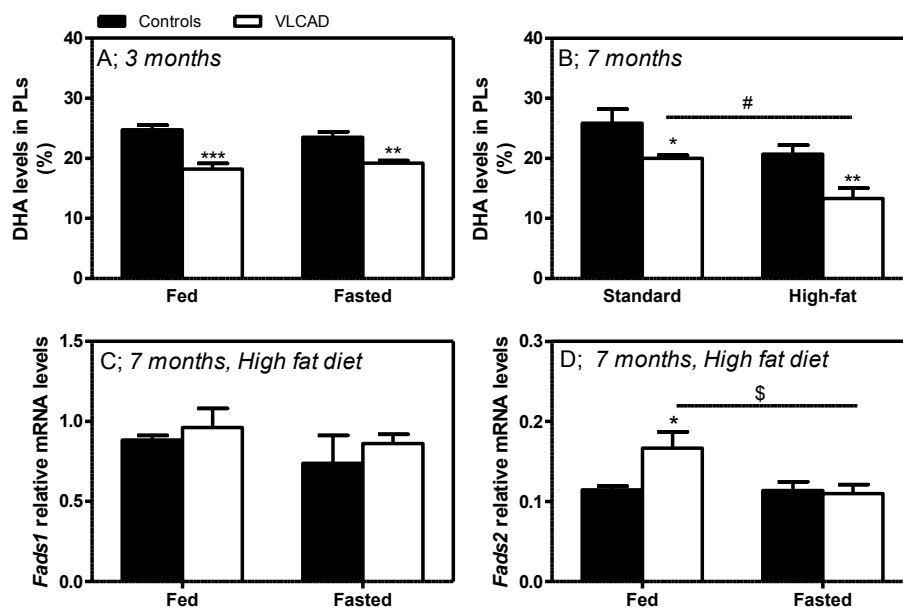


Figure 5: Levels of docosahexaenoic acid (DHA) in phospholipids (PLs) (A-B) and mRNA levels for gene encoding enzymes involved in DHA biosynthesis (C-D) in VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mouse hearts freeze-clamped *in situ* under various conditions.

Data are means \pm S.E. on 4-7 non-perfused freeze-clamped hearts from 3- (A) or 7-month-old (B-D) VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice fed a standard (A-B) or high-fat (B-D). A-B: DHA levels are expressed as percent of total LCFAs in PLs. C-D: mRNA levels for delta-5 desaturase (*Fads1*; C) and delta-6 desaturase (*Fads2*; D), are normalized to the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*). Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+}, # $P < 0.05$ high-fat vs. standard diet and \$ $P < 0.05$ fasted vs. fed.

Our finding of a lower DHA level in heart PLs appears to be of great potential pathophysiological significance given the reported anti-arrhythmogenic effects of omega-3 polyunsaturated FAs (ω -3 PUFAs), and, more specifically, DHA (35). In this regard, because the heart seems to rely mainly on liver synthesis and export to maintain its DHA level, since it would be devoid of 2-elongase (3; 23), and a number of studies have emphasized the role of the liver in cardiac functional and metabolic abnormalities (17; 24; 39; 61), we tested the possibility that VLCAD null mice exhibit lipid alterations also in this tissue. In contrast to heart, the hepatic LCFA

profile in PLs and, consequently, DHA percent were similar in both groups of mice under all conditions examined: 3- or 7-month-old mice, fasted or fed the standard diet or the HFD (Table I). A similar conclusion was reached for the level of DHA in total PLs of skeletal muscles and for total DHA level in plasma (Table I), supporting the notion that the liver export of this LCFA was also not affected. It is noteworthy that PLs from mouse hearts were found to contain almost 2-fold more DHA than livers, concurring with data from Watkins *et al.* (59).

Table I: Impact of nutritional status on docosahexaenoic acid (DHA) levels in various tissues and plasma from VLCAD^{+/+} (controls) and VLCAD^{-/-} null mice.

	Age (mo)	Standard diet		High fat diet	
		Controls	VLCAD	Controls	VLCAD
Liver (% , n=6)	3	10.2 ± 0,3	9.8 ± 0.3	ND	ND
	7	9.4 ± 0.4	10.6 ± 0.5	10.1 ± 0.6	10.2 ± 0.9
Skeletal muscle (% , n=4-6)	7	ND	ND	9.9 ± 0.2	9.1 ± 0.7
Plasma (µmol/L, n=7-20)	7	1,887 ± 174	1,593 ± 58	ND	ND

Values are means ± S.E. DHA levels were assessed in (i) phospholipids isolated from liver and skeletal muscle from control and VLCAD mice, and expressed as percent of total LCFAs, and (ii) total plasma collected from these mice. Statistics: Unpaired *t*-test. There were no significant differences between groups of mice. ND: not determined.

Further to our findings of a cardiac-specific decrease in DHA in PLs, we tested the impact of a 5-week FOD. This diet increased the cardiac level of DHA in PLs in both control (59%) and VLCAD (82%) groups of mice (Fig. 6). While there was still a ~11% lower proportion of DHA in PLs of VLCAD mouse hearts, this difference did not reach significance ($p=0.06$; $n=6-7$ /group).

The proportion of almost all other LCFAs in cardiac PLs was also markedly affected by the FOD compared to the standard diet, in both groups of mice (Supplemental Table V) and for some of them (C16:0; C18:0; C18:1n7; C18:2n6), the proportion was significantly different between the VLCAD and control groups.

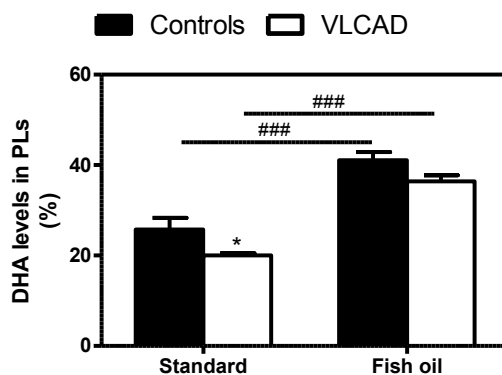


Figure 6: Impact of a fish oil diet on the level of docosahexaenoic acid (DHA) in phospholipids (PLs) of VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mouse hearts freeze-clamped *in situ*.

Data are means \pm S.E. on 6-7 non-perfused freeze-clamped hearts from 7-month-old VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice fed a standard or fish oil diet for 5 weeks. DHA levels are expressed as percent of total LCFAs in PLs. Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+} and ### $P < 0.001$ fish oil vs. standard diet.

VLCAD null mouse hearts display prolonged QTc interval in vivo under all conditions examined

Finally, further to our finding of a cardiac specific decrease in DHA in PLs in VLCAD null mice and considering (i) the proposed role of DHA in modulating the electrical activity of the heart and that (ii) arrhythmias are part of the cardiac phenotype of patients with LCFA oxidation defect (6) and VLCAD-deficient mice (14; 60), we conducted a telemetry study which delivers precise ECG characterization in conscious animals without the impact of acute anaesthesia (38). This was achieved in 7-month-old VLCAD null mice and their littermate counterparts, which were consecutively fed a standard diet followed by either (i) a HFD for 2 weeks or (ii) a fish oil supplemented diet (FOD) for 5 weeks.

Under all conditions examined, both groups of mice maintained similar heart rate, R-R and QRS values (Table II). The rate-corrected QT (QTc) interval, calculated with a

modified Bazett correction formula, $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$ (38), varied between 45 and 55 ms, concurring with published values (38). VLCAD-deficient mice displayed, however, a significantly longer average QTc interval when fed a standard diet or HFD (~11% and ~17%, respectively, $P<0.05$), which persisted with the FOD (~24%, $P<0.05$), suggesting that factors beyond DHA contribute to the QTc prolongation at least under our conditions.

Table II: Impact of different diets on the QTc interval and other electrocardiogram parameters assessed *in vivo* in 7-month-old VLCAD^{+/+} (controls) and VLCAD^{-/-} mice.

	Impact of High fat diet				Impact of Fish oil diet			
	Standard diet		High fat diet		Standard diet		Fish oil diet	
	Controls	VLCAD	Controls	VLCAD	Controls	VLCAD	Controls	VLCAD
HR (bpm)	528 ± 11	571 ± 14	579 ± 27	599 ± 8	601 ± 18	588 ± 11	591 ± 16	543 ± 13
RR (msec)	114 ± 2	106 ± 3	98 ± 3	98 ± 2	101 ± 3	103 ± 3	103 ± 3	112 ± 3
QTc (msec)	47 ± 2	52 ± 1*	46 ± 1	54 ± 1***	45 ± 1	53 ± 3**	42 ± 1	52 ± 2***
QRS (msec)	12.7 ± 0.4	12 ± 1	12.9 ± 0.3	14.3 ± 0.7	12.4 ± 0.7	15.0 ± 1.5	13.6 ± 0.8	15.3 ± 0.7

Data are means ± S.E. (n=7). Values reported represent average HR, RR, QTc or QRS over a 24-h period. Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $P<0.05$, ** $P<0.005$ and *** $P<0.001$ VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+}.

DISCUSSION

In this study, we adopted both *ex vivo* and *in vivo* approaches to test the metabolic and functional capacity of VLCAD null mouse hearts under various conditions that mimic those believed to induce decompensation in human patients, namely, fasting, adrenergic stress or high-fat loading. Firstly, our results demonstrate the ability of 3- and 7-month-old VLCAD null mouse hearts perfused *ex vivo* to maintain normal values for (i) the various physiological parameters measured as well as (ii) the contribution of exogenous palmitate, oleate or linoleate (which are the most abundant LCFAs occurring in plasma) to β -oxidation under all conditions examined. These included (i) increasing the concentration of palmitate to 1 mM, a condition under

which palmitate β -oxidation contributed 60% to energy production, (ii) simulating a rise in energy demand combined with adrenergic stimulation, and (iii) fasting conditions. While the results contrast with our previous findings in another model of LCFA oxidation defects, namely, PPAR α null mouse hearts (18), they are consistent with the notion that compensatory mechanisms of LCFA β -oxidation are present in VLCAD-null mice, as suggested by studies in fibroblasts with radioactive oleate (9) and measurement of acyl-CoA dehydrogenase activity with palmitoyl-CoA in the hearts of these mice (10). However, the latter studies did not evaluate whether these compensatory mechanisms are able to maintain normal substrate flux in the intact, beating heart through β -oxidation as well as contractile activity, even under conditions of high-energy demand and LCFA supply. Here, we show that this is the case, at least *ex vivo*.

Additional data on LCFA accumulation in TGs in freeze-clamped hearts support the notion that such is also the case in the heart, as well as in the liver, *in vivo*, although they also indicate that the efficiency of compensatory mechanisms for VLCAD deficiency may decrease under some conditions and differ between organs. Regarding the latter, it should be emphasized that both LCAD and ACAD9 have been shown to present activity that overlaps with VLCAD, although the specificity of all these enzymes towards the various LCFAs differs according to chain length, or saturation vs. unsaturation level (9; 13). Interestingly, VLCAD and ACAD9, but not LCAD, were reported to interact with the mitochondrial membrane (13; 25; 50). However, based on a recent study suggesting that ACAD9 is involved in the biogenesis of electron transport chain complex 1 rather than LCFA β -oxidation (43), LCAD is more likely to be the compensatory mechanism for VLCAD deficiency.

From our other data, we would like to emphasize the following notions. First, the observed age-, condition- and tissue-dependent changes in LCFA accumulation in TGs (which reflect altered LCFA partitioning between β -oxidation and storage) as well as in *Acadl* transcript levels suggest that VLCAD deficiency is more efficiently compensated in the heart than in the liver. Second, our qPCR and Western blotting

data suggest other potential mechanisms beyond reduced β -oxidation flux due to decreased efficiency of compensatory mechanisms, which may contribute to the condition- and age-dependent accumulation of LCFAs in TGs in VLCAD null mouse hearts. These include potential alterations in the activity of (i) enzymes or (ii) signalling pathways involved in TG hydrolysis. This is suggested, respectively, by lower levels, in VLCAD null mouse hearts, of (i) transcripts for *Lipe*, which encodes for HSL (for review, see ref. (7)), and (ii) phosphorylated ERK1/2, known to enhance HSL activity by ser600 phosphorylation (22; 29) in working hearts perfused *ex vivo*, although further investigations are needed to explore these issues. Third, although VLCAD null mouse hearts and livers displayed age- and condition-dependent LCFA accumulation in TGs that was greater than in the controls, the 2 groups did not differ in their response to a HFD. This contrasts, to some extent, with a recent study reporting that VLCAD null mice were resistant to high fat-induced obesity, as evidenced by a ~2- to -4-fold decrease in TG levels in the liver and skeletal muscles in the fed state (63). Among possible explanations of this discrepancy are differences in the type of diet, which consisted of hydrogenated vegetable oils, compared to lard (i.e. from animal fats, predominantly palmitate, stearate and oleate) in our study, which may differentially impact on the levels of compensatory mechanisms.

Beyond considerations about TGs accumulation and compensatory mechanisms for VLCAD deficiency, one unexpected and consistent finding of our targeted lipidomic study was the lower levels of DHA in cardiac PLs from VLCAD deficient mice. This was found both in hearts perfused *ex vivo* and freeze-clamped *in situ*, under all conditions examined and at all ages, and, interestingly, this was the only parameter to be exacerbated by high-fat feeding in VLCAD null mice. Little is known about the mechanisms regulating DHA level in PLs in the heart. DHA is synthesized from its precursor linolenic acid, which is an essential PUFA, through a series of enzymatic steps that include delta-5 and delta-6 desaturases. However, the heart appears to rely mainly on liver synthesis and export via lipoproteins to maintain its DHA level since

it would be devoid of 2-elongase (3; 23), although this view has been challenged recently (44).

In this regard, our findings of similar DHA levels in both groups of mice in hepatic PLs as well as in skeletal muscle and in plasma, suggest that DHA exportation and trafficking from liver to the heart are unaffected in VLCAD null mice despite the fact that we did document some abnormalities in lipid accumulation in the liver of these mice, as discussed above. This notion is further supported by the fact that DHA level in PLs was increased by 82% when VLCAD null mice were fed the FOD. Our gene expression data for delta-5 and delta-6 desaturase along with the absence of accumulation of eicosapentanoic acid, a DHA precursor, do not support the notion of restricted cardiac DHA synthesis. Hence, collectively, these results point out to a cardiac-specific decrease in DHA level in PLs from VLCAD null mouse hearts. While the underlying mechanism remains to be clarified, potential explanations include increased DHA metabolism (through oxidation or conversion to bioactive metabolites) (11) and/or restricted incorporation of DHA into specific classes of phospholipids (27; 59).

Nevertheless, our finding of a cardiac specific reduction of DHA in PLs of VLCAD null mice appeared particularly important, given that DHA, which is a PUFA of the *n*-3 series, has numerous biological roles (55) as well as beneficial effects on the heart. Interestingly, DHA supplementation is recommended in patients with long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (19; 36) to improve visual acuity (51). However, to the best of our knowledge, there is no specific recommendation for VLCAD-deficient patients. However, since plasma or blood DHA level is most commonly used as an indicator of its tissue level, a cardiac-specific decrease in DHA level cannot be excluded. Among its many biological roles, DHA is proposed to be anti-arrhythmogenic and to reduce sudden cardiac death (32; 35), which is most relevant to cardiac symptoms reported in both VLCAD null mice (namely, arrhythmias (14; 60)) and patients with LCFA oxidation defects (i.e. arrhythmias and conduction defects, leading to sudden death). In this regard, we found that VLCAD

null mice display prolonged QTc intervals (>10%) compared to their littermates under all conditions examined, as revealed by *in vivo* telemetry. This observation alone appeared to bear a strong pathophysiological significance given that prolonged QTc is considered to be an independent predictor of sudden cardiac death in humans (1). While little is known about the impact of QTc prolongation in mice, genetic murine models with long QT syndrome have been shown to be prone to inducible polymorphic ventricular tachycardia (26).

Interestingly, a potential cause-effect relationship between DHA and QTc interval is suggested by literature data. In fact, *n*-3 PUFA administration or a fish diet enriched in *n*-3 PUFAs decreases the likelihood of prolonged QT interval in dogs following ischemia (5) and in humans (40), respectively, while DHA supplementation (but not its precursor eicosapentaenoic acid) shortens QT interval in spontaneously hypertensive rats (45). However, in this study, feeding VLCAD null mice a FOD increased the cardiac level of DHA in PLs above that observed for controls under the standard diet, yet the prolonged QTc interval persisted. Potential explanations for the apparent discrepancy between our results and previous reports in dogs or rats include the absence under our basal condition of sympathetic stimulation (in contrast to what occurs during ischemia in dogs or with hypertension in rats), which is one mechanism by which DHA and *n*-3 PUFA are proposed to exert their effect. This action appears to involve factors such as intracellular calcium homeostasis, inositol phosphate, protein kinase C signaling and diacylglycerol (27; 41; 42). Interestingly, the latter are the specific substrate for HSL, for which we report decreased level of (i) mRNA and (ii) stimulatory signaling stimulus (ERK $\frac{1}{2}$) in VLCAD mouse hearts, while abnormal calcium homeostasis are a hallmark of these mice (60). Hence, it appears warranted in future studies to (i) test for the impact of FOD on QTc under conditions that are known to precipitate arrhythmia in order to further clarify the exact mechanism(s) underlying prolonged QTc interval in VLCAD null mouse hearts remain(s), as well as (ii) to assess DHA level in the various classes of PLs, particularly those potentially involved in cell signalling (27).

In conclusion, the results from this investigation demonstrate that despite normal exogenous cardiac LCFA β -oxidation and contractile function *ex vivo*, VLCAD null mice display other lipid alterations as well as a prolonged QTc interval *in vivo*. The reported age- and condition-dependent changes in LCFA accumulation in TGs and *Acadl* mRNA levels predict that VLCAD deficiency would be more efficiently compensated in the heart than in the liver. However, more importantly, our study highlighted lower DHA in PLs in VLCAD-deficient hearts at all ages and conditions examined, which appears to be independent of liver DHA supply and export via lipoproteins. Future experiments are warranted to clarify the exact cause and potential consequence of lower DHA in cardiac PLs as well as the exact mechanism underlying the QTc prolongation in VLCAD null mouse hearts.

ACKNOWLEDGMENTS

Part of this work was presented at the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids Meeting in Maastricht in May 2010, at the Society for Heart and Vascular Metabolism Meeting in Boston in June 2008 and in Padova in August 2009, at the Mitochondrial Biology in Cardiovascular Health and Diseases Conference in Bethesda in October 2008, at the Experimental Biology Meeting in April 2009 and at the International Society for Heart Research American Section in Baltimore in May 2009. The authors thank Drs. C. Fiset, M-C. Guertin and V.J. Exil for helpful comments, Asmaa Mansour for assistance with statistical analyses, N. Duquette and A. Sanscartier for assistance with animal care, as well as Ovid Da Silva and Luce Begin for editorial and secretarial assistance, respectively. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Grant #9575 to C.D.R.) and the National Institutes of Health (RO1 DK069752) as well as studentships to R.G. (CIHR and the Department of Nutrition, Université de Montréal).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

SUPPLEMENTARY INFORMATION**SUPPLEMENTARY TABLES**

Supplementary Table SI: Composition of the diets expressed in mole percent of total fatty acids

Fatty Acids	Diets		
	Standard	High fat diet	Fish oil diet
C14:0	0.34	1.14	3.14
C16:0	17.80	27.38	24.53
C16:1n-9	2.04	0.97	2.47
C18:0	8.38	18.54	2.16
C18:1n-9	13.11	39.32	10.08
C18:1n-7	1.19	1.61	0.70
C18:2n-6	55.92	10.82	48.50
C18:3n-6	0.13	0.02	0.00
C18:3n-3	1.09	0.09	0.65
C20:5n-3	ND	ND	2.77
C22:6n-3	ND	ND	4.53

ND : not detected

Supplementary Table SII: Body weights and daily food intake

Ages (months)	Diets	VLCAD ^{+/+}		VLCAD ^{-/-}	
		Fed	Fasted	Fed	Fasted
Body weight (g)					
3	Standard	32.5 ± 1.0	27.4 ± 1.1	34.0 ± 1.0	25.4 ± 1.0
7	Standard	35.6 ± 2.6	32.2 ± 1.8	40.1 ± 1.2	37.4 ± 1.0
	High-fat	46.2 ± 1.2	41.7 ± 2.5	44.5 ± 3.3	34.8 ± 1.6
	Fish oil	39.1 ± 2.0	NA	39.1 ± 1.8	NA
Daily food intake (kcal/g of wt)					
7	High-fat	0.37 ± 0.01	NA	0.34 ± 0.02	NA
	Fish oil	0.38 ± 0.02	NA	0.35 ± 0.02	NA

Data are means ± SEM of 10-20 mice. Statistics: Body weight: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Daily food intake: Unpaired t-test. There were no significant differences between groups of mice under fed or fasted conditions. NA: not available

Supplementary Table SIII: Primer and probe sequences used in comparative real time quantitative polymerase chain reaction

Symbols	Name	Gene bank	Forward	Reverse
<i>Acad9</i>	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9	NM_172678	AGATTCTTCGGTTGTTTCATTCG	CCCAGGTCCACAGTTCGG
<i>Acadl</i>	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase	NM_007381	ATGCCCTATATTGCGAATTACG	CCTTGCTTCCATTGAGAATCC
<i>Acadvl</i>	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase	NM_017366	GGCTCTCCAAGGCTGTATG	ACCACTGCGACTTAACTCTG
<i>Fads1</i>	Delta-5 desaturase	NM_0146094	CCTGGTCTACCTGCTTCAC	GTAGCCAACCTGCCTGAG
<i>Fads2</i>	Delta-6 desaturase	NM_019699	CTTCTCCTGCTATTCAATGC	CCTTCTCAATGACTGGTTC
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	NM_013556	CCAGCGTCGTGATTAGCG	AGCAAGTCTTTCAGTCTGTG
<i>Lipe</i>	Hormone-sensitive lipase	NM_010719	GGCAGACCTCTAAATCCC	CCGCTCTCCAGTTGAACC
<i>Pnpla2</i>	Adipose triglyceride lipase	NM_001163689	CGTCATCATATCCCACCTTAGC	TGCCGCATCCACATAGC

Supplementary Table SIV: Functional and physiological parameters of 3-month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mouse hearts perfused *ex vivo*

	Nutritional status			
	Fed (palmitate 0.4 mM, glucose 11 mM)		Fasted (palmitate 1 mM, glucose 7 mM)	
	VLCAD ^{+/+}	VLCAD ^{-/-}	VLCAD ^{+/+}	VLCAD ^{-/-}
Heart rate, beats/min	386 ± 56	384 ± 60	327 ± 50	325 ± 32
LVSP _{max} , mmHg	114 ± 4	110 ± 4	122 ± 6	116 ± 7
LVEDP _{max} , mmHg	11.77 ± 2.1	13.5 ± 2.7	10.4 ± 1.6	10.24 ± 1.1
RPP, mmHg·min ⁻¹ ·10 ³	38,976 ± 4,921	37,004 ± 5,541	36,026 ± 5,260	33,855 ± 3,167
dP/dt _{max} , mmHg/s	4,641 ± 561	5,087 ± 508	6,058 ± 397	3,627 ± 965
Ejection fraction, ml/beats	0.034 ± 0.003	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.004	0.030 ± 0.003
Cardiac output, ml/min	12.49 ± 0.86	11.34 ± 1.26	10.16 ± 1.35	9.56 ± 0.82
Aortic flow, ml/min	8.94 ± 0.85	8.10 ± 0.85	7.20 ± 0.99	6.02 ± 0.61
Coronary flow, ml/min	3.55 ± 0.45	3.24 ± 0.46	2.97 ± 0.38	3.54 ± 0.24
MVO ₂ , μmol/min	2.29 ± 0.31	2.24 ± 0.32	2.15 ± 0.31	2.47 ± 0.15
Cardiac power, mW	2.85 ± 0.30	2.48 ± 0.40	2.53 ± 0.39	2.24 ± 0.23
Cardiac efficiency, mW·μmol ⁻¹ ·min ⁻¹	1.36 ± 0.30	1.13 ± 0.08	1.20 ± 0.03	0.95 ± 0.09
pH _i	7.35 ± 0.01	7.36 ± 0.01	7.37 ± 0.01	7.38 ± 0.01

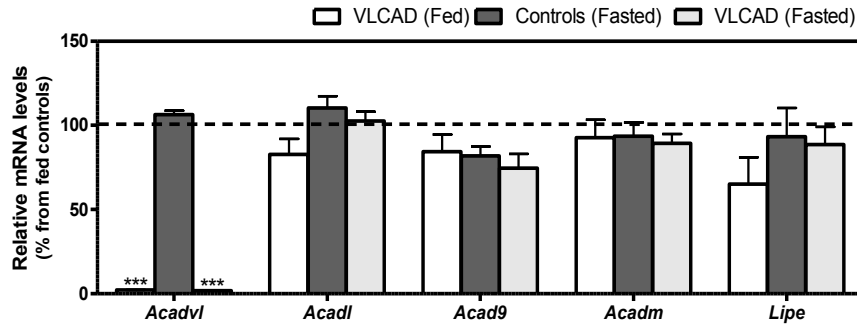
Data are means ± S.E. of 5 heart perfusion experiments. The values reported represent averages for the 25-30-min perfusion period, except for myocardial oxygen consumption (MVO₂) and intracellular pH (pH_i), which were calculated from pO₂ and pCO₂ values determined in influent and effluent perfusates collected at 20 min. LVSP_{max}, maximum left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure; RPP, rate pressure product; dP/dt_{max}, maximum value for the first derivative of left ventricular pressure. Statistics: Unpaired t-test. There were no significant differences between groups of mice under fed or fasted conditions.

Supplementary Table SV: Long chain fatty acids profile in cardiac phospholipids in freeze-clamped *in vivo* 3 and 7 month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mouse hearts fed with a standard, a high fat or a fish oil diet expressed in percent of total fatty acids.

Fatty acids	3 months				7 months			
	Standard diet		Standard diet		High fat diet		Fish oil diet	
	Controls	VLCAD	Controls	VLCAD	Controls	VLCAD	Controls	VLCAD
C16:0	13.5 ± 0.3	12.7 ± 0.5	14.5 ± 0.8	13.7 ± 0.4	15.6 ± 1.1	14.1 ± 0.9	18.7 ± 0.9 ^{###}	16.1 ± 0.6*
C16:1n-9	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.5	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0 ^{##}	0.6 ± 0.0 ^{##}
C18:0	17.9 ± 0.3	18.4 ± 0.7	17.4 ± 0.5	17.8 ± 0.4	27.6 ± 0.6 ^{###}	29.3 ± 1.0 ^{###}	14.7 ± 0.8 [#]	18.5 ± 0.9*
C18:1n-9	6.9 ± 0.2	8.3 ± 0.7	7.2 ± 0.4	7.9 ± 0.3	4.6 ± 0.6	5.9 ± 0.5	4.8 ± 0.5 ^{###}	4.2 ± 0.4 ^{###}
C18:1n-7	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.3 ± 0.1	3.6 ± 0.2 ^{###}	2.6 ± 0.1 ^{***}
C18:2n-6	21.2 ± 0.8	22.6 ± 0.2	18.6 ± 2.4	21.0 ± 0.4	15.4 ± 1.0	19.0 ± 1	11.9 ± 0.5 ^{###}	15.3 ± 0.5 ^{***, #}
C18:3n-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18:3n-3	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.2	0.62 ± 0.2	1.6 ± 0.1	ND	ND	0.03 ± 0.02	0.10 ± 0.01
C20:4n-6	8.5 ± 0.2	10.8 ± 0.5 ^{†††}	8.0 ± 0.5	9.3 ± 0.2	12.8 ± 0.9 ^{###}	14.7 ± 0.6 ^{###}	2.2 ± 0.2 ^{###}	3.2 ± 0.1 ^{###}
C20:5n-3	0.57 ± 0.02	0.72 ± 0.07	0.72 ± 0.26	0.57 ± 0.11	ND	ND	0.70 ± 0.04	0.87 ± 0.05
C22:5n-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1

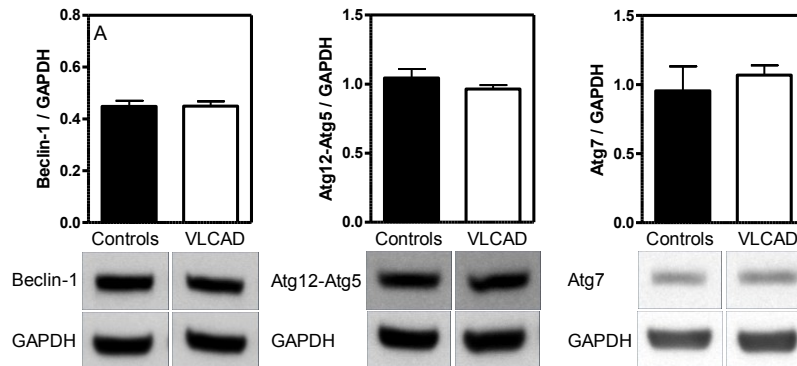
Data are means ± S.E. of 6-8 hearts freeze clamped *in vivo*. Statistics: 3 months: Unpaired t-test: ††† p < 0.001 VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+}; 7 months: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. *P < 0.05 and ***P < 0.001 VLCAD^{-/-} vs. VLCAD^{+/+} and # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. standard diet. ND: not detected

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure S1: Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of selected metabolic genes in 3-month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice.

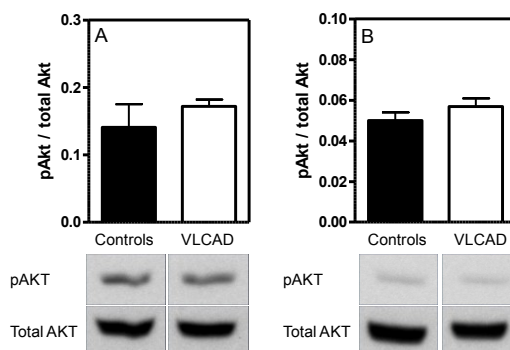
Data are means \pm S.E. of 4-5 non-perfused freeze-clamped hearts from fed or 24-h fasted VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. mRNA levels of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadvl*), long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadl*), acyl-CoA dehydrogenase 9 (*Acad9*), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadm*) and hormone-sensitive lipase (*Lipe*) are normalized to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt1*). Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. *** $p < 0.001$ vs. VLCAD^{+/+}.



Supplementary Figure S2: Potential mechanisms regulating lipolysis: levels of proteins involved in autophagy in livers from 24-h fasted 3-month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice.

Data are means \pm S.E. of 4-5 freeze-clamped livers from VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. Representative immunoblots are shown from experiments using (A) anti-

beclin1 (1:1,000), (B) anti-Atg12-Atg5 (1:1,000) and (C) anti-Atg7 (1:500). Densitometry of protein levels normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is also reported. Statistics: Unpaired *t*-test. There were no significant differences between groups of mice.



Supplementary Figure S3: Potential mechanisms regulating lipolysis: phosphorylation status of Akt in perfused hearts from 3- and 7-month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice.

Data are mean ± SE of 4-5 hearts perfused with 0.4 mM palmitate from VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. Representative immunoblots using anti-phospho Akt (ser473) (1:1,000), with anti-Akt (1:1,000) serving as loading control for total Akt protein. Densitometry of phosphorylated protein to total protein ratios in heart tissue extracts is reported for 3- (A) and 7-month-old (B) mice. Statistics: Unpaired *t*-test. There were no significant differences between groups of mice.

REFERENCES

1. **Algra A, Tijssen JG, Roelandt JR, Pool J and Lubsen J.** QTc prolongation measured by standard 12-lead electrocardiography is an independent risk factor for sudden death due to cardiac arrest. *Circulation* 83: 1888-1894, 1991.
2. **Aoyama T, Uchida Y, Kelley RI, Marble M, Hofman K, Tonggard JH, Rhead WJ and Hashimoto T.** A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 1369-1372, 1993.

3. **Barcelo-Coblijn G and Murphy EJ.** Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res* 48: 355-374, 2009.
4. **Bertrand C, Largilliere C, Zobot MT, Mathieu M and Vianey-Saban C.** Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid oxidation in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1180: 327-329, 1993.
5. **Billman GE, Kang JX and Leaf A.** Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Lipids* 32: 1161-1168, 1997.
6. **Bonnet D, Martin D, Pascale DL, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M and Saudubray JM.** Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation* 100: 2248-2253, 1999.
7. **Brindley DN, Kok BP, Kienesberger PC, Lehner R and Dyck JR.** Shedding light on the enigma of myocardial lipotoxicity: the involvement of known and putative regulators of fatty acid storage and mobilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E897-E908, 2010.
8. **Brouillette J, Grandy SA, Jolicoeur P and Fiset C.** Cardiac repolarization is prolonged in CD4C/HIV transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 43: 159-167, 2007.
9. **Chegary M, Brinke H, Ruiter JP, Wijburg FA, Stoll MS, Minkler PE, van Weeghel M, Schulz H, Hoppel CL, Wanders RJ and Houten SM.** Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1791: 806-815, 2009.
10. **Cox KB, Hamm DA, Millington DS, Matern D, Vockley J, Rinaldo P, Pinkert CA, Rhead WJ, Lindsey JR and Wood PA.** Gestational, pathologic and biochemical differences between very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the mouse. *Hum Mol Genet* 10: 2069-2077, 2001.
11. **Das UN.** Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J* 1: 420-439, 2006.
12. **Drouin A, Gendron ME, Thorin E, Gillis MA, Mahlberg-Gaudin F and Tardif JC.** Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol* 154: 749-757, 2008.

13. **Ensenauer R, He M, Willard JM, Goetzman ES, Corydon TJ, Vandahl BB, Mohsen AW, Isaya G and Vockley J.** Human acyl-CoA dehydrogenase-9 plays a novel role in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 280: 32309-32316, 2005.
14. **Exil VJ, Gardner CD, Rottman JN, Sims H, Bartelds B, Khuchua Z, Sindhal R, Ni G and Strauss AW.** Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1289-H1297, 2006.
15. **Exil VJ, Roberts RL, Sims H, McLaughlin JE, Malkin RA, Gardner CD, Ni G, Rottman JN and Strauss AW.** Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. *Circ Res* 93: 448-455, 2003.
16. **Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.
17. **Fukazawa K, Gologorsky E, Manmohansingh V, Nishida S, Vigoda MM and Pretto EA, Jr.** Is the immediate reversal of diastolic dysfunction of cirrhotic cardiomyopathy after liver transplantation a sign of the metabolic etiology? *Liver Transpl* 15: 1417-1419, 2009.
18. **Gelinas R, Labarthe F, Bouchard B, Mc Duff J, Charron G, Young ME and Des Rosiers C.** Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPARalpha null mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1571-H1580, 2008.
19. **Gillingham M, Van Calcar S, Ney D, Wolff J and Harding C.** Dietary management of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD). A case report and survey. *J Inherit Metab Dis* 22: 123-131, 1999.
20. **Goetzman ES, Tian L and Wood PA.** Differential induction of genes in liver and brown adipose tissue regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during fasting and cold exposure in acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *Mol Genet Metab* 84: 39-47, 2005.
21. **Gregersen N, Andresen BS, Corydon MJ, Corydon TJ, Olsen RK, Bolund L and Bross P.** Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat* 18: 169-189, 2001.

22. **Holm C.** Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31: 1120-1124, 2003.
23. **Igarashi M, Ma K, Chang L, Bell JM and Rapoport SI.** Rat heart cannot synthesize docosahexaenoic acid from circulating alpha-linolenic acid because it lacks elongase-2. *J Lipid Res* 49: 1735-1745, 2008.
24. **Iozzo P.** Metabolic toxicity of the heart: insights from molecular imaging. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20: 147-156, 2010.
25. **Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S and Hashimoto T.** Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 267: 1027-1033, 1992.
26. **Jeron A, Mitchell GF, Zhou J, Murata M, London B, Buckett P, Wiviott SD and Koren G.** Inducible polymorphic ventricular tachyarrhythmias in a transgenic mouse model with a long Q-T phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1891-H1898, 2000.
27. **Jude S, Martel E, Vincent F, Besson P, Couet C, Ogilvie GK, Pinault M, De CC, Bougnoux P, Richard S, Champeroux P, Crozatier B and Le Guennec JY.** Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation. *Br J Nutr* 98: 1143-1151, 2007.
28. **Khairallah M, Labarthe F, Bouchard B, Danialou G, Petrof BJ and Des Rosiers C.** Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using ¹³C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1461-H1470, 2004.
29. **Khairallah RJ, Khairallah M, Gelinis R, Bouchard B, Young ME, Allen BG, Lopaschuk GD, Deschepper CF and Des Rosiers C.** Cyclic GMP signaling in cardiomyocytes modulates fatty acid trafficking and prevents triglyceride accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 45: 230-239, 2008.
30. **Kluge S, Kuhnelt P, Block A, Merkel M, Gocht A, Lukacs Z, Kohlschutter A and Kreymann G.** A young woman with persistent hypoglycemia, rhabdomyolysis, and coma: recognizing fatty acid oxidation defects in adults. *Crit Care Med* 31: 1273-1276, 2003.

31. **Kovsan J, Bashan N, Greenberg A and Rudich A.** Potential role of autophagy in modulation of lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1-E7, 2010.
32. **Kris-Etherton PM, Harris WS and Appel LJ.** Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: e20-e30, 2003.
33. **Lepage G and Roy CC.** Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27: 114-120, 1986.
34. **Liebig M, Schymik I, Mueller M, Wendel U, Mayatepek E, Ruiter J, Strauss AW, Wanders RJ and Spiekeroetter U.** Neonatal screening for very long-chain acyl-coA dehydrogenase deficiency: enzymatic and molecular evaluation of neonates with elevated C14:1-carnitine levels. *Pediatrics* 118: 1065-1069, 2006.
35. **London B, Albert C, Anderson ME, Giles WR, Van Wagoner DR, Balk E, Billman GE, Chung M, Lands W, Leaf A, McNulty J, Martens JR, Costello RB and Lathrop DA.** Omega-3 fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Dietary Supplements Omega-3 Fatty Acids and their Role in Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation* 116: e320-e335, 2007.
36. **Lund AM, Dixon MA, Vreken P, Leonard JV and Morris AA.** Plasma and erythrocyte fatty acid concentrations in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 26: 410-412, 2003.
37. **Mathur A, Sims HF, Gopalakrishnan D, Gibson B, Rinaldo P, Vockley J, Hug G and Strauss AW.** Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. *Circulation* 99: 1337-1343, 1999.
38. **Mitchell GF, Jeron A and Koren G.** Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 274: H747-H751, 1998.
39. **Moller S, Dumcke CW and Krag A.** The heart and the liver. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 3: 51-64, 2009.
40. **Mozaffarian D, Prineas RJ, Stein PK and Siscovick DS.** Dietary fish and n-3 fatty acid intake and cardiac electrocardiographic parameters in humans. *J Am Coll Cardiol* 48: 478-484, 2006.

41. **Nair SS, Leitch J and Garg ML.** Suppression of inositol phosphate release by cardiac myocytes isolated from fish oil-fed pigs. *Mol Cell Biochem* 215: 57-64, 2000.
42. **Nair SS, Leitch J and Garg ML.** N-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alters inositol phosphate metabolism and protein kinase C activity in adult porcine cardiac myocytes. *J Nutr Biochem* 12: 7-13, 2001.
43. **Nouws J, Nijtmans L, Houten SM, van den Brand M, Huynen M, Venselaar H, Hoefs S, Gloerich J, Kronick J, Hutchin T, Willems P, Rodenburg R, Wanders R, van den Heuvel L, Smeitink J and Vogel RO.** Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metab* 12: 283-294, 2010.
44. **Rapoport SI, Igarashi M and Gao F.** Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 273-276, 2010.
45. **Rousseau-Ralliard D, Moreau D, Guiland JC, Raederstorff D and Grynberg A.** Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, lowers ambulatory blood pressure and shortens interval QT in spontaneously hypertensive rats in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80: 269-277, 2009.
46. **Ruiz J, Antequera T, Andres AI, Petron M and Muriel E.** Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta* 520: 201-205, 2004.
47. **Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvret P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P and Brivet M.** Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis* 22: 488-502, 1999.
48. **Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM and Czaja MJ.** Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458: 1131-1135, 2009.
49. **Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, Tang Y, Pessin JE, Schwartz GJ and Czaja MJ.** Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 119: 3329-3339, 2009.

50. **Souri M, Aoyama T, Hoganson G and Hashimoto T.** Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase subunit assembles to the dimer form on mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett* 426: 187-190, 1998.
51. **Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, Das A, Haase C, Hennermann JB, Karall D, de Klerk H, Knerr I, Koch HG, Plecko B, Roschinger W, Schwab KO, Scheible D, Wijburg FA, Zschocke J, Mayatepek E and Wendel U.** Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop. *J Inherit Metab Dis* 32: 498-505, 2009.
52. **Spiekerkoetter U, Sun B, Zytovicz T, Wanders R, Strauss AW and Wendel U.** MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 143: 335-342, 2003.
53. **Spiekerkoetter U, Tokunaga C, Wendel U, Mayatepek E, Exil V, Duran M, Wijburg FA, Wanders RJ and Strauss AW.** Changes in blood carnitine and acylcarnitine profiles of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice subjected to stress. *Eur J Clin Invest* 34: 191-196, 2004.
54. **Spiekerkoetter U, Tokunaga C, Wendel U, Mayatepek E, Iilst L, Vaz FM, van Viies N, Overmars H, Duran M, Wijburg FA, Wanders RJ and Strauss AW.** Tissue carnitine homeostasis in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *Pediatr Res* 57: 760-764, 2005.
55. **Stillwell W and Wassall SR.** Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126: 1-27, 2003.
56. **ter Veld F, Primassin S, Hoffmann L, Mayatepek E and Spiekerkoetter U.** Corresponding increase in long-chain acyl-CoA and acylcarnitine after exercise in muscle from VLCAD mice. *J Lipid Res* 50: 1556-1562, 2009.
57. **Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, Nada M, Zobot MT, Mathieu M and Roe C.** Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta* 269: 43-62, 1998.
58. **Vincent G, Bouchard B, Khairallah M and Des Rosiers C.** Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H257-H266, 2004.

59. **Watkins SM, Lin TY, Davis RM, Ching JR, DePeters EJ, Halpern GM, Walzem RL and German JB.** Unique phospholipid metabolism in mouse heart in response to dietary docosahexaenoic or alpha-linolenic acids. *Lipids* 36: 247-254, 2001.
60. **Werdich AA, Baudenbacher F, Dzhura I, Jeyakumar LH, Kannankeril PJ, Fleischer S, LeGrone A, Milatovic D, Aschner M, Strauss AW, Anderson ME and Exil VJ.** Polymorphic ventricular tachycardia and abnormal Ca²⁺ handling in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2202-H2211, 2007.
61. **Wong F.** Cirrhotic cardiomyopathy. *Hepatol Int* 3: 294-304, 2009.
62. **Yamaguchi S, Indo Y, Coates PM, Hashimoto T and Tanaka K.** Identification of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in three patients previously diagnosed with long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 34: 111-113, 1993.
63. **Zhang D, Christianson J, Liu ZX, Tian L, Choi CS, Neschen S, Dong J, Wood PA and Shulman GI.** Resistance to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Cell Metab* 11: 402-411, 2010.

5. CHAPITRE V - MANUSCRIT III

MITOCHONDRIAL ALTERATIONS IN VLCAD (VERY LONG CHAIN ACYL-COA DEHYDROGENASE) DEFICIENT MOUSE HEARTS

Roselle Gélinas, Bertrand Bouchard, François Labarthe et Christine Des Rosiers

Manuscrit en préparation

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Roselle Gélinas a contribué à l'élaboration du projet de recherche à tous les niveaux, incluant la définition de l'hypothèse et des objectifs, le choix des protocoles et la mise au point des techniques en plus d'avoir réalisé toutes les expérimentations présentées dans ce manuscrit, et assumé la responsabilité de rédiger le manuscrit.

Bertrand Bouchard a participé à la réalisation des expérimentations, plus précisément au niveau des perfusions de cœur au travail *ex vivo* et l'analyse par GCMS.

Le présent projet de recherche est en continuité avec un projet réalisé dans le passé par Dr François Labarthe. Ce dernier a donc contribué à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Finalement, Dre Christine Des Rosiers a directement supervisé et contribué à toutes les étapes de la réalisation de ce manuscrit.

MITOCHONDRIAL ALTERATIONS IN VLCAD (VERY LONG CHAIN ACYL-COA DEHYDROGENASE) DEFICIENT MOUSE HEARTS

Roselle Gélinas^{1,2}, Bertrand Bouchard², François Labarthe³,
and Christine Des Rosiers^{1,2}

¹Department of Nutrition, Université de Montréal, and ²Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada HIT 1C8; and ³Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Tours, Université François Rabelais, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U921, Tours, France

Running title: Mitochondrial alterations in VLCAD-deficient hearts

ABSTRACT

Patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency, which is the most common inherited long chain fatty acid (LCFA) β -oxidation disorders in humans, present cardiomyopathy and heart beat disorders. However, the underlying factors remain to be elucidated. We recently reported that, unexpectedly, LCFA β -oxidation is not decreased in VLCAD deficient (VLCAD^{-/-}) mouse hearts. However, these hearts show other alterations in lipid metabolism, namely LCFA accumulation in triglycerides and lower docosahexanoic acid

(DHA) levels in phospholipids, as well as in its function, namely a prolonged QTc interval. Building on these findings, this study aimed at testing the hypothesis that VLCAD^{-/-} hearts manifest also alterations in alterations in carbohydrate and mitochondrial metabolism. Hearts from VLCAD^{-/-} mice and their littermate counterparts were used for (i) *ex vivo* perfusion in the working mode with ¹³C-labeled substrates under various conditions, and (ii) *in vivo* targeted metabolite profiling and gene expression analysis. *Ex vivo* perfusion studies revealed that compared to controls, VLCAD^{-/-} hearts showed: (i) a modified pattern of substrate selection for mitochondrial acetyl-CoA formation, namely a higher contribution for oleate through β -oxidation (40%; $p < 0.05$), while that of carbohydrates was lower (30%; $p < 0.05$). and (ii) a 30% lower anaplerotic flux through pyruvate carboxylation ($p < 0.05$). *In vivo* analysis revealed that concurring with the lower anaplerotic flux observed *ex vivo*, VLCAD^{-/-} hearts showed lower citrate acid cycle intermediates tissue levels, specifically succinate and malate (~50%; $p < 0.05$). In addition, these hearts displayed age- and condition-dependent decreases in mRNA levels for mitochondrial proteins or enzymes determinant for anaplerosis (Pcx and Pccb) or its function (Ucp3 and Pparg1a). Collectively, our data highlight mitochondrial metabolic alterations in VLCAD^{-/-} mouse hearts, which may be involved in cardiomyopathy and arrhythmia development.

INTRODUCTION

In human, very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) catalyzes the first reaction of mitochondrial β -oxidation. This enzyme utilizes fatty acyl-CoA of chain lengths varying between 14 and 24 carbons, but shows its highest activity with palmitoyl-CoA (19). VLCAD deficiency, which is the most common inherited long chain fatty acidss (LCFA) β -oxidation disorder, was first reported in 1993 (1; 3; 43). Without appropriate treatments, VLCAD-deficient infants with the

most severe phenotype, which includes cardiomyopathy development and heart beat disorders (4), will succumb from sudden cardiac death, mainly caused by severe arrhythmias between 2 and 5 months of age, often after fasting or an infectious illness (21; 34; 39). However, about 30% of these patients never develop cardiac symptoms, which are currently believed to arise from an energy deficit due to impaired β -oxidation of LCFAs and/or accumulation of toxic metabolites, such as long-chain (LC)-acylcarnitines or LC-CoAs (4). These patients display a milder clinical phenotype characterized by hypoketotic hypoglycaemia, indicating metabolic derangements in the liver (39).

A mouse model of VLCAD deficiency has been developed to improve the knowledge of the disease as well as the treatment for the patients (13). This mouse model presents no specific clinical phenotype at rest and a milder cardiac phenotype than LCAD deficient mice (7). In this regard, Chegary et al. recently reported that fibroblasts from VLCAD-deficient mice and humans differ in their capacity to oxidize LCFA, and their finding was explained by the functional overlap of LC-acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) with VLCAD, an enzyme that is active in mice but apparently not in humans (5). Nevertheless, few studies have shown that VLCAD deficient mouse presents stress-induced phenotypes similar to those reported in humans, such as fat infiltration, lower rates of survival, but also LC-acylcarnitine accumulation in skeletal muscles when exposed to cold and fasting (6; 12; 13; 36-38). Therefore, based on these considerations, we reasoned that VLCAD null mice do represent a good study model to examine stress-induced alterations occurring in LCFA oxidation disorders.

We have recently published a study in which we show that VLCAD deficient hearts present age and condition-dependent alterations in lipid metabolic alterations despite their unexpected ability to oxidize normally exogenous palmitate *ex vivo*. We also showed that VLCAD deficient hearts present a prolonged QTc interval *in vivo*, for which the exact mechanism remains, however, to be elucidated. Alterations in carbohydrate and mitochondrial metabolism have

been linked to heart beat disorders development as well as QT prolongation (2; 27). However, to the best of our knowledge, the impact of VLCAD deficiency on carbohydrate and mitochondrial metabolism, particularly in the heart, has not yet been specifically examined.

Hence, this study aimed at documenting alterations in carbohydrate utilisation as well in mitochondrial metabolism in general in VLCAD deficient hearts. These parameters were assessed in 3- and/or 7-month-old VLCAD null mice and their littermates using our model of hearts perfused *ex vivo* in working mode with concomitant evaluation of myocardial contractility and metabolic flux, employing ^{13}C -labeled substrates (20). In parallel, mRNA expression for selected metabolic genes were also assessed by qPCR. While *ex vivo* working VLCAD null mouse hearts showed an unexpected switch in substrate selection from carbohydrate to lipids (with oleate) as well as a lower pyruvate carboxylation flux at 3 months albeit not at 7 months, *in vivo* analysis revealed lower levels of citric acid cycle (CAC) intermediates levels and age and condition-dependant changes in gene expression for proteins/enzymes involved in carbohydrates metabolism, anaplerosis and mitochondrial function.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and animals

The sources of chemicals, biological products and ^{13}C -labeled substrates as well as the BSA dialysis procedure (BSA fraction V, Intergen, Purchase, NY) have been identified previously (40). Animal experiments were all approved by the local animal care committee in agreement with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. *Acadv1*^{-/-} (VLCAD^{-/-}) mice (129svJ X C57BL/6J genetic background) were kindly provided by Dr. Arnold Strauss, University of

Cincinnati, College of Medicine (13). Male VLCAD^{-/-} mice were generated as previously described (Gélinas, 2011). All animals, housed in a specific pathogen free facility with a 12-h:12-h light-dark cycle starting at 7:00 AM, had free access to water and standard chow (except if specified otherwise, as described below).

Heart perfusion in semi-recirculating mode.

Male VLCAD^{-/-} and VLCAD^{+/+} mice, which had free access to water and food unless specified otherwise, were anaesthetized (1 µl/g ip) with a mixture of ketamine (100 mg/ml) and xylazine (20 mg/ml) and heparinised (5,000 U/kg sc) 15 min before surgery. Previous publications describe the procedure: (i) for mouse heart isolation and its *ex vivo* perfusion in working mode as well as for continuous monitoring of functional and physiological parameters throughout perfusion as well as of concentrations in influent (arterial) and effluent (coronary) of pO₂, pCO₂, pH, Ca²⁺ and other ions (15; 20), and (ii) for calculating myocardial oxygen consumption (MVO₂), intracellular pH, rate pressure product (RPP), cardiac power and cardiac efficiency from previously-reported equations (20). At the end of the perfusion period, hearts were freeze-clamped with metal tongs chilled in liquid nitrogen, weighed, and stored at -80°C for further analyses.

Perfusion protocols. Working mouse hearts were perfused for 30 min with semi-recirculating Krebs-Heinselet buffer containing various substrates, co-factors and hormones.. For all perfusions, the buffer contained 1.5 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.8 nM insulin, 50 µM L-carnitine and 0.5 nM epinephrine, For any given perfusion, we included a different labelled substrates, [U¹³-C₁₈]oleate [initial molar percent enrichment: 25%], a mixture of [U¹³-C₃]lactate and [U¹³-C₃]pyruvate. Hearts from 3- and 7-month-old VLCAD^{+/+} (n=6) and VLCAD^{-/-} (n=5) mice were perfused at preload and afterload pressures of 15 and 50 mmHg, respectively, in the presence of 11 mM glucose and 0.4 mM oleate.

Effect of a 24-h fast and various diets.

Male VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice fed, either a standard diet (3- and 7-month-old; Harlan Teklab #2018, 3.1 kcal/g), a high-fat diet (for 2 weeks) (HFD: Harlan Teklab #03584, 5.4kcal/g) *ad libitum*, and were kept in the same room as previously described (16). To document the impact of fasting, selected animals from all groups were housed individually in cages, with fasting initiated at 9:00 a.m. and lasting 24 h. All animals were weighed before sacrifice under anaesthesia induced by injection of a solution (1 μ l/g i.p.) of ketamine (100 mg/ml) and xylazine (20 mg/ml). Hearts were excised rapidly, freeze-clamped with metal tongs chilled in liquid nitrogen, and stored in liquid nitrogen.

Analytical procedures.

Gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) assay and flux parameters. Our previously-published studies (20; 40) provide: (i) detailed descriptions of ¹³C-enrichment of CAC intermediates (citrate, succinate, fumarate and malate) by GCMS (Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a HP-5 column coupled to a 5973N mass selective detector); (ii) definitions of ¹³C terminology and calculations of flux ratios relevant to substrate selection for citrate synthesis (CS) from ¹³C-enrichment of the acetyl (carbons 4 and 5) and oxaloacetate (carbons 1,2,3,6) moiety of citrate and (iii) activities of selected CAC enzymes (citrate synthase (CS), aconitase) by spectrophotometry.

Reverse transcription-qPCR gene expression analysis. The qPCR primer pairs for the selected genes, crafted with the Beacon Designer program (version 5.0), using mouse sequences available in *GenBank*, and not reported previously (15). We documented the gene expression of enzymes/proteins involved in (i) carbohydrates metabolism: pyruvate dehydrogenase kinase (*Pdk4*) and phosphofructokinase (*Pfkm*), (ii) anaplerosis: pyruvate carboxylase (*Pcx*), propionyl-CoA carboxylase

(*Pccb*) and malic enzyme (*Me2*); and (iii) mitochondrial function: uncoupling protein 3 (*Ucp3*) and PGC1 α (*Ppargc1a*; forward: *tggatgaagacggattgc*, reverse: *tggttctgagtgctaagac*). Gene transcript levels in each sample were averaged and normalized to the housekeeping gene, namely, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*), after $\Delta\Delta C_t$ correction as previously describes (15; 16).

Statistical analyses.

The data are expressed as mean \pm standard error (S.E.) of n=4-20 hearts samples. Statistical significance was reached at $P < 0.05$ by unpaired t-test or two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. The 2-way ANOVA was used to compare the effects of conditions (fasting or diet) within the control and VLCAD null groups and to assess the interaction between these groups.

RESULTS

Unexpected metabolic changes in VLCAD deficient hearts

Our previous study has revealed several metabolic alterations in lipid metabolism beyond LCFA β -oxidation (16). While the focus of this previous study was on lipid metabolism, in this study, we aimed at testing the hypothesis that VLCAD-deficient hearts manifest also alterations in alterations in carbohydrate metabolism. For this purpose, working hearts were perfused with ^{13}C -labeled lactate plus pyruvate in the presence of oleate as the LCFA. In some additional perfusions experiments, oleate was also labelled. Fluxes data obtained in the first part of this study are complemented with additional data relevant to carbohydrate and mitochondrial metabolism, namely tissue CAC intermediates levels, CAC enzyme activities and gene expression for selected enzymes/proteins.

VLCAD deficient hearts maintained functional parameters similar to controls when perfused *ex vivo* with oleate as the LCFA.

When perfused *ex vivo*, working hearts from 3- and 7-month-old VLCAD null mice maintained physiological parameters similar to their age-matched littermate counterparts during the entire 30-min perfusion in the presence of carbohydrates (glucose, lactate plus pyruvate) and oleate as the exogenous source of LCFA (data not shown). This result concurred with those obtained with palmitate, which are reported in our previously published study (16).

VLCAD deficient hearts show increased oleate oxidation and decreased pyruvate decarboxylation

Unexpectedly, as shown in Figure 1A, the contribution of exogenous oleate to acetyl-CoA formation for citrate synthesis is increased by 40 % in VLCAD deficient hearts compared with controls. This is unlike what we observed with palmitate in our previously published study, for which no difference was found between the two groups of hearts. This suggests a different metabolism between palmitate and oleate for the various enzymatic steps following their entry into cells until they undergo β -oxidation. In parallel to the flux data obtained for oleate, the flux ratio PDC/CS is 35% lower in 3 month-old VLCAD deficient hearts, while that of other sources remains unchanged (Figure 1A). However, none of these alterations were observed in 7 month-old hearts (Figure 1B).

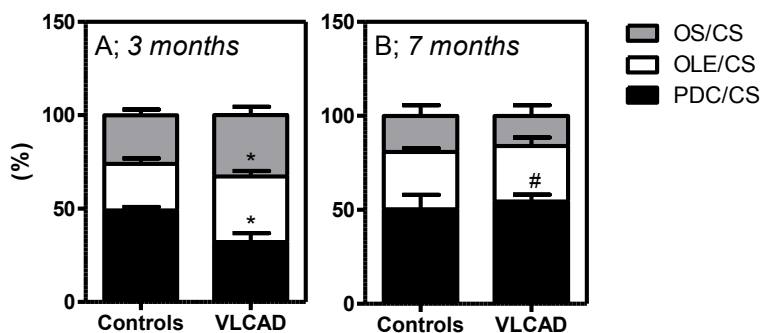


Figure 1: Relative contribution of substrates to mitochondrial acetyl-CoA formation at 3 and 7 months.

Data are means \pm SE of 6 perfusion experiments with [U- $^{13}\text{C}_{18}$]oleate or a mixture of [U- $^{13}\text{C}_3$]lactate/[U- $^{13}\text{C}_3$]pyruvate on VLCAD $^{+/+}$ and VLCAD $^{-/-}$ mouse hearts at (A) 3 months and (B) 7 months. Figures present flux values expressed relative to citrate synthase (CS) representing the fractional contributions of the followings pathways/substrates to citrate synthesis: (i) pyruvate decarboxylation (PDC/CS; black bars) (ii) oleate oxidation (OLE/CS; open bars), and (iii) other sources (OS/CS; grey bars). Data are calculated from the measured tissue mass isotopomer distribution of citrate and its oxaloacetate moiety, from which we extrapolate the acetyl moiety of citrate. Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $p < 0.05$ VLCAD $^{-/-}$ vs. controls and, # $p < 0.05$ 7 vs. 3 months.

Building on data from our previous study, in which we assessed expression of several genes encoding for enzymes in lipid metabolism, we have herein documented, under various conditions, the expression of genes encoding for enzymes involved in two major regulatory steps in CHO metabolism, namely phosphofructokinase for glycolysis and PDK4 for pyruvate decarboxylation. Collectively, the data obtained cannot explain the observed alterations in the PDC/CS flux ratios at 3 months of age. Indeed, at 3 months of age, there were no significant differences between groups of mice in transcript levels for Pfkfb3 or Pdk4 (Figure 2A and D), although as expected transcript levels for Pdk4 was increased several-fold following fasting in both groups. However, at 7 months of age, there was a significantly lower transcript level for Pfkfb3 (Figure 2B-C), albeit

not for Pdk4 (Figure 2E-F), in VLCAD deficient mouse hearts following fasting and feeding the high fat diet

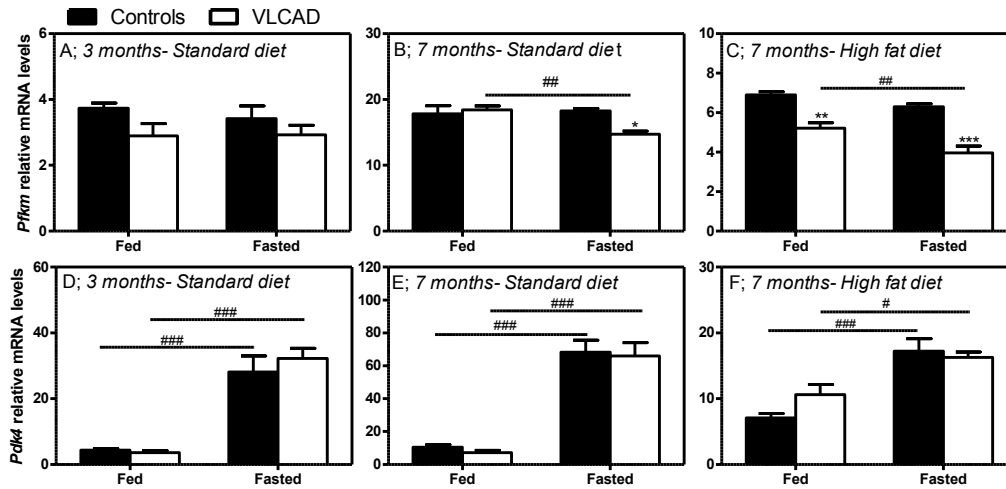


Figure 2: Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of enzymes involved in carbohydrates metabolism in 3 and 7 month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice fed a standard or a high fat diet.

Data are means \pm SE on 4-5 non-perfused freeze-clamped hearts from fed or 24-h fasted 7-month-old VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. mRNA levels of phosphofruktokinase-1 (*Pfkfb1*; A-C) and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*Pdk4*; D-F) are normalized to the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*). Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ VLCAD^{-/-} vs. controls; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ fasted vs. fed.

VLCAD deficient hearts show impaired anaplerosis

One interesting finding of this study is the impaired anaplerosis in VLCAD deficient hearts, which is reflected by a ~30% decrease in the PC/CS flux ratio, an anaplerotic reaction generating OAA from pyruvate carboxylation, when assessed in *ex vivo* working hearts from mice at 3 months (Fig. 3A), albeit not at 7 months

of age (Fig. 3B). However, despite these differences in the anaplerotic flux ratios in 3 month-old VLCAD deficient hearts, CAC intermediates levels in *ex vivo* perfused hearts were similar to controls both at 3 (Figure 3C) and 7 months (data not shown).

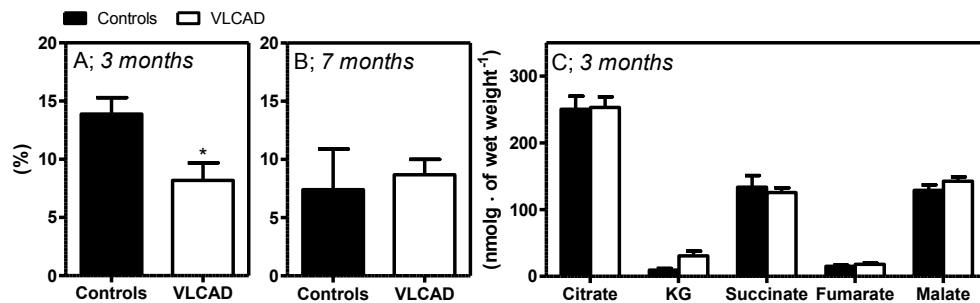


Figure 3: Pyruvate carboxylation and CAC intermediates levels in *ex vivo* perfused hearts from 3 month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice.

Data are means \pm SE of 6 perfusion experiments with mixture of [U-¹³C₃]-labeled lactate and pyruvate on VLCAD^{+/+} (black bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mouse hearts at 3 months and 7 months. Figures 3A (3 months) and 3B (7 months) present flux values expressed relative to citrate synthase (CS) for pyruvate carboxylation (PC/CS). Data are calculated from the measured tissue mass isotopomer distribution of citrate and its oxaloacetate moiety, from which we extrapolate the acetyl moiety of citrate. Figure 3C represents cardiac levels of CAC intermediates. Statistics: Unpaired *t*-test: * $p < 0.05$ VLCAD^{-/-} vs. controls.

However, in contrast, 7 month-old VLCAD deficient hearts that were freeze-clamped *in situ*, without *ex vivo* perfusion, showed reduced levels for the CAC intermediates succinate and malate compared to controls (Figure 4A), and, hence, for total CAC intermediates (Figure 4B).

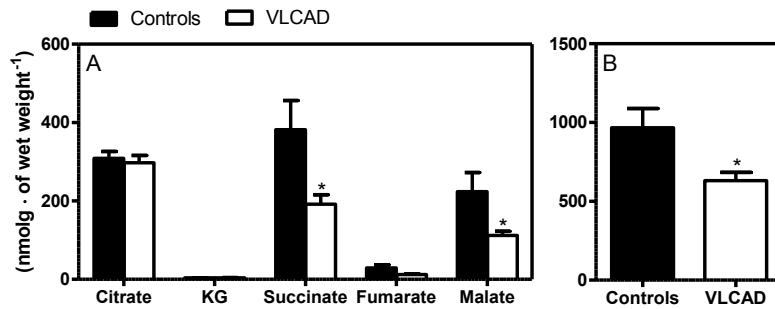


Figure 4: Effects of VLCAD deficiency on CAC intermediate cardiac concentrations (A), and total (B) CAC intermediate cardiac concentrations *in vivo* at 7 months.

Data are means \pm SE of 7 non-perfused freeze-clamped hearts from fed VLCAD^{+/+} (black bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mouse hearts. Statistics: Unpaired *t*-test: **p*<0.05 VLCAD^{-/-} vs. controls.

Further to our finding of a discrepancy in the tissue levels of CAC intermediates between hearts freeze-clamped after *ex vivo* perfusion or *in situ*, we sought for potential explanations. Hence, we assessed (i) the activities of selected CAC enzymes and (ii) the expression of genes encoding for enzymes involved in anaplerosis. Measurement of CAC enzymatic activities revealed no change for aconitase or citrate synthase (Figure 5). Thus lower enzymatic activities cannot explain the observed difference between the two groups of mice for CAC intermediate levels *in vivo*.

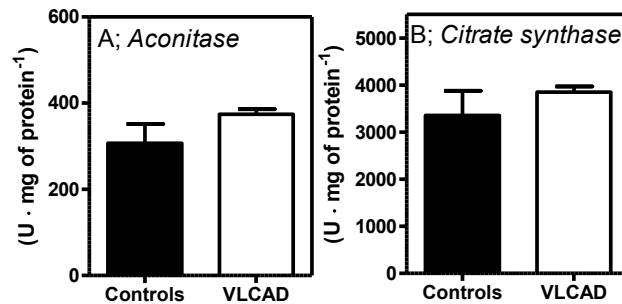


Figure 5: Effects of VLCAD deficiency on aconitase (A), and citrate synthase (B) activities *in vivo* at 7 months.

Data are means \pm SE of 7 non-perfused freeze-clamped hearts from fed VLCAD^{+/+} (black bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mouse hearts. Statistics: Unpaired *t*-test: Non significant

However, gene expression analyses in hearts freeze-clamped *in vivo* revealed age and condition-dependant changes in transcript levels for pyruvate carboxylase (Pcx) (Figure 6 A-C) and propionyl-CoA carboxylase (Pccb) (Figure 6D-F) two enzymes involved in anaplerosis, in VLCAD deficient hearts compared to their matched counterparts. It is noteworthy that the greatest differences were observed following fasting or feeding a high fat diet. Finally, there were no changes in transcript levels for malic enzyme (*Me2*), another enzyme potentially involved in anaplerosis, under all tested conditions (data not shown).

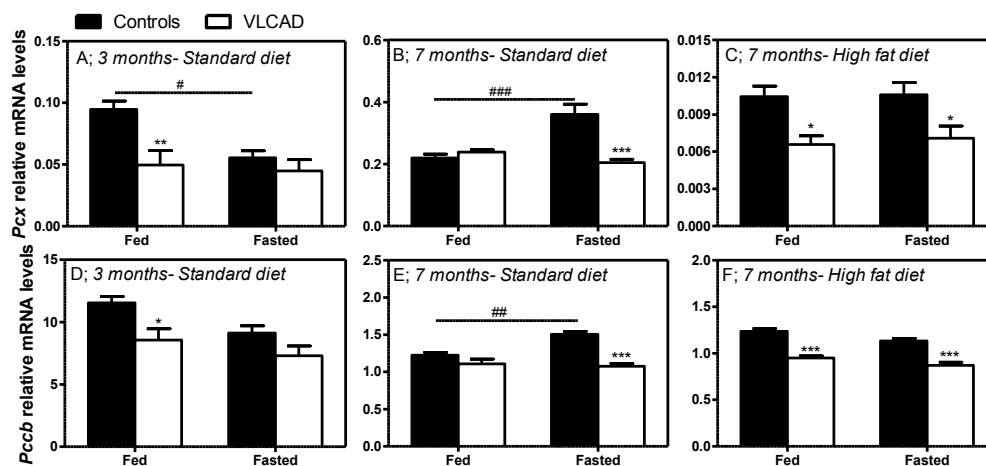


Figure 6: Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of enzymes involved in anaplerosis in 3 and 7 month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice fed a standard or a high fat diet.

Data are means \pm SE on 4-5 non-perfused freeze-clamped hearts from fed or 24-h fasted 3 and 7-month-old VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. mRNA levels of pyruvate carboxylase (*Pcx*; A-C) and propionyl-CoA carboxylase B (*Pccb*; D-F) are normalized to the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*). Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ VLCAD^{-/-} vs. controls ; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ fasted vs. fed.

VLCAD deficient hearts show other mitochondrial alterations

Further to our findings of major decreases in transcript levels for mitochondrial anaplerotic enzymes, we sought to assess whether other proteins involved in mitochondrial function and biogenesis were altered. qPCR analysis revealed a 50% lower mRNA levels for UCP3 (*Ucp3*) (Figure 7A), an enzyme involved in mitochondrial function, following fasting in hearts from 7 months VLCAD deficient mice fed a high fat diet. Similar results were obtained with the standard diet at 7 months, but not at 3 months (data not shown). Furthermore, 25 % and 35% lower PGC1 α (*Ppargc1a*) transcripts levels were observed at 7 months in

VLCAD deficient hearts fed with the high fat diet the fed and the fasted states, respectively, compared to their matched counterparts in (Figure 7B).

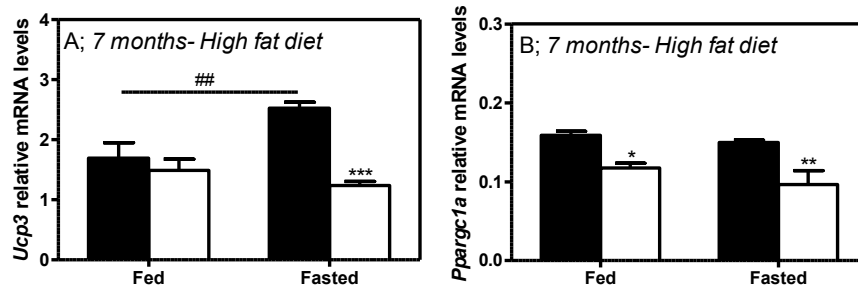


Figure 7: Impact of nutritional status on myocardial mRNA levels of proteins involved in mitochondrial function and biogenesis in 7 month-old VLCAD^{+/+} and VLCAD^{-/-} mice fed a high fat diet.

Data are means \pm SE on 4-5 non-perfused freeze-clamped hearts from fed or 24-h fasted 7-month-old VLCAD^{+/+} (solid bars) and VLCAD^{-/-} (open bars) mice. mRNA levels of uncoupling protein 3 carboxylase (*Ucp3*; A) and PGC1 α (*Ppargc1a*; B) are normalized to the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*). Statistics: 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ VLCAD^{-/-} vs. controls; ## $p < 0.01$ fasted vs. fed.

DISCUSSION

In our previously published study, we showed that VLCAD deficient hearts present unexpected lipid handling alterations both when perfused *in vitro* as well as *in vivo*. These hearts display also *in vivo* QTc prolongation despite their ability to efficiently oxidize exogenous palmitate *ex vivo*. Hence, the goal of this study was to test for additional alterations in carbohydrate and mitochondrial metabolism in VLCAD deficient mouse hearts, which could potentially be involved in the development of heart beat disorders. For this purpose, we used as our study model the *ex vivo* work-performing perfused mouse heart, because of its greater relevance to the physiological situation with respect to workload in combination with *in vivo*

determination of CAC intermediates levels and gene expression for selected metabolic enzymes/proteins. Collectively, results from this study demonstrate that VLCAD deficiency in the mouse is linked to age- and condition-dependent (i) changes in substrate selection for the formation of acetyl-CoA for citrate synthesis, (ii) a lower pyruvate's contribution to citrate synthesis through anaplerosis, (iii) lower CAC intermediates levels *in vivo*, (iv) lower mRNA levels for various metabolic enzymes, and (v) mitochondrial alterations. The various effects of VLCAD deficiency on energy substrate selection will be discussed prior to the effects on anaplerosis and other mitochondrial parameters.

Firstly, confirming our previous findings (16), results from this study demonstrate the ability of 3- and 7-month-old VLCAD null mouse hearts perfused *ex vivo* to maintain normal values for the various physiological parameters measured. However, interestingly, the contribution of exogenous oleate (which is one of the most abundant LCFAs occurring in plasma) to β -oxidation was increased by 40% in 3 month-old VLCAD deficient hearts compared to controls, while that of carbohydrates was decreased by 30%. Although these results contrast with our previous findings in another model of LCFA oxidation defects, namely, PPAR α null mouse hearts (15), they are consistent with the notion that compensatory mechanisms of LCFA β -oxidation, namely LCAD or ACAD9, are present in VLCAD-null mice, as suggested by studies in fibroblasts with radioactive oleate (5) and measurement of acyl-CoA dehydrogenase activity with palmitoyl-CoA in the hearts of these mice (6). Furthermore, our previously reported result about efficient exogenous palmitate oxidation in all tested condition also supports the notion of a compensatory mechanism for LCFA oxidation in VLCAD deficient mouse hearts (16).

However, in this previously reported study no difference was found for the contribution of exogenous palmitate to mitochondrial acetyl-CoA formation between the two groups of hearts (16), which is different from what we now see for the increased contribution of oleate in VLCAD deficient hearts. The difference

between palmitate and oleate oxidation could be explained by a different oxidation mechanism for saturated and unsaturated FA. Indeed, different oxidation capacities have been reported in human VLCAD deficient fibroblasts according to the different type of unsaturated FA (33). This could be explained by the higher affinity of LCAD and ACAD9 for unsaturated FAs (11; 22). However, the increased contribution of exogenous oleate was not observed in 7 month-old hearts, suggesting that the compensatory mechanism could be less efficient at this age. Our previously reported data showing that LCAD mRNA levels are modified in a age- and condition dependant manner support also this hypothesis (16). Another potential explanation for this difference between oleate oxidation at 3 and 7 months could involve a different oleate partitioning between oxidation and storage in TGs at 3 months. In the heart, the initial step in TGs and phospholipid synthesis is the glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 (GPAT-1) catalyzed acylation of sn-glycerol-3-phosphate with long chain acyl-CoA (23). It is known that GPAT activity regulates the incorporation of FAs in TGs and, furthermore, the apparent reciprocal regulation of mitochondrial GPAT with CPT-1 and their similar location on the outer mitochondrial membrane suggest that they may compete for acyl-CoAs (18). In this context, it has been shown that mitochondrial GPAT overexpression leads to decreased FAs oxidation and increased TGs synthesis, at least in hepatocytes (24). Thus, modifications of GPAT activity in VLCAD deficient heart could also contribute the decreased oleate oxidation at 7 months. Nevertheless, altogether the results obtained in *ex vivo* perfused VLCAD deficient hearts showed that the metabolic flexibility between glucose and oleate oxidation is maintained in those hearts, as shown by the concerted variation in PDC/CS (decreased) and OLE/CS (increased) fluxes at 3 months followed by normalisation of these variations with aging.

In this study, we also report data about the impact of VLCAD deficiency on the anaplerotic flux of pyruvate carboxylation in the heart. This bears relevance given that in humans it has been hypothesized by Roe et al. that in patients with VLCAD

deficiency, anaplerosis is unable to compensate for the increased leakage of catalytic intermediates of the CAC, supporting the beneficial effect of diet containing triheptanoin (32). In this regard, our results clearly demonstrated a 30% lower contribution of pyruvate carboxylation for citrate synthesis in the VLCAD deficient hearts at 3 months, albeit not at 7 months. This result is supported by the lower mRNA levels for Pcx in the fed state, which is the condition used for the perfusion experiments, compared to controls at 3 months. Nevertheless, despite their lower pyruvate carboxylation flux ratio, VLCAD deficient hearts were able to maintain contractile function and CAC intermediate tissue levels *ex vivo* similar to controls. The impact of a lower anaplerosis from pyruvate carboxylation remains poorly understood in the heart (for review (10)), and cardiac symptoms have not been reported in patients with PC deficiency (14).

However, another interesting finding of this study is the age and condition-dependent lower levels of transcript for Pccb in VLCAD deficient hearts, as revealed by our gene expression analysis. Propionyl-CoA carboxylase (PCC), which converts propionyl-CoA into methylmalonyl-CoA, in an ATP-dependant manner, and subsequently to the CAC intermediate succinyl-CoA, is involved in branched-chain amino acid and odd-numbered FA metabolism. In humans, inherited mutations in genes coding for PCCA or PCCB cause propionic aciduria (30). Despite treatments based on strict low-protein diet, patients with propionic aciduria present long-term complications including neurological disorders, renal failure and cardiomyopathy (26). Because of the lower CAC intermediates levels, mainly succinate and malate (metabolites that are downstream of succinyl-CoA) in 7 month-old VLCAD deficient hearts, we can speculate that the lower mRNA levels for Pccb are reflected by lower PCC activity in these hearts. Alterations in BCAAs metabolism could lead to propionyl-CoA accumulation and thus to short chain acylcarnitine accumulation, mainly of 3 and 5 carbons chain length (C3 and C5). Increased levels of short chain acylcarnitines have been reported to independently contribute to insulin resistance and diabetes (28; 29). Furthermore, a

recently published study reports that higher levels of BCAAs in blood are new predictors for future type 2 diabetes in healthy humans (41). However, the role of these short chain acylcarnitines in VLCAD deficient mice and patients remains to be elucidated. In this regard, in the case-report study by Roe et al. it is shown that C3 acylcarnitine are elevated in plasma of one patient with VLCAD deficiency following meal containing triheptanoin, TG containing odd-chain medium chain FA, compared to values following the even-chain medium chain TG meal (32). Thus, condition-dependant accumulation of this specific short-chain acylcarnitine cannot be excluded in VLACD deficient patients.

Patients with propionic acidemia display other metabolic alterations in various tissues, including the heart, which appear of relevance to our findings in VLCAD deficient mouse hearts of lower transcript levels for Ucp3 and Ppargc1a. These include alterations in mitochondrial respiratory chain components leading to multiple oxidative phosphorylation (OXPHOS) deficiencies (9). Interestingly, PGC1 α is also involved in OXPHOS capacity at the transcriptional levels via its association with YY1, another transcription factor, and their activation by the mammalian target for rapamycin (mTOR) (8). mTOR is a serine/threonine kinase, which is activated by nutrients, including BCAAs (for review (17; 31)). Thus once again, our results point to potential alterations in mitochondrial BCAAs metabolism in VLCAD deficient hearts. This appears particularly relevant given the recently reported role for VLCAD in fatty acid oxidation complex formation in mutlicomplexes for OXPHOS according to its interaction with the mitochondrial inner membrane (35; 42). On the other hand, it is actually believed that the UCPs reduce cardiac efficiency by dissipating the mitochondrial proton gradient and thus uncoupling it from ATP synthesis in condition of increased reliance on FAs oxidation (for review (25)). Thus the lower transcript levels for UCP3 observed in VLCAD deficient hearts could be interpreted as a mechanism to protect the heart and to spare protons for ATP synthesis.

In conclusion, in addition to demonstrating age-dependent changes in energy substrate selection in VLCAD deficient mouse hearts, our study highlights previously undescribed and unexpected mitochondrial alterations in these hearts, suggesting impaired anaplerosis and mitochondrial biogenesis. We speculate that this could potentially lead to alterations in BCAAs metabolism, which in turn would compromise OXPHOS capacity in VLCAD deficient hearts under specific conditions, including fat overload, by a mechanism including the mTOR signalling pathway. The exact mechanism remains, however, to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

Part of this work was presented at the Experimental Biology Meeting in April 2009 and 2011 and at Society for Heart and Vascular Metabolism meeting in June 2011. The authors thank the staff of the animal facility at the MHI for assistance with animal care. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Grant #9575 to C.D.R.) and the National Institutes of Health (RO1 DK069752) as well as studentships to R.G. (CIHR).

REFERENCES

1. **Aoyama T, Uchida Y, Kelley RI, Marble M, Hofman K, Tonsgard JH, Rhead WJ and Hashimoto T.** A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 1369-1372, 1993.
2. **Baumgartner D, Scholl-Burgi S, Sass JO, Sperl W, Schweigmann U, Stein JI and Karall D.** Prolonged QTc intervals and decreased left ventricular contractility in patients with propionic acidemia. *J Pediatr* 150: 192-7, 197, 2007.

3. **Bertrand C, Largilliere C, Zobot MT, Mathieu M and Vianey-Saban C.** Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid oxidation in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1180: 327-329, 1993.
4. **Bonnet D, Martin D, Pascale DL, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M and Saudubray JM.** Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation* 100: 2248-2253, 1999.
5. **Chegary M, Brinke H, Ruiter JP, Wijburg FA, Stoll MS, Minkler PE, van WM, Schulz H, Hoppel CL, Wanders RJ and Houten SM.** Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1791: 806-815, 2009.
6. **Cox KB, Hamm DA, Millington DS, Matern D, Vockley J, Rinaldo P, Pinkert CA, Rhead WJ, Lindsey JR and Wood PA.** Gestational, pathologic and biochemical differences between very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the mouse. *Hum Mol Genet* 10: 2069-2077, 2001.
7. **Cox KB, Liu J, Tian L, Barnes S, Yang Q and Wood PA.** Cardiac hypertrophy in mice with long-chain acyl-CoA dehydrogenase or very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lab Invest* 89: 1348-1354, 2009.
8. **Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK and Puigserver P.** mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* 450: 736-740, 2007.
9. **de Keyzer Y, Valayannopoulos V, Benoist JF, Batteux F, Lacaille F, Hubert L, Chretien D, Chadeaux-Vekemans B, Niaudet P, Touati G, Munnich A and de LP.** Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. *Pediatr Res* 66: 91-95, 2009.
10. **Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG and Chatham JC.** Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc Res* 90: 210-219, 2011.
11. **Ensenauer R, He M, Willard JM, Goetzman ES, Corydon TJ, Vandahl BB, Mohsen AW, Isaya G and Vockley J.** Human acyl-CoA dehydrogenase-9 plays a novel role in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 280: 32309-32316, 2005.
12. **Exil VJ, Gardner CD, Rottman JN, Sims H, Bartelds B, Khuchua Z, Sindhal R, Ni G and Strauss AW.** Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1289-H1297, 2006.

13. **Exil VJ, Roberts RL, Sims H, McLaughlin JE, Malkin RA, Gardner CD, Ni G, Rottman JN and Strauss AW.** Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. *Circ Res* 93: 448-455, 2003.
14. **Garcia-Cazorla A, Rabier D, Touati G, Chadeaux-Vekemans B, Marsac C, de LP and Saudubray JM.** Pyruvate carboxylase deficiency: metabolic characteristics and new neurological aspects. *Ann Neurol* 59: 121-127, 2006.
15. **Gelinas R, Labarthe F, Bouchard B, Mc DJ, Charron G, Young ME and Des RC.** Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPARalpha null mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1571-H1580, 2008.
16. **Gelinas R, Thompson-Legault J, Bouchard B, Daneault C, Mansour A, Gillis MA, Charron G, Gavino V, Labarthe F and Des RC.** Prolonged QT interval and lipid alterations beyond {beta}-oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011.
17. **Hall MN.** mTOR-what does it do? *Transplant Proc* 40: S5-S8, 2008.
18. **Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baro M and Coleman RA.** Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol. *J Biol Chem* 276: 42205-42212, 2001.
19. **Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S and Hashimoto T.** Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 267: 1027-1033, 1992.
20. **Khairallah M, Labarthe F, Bouchard B, Danialou G, Petrof BJ and Des RC.** Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using ¹³C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1461-H1470, 2004.
21. **Kluge S, Kuhnelt P, Block A, Merkel M, Gocht A, Lukacs Z, Kohlschutter A and Kreymann G.** A young woman with persistent hypoglycemia, rhabdomyolysis, and coma: recognizing fatty acid oxidation defects in adults. *Crit Care Med* 31: 1273-1276, 2003.
22. **Lea W, Abbas AS, Sprecher H, Vockley J and Schulz H.** Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1485: 121-128, 2000.
23. **Lewin TM, de JH, Schwerbrock NJ, Hammond LE, Watkins SM, Combs TP and Coleman RA.** Mice deficient in mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 have diminished myocardial triacylglycerol accumulation during lipogenic diet and altered phospholipid fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta* 1781: 352-358, 2008.

24. **Linden D, William-Olsson L, Rhedin M, Asztely AK, Clapham JC and Schreyer S.** Overexpression of mitochondrial GPAT in rat hepatocytes leads to decreased fatty acid oxidation and increased glycerolipid biosynthesis. *J Lipid Res* 45: 1279-1288, 2004.
25. **Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS and Stanley WC.** Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90: 207-258, 2010.
26. **Mardach R, Verity MA and Cederbaum SD.** Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 85: 286-290, 2005.
27. **Marionneau C, Aimond F, Brunet S, Niwa N, Finck B, Kelly DP and Nerbonne JM.** PPARalpha-mediated remodeling of repolarizing voltage-gated K⁺ (K_v) channels in a mouse model of metabolic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 44: 1002-1015, 2008.
28. **Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FG and DeLany JP.** Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipototoxicity. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1695-1700, 2010.
29. **Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS, Jr., Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD and Svetkey LP.** A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9: 311-326, 2009.
30. **Ogier de BH and Saudubray JM.** Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol* 7: 65-74, 2002.
31. **Polak P and Hall MN.** mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 21: 209-218, 2009.
32. **Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F and Brunengraber H.** Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest* 110: 259-269, 2002.
33. **Roe DS, Vianey-Saban C, Sharma S, Zobot MT and Roe CR.** Oxidation of unsaturated fatty acids by human fibroblasts with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: aspects of substrate specificity and correlation with clinical phenotype. *Clin Chim Acta* 312: 55-67, 2001.
34. **Saudubray JM, Martin D, de LP, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P and Brivet M.** Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis* 22: 488-502, 1999.

35. **Souri M, Aoyama T, Hoganson G and Hashimoto T.** Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase subunit assembles to the dimer form on mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett* 426: 187-190, 1998.
36. **Spiekerkoetter U, Tokunaga C, Wendel U, Mayatepek E, Exil V, Duran M, Wijburg FA, Wanders RJ and Strauss AW.** Changes in blood carnitine and acylcarnitine profiles of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice subjected to stress. *Eur J Clin Invest* 34: 191-196, 2004.
37. **Spiekerkoetter U, Tokunaga C, Wendel U, Mayatepek E, IJlst L, Vaz FM, van VN, Overmars H, Duran M, Wijburg FA, Wanders RJ and Strauss AW.** Tissue carnitine homeostasis in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *Pediatr Res* 57: 760-764, 2005.
38. **Ter VF, Primassin S, Hoffmann L, Mayatepek E and Spiekerkoetter U.** Corresponding increase in long-chain acyl-CoA and acylcarnitine after exercise in muscle from very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *J Lipid Res* 2008.
39. **Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, Nada M, Zobot MT, Mathieu M and Roe C.** Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta* 269: 43-62, 1998.
40. **Vincent G, Bouchard B, Khairallah M and Des RC.** Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H257-H266, 2004.
41. **Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB and Gerszten RE.** Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17: 448-453, 2011.
42. **Wang Y, Mohsen AW, Mihalik SJ, Goetzman ES and Vockley J.** Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *J Biol Chem* 285: 29834-29841, 2010.
43. **Yamaguchi S, Indo Y, Coates PM, Hashimoto T and Tanaka K.** Identification of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in three patients previously diagnosed with long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 34: 111-113, 1993.

6. CHAPITRE VI - DISCUSSION

La flexibilité métabolique du cœur est cruciale à sa capacité d'adaptation aux différentes conditions physiologiques. Bien que le développement des moyens technologiques permettant d'étudier le lien entre ces deux phénomènes plus en profondeur ait permis d'associer le développement de dysfonctions contractiles à des altérations du métabolisme énergétique, les mécanismes exacts qui sont impliqués ne sont pas totalement élucidés. Toutefois, le fait que les patients atteints de désordres génétiques de l'oxydation des AGCLs développent des cardiomyopathies et des troubles du rythme suggère un rôle important des AGCLs pour le maintien d'une fonction cardiaque adéquate.

Cette étude avait pour but de documenter les impacts d'un tel déficit génétique de l'oxydation des AGCLs sur le métabolisme cardiaque à l'aide de deux modèles de souris invalidées pour des protéines impliquées dans l'oxydation des AGs. Cette étude fait partie d'un projet multidisciplinaire qui vise l'amélioration des connaissances de ce type de déficits héréditaires de manière à mieux comprendre les causes de l'apparition du phénotype clinique chez les patients. À plus long terme, l'objectif de ce projet est d'optimiser le support nutritionnel et le traitement afin d'améliorer la qualité de vie des individus atteints de ce type de maladie.

Au départ, l'hypothèse générale du projet était que les souris avec des déficits de l'oxydation des AGs, présenteraient des altérations du métabolisme cardiaque qui seraient exacerbées par des conditions de surcharge lipidique, comme le jeûne ou la diète riche en gras, conditions qui sont connues comme étant impliquées dans la décompensation cardiaque chez les patients avec des déficits génétiques pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans l'oxydation des AGCLs.

Pour aborder cette problématique, le phénotypage métabolique et fonctionnel du cœur des deux modèles de souris avec des déficits de l'oxydation des AGCLs, la souris déficiente pour PPAR α et la souris déficiente pour VLCAD, a été réalisé *ex vivo* à l'aide du modèle de perfusion de cœur de souris en mode travaillant combiné à l'utilisation de substrats marqués au ^{13}C et à l'analyse par GCMS. De plus, des mesures de l'expression génique et protéique pour certaines

enzymes/protéines métaboliques clés ont permis d'identifier les altérations du métabolisme cardiaque *in vivo*. Finalement, l'activité électrique du cœur de la souris déficiente pour VLCAD a été étudiée *in vivo* à l'aide de télémétrie dans différentes conditions nutritionnelles via des manipulations de la diète.

La première section de cette discussion rappellera les principaux résultats obtenus. Par la suite, l'accent sera mis sur les considérations méthodologiques, incluant les critiques se rapportant au choix de la stratégie expérimentale utilisée. Suivra subséquemment une section sur les considérations conceptuelles additionnelles, qui discutera des différentes pistes explorées en plus des principaux résultats obtenus remis dans le contexte de la littérature actuelle.

6.1 Rappel des principaux résultats

La sélection des différents substrats pour la production énergétique du myocarde est étroitement reliée à la fonction contractile du cœur. Dans cette étude, nous avons étudié les altérations du métabolisme énergétique cardiaque dans deux modèles murins de déficits de l'oxydation des AGCLs.

Notre première étude a été menée avec la souris invalidée pour PPAR α , un facteur de transcription connu pour être impliqué dans l'expression des gènes de β -OX des AGs (97). Sugden et collaborateurs avaient préalablement montré des altérations du métabolisme des glucides au niveau hépatique chez les souris PPAR α (304). Toutefois, le métabolisme glucidique chez ces souris au niveau du cœur était très peu décrit. Dans cette optique, notre étude a permis de mettre en évidence un découplage entre la glycolyse et la décarboxylation du pyruvate. De plus, cette étude a montré l'incapacité de ces cœurs, lorsque perfusés *ex vivo*, à répondre ainsi qu'à supporter une situation de demande énergétique accrue, tel qu'illustré par une fonction contractile inadéquate à la suite d'une augmentation physiologique de la charge de travail. En soi, ce résultat supportait l'hypothèse de travail initiale du projet.

La deuxième partie des travaux de cette thèse a été menée avec la souris invalidée pour VLCAD, le déficit génétique de l'oxydation des AGCLs le plus commun chez l'humain. Au moment de débiter les travaux de cette thèse, peu d'études avaient été menées à l'aide de ce modèle et l'impact de la déficience en VLCAD chez la souris sur le métabolisme d'un organe hautement oxydatif, comme le cœur, était inconnu. De façon surprenante, nos études menées avec cette souris ont révélé que, lorsque perfusés *ex vivo*, les cœurs déficients pour VLCAD ont la capacité d'oxyder de manière efficace les AGCLs et de maintenir une fonction contractile normale, et ce, même dans des conditions dans lesquelles les concentrations d'AGCLs sont élevées ou dans lesquelles la charge de travail est augmentée. Toutefois, ces souris présentent au niveau cardiaque des altérations métaboliques inattendues. De fait, la première étude menée avec les souris VLCAD a permis de documenter plus spécifiquement des altérations au niveau du métabolisme lipidique, à savoir une diminution des niveaux de DHA dans les PLs et une accumulation d'AGCLs dans les TGs cardiaques. En parallèle, les résultats obtenus quant à la fonction cardiaque *in vivo* par les expériences de télémétrie montrent une prolongation du segment QTc chez ces souris, et ce, même à la suite d'un traitement de 5 semaines avec une diète riche en huile de poisson. Toutefois, le lien entre les altérations métaboliques et la prolongation de l'onde QT reste à être clarifié. Finalement, le troisième volet de cette thèse a permis de mettre en évidence d'autres altérations métaboliques, qui varient selon l'âge et les conditions, chez la souris déficiente en VLCAD. Cette dernière étude met l'accent principalement sur les altérations mitochondriales qui pourraient être reliées à l'apparition des manifestations cliniques, comme une diminution des niveaux des intermédiaires du CAC et une diminution de l'expression génique de protéines impliquées dans la fonction mitochondriale et dans l'anaplérose, dont la propionyl-CoA carboxylase dont le déficit génétique chez l'humain est associé à une cardiomyopathie.

En résumé les 3 études réalisées dans le cadre de cette thèse montrent que l'absence d'une protéine/enzyme impliquée dans une cascade métabolique connue

peut avoir des impacts sur d'autres voies métaboliques et ainsi mener à la détérioration de la fonction cardiaque. De manière générale, les différentes approches utilisées et les résultats obtenus dans ce travail nous permettent de formuler de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes impliqués dans l'apparition des manifestations cliniques au niveau cardiaque chez les patients avec un déficit génétique de l'oxydation des AGs.

6.2 Considérations méthodologiques

Dans le cadre des travaux de cette thèse, des informations pertinentes ont été obtenues quant aux altérations du métabolisme cardiaque associées aux désordres de l'oxydation des AGCLs. Toutefois, plusieurs problèmes et résultats inattendus ont été rencontrés, nous obligeant à modifier le plan initial. Ainsi, quelques limites se rapportant au choix de la stratégie expérimentale utilisée, tant pour l'utilisation d'animaux transgéniques que pour le modèle de perfusion de cœurs de souris *ex vivo*, doivent être mentionnées.

6.2.1 Utilisation d'animaux transgéniques

Bien que les travaux de cette thèse n'aient pas permis de répondre à l'objectif initial visant l'amélioration des connaissances sur l'utilisation des AGCMs à nombre impair dans le traitement des désordres de l'oxydation des AGCLs, ils contribuent à mettre en évidence certaines difficultés liées à l'utilisation d'animaux transgéniques et suggèrent une certaine prudence quant aux choix des modèles d'étude. L'utilisation d'animaux transgéniques, quoique très utile pour la recherche cardiovasculaire, comporte plusieurs limites et certaines considérations méthodologiques importantes doivent être prises en compte lors de l'établissement d'un protocole de recherche. Dans le cadre de notre étude, plusieurs problèmes techniques ont été rencontrés au moment de débiter la colonie de souris déficientes pour VLCAD causant des retards importants dans la réalisation du

projet. Premièrement, les souris déficientes pour VLCAD ne sont pas disponibles commercialement; elles nous ont été fournies en début d'étude par le Dr Arnold Strauss de l'Université de Cincinnati (89). Étant donné la sensibilité de ces souris au froid, le transfert des animaux devait se faire en début de l'été afin de limiter les variations de température. Deuxièmement, les animaux reçus étaient contaminés à *Helicobacter pilori*. Une césarienne a donc dû être effectuée afin de s'assurer que les animaux reproducteurs soient exempts de tous pathogènes avant de commencer les accouplements pour la production des animaux destinés aux expérimentations. Finalement, étant donné la variabilité du fond génétique de ces souris (C57BL/6J+sv129), le plan initial qui était de produire des animaux VLCAD^{-/-} et de se procurer les témoins (C57BL/6J) commercialement a dû être révisé. Il est connu que le fond génétique de la souris influence grandement certains paramètres, comme le comportement (40; 207), la flore intestinale (86), la réponse immunitaire (114), mais aussi le métabolisme du glucose (24; 126) et la fonction cardiaque (19; 282). En accord avec ces travaux, une étude en cours dans notre laboratoire montre qu'en plus d'avoir un impact sur la fonction contractile du cœur, le fond génétique influence aussi son métabolisme principalement la sélection des substrats pour la production d'énergie et l'expression de certains gènes clés (Vaillant F. et al, en préparation). Prises ensemble, ces études témoignent de l'importance de choisir le bon témoin dans des études avec les souris transgéniques. Ainsi, pour notre étude, nous avons produit des souris frères et sœurs des 3 génotypes VLCAD (+/+, +/- et -/-), ce qui a nécessité une gestion de la colonie beaucoup plus laborieuse que ce qui avait initialement été prévu en plus d'une étape de génotypage (décrite au chapitre IV) pour toutes les souris de la colonie et des frais supplémentaires. Ainsi, la production active d'animaux témoins et déficients pour VLCAD a été retardée d'un an, ce qui explique le choix d'un autre modèle animal, disponible commercialement, pour la première étude.

6.2.2 Perfusion de cœurs de souris *ex vivo* en mode travaillant

Le modèle de cœur de souris perfusé *ex vivo* en mode travaillant combiné à l'utilisation de substrat marqués au ^{13}C et à l'analyse par GCMS utilisé dans le cadre des travaux de cette thèse, et dans d'autres études dans le laboratoire (157-159; 176), permet une étude dynamique de la fonction cardiaque et de suivi du devenir métabolique des différents substrats dans la cellule. Bien que cette technique unique et puissante permette de coupler, par l'analyse de flux, des altérations métaboliques à une dysfonction cardiaque, elle comporte tout de même ses limites. Parmi celles-ci, notons, en premier lieu, la composition du tampon de perfusion. En effet, bien que plusieurs efforts soient faits afin de mimer le milieu auquel est exposé le cœur *in vivo* et bien que les différents ions, hormones, cofacteurs et substrats soient administrés en concentrations physiologiques, le milieu de perfusion utilisé *ex vivo* demeure incomplet. À titre d'exemple, en plus d'être déficient pour certains acides aminés comme la glutamine, les substrats lipidiques compris dans le tampon de perfusion sont présents seulement liés à l'albumine et non pas sous forme de TGs compris dans les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité. Il s'agit d'une limite majeure, puisque, bien que les AG libres couplés à l'albumine soient la principale source d'AGs dans le cœur de rat perfusés *ex vivo* (131), des études menées *in vivo* chez la souris révèlent une utilisation préférentielles des TGs (14). La captation de ces AGs nécessite l'hydrolyse des TGs par la LPL. Cette limite du modèle est très pertinente dans notre étude avec la souris VLCAD, laquelle présente de possibles altérations dans la captation du DHA qui ne peuvent être étudiées avec le modèle de perfusion. En effet, l'exportation du DHA de son lieu de synthèse, le foie, vers le cœur se fait via les lipoprotéines dans lesquelles le DHA est lié aux TGs ou aux PLs. Ainsi la captation du DHA par le cœur nécessite l'hydrolyse de cette liaison par des phospholipases ou la LPL (16; 292).

Une autre limite importante du modèle de perfusion *ex vivo* est qu'il ne permet pas une intégration systémique, sous-estimant ainsi le rôle des tissus extracardiaques sur la régulation du métabolisme et la fonction du cœur. Ceci peut être considéré

comme un avantage, selon les protocoles, puisque, *ex vivo*, le cœur n'est pas sous contrôle du système nerveux sympathique ou parasympathique, mais peut aussi être limitant à représenter le contexte *in vivo*. Les différents niveaux des intermédiaires du CAC observés dans les coeurs perfusés *ex vivo* comparativement à ceux clampés *in vivo* sont une preuve tangible que les conditions de perfusions ne représentent pas le milieu *in vivo* de manière parfaite. En effet, nos analyses *in vivo* nous ont permis de montrer une diminution des niveaux des intermédiaires du CAC à 7 mois chez les souris déficientes pour VLCAD (Chapitre V, Figure 4, page 202), toutefois, la même analyse dans les coeurs du même âge perfusés *ex vivo* n'a pas permis de faire ressortir cette différence. Comme explication possible, notons entre autres le fait que les conditions de perfusions *ex vivo* sont contrôlées et fixes, ce qui peut contribuer à dissimuler des altérations importantes de la disponibilité des différents substrats.

Finalement, au moment d'effectuer les perfusions des études de cette thèse, notre système d'acquisition ne permettait pas la mesure de l'activité électrique du cœur. Afin d'investiguer ces paramètres, un nouveau système d'acquisition (EMKA IOX Cardio, Emka technology) a été acquis par le laboratoire et nous avons entrepris la mise au point de l'enregistrement des paramètres d'ECG sur notre modèle de coeurs perfusés.

Ainsi, de manière à vérifier la présence de la prolongation du segment QT en absence du contrôle du système nerveux sympathique, des coeurs de souris témoins et déficientes pour VLCAD âgées de 7 mois ont été perfusés en condition basale en présence de palmitate comme source d'AGCL exogène. La figure 1 (page 212) montre que la tendance à l'augmentation du segment QT est toujours présente *ex vivo*, par contre cette différence n'est pas significative. L'interprétation de ces résultats est difficile, puisque le nombre de coeurs par groupe est peu élevé (n=3-4) et que le signal d'ECG enregistré fut difficile à analyser étant donné la présence de bruit de fond causé par les autres appareils électriques du système à perfusion. Néanmoins, ces expérimentations supplémentaires suggèrent que la prolongation

de l'onde QT chez les souris déficientes pour VLCAD soit une propriété intrinsèque du cœur bien que ceci reste à être confirmé.

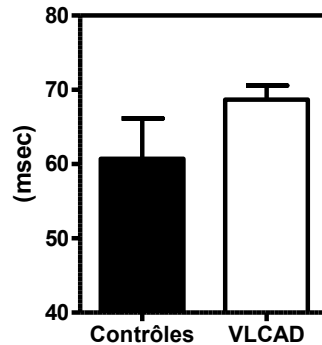


Figure 1 : Durée du segment QTc dans les cœurs VLCAD^{-/-} et VLCAD^{+/+} de 7 mois perfusés *ex vivo*.

Les données représentent les moyennes \pm S.E. de 3-4 perfusions de cœurs de souris VLCAD^{+/+} (barre noire) et VLCAD^{-/-} (barre blanche) en présence de 1mM de palmitate et 7mM de glucose. Statistiques : test de t. *non significatif*

6.3 Considérations conceptuelles additionnelles

Le déficit énergétique et l'accumulation de dérivés toxiques des AGCLs, les acyl-CoA et les acylcarnitines à CL, en amont du site de restriction sont considérés comme les mécanismes principaux responsables de l'apparition des symptômes cardiaques chez les patients atteints de désordres génétiques de l'oxydation des AGCLs. Les patients avec ce type de déficits, dont ceux avec des mutations sur le gène codant pour VLCAD, sont actuellement traités avec une diète contenant des AGCMs sous forme de TGs, toutefois, les preuves scientifiques qui sous-tendent les recommandations de ce traitement sont manquantes (330). De plus, cette diète ne parvient pas à prévenir l'apparition des symptômes chez tous les patients, principalement en condition de jeûne ou de stress. De fait, il a été proposé que les AGCMs à nombre impair, de par leur métabolisme particulier et leurs propriétés anaplérotiques seraient plus efficaces à prévenir le développement des manifestations cliniques (259; 260).

Ainsi, un des objectifs de départ de cette étude était de documenter les effets métaboliques au niveau cardiaque de l'administration aigue et chronique d'AGCMs à nombre pair et impair dans des conditions où serait mise en évidence une dysfonction cardiaque liée à un déficit énergétique. Étant donné les résultats inattendus quant à la capacité des cœurs déficients pour VLCAD à oxyder les AGCLs, cet objectif n'a pas pu être réalisé. Néanmoins, certaines expérimentations ont été menées avec ces deux types d'AGCMs, toutefois, considérant les contraintes d'espace, certaines informations n'ont pas pu être abordées dans les chapitres III à IV, les principaux résultats sont donc présentés et discutés dans cette section.

6.3.1 Effets aigus des AGCMs dans les cœurs perfusés *ex vivo*

Un des objectifs du projet initial concernant les AGCMS était de décrire leurs impacts au niveau métabolique et fonctionnel suite à leur administration de manière aigue dans le modèle de cœur perfusé *ex vivo*. Ainsi, en plus des perfusions effectuées avec des AGCLs, comme le palmitate et l'oléate (résultats chapitre IV et V), les cœurs de souris déficientes pour VLCAD âgées de 3 mois ont été perfusés en présence d'AGCMs à nombre pair et impair. En effet, 0,2 mM octanoate et un mélange de 0,1 mM octanoate et 0,2 mM heptanoate ont été ajoutés au tampon de perfusion décrit au chapitre V, c'est-à-dire, contenant 0,4 mM oléate, 11 mM glucose, 1,5 mM de lactate et 0,2 mM de pyruvate. Le choix des concentrations des AGCMs a été basé sur l'étude précédente menée dans le laboratoire sur les cœurs de rat SHR (169). De plus, le mélange contenant 0,1 mM octanoate et 0,2 mM heptanoate a été choisi afin de fournir une quantité identique d'unités acétyl-CoA que 0,2 mM d'octanoate seul.

Dans notre modèle, l'ajout d'octanoate seul n'a pas modifié la contribution de l'oléate exogène et de glucides pour la formation de l'acétyl-CoA mitochondrial, toutefois, il a diminué la contribution des autres sources. Ce qui diffère des résultats obtenus précédemment chez le rat SHR, pour lequel l'ajout d'octanoate à

la même concentration n'avait pas modifié le flux PDC/CS, mais avait diminué la contribution de l'oléate exogène (169). Outre le nombre faible d'expériences dans notre étude, la différence entre nos résultats et ceux précédemment rapportés peut peut-être s'expliquer par la capacité des cœurs VLCAD à oxyder efficacement les AGCLs comparativement aux SHR qui ont une capacité moindre due à un défaut génétique du CD36 (169; 175). De plus, dans notre étude, tel qu'illustré à la figure 2A (page 214), le flux PDC/CS n'a pas non plus été modifié par l'ajout d'un mélange d'octanoate et d'heptanoate. Toutefois, le flux OLE/CS est diminué par l'ajout du mélange d'octanoate et d'heptanoate (Figure 2B, page 214), ce qui montre bien, dans cette condition, que les AGCMs sont utilisés comme substrat énergétique.

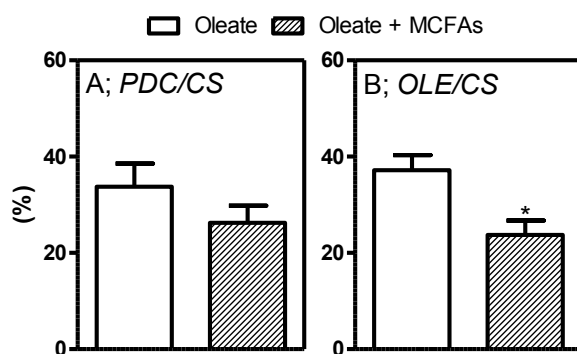


Figure 2 : Contribution des différents substrats dans les cœurs de souris VLCAD^{-/-} de 3 mois perfusés ex vivo en présence ou en absence d'AGCMs.

Les données représentent les moyennes \pm S.E. 3-4 perfusions de cœurs de souris VLCAD^{-/-} perfusés avec 0,4 mM d'oléate (barre blanche) en présence ou d'un mélange de 0,2 mM d'heptanoate et 0,1 mM d'octanoate (barre avec lignes diagonales). Statistiques : test de t. * $P < 0,05$ vs témoin.

De plus, l'analyse du profil lipidique des cœurs perfusés a montré que les cœurs déficients pour VLCAD accumulent des AGCLs dans les TGs (Figure 3, page 215). De manière surprenante, lorsque ces cœurs sont perfusés pour 30 minutes en présence de 0,2 mM d'octanoate, cette accumulation d'AGCLs n'apparaît plus. Toutefois, lorsque 0,2 mM heptanoate et 0,1 mM d'octanoate sont ajoutés,

l'accumulation d'AGCLs dans les TGs est similaire à celle observée dans les cœurs perfusés seulement avec oléate.

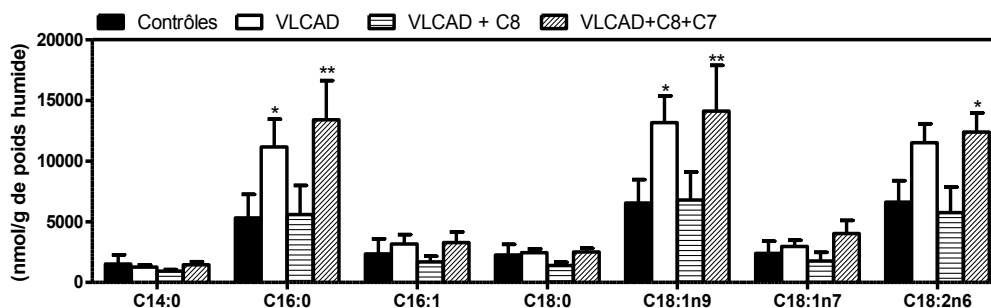


Figure 3 : Profil des AGs dans les TGs des cœurs VLCAD et VLCAD de 3 mois perfusés *ex vivo* en absence ou en présence d'AGCMs

Les données représentent les moyennes \pm S.E. de 4-7 perfusions de cœurs de souris VLCAD^{+/+} (barre noire) et VLCAD^{-/-} (barre blanche) en présence de 0,4 mM d'oléate et 11 mM de glucose et en présence d'AGCs : 0,2 mM d'octanoate (VLCAD^{-/-}; barre avec lignes horizontales) ou un mélange de 0,2 mM d'heptanoate et 0,1 mM d'octanoate (VLCAD^{-/-}; barres avec lignes diagonales). Statistiques : test de t. * $P < 0,05$ et ** $P < 0,005$ vs témoins,

Cet effet de l'octanoate suite à son administration aigue *ex vivo* au niveau cardiaque est à l'opposé de ce qui est montré dans une étude menée chez le rat par Allard et al. (4). Les résultats de cette étude, dans laquelle les auteurs ont montré l'effet de 1,2 mM d'octanoate dans un modèle de rat avec une hypertrophie du ventricule gauche induit par un cerclage aortique, montrent que suite à l'administration d'octanoate, les niveaux de TGs sont inchangés dans les cœurs témoins, mais sont augmentés dans les cœurs hypertrophiés. La concentration beaucoup plus élevée d'octanoate (0,2 mM vs 1,2 mM) utilisée dans l'étude d'Allard et al. pourrait toutefois contribuer à expliquer cette différence.

Plus récemment, des études ont été menées chez la souris déficiente pour VLCAD de manière à documenter l'effet d'une diète contenant des AGCMs sur le métabolisme lipidique *in vivo*. Bien que ces études ne portent pas directement sur

l'effet de ces AGs sur le cœur, elles apportent tout de même des informations nouvelles sur le métabolisme des AGCMs dans un contexte de déficit en VLCAD. Au niveau du muscle squelettique, il a été montré que, contrairement à l'administration chronique d'une diète contenant 4,4% en TGCM (lipides totaux = 5%), l'administration d'un bolus de TGCMs une demi-heure avant l'exercice réduit de manière importante l'accumulation d'acylcarnitines à CL, plus précisément d'oleoyl-carnitine, au niveau du muscle squelettique chez la souris VLCAD (251). Ce résultat supporte un effet bénéfique des AGCMs dû à leur oxydation rapide dans le muscle squelettique. De plus, l'administration d'un bolus de TGCMs avant l'exercice semble aussi prévenir au niveau hépatique l'accumulation de TGs qui est observée avec un traitement chronique de 5 semaines (315). Ces résultats suggèrent que l'administration de TGCMs de manière aigue en situation d'augmentation de la demande énergétique pourrait être bénéfique. Finalement, une dernière étude a montré que l'administration chronique pour une période de 1 an d'une diète contenant des TGCMs induit non seulement une augmentation du contenu dans les TGs hépatique en AGs saturés et mono insaturés et une diminution du contenu en AGPIs, mais aussi une augmentation du stress oxydant chez les souris déficientes pour VLCAD et chez les souris témoins (314). Il est toutefois important de noter que ces études de Tucci et collaborateurs menées chez la souris VLCAD ne mentionnent pas spécifiquement la composition des AGCMs. Collectivement, les résultats de ces études menées chez la souris déficiente pour VLCAD montrent que les AGCMs influencent de manière importante le métabolisme lipidique et suggèrent une certaine prudence quant à leur utilisation dans le traitement des patients à long terme.

6.4 Altérations métaboliques et troubles du rythme

L'analyse *in vivo* de la fonction du cœur de souris déficiente pour VLCAD nous a permis de mettre en évidence une prolongation de l'intervalle QTc dans toutes les conditions testées. Bien que notre étude n'ait pas permis d'identifier avec certitude

le mécanisme impliqué dans cette perturbation de l'activité électrique du cœur, nos travaux mettent en évidence des perturbations métaboliques qui pourraient potentiellement compromettre la fonction cardiaque, à savoir des altérations du métabolisme des AGPIs, du glucose et de la propionyl-CoA carboxylase. Les principaux résultats obtenus en lien avec la littérature actuelle seront discutés dans les prochaines sections.

6.4.1 Les AGPIs

Parmi les altérations lipidiques identifiées chez les souris VLCAD, la diminution des niveaux de DHA est parmi les plus importantes, principalement en lien avec le développement des troubles du rythme qui se développent chez les patients.

Plusieurs études chez l'homme ont montré que les AGPIs n-3 (via la prise de suppléments ou la consommation de poisson) ont des effets bénéfiques sur le rythme cardiaque, comme une diminution de la fréquence au repos ou suite à l'exercice ou encore une diminution de la conduction atriale menant à une diminution des probabilités d'avoir une augmentation du segment QT (pour revue (177)). Ces effets des AGPIs ont d'abord été rapportés chez un modèle de chiens avec une ligature de la coronaire antérieure descendante gauche pour lesquels une infusion d'AGPIs n-3 a prévenu la fibrillation ventriculaire sans signe d'estérification des AGPIs dans les PLs. Cet effet des AGPIs est, selon les auteurs, associé à (i) une diminution de la fréquence; (ii) une diminution de l'intervalle QT; (iii) une diminution de la pression systolique et (iv) une prolongation de la conduction auriculo-ventriculaire (28). En 2002, une petite étude chez l'humain a par contre rapporté des résultats négatifs pour l'association entre les AGPIs et le segment QT (n=42 par groupe) (104). En 2006, dans une large étude menée chez plus de 5000 hommes et femmes, de manière similaire à ce qui a été observé dans l'étude de Billman chez le chien, les auteurs ont conclu que la consommation de poissons, tels que le thon, induit (i) une diminution significative de la fréquence

cardiaque; (ii) une onde PR plus lente et (iii) une diminution de la probabilité d'avoir une prolongation de l'intervalle QT (220).

Parmi les AGPIs contenus dans l'huile de poisson souvent utilisée dans ces études, on retrouve le DHA et l'EPA. Le rôle relatif de ces deux AGPIs dans la régulation de la fréquence cardiaque n'est pas encore clair, toutefois, il semble que le rôle protecteur contre les troubles du rythme du DHA soit supérieur à celui de l'EPA (177). Au niveau cellulaire, le DHA est principalement incorporé dans PLs membranaires, où il joue un rôle aussi bien sur la fluidité et la perméabilité membranaire que sur son interaction avec des protéines membranaires et des canaux ioniques (301). De fait, une étude chez le rat SHR a montré que l'administration de suppléments de DHA, mais non d'EPA, diminue le segment QT et la pression systolique chez le rat SHR (264). Les auteurs expliquent ce résultat par une modification de la composition en AGs membranaires, le DHA ayant remplacé l'ARA. Puisque les thromboxanes, formées à partir de l'ARA, pourraient être impliquées dans l'arythmogénèse (64; 310), un remodelage de la composition membranaire dû à la consommation de DHA pourrait diminuer la libération de ces hormones et améliorer la fonction cardiaque tel qu'observé suite à l'administration d'une diète à base d'huile de poisson dans une situation d'ischémie-reperfusion (349).

Paradoxalement, bien que de plus en plus d'études montrent les effets bénéfiques du DHA au niveau du système cardiovasculaire et dans la prévention de l'apparition de certaines maladies chroniques, son métabolisme au niveau cardiaque n'est pas totalement élucidé. Une étude a montré l'incapacité des cardiomyocytes de rat à convertir l'EPA en C22:5n-3 puis en DHA (139). De plus, une étude menée *in vivo* chez le rat a montré que le foie est la source principale de DHA pour le cœur et le cerveau, qui ne peuvent maintenir seuls l'homéostasie du DHA, suite à l'administration d'une diète sans DHA, mais contenant une quantité adéquate de précurseurs n-3 (ALA) (255). Ces différences dans la capacité des organes à synthétiser le DHA pourraient, selon ces auteurs, provenir des différents

niveaux d'expression des enzymes impliquées dans cette voie métabolique. Chez le rat, en présence d'une faible concentration de DHA ou d'ALA, l'expression des enzymes de conversion, $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases et les élongases 2 et 5, est augmentée au niveau hépatique, ce qui n'est pas le cas dans le cœur et le cerveau (255). Il n'est pas encore clair à savoir si ceci est applicable ou non chez l'humain et la souris.

Contrairement aux résultats de plusieurs études citées plus haut, dans notre étude, la diète riche en huile de poisson n'a pas permis de corriger complètement les anomalies du segment QT. Toutefois, bien que la différence ne soit plus significative, l'implication de la modification de la composition des PLs ne peut pas être éliminée. En effet, il est possible de croire que la concentration de DHA qui est mesurée dans les PLs totaux ne soit pas représentative de son incorporation dans les différentes fractions de PLs, dont ceux de type phosphoinositide, phosphatidylethanolamine, et phosphatidylcholine, qui sont spécifiquement enrichis en DHA et qui sont impliqués dans la signalisation de PKC (151; 341). En effet, Jude et collaborateurs ont montré que la translocation de PKC- δ et PKC- ϵ , les isoformes de PKC activés par les DAGs dérivés des PLs, est diminuée dans les cardiomyocytes de chiens nourris avec une diète riche en huile de poisson. Ces auteurs proposent que la diminution de la translocation de ces isoformes de PKC, probablement associée à une diminution de leur activité, est liée à l'augmentation des niveaux de DHA et d'EPA dans les PLs, principalement ceux de type phosphoinositide et/ou phosphatidylcholine, et serait impliquée dans le rôle cardioprotecteur des AGPIs (151).

De plus, parmi les mécanismes pouvant expliquer l'absence d'effet de la diète riche en huile de poisson sur la durée du segment QTc, notons entre autres l'absence de stimulation adrénergique dans notre étude. À cet effet, l'étude de Rousseau-Ralliard menée chez le rat SHR mentionne que l'effet du DHA sur la diminution du segment QTc suppose l'intervention du système adrénergique, puisque l'effet du DHA sur le segment QT est similaire à celui des β -bloquants

(264). Nos études ne permettent pas de cibler précisément un mécanisme associant des altérations du système adrénergique à la prolongation du segment QT chez la souris déficiente pour VLCAD, toutefois, quelques observations rapportées dans notre étude permettent de présumer à la présence d'anomalies de la fonction β -adrénergique chez ces souris. En effet, les différents mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation des AGPIs sur la fonction adrénergique incluent entre autres l'inositol phosphate et l'homéostasie calcique (222; 223), pour laquelle des altérations ont été rapportées chez les souris déficientes pour VLCAD (343). Un autre mécanisme des AGPIs potentiellement impliqué au niveau de la régulation adrénergique passe au niveau de la voie de signalisation de la PKC (151). De plus, il a récemment été montré dans des cardiomyocytes de ventricule humains isolés qu'une augmentation des niveaux intracellulaires d'AGs saturés mène à une inhibition de la réponse β -adrénergique via une activation de PKC (81). Bien que les niveaux en céramides et en DAGs, cités comme étant responsables de cette activation de PKC, ne soient pas connus chez la souris VLCAD, une diminution de l'activité de la voie d'ERK1/2 combinée à une diminution des niveaux en ARNm pour HSL, dont les DAGs sont les substrats spécifiques, suggèrent une potentielle accumulation de ces composés dans ces cœurs. De plus, l'accumulation d'AGs dans les TGs peut être considérée comme un mécanisme de protection contre la lipotoxicité causée par ces autres dérivés lipidiques toxiques (190). Le fait que, lorsque nourries avec la diète riche en gras, les souris VLCAD accumulent des AGs, principalement insaturés (C18 :1n9 et C18 :2n6) dans les TGs, malgré une proportion plus importante d'AG saturés dans la diète, suggère de possibles accumulation de composés lipidiques saturés qui, en combinaison avec des niveaux abaissés de DHA dans les PLs, pourraient causer des anomalies de la fonction adrénergique via PKC et ainsi provoquer des troubles du rythme. Ce mécanisme demeure toutefois hypothétique et reste à être démontré.

6.4.2 Métabolisme des glucides

Les perturbations du métabolisme des AGPIs ne représentent pas les seuls mécanismes métaboliques possibles pour expliquer le prolongement de l'onde QT rapportée chez les souris déficientes pour VLCAD. En effet, des altérations du métabolisme des glucides pourraient aussi être impliquées dans les modifications de l'activité électrique du cœur. Les résultats de l'étude menée avec les souris déficientes pour PPAR α ont permis de mettre en évidence que, chez ce modèle animal, un changement métabolique dans le choix des substrats, des lipides vers les glucides ne permet pas de maintenir une fonction contractile adéquate lorsque la demande énergétique est augmentée. De plus, notre étude montre des altérations du métabolisme glucidique liées à la désactivation de PPAR α . Dans cette optique, de manière intéressante, une étude par Marionneau et collaborateurs en 2008 menée chez un modèle de souris avec une cardiomyopathie diabétique montre que PPAR α joue un rôle dans le remodelage des canaux K⁺ voltage-dépendant et plus précisément dans la densité des canaux $I_{to,f}$, lesquels sont impliqués dans la durée du potentiel d'action et conséquemment celle du segment QT (204). Ces auteurs suggèrent que le changement dans l'utilisation des substrats, comme une diminution de l'oxydation des glucides, est impliqué dans l'altération de la fonction de canal $I_{to,f}$. Dans notre étude chez la souris PPAR α , la durée de l'intervalle QT n'a toutefois pas été mesurée. Il est tout de même possible de faire un lien entre les altérations du métabolisme glucidiques et la prolongation du segment QT observée chez la souris déficiente en VLCAD. En effet, bien que le mécanisme impliqué dans la prolongation du segment QT n'est pas clair, des altérations dans le choix des substrats *in vivo* chez cette souris ne peuvent pas être exclues, tel qu'illustré par une diminution des niveaux d'ARNm de *Pfkm* et des changements selon l'âge et les conditions dans la contribution des différents substrats à la formation de l'acétyl-CoA mitochondrial *ex vivo*.

6.4.3 Le rôle des acides aminés à chaîne branchée (AACBs)

Au-delà des altérations métaboliques de la voie des AGPIs et de celle du glucose, notre étude a permis de mettre en évidence que les souris déficientes pour VLCAD

présentent d'autres altérations métaboliques inattendues qui pourraient être impliquées dans le développement des manifestations cliniques. À savoir, une diminution des niveaux des intermédiaires du CAC et des transcrits pour des enzymes impliquées dans l'anaplérose et la fonction mitochondriale. Ces résultats sont très pertinents et pointent vers de possibles altérations du métabolisme des AACBs. Les AACBs, la leucine, l'isoleucine et la valine, comptent parmi les 9 AA essentiels. Contrairement aux autres acides aminés qui sont métabolisés dans le foie, les AACBs sont métabolisés principalement dans les tissus périphériques comme les muscles squelettiques et le cœur (130).

Notre étude ne permet pas de mettre en évidence une accumulation d'AACBs. Toutefois, les souris VLCAD présentent une diminution des niveaux d'ARNm pour Pccb et une diminution des niveaux d'intermédiaires du CAC, plus précisément du succinate et du malate, lesquels sont issus du succinyl-CoA, point d'entrée des carbones provenant de la voie de la propionyl-CoA carboxylase. Pris ensemble, ces résultats suggèrent une diminution de l'activité de la voie de la propionyl-CoA carboxylase, une enzyme mitochondriale qui catalyse la carboxylation du propionyl-CoA en D-méthylmalonyl-CoA de manière ATP-dépendante. Le propionyl-CoA est, entre autres, produit à partir du catabolisme de la valine et l'isoleucine, deux AACBs. Les patients atteints d'un déficit génétique pour PCC développent une AP et présentent des altérations métaboliques importantes en plus de symptômes sévères incluant une cardiomyopathie (202; 236). En lien avec les résultats obtenus avec la souris déficiente pour VLCAD, une étude rapporte une prolongation du segment QT chez des patients avec une AP (21). Les manifestations cliniques observées chez ces patients ne sont pas toutes expliquées à ce jour. De plus, les propriétés antiarythmiques de la leucine et de la valine ont été rapportées *ex vivo* (318) et, récemment, *in vivo* chez le rat (216). Collectivement, ces études suggèrent que des altérations dans la voie métabolique des AACBs puissent contribuer au développement des manifestations cliniques au niveau cardiaque, notamment des troubles du rythme, chez la souris VLCAD. Les

l'isovalerylcarnitine, sont en équilibre avec l' α -méthylbutyryl-CoA et l'isovaleryl-CoA, des intermédiaires du métabolisme mitochondrial de l'isoleucine et de la leucine (228). Dans les dernières années, un intérêt particulier a été porté sur ces acylcarnitines à chaîne courte qui semblent être des biomarqueurs intéressants. En effet, une étude, publiée en 2009 par Newgard et collaborateurs comparant le profil des métabolites circulants d'individus obèses à celui d'individus minces, montre une accumulation des AACBs ainsi que des acylcarnitines C3 et C5 dans le plasma des individus obèses (228). Les auteurs de cette étude expliquent cette augmentation des AACBs par une diminution de la synthèse protéique causée par une diminution des niveaux d'IGF-1. De plus, ils concluent que l'accumulation d'AACBs, via leur action sur la stimulation de la voie de mTOR, pourrait contribuer de manière indépendante au développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 chez ces individus. Une autre étude montre que les patients avec un diabète de type deux, comparativement à des sujets sains, présentent non seulement des niveaux d'acylcarnitines à CL plus élevés, causés par une oxydation incomplète des AGCLs, mais aussi une accumulation d'acylcarnitines C3 et C5 (213). De plus, cette étude rapporte que chez ces patients, les niveaux de d'acylcarnitines C4, représentant la somme du methylmalonylcarnitine et du succinylcarnitine, corrélerent avec le glucose plasmatique à jeun et l'hémoglobine glyquée. Finalement, une étude publiée récemment par Wang et collaborateurs rapporte que les AACBs sont des métabolites qui prédisent le développement futur du diabète de type 2 chez des sujets sains et normoglycémiques (338). En effet, les niveaux sanguins à jeun d'AACBs sont augmentés jusqu'à 12 ans avant le développement de la maladie chez des sujets à haut risque comparativement à des sujets témoins. Collectivement, ces études suggèrent que les niveaux d'acylcarnitines à courte chaîne sont impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline et pourraient être utilisés comme biomarqueurs de la glucotoxicité et de la lipotoxicité.

Bien que les patients avec des déficits en VLCAD présentent majoritairement une accumulation des acylcarnitines à chaîne moyenne et longue (C12 à C18), leurs

profils d'acylcarnitines C3 et C5 dans les fibroblastes semblent être différents de ceux des individus sains, mais rien n'est précisé quant à une accumulation significative de ces acylcarnitines (324). Toutefois, il est important de mentionner que chez les patients VLCAD, la majorité des tests quant à l'oxydation des AGCLs et l'accumulation d'acylcarnitines se fait dans des fibroblastes de peau et que les résultats sont très variables selon les phénotypes (324). De plus, une autre étude menée chez des patients déficients pour VLCAD montre une légère augmentation des niveaux d'acylcarnitines C3 au niveau plasmatique à la suite d'un traitement avec une diète contenant de la triheptanoïne versus une diète contenant des AGCMs à nombre pair (260). Ainsi, une accumulation d'acylcarnitines à chaîne courte au niveau cardiaque n'est donc pas à exclure chez ces patients dans certaines conditions. De plus, chez la souris déficiente pour VLCAD, Spiekerkoetter et al. rapportent une importante accumulation des acylcarnitines à CL (C16-C18) et très longue (C20-C-24) au niveau sanguin à l'état basal, à la suite d'un exercice intense ainsi que suite à 8h d'exposition au froid à jeun. De plus, cette étude montre que les niveaux d'acétylcarnitine (C2) sont diminués dans toutes ces conditions. Toutefois, ces auteurs ne rapportent aucune différence des niveaux sanguins d'acylcarnitines à courte et moyenne chaîne dans ces conditions. Une accumulation de C3 et C5 n'est toujours pas à exclure puisque les données rapportées dans cette étude s'appliquent seulement aux acylcarnitines à nombre pair (296).

Étant donné la baisse des niveaux d'ARNm de *Pccb* chez les souris déficientes pour VLCAD, il est possible de croire à une accumulation de propionyl-CoA, semblable à celle observée chez les patients présentant un déficit génétique de PCC. Cependant, à l'opposé de ce qui est observé chez les patients diabétiques ou obèses, les patients avec des déficits génétiques en PCC présentent habituellement des niveaux d'AACBs abaissés (276). Cette diminution des niveaux d'AACBs chez les patients est par contre peut-être secondaire au traitement nutritionnel visant la diminution de l'apport alimentaire des précurseurs de propionyl-CoA (pour revue (277)). Ainsi, de telles recommandations nutritionnelles pourraient

être prises en compte pour le traitement des patients VLCAD de manière à limiter non seulement l'accumulation des acylcarnitines à chaîne longue, mais aussi de propionyl-CoA. Bien qu'aucun signe d'une surcharge de propionate n'ait été observé dans l'urine de patients déficients pour VLCAD traités avec une diète contenant des AGCMs à nombre impair (260), d'autres études sont nécessaires afin de documenter les profils de ces métabolites dans différentes conditions, premièrement chez la souris VLCAD, puis chez les patients.

Au-delà des accumulations possibles d'acylcarnitines à chaîne courte, les conséquences des modifications du métabolisme des AACBs incluent aussi des altérations dans la voie de signalisation de mTOR. En effet, les nutriments, dont les AACBs et plus spécifiquement la leucine, sont les activateurs préférentiels de mTOR et une diminution de leur capacité à induire la voie de mTOR peut avoir des conséquences importantes (pour revue (125; 247)). Ceci est possible aussi au niveau cardiaque, à titre d'exemple, une diminution de l'efficacité de la leucine à stimuler S6K, une cible de mTOR, est impliquée dans les altérations induites par l'alcool dans le muscle squelettique et le cœur (172). Cet effet des AACBs sur l'activité de la voie de mTOR pourrait être important non seulement au niveau de la sensibilité à l'insuline, tel que mentionné dans l'étude de Newgard et collaborateurs, mais pourrait aussi agir au niveau d'autres mécanismes. mTOR contrôle la transcription de plusieurs gènes et l'activité de la mitochondrie. Parmi les mécanismes impliqués dans l'activité mitochondriale, on retrouve son interaction avec PGC1 α pour la régulation de la phosphorylation oxydative. PGC1 α est impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique, incluant la biogenèse mitochondriale et la β -OX (143). Différents facteurs de transcription participent à l'induction de la biogénèse mitochondriale par PGC1 α , tels qu'ERR et les NRFs. Une étude de Cunnungham et collaborateurs en 2007 a montré que mTOR agit au niveau de l'interaction de PGC1 avec YY1, un facteur de transcription, en altérant leur interaction physique, réduisant la capacité de phosphorylation oxydative (OXPHOS) (63). Étant donné notre résultat d'une diminution des niveaux de transcrits de PGC1 α en condition de surcharge lipidique

dans les cœurs déficients en VLCAD, de possibles altérations dans cette voie métabolique sont envisageables chez la souris déficiente en VLCAD. Ainsi il est possible de penser que la capacité d'OXPPOS de ces souris pourrait être altérée dans certaines conditions. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible considérant le rôle récemment rapporté de VLCAD, étant donné sa localisation dans la membrane de la mitochondrie, dans la formation de complexes multifonctionnels pour l'oxydation des AGs physiquement associés à de super-complexes pour l'OXPPOS dans la mitochondrie (339). En lien avec cette idée, les patients atteints des désordres génétiques de la voie de la propionyl-CoA carboxylase présentent de multiples altérations de l'OXPPOS dans divers organes dont le cœur (68), suggérant, une fois de plus, un lien entre les phénotypes de ces patients et ceux de la souris déficientes pour VLCAD.

**7. CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES**

Les recherches réalisées au cours de cette thèse de doctorat ont permis de documenter l'impact d'une déficience génétique pour une protéine impliquée dans l'oxydation des AGCLs. Même si les hypothèses de départ n'ont pas pu être vérifiées dans leur ensemble, étant donné les problèmes rencontrés et les résultats inattendus obtenus, les différents travaux réalisés ont permis de mettre en évidence des altérations métaboliques potentiellement impliquées dans la survenue des troubles du rythme chez les patients avec des déficits génétiques de l'oxydation des AGCLs. Grâce à la fine pointe de nos outils méthodologiques, une élégante étude de phénotypage métabolique et fonctionnel des cœurs de souris déficientes pour PPAR α et pour VLCAD a été réalisée. De plus, cette étude est, à notre connaissance, la première à caractériser l'impact d'un déficit en VLCAD chez la souris dans un organe hautement oxydatif, comme le cœur.

Spécifiquement, les résultats obtenus au cours du premier des 3 volets de cette thèse ont montré que la diminution de l'expression de PPAR α est liée à des altérations du métabolisme des glucides et à une dysfonction des cœurs perfusés *ex vivo* lorsque la demande énergétique est augmentée. De plus, les deux autres études menées avec la souris VLCAD ont permis de mettre en évidence, malgré la capacité de ces cœurs à oxyder de manière efficace les AGCLS exogènes et à maintenir une fonction contractile adéquate *ex vivo*, d'autres altérations métaboliques et fonctionnelles. À savoir, (i) des accumulations d'AGs dans les TGs cardiaques et hépatiques liées à des altérations des voies de signalisation impliquées dans la lipolyse, (ii) une diminution des niveaux de DHA dans les PLs cardiaques et (iii) une prolongation de l'onde QTc *in vivo*. De plus, au niveau moléculaire, les analyses de qPCR réalisées dans ces études ont permis de suggérer (i) une diminution de l'efficacité des mécanismes compensatoires pour l'oxydation des AGCLs selon l'âge et les conditions nutritionnelles, (ii) des mécanismes responsables du développement des troubles du rythme, tels que altérations du métabolisme des AGPIs et des glucides, mais aussi des AACBs.

Ces résultats apparaissent pertinents d'un point de vue clinique puisque le traitement nutritionnel des patients déficients pour VLCAD ne tient pas compte de ces facteurs. En outre, il serait intéressant de mener des études électrophysiologiques, ou du moins de documenter l'expression génique ou l'activité des différents canaux ioniques afin de mieux comprendre la survenue des troubles du rythme chez la souris déficiente pour VLCAD.

Par ailleurs, les résultats des recherches de cette thèse soulèvent de nouveaux questionnements. D'une part, des expérimentations additionnelles doivent être réalisées dans le but d'obtenir des évidences directes appuyant le rôle des altérations du métabolisme des AACBs dans l'apparition des troubles du rythme chez la souris VLCAD. À cet effet, il serait pertinent de caractériser le profil des acylcarnitines à courte chaîne, plus spécifiquement de C3 et des C5 et de documenter l'impact d'une diète riche en AACBs non seulement sur les troubles du rythme, mais aussi sur la signalisation de l'insuline.

De plus, il serait aussi intéressant de mesurer la capacité d'OXPPOS et plus spécifiquement d'effectuer un phénotypage fonctionnel des mitochondries intactes pour évaluer l'activité des différents complexes de la chaîne de transport des électrons, mais aussi la susceptibilité à l'ouverture du pore de transition mitochondrial dans les cœurs déficients en VLCAD dans les conditions pour lesquelles nous rapportons une diminution des niveaux d'ARNm de *Pccb* et de *Ppargc1a*, c'est-à-dire en situation de surcharge lipidique. De plus, le fait que les souris déficientes à la fois pour VLCAD et pour LCAD ne soient pas viables (60) suggère qu'il serait intéressant de créer un modèle animal déficient pour VLCAD et hétérozygote pour LCAD de manière à limiter le rôle de ce mécanisme compensatoire. Ainsi, ce modèle animal pourrait être un meilleur modèle murin de désordres de l'oxydation des AGCLs, et l'étude du métabolisme cardiaque de ces souris pourrait s'avérer très utile.

En conclusion, l'utilisation de différentes approches, telles que la perfusion *ex vivo* de cœurs de souris au travail couplée à l'utilisation de substrat marqués avec des isotopes stables combinées à l'analyse des isotopomères de masse par GCMS, l'analyse de l'expression génique par qPCR et l'analyse de la fonction électrique du cœur *in vivo* par télémétrie, a permis de sonder le métabolisme énergétique et la fonction contractile de deux modèles de souris de façon précise. Il paraît maintenant pertinent de penser que chez l'humain, les conséquences d'un désordre de l'oxydation des AGCLs sur le développement des manifestations cliniques dépassent le déficit énergétique et l'accumulation de dérivés des AGCLs toxiques. Bien qu'il soit difficile d'extrapoler les données obtenues à l'humain, les résultats de cette thèse pourraient servir à l'élaboration de nouvelles interventions métaboliques destinées à améliorer les traitements possibles et donc, la qualité de vie des patients atteints de désordres héréditaires de la β -OX des AGCLs.

8. CHAPITRE VIII : BIBLIOGRAPHIE

1. **Aasum E, Khalid AM, Gudbrandsen OA, How OJ, Berge RK and Larsen TS.** Fenofibrate modulates cardiac and hepatic metabolism and increases ischemic tolerance in diet-induced obese mice. *J Mol Cell Cardiol* 44: 201-209, 2008.
2. **Abel ED.** Glucose transport in the heart. *Front Biosci* 9: 201-215, 2004.
3. **Akiyama M, Sakai K, Ogawa M, McMillan JR, Sawamura D and Shimizu H.** Novel duplication mutation in the patatin domain of adipose triglyceride lipase (PNPLA2) in neutral lipid storage disease with severe myopathy. *Muscle Nerve* 36: 856-859, 2007.
4. **Allard MF, Parsons HL, Saeedi R, Wambolt RB and Brownsey R.** AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H140-H148, 2007.
5. **An D and Rodrigues B.** Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1489-H1506, 2006.
6. **Anand RG, Alkadri M, Lavie CJ and Milani RV.** The role of fish oil in arrhythmia prevention. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 28: 92-98, 2008.
7. **Andresen BS, Bross P, Vianey-Saban C, Divry P, Zobot MT, Roe CR, Nada MA, Byskov A, Kruse TA, Neve S, Kristiansen K, Knudsen I, Corydon MJ and Gregersen N.** Cloning and characterization of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase cDNA, chromosomal assignment of the gene and identification in four patients of nine different mutations within the VLCAD gene. *Hum Mol Genet* 5: 461-472, 1996.
8. **Andresen BS, Olpin S, Poorthuis BJ, Scholte HR, Vianey-Saban C, Wanders R, IJlst L, Morris A, Pourfarzam M, Bartlett K, Baumgartner ER, deKlerk JB, Schroeder LD, Corydon TJ, Lund H, Winter V, Bross P, Bolund L and Gregersen N.** Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am J Hum Genet* 64: 479-494, 1999.
9. **Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T and Gonzalez FJ.** Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 273: 5678-5684, 1998.
10. **Aoyama T, Souri M, Ushikubo S, Kamijo T, Yamaguchi S, Kelley RI, Rhead WJ, Uetake K, Tanaka K and Hashimoto T.** Purification of human very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and characterization of its deficiency in seven patients. *J Clin Invest* 95: 2465-2473, 1995.
11. **Aoyama T, Uchida Y, Kelley RI, Marble M, Hofman K, Tonsgard JH, Rhead WJ and Hashimoto T.** A novel disease with deficiency of mitochondrial very-

- long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 1369-1372, 1993.
12. **Aoyama T, Wakui K, Fukushima Y, Orii KO and Hashimoto T.** Assignment of the human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene (LCACD) to 17p13 by in situ hybridization. *Genomics* 37: 144-145, 1996.
 13. **Armstrong DL, Masiowski ML and Wood PA.** Pathologic characterization of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in BALB/cByJ mice. *Am J Med Genet* 47: 884-892, 1993.
 14. **Augustus AS, Kako Y, Yagyu H and Goldberg IJ.** Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E331-E339, 2003.
 15. **Bach AC and Babayan VK.** Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr* 36: 950-962, 1982.
 16. **Barcelo-Coblijn G and Murphy EJ.** Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res* 48: 355-374, 2009.
 17. **Barger PM and Kelly DP.** Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms. *Am J Med Sci* 318: 36-42, 1999.
 18. **Barger PM and Kelly DP.** PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 10: 238-245, 2000.
 19. **Barnabei MS, Palpant NJ and Metzger JM.** Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains. *Physiol Genomics* 42A: 103-113, 2010.
 20. **Bastin J, Lopes-Costa A and Djouadi F.** Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet* 20: 2048-2057, 2011.
 21. **Baumgartner D, Scholl-Burgi S, Sass JO, Sperl W, Schweigmann U, Stein JI and Karall D.** Prolonged QTc intervals and decreased left ventricular contractility in patients with propionic acidemia. *J Pediatr* 150: 192-7, 197, 2007.
 22. **Beauloye C, Bertrand L, Horman S and Hue L.** AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res* 2011.
 23. **Benatti P, Peluso G, Nicolai R and Calvani M.** Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr* 23: 281-302, 2004.

24. **Berglund ED, Li CY, Poffenberger G, Ayala JE, Fueger PT, Willis SE, Jewell MM, Powers AC and Wasserman DH.** Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes* 57: 1790-1799, 2008.
25. **Bergmann SR, Herrero P, Sciacca R, Hartman JJ, Rubin PJ, Hickey KT, Epstein S and Kelly DP.** Characterization of altered myocardial fatty acid metabolism in patients with inherited cardiomyopathy. *J Inherit Metab Dis* 24: 657-674, 2001.
26. **Bertrand C, Largilliere C, Zobot MT, Mathieu M and Vianey-Saban C.** Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid oxidation in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1180: 327-329, 1993.
27. **Bertrand L, Horman S, Beauvoys C and Vanoverschelde JL.** Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res* 79: 238-248, 2008.
28. **Billman GE, Kang JX and Leaf A.** Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Lipids* 32: 1161-1168, 1997.
29. **Bonnefont JP, Bastin J, Behin A and Djouadi F.** Bezafibrate for an inborn mitochondrial beta-oxidation defect. *N Engl J Med* 360: 838-840, 2009.
30. **Bonnefont JP, Bastin J, Laforet P, Aubey F, Mogenet A, Romano S, Ricquier D, Gobin-Limballe S, Vassault A, Behin A, Eymard B, Bresson JL and Djouadi F.** Long-term follow-up of bezafibrate treatment in patients with the myopathic form of carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency. *Clin Pharmacol Ther* 88: 101-108, 2010.
31. **Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A and Bastin J.** Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 25: 495-520, 2004.
32. **Bonnet D, de LP, Gautier I, Rustin P, Rotig A, Kachaner J, Acar P, LeBidois J, Munnich A and Sidi D.** Efficiency of metabolic screening in childhood cardiomyopathies. *Eur Heart J* 19: 790-793, 1998.
33. **Bonnet D, Martin D, Pascale DL, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M and Saudubray JM.** Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation* 100: 2248-2253, 1999.
34. **Bordoni A, Astolfi A, Morandi L, Pession A, Danesi F, Di NM, Franzoni M, Biagi P and Pession A.** N-3 PUFAs modulate global gene expression profile in cultured rat cardiomyocytes. Implications in cardiac hypertrophy and heart failure. *FEBS Lett* 581: 923-929, 2007.

35. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M and Wahli W.** Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366, 1996.
36. **Brinkmann JF, Abumrad NA, Ibrahimi A, van der Vusse GJ and Glatz JF.** New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochem J* 367: 561-570, 2002.
37. **Brown-Harrison MC, Nada MA, Sprecher H, Vianey-Saban C, Farquhar J, Jr., Gilladoga AC and Roe CR.** Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: successful treatment of acute cardiomyopathy. *Biochem Mol Med* 58: 59-65, 1996.
38. **Brownsey RW, Boone AN and Allard MF.** Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res* 34: 3-24, 1997.
39. **Brunengraber H and Roe CR.** Anaplerotic molecules: current and future. *J Inherit Metab Dis* 29: 327-331, 2006.
40. **Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA and McRoberts JA.** Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet* 22: 315-331, 2008.
41. **Burdge GC.** Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 161-168, 2006.
42. **Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, Severson DL, Kelly DP and Lopaschuk GD.** A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 277: 4098-4103, 2002.
43. **Chan AY, Dolinsky VW, Soltys CL, Viollet B, Baksh S, Light PE and Dyck JR.** Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem* 283: 24194-24201, 2008.
44. **Chan AY, Soltys CL, Young ME, Proud CG and Dyck JR.** Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem* 279: 32771-32779, 2004.
45. **Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O and Reitman ML.** Adipose tissue is required for the antidiabetic,

- but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106: 1221-1228, 2000.
46. **Chatham JC, Des RC and Forder JR.** Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E794-E802, 2001.
 47. **Chatham JC, Gao ZP, Bonen A and Forder JR.** Preferential inhibition of lactate oxidation relative to glucose oxidation in the rat heart following diabetes. *Cardiovasc Res* 43: 96-106, 1999.
 48. **Chatham JC, Not LG, Fulop N and Marchase RB.** Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. *Shock* 29: 431-440, 2008.
 49. **Chatham JC and Seymour AM.** Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Res* 55: 104-112, 2002.
 50. **Chegary M, Brinke H, Ruiter JP, Wijburg FA, Stoll MS, Minkler PE, van WM, Schulz H, Hoppel CL, Wanders RJ and Houten SM.** Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1791: 806-815, 2009.
 51. **Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, Evans RM, Schneider MD, Brako FA, Xiao Y, Chen YE and Yang Q.** Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med* 10: 1245-1250, 2004.
 52. **Cheng L, Ding G, Qin Q, Xiao Y, Woods D, Chen YE and Yang Q.** Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 277-286, 2004.
 53. **Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG and Carling D.** Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J* 346 Pt 3: 659-669, 2000.
 54. **Coleman RA, Lewin TM and Muoio DM.** Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr* 20: 77-103, 2000.
 55. **Coll T, Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X and Vazquez-Carrera M.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Mol Pharmacol* 2: 46-55, 2009.

56. **Comte B, Vincent G, Bouchard B and Des RC.** Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ¹³C labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26117-26124, 1997.
57. **Comte B, Vincent G, Bouchard B, Jette M, Cordeau S and Rosiers CD.** A ¹³C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125-26131, 1997.
58. **Corr PB and Yamada KA.** Selected metabolic alterations in the ischemic heart and their contributions to arrhythmogenesis. *Herz* 20: 156-168, 1995.
59. **Coughlin CR and Ficicioglu C.** Genotype-phenotype correlations: sudden death in an infant with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2010.
60. **Cox KB, Hamm DA, Millington DS, Matern D, Vockley J, Rinaldo P, Pinkert CA, Rhead WJ, Lindsey JR and Wood PA.** Gestational, pathologic and biochemical differences between very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the mouse. *Hum Mol Genet* 10: 2069-2077, 2001.
61. **Cox KB, Johnson KR and Wood PA.** Chromosomal locations of the mouse fatty acid oxidation genes Cpt1a, Cpt1b, Cpt2, Acadvl, and metabolically related Crat gene. *Mamm Genome* 9: 608-610, 1998.
62. **Cox KB, Liu J, Tian L, Barnes S, Yang Q and Wood PA.** Cardiac hypertrophy in mice with long-chain acyl-CoA dehydrogenase or very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lab Invest* 89: 1348-1354, 2009.
63. **Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK and Puigserver P.** mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450: 736-740, 2007.
64. **Curtis MJ, Pugsley MK and Walker MJ.** Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 27: 703-719, 1993.
65. **DaTorre SD, Creer MH, Pogwizd SM and Corr PB.** Amphipathic lipid metabolites and their relation to arrhythmogenesis in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* 23 Suppl 1: 11-22, 1991.
66. **Davidson B and Schulz H.** Separation, properties, and regulation of acyl coenzyme A dehydrogenases from bovine heart and liver. *Arch Biochem Biophys* 213: 155-162, 1982.

67. **de Baulny HO, Benoist JF, Rigal O, Touati G, Rabier D and Saudubray JM.** Methylmalonic and propionic acidaemias: management and outcome. *J Inherit Metab Dis* 28: 415-423, 2005.
68. **de Keyzer Y, Valayannopoulos V, Benoist JF, Batteux F, Lacaille F, Hubert L, Chretien D, Chadefaux-Vekemans B, Niaudet P, Touati G, Munnich A and de LP.** Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. *Pediatr Res* 66: 91-95, 2009.
69. **DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M and Muslin AJ.** Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem* 281: 32841-32851, 2006.
70. **DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M and Muslin AJ.** Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 113: 2097-2104, 2006.
71. **DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM and Bray GA.** Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 72: 905-911, 2000.
72. **Depre C, Rider MH and Hue L.** Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* 258: 277-290, 1998.
73. **Depre C, Vanoverschelde JL and Taegtmeyer H.** Glucose for the heart. *Circulation* 99: 578-588, 1999.
74. **Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG and Chatham JC.** Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc Res* 90: 210-219, 2011.
75. **Des Rosiers C, Lloyd S, Comte B and Chatham JC.** A critical perspective of the use of (13)C-isotopomer analysis by GCMS and NMR as applied to cardiac metabolism. *Metab Eng* 6: 44-58, 2004.
76. **Desvergne B and Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688, 1999.
77. **Di NM, Danesi F and Bordoni A.** n-3 PUFA as regulators of cardiac gene transcription: a new link between PPAR activation and fatty acid composition. *Lipids* 44: 1073-1079, 2009.
78. **Djouadi F, Aubey F, Schlemmer D, Ruiter JP, Wanders RJ, Strauss AW and Bastin J.** Bezafibrate increases very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase protein and mRNA expression in deficient fibroblasts and is a potential therapy for fatty acid oxidation disorders. *Hum Mol Genet* 14: 2695-2703, 2005.

79. **Dolinsky VW, Chan AY, Robillard F, I, Light PE, Des RC and Dyck JR.** Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. *Circulation* 119: 1643-1652, 2009.
80. **Drake AJ, Haines JR and Noble MI.** Preferential uptake of lactate by the normal myocardium in dogs. *Cardiovasc Res* 14: 65-72, 1980.
81. **Drosatos K, Bharadwaj KG, Lymeropoulos A, Ikeda S, Khan R, Hu Y, Agarwal R, Yu S, Jiang H, Steinberg SF, Blaner WS, Koch WJ and Goldberg IJ.** Cardiomyocyte lipids impair beta-adrenergic receptor function via PKC activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E489-E499, 2011.
82. **Duncan JG.** Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Alpha (PPARalpha) and PPAR Gamma Coactivator-1alpha (PGC-1alpha) Regulation of Cardiac Metabolism in Diabetes. *Pediatr Cardiol* 32: 323-328, 2011.
83. **Dyck JR and Lopaschuk GD.** AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol* 574: 95-112, 2006.
84. **Eaton S.** Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res* 41: 197-239, 2002.
85. **Ensenauer R, He M, Willard JM, Goetzman ES, Corydon TJ, Vandahl BB, Mohsen AW, Isaya G and Vockley J.** Human acyl-CoA dehydrogenase-9 plays a novel role in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 280: 32309-32316, 2005.
86. **Esworthy RS, Smith DD and Chu FF.** A Strong Impact of Genetic Background on Gut Microflora in Mice. *Int J Inflamm* 2010: 986046, 2010.
87. **Evans RD, Bennett MJ and Hauton D.** Perfused heart studies to investigate lipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 28: 113-120, 2000.
88. **Exil VJ, Gardner CD, Rottman JN, Sims H, Bartelds B, Khuchua Z, Sindhal R, Ni G and Strauss AW.** Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1289-H1297, 2006.
89. **Exil VJ, Roberts RL, Sims H, McLaughlin JE, Malkin RA, Gardner CD, Ni G, Rottman JN and Strauss AW.** Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. *Circ Res* 93: 448-455, 2003.
90. **Farfari S, Schulz V, Corkey B and Prentki M.** Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49: 718-726, 2000.

91. **Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA and Wanders RJ.** Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 42: 1987-1995, 2001.
92. **Ferencz C and Neill CA.** Cardiomyopathy in infancy: observations in an epidemiologic study. *Pediatr Cardiol* 13: 65-71, 1992.
93. **Ficicioglu C, Coughlin CR, Bennett MJ and Yudkoff M.** Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a patient with normal newborn screening by tandem mass spectrometry. *J Pediatr* 156: 492-494, 2010.
94. **Ficicioglu C and Hussa C.** Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: The effects of accidental fat loading in a patient detected through newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2009.
95. **Finck BN.** Effects of PPARalpha on cardiac glucose metabolism: a transcriptional equivalent of the glucose-fatty acid cycle? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4: 161-171, 2006.
96. **Finck BN, Han X, Courtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, Gross RW and Kelly DP.** A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1226-1231, 2003.
97. **Finck BN and Kelly DP.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) signaling in the gene regulatory control of energy metabolism in the normal and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1249-1257, 2002.
98. **Finck BN and Kelly DP.** PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116: 615-622, 2006.
99. **Finck BN and Kelly DP.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 115: 2540-2548, 2007.
100. **Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD and Kelly DP.** The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109: 121-130, 2002.
101. **Fischer J, Lefevre C, Morava E, Mussini JM, Laforet P, Negre-Salvayre A, Lathrop M and Salvayre R.** The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat Genet* 39: 28-30, 2007.

102. **Ford DA, Horner CC and Gross RW.** Protein kinase C acylation by palmitoyl coenzyme A facilitates its translocation to membranes. *Biochemistry* 37: 11953-11961, 1998.
103. **Fox JE, Magga J, Giles WR and Light PE.** Acyl coenzyme A esters differentially activate cardiac and beta-cell adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a side-chain length-specific manner. *Metabolism* 52: 1313-1319, 2003.
104. **Geelen A, Brouwer IA, Zock PL, Kors JA, Swenne CA, Katan MB and Schouten EG.** (N-3) fatty acids do not affect electrocardiographic characteristics of healthy men and women. *J Nutr* 132: 3051-3054, 2002.
105. **Genzel-Boroviczeny O, Wahle J and Koletzko B.** Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. *Eur J Pediatr* 156: 142-147, 1997.
106. **Gibala MJ, Young ME and Taegtmeier H.** Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 168: 657-665, 2000.
107. **Gilde AJ and van BM.** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 178: 425-434, 2003.
108. **Glatz JF, Luiken JJ and Bonen A.** Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 90: 367-417, 2010.
109. **Gobin-Limballe S, Djouadi F, Aubey F, Olpin S, Andresen BS, Yamaguchi S, Mandel H, Fukao T, Ruiter JP, Wanders RJ, McAndrew R, Kim JJ and Bastin J.** Genetic basis for correction of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency by bezafibrate in patient fibroblasts: toward a genotype-based therapy. *Am J Hum Genet* 81: 1133-1143, 2007.
110. **Goetzman ES, Tian L and Wood PA.** Differential induction of genes in liver and brown adipose tissue regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during fasting and cold exposure in acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *Mol Genet Metab* 84: 39-47, 2005.
111. **Goetzman ES, Wang Y, He M, Mohsen AW, Ninness BK and Vockley J.** Expression and characterization of mutations in human very long-chain acyl-CoA dehydrogenase using a prokaryotic system. *Mol Genet Metab* 91: 138-147, 2007.
112. **Gregersen N, Andresen BS, Corydon MJ, Corydon TJ, Olsen RK, Bolund L and Bross P.** Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects:

- Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat* 18: 169-189, 2001.
113. **Gregersen N, Andresen BS, Pedersen CB, Olsen RK, Corydon TJ and Bross P.** Mitochondrial fatty acid oxidation defects--remaining challenges. *J Inherit Metab Dis* 31: 643-657, 2008.
 114. **Gridley DS and Pecaut MJ.** Genetic background and lymphocyte populations after total-body exposure to iron ion radiation. *Int J Radiat Biol* 87: 8-23, 2011.
 115. **Guerra C, Koza RA, Walsh K, Kurtz DM, Wood PA and Kozak LP.** Abnormal nonshivering thermogenesis in mice with inherited defects of fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 102: 1724-1731, 1998.
 116. **Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD and Kelly DP.** The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11012-11016, 1994.
 117. **Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE and Shaw RJ.** AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-226, 2008.
 118. **Haas RH, Marsden DL, Capistrano-Estrada S, Hamilton R, Grafe MR, Wong W and Nyhan WL.** Acute basal ganglia infarction in propionic acidemia. *J Child Neurol* 10: 18-22, 1995.
 119. **Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G and Zechner R.** Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312: 734-737, 2006.
 120. **Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF and Zechner R.** Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277: 4806-4815, 2002.
 121. **Hafstad AD, Khalid AM, Hagve M, Lund T, Larsen TS, Severson DL, Clarke K, Berge RK and Aasum E.** Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor- α activation causes increased fatty acid oxidation, reducing efficiency and post-ischaemic functional loss. *Cardiovasc Res* 83: 519-526, 2009.
 122. **Hale DE, Batshaw ML, Coates PM, Frerman FE, Goodman SI, Singh I and Stanley CA.** Long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency: an inherited cause of nonketotic hypoglycemia. *Pediatr Res* 19: 666-671, 1985.

123. **Halestrap AP and Price NT.** The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2: 281-299, 1999.
124. **Hall JL, Stanley WC, Lopaschuk GD, Wisneski JA, Pizzurro RD, Hamilton CD and McCormack JG.** Impaired pyruvate oxidation but normal glucose uptake in diabetic pig heart during dobutamine-induced work. *Am J Physiol* 271: H2320-H2329, 1996.
125. **Hall MN.** mTOR-what does it do? *Transplant Proc* 40: S5-S8, 2008.
126. **Haluzik M, Colombo C, Gavrilova O, Chua S, Wolf N, Chen M, Stannard B, Dietz KR, Le RD and Reitman ML.** Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology* 145: 3258-3264, 2004.
127. **Hardie DG.** Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144: 5179-5183, 2003.
128. **Hardie DG.** AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 774-785, 2007.
129. **Hardie DG.** AMPK and autophagy get connected. *EMBO J* 30: 634-635, 2011.
130. **Harper AE, Miller RH and Block KP.** Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 4: 409-454, 1984.
131. **Hauton D, Bennett MJ and Evans RD.** Utilisation of triacylglycerol and non-esterified fatty acid by the working rat heart: myocardial lipid substrate preference. *Biochim Biophys Acta* 1533: 99-109, 2001.
132. **Hazey JW, Yang D, Powers L, Previs SF, David F, Beaulieu AD, Puchowicz MA, Potter JL, Palmquist DL and Brunengraber H.** Tracing gluconeogenesis with deuterated water: measurement of low deuterium enrichments on carbons 6 and 2 of glucose. *Anal Biochem* 248: 158-167, 1997.
133. **He M, Pei Z, Mohsen AW, Watkins P, Murdoch G, Van Veldhoven PP, Ensenaer R and Vockley J.** Identification and characterization of new long chain acyl-CoA dehydrogenases. *Mol Genet Metab* 102: 418-429, 2011.
134. **He M, Rutledge SL, Kelly DR, Palmer CA, Murdoch G, Majumder N, Nicholls RD, Pei Z, Watkins PA and Vockley J.** A new genetic disorder in mitochondrial fatty acid beta-oxidation: ACAD9 deficiency. *Am J Hum Genet* 81: 87-103, 2007.
135. **Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha**

- AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Jr., Alt FW, Kahn CR and Verdin E.** SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464: 121-125, 2010.
136. **Hoffman JD, Steiner RD, Paradise L, Harding CO, Ding L, Strauss AW and Kaplan P.** Rhabdomyolysis in the military: recognizing late-onset very long-chain acyl Co-A dehydrogenase deficiency. *Mil Med* 171: 657-658, 2006.
137. **Holm C.** Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31: 1120-1124, 2003.
138. **Hopkins TA, Dyck JR and Lopaschuk GD.** AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem Soc Trans* 31: 207-212, 2003.
139. **Hrelia S, Lopez Jimenez JA, Bordoni A, Nvarro SZ, Horrobin DF, Rossi CA and Biagi PL.** Essential fatty acid metabolism in cultured rat cardiomyocytes in response to either N-6 or N-3 fatty acid supplementation. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 11-19, 1995.
140. **Hue L and Taegtmeyer H.** The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E578-E591, 2009.
141. **Huijsman E, van de Par C, Economou C, van der Poel C, Lynch GS, Schoiswohl G, Haemmerle G, Zechner R and Watt MJ.** Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E505-E513, 2009.
142. **Huss JM and Kelly DP.** Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res* 95: 568-578, 2004.
143. **Huss JM and Kelly DP.** Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* 115: 547-555, 2005.
144. **Hyyti OM, Ledee D, Ning XH, Ge M and Portman MA.** Aging impairs myocardial fatty acid and ketone oxidation and modifies the cardiac functional and metabolic responses to insulin in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010.
145. **Ibdah JA, Paul H, Zhao Y, Binford S, Salleng K, Cline M, Matern D, Bennett MJ, Rinaldo P and Strauss AW.** Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J Clin Invest* 107: 1403-1409, 2001.
146. **Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, Wagner JD, Matern D, Rinaldo P and Cline JM.** Mice heterozygous for a

- defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 128: 1381-1390, 2005.
147. **Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S and Hashimoto T.** Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 267: 1027-1033, 1992.
 148. **Jandeleit-Dahm KA, Calkin A, Tikellis C and Thomas M.** Direct antiatherosclerotic effects of PPAR agonists. *Curr Opin Lipidol* 20: 24-29, 2009.
 149. **Jessen N, Koh HJ, Folmes CD, Wagg C, Fujii N, Lofgren B, Wolf CM, Berul CI, Hirshman MF, Lopaschuk GD and Goodyear LJ.** Ablation of LKB1 in the heart leads to energy deprivation and impaired cardiac function. *Biochim Biophys Acta* 1802: 593-600, 2010.
 150. **Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, Chick WS, Hamm DA, Sharer JD and Wood PA.** Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab* 93: 314-322, 2008.
 151. **Jude S, Martel E, Vincent F, Besson P, Couet C, Ogilvie GK, Pinault M, De CC, Bougnoux P, Richard S, Champeroux P, Crozatier B and Le Guennec JY.** Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation. *Br J Nutr* 98: 1143-1151, 2007.
 152. **Kaunitz H.** Medium chain triglycerides (MCT) in aging and arteriosclerosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 6: 115-121, 1986.
 153. **Kelly DP and Strauss AW.** Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 330: 913-919, 1994.
 154. **Kemppainen J, Fujimoto T, Kalliokoski KK, Viljanen T, Nuutila P and Knuuti J.** Myocardial and skeletal muscle glucose uptake during exercise in humans. *J Physiol* 542: 403-412, 2002.
 155. **Kerner J and Hoppel C.** Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu Rev Nutr* 18: 179-206, 1998.
 156. **Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B and Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489-1498, 1999.
 157. **Khairallah M, Khairallah R, Young ME, Dyck JR, Petrof BJ and Des RC.** Metabolic and signaling alterations in dystrophin-deficient hearts precede overt cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 43: 119-129, 2007.

158. **Khairallah M, Labarthe F, Bouchard B, Danialou G, Petrof BJ and Des RC.** Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using ¹³C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1461-H1470, 2004.
159. **Khairallah RJ, Khairallah M, Gelinas R, Bouchard B, Young ME, Allen BG, Lopaschuk GD, Deschepper CF and Des RC.** Cyclic GMP signaling in cardiomyocytes modulates fatty acid trafficking and prevents triglyceride accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 45: 230-239, 2008.
160. **Khairallah RJ, Sparagna GC, Khanna N, O'Shea KM, Hecker PA, Kristian T, Fiskum G, Des RC, Polster BM and Stanley WC.** Dietary supplementation with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, dramatically alters cardiac mitochondrial phospholipid fatty acid composition and prevents permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 2010.
161. **Kien CL, Murray RD, Ailabouni A, Powers P, Kepner J, Powers L and Brunengraber H.** Stable isotope model for assessing production of short chain fatty acids from colon-derived sugar: application in pigs. *J Nutr* 126: 3069-3076, 1996.
162. **Klein LJ and Visser FC.** The effect of insulin on the heart : Part 1: Effects on metabolism and function. *Neth Heart J* 18: 197-201, 2010.
163. **Kluge S, Kuhnelt P, Block A, Merkel M, Gocht A, Lukacs Z, Kohlschutter A and Kreymann G.** A young woman with persistent hypoglycemia, rhabdomyolysis, and coma: recognizing fatty acid oxidation defects in adults. *Crit Care Med* 31: 1273-1276, 2003.
164. **Kodde IF, van der SJ, Smolenski RT and de Jong JW.** Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 26-39, 2007.
165. **Kompare M and Rizzo WB.** Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol* 15: 140-149, 2008.
166. **Kuang M, Febbraio M, Wagg C, Lopaschuk GD and Dyck JR.** Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation* 109: 1550-1557, 2004.
167. **Kurtz DM, Rinaldo P, Rhead WJ, Tian L, Millington DS, Vockley J, Hamm DA, Brix AE, Lindsey JR, Pinkert CA, O'Brien WE and Wood PA.** Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15592-15597, 1998.
168. **Labarthe F, Gelinas R and Des RC.** Medium-chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 22: 97-106, 2008.

169. **Labarthe F, Khairallah M, Bouchard B, Stanley WC and Des RC.** Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1425-H1436, 2005.
170. **Laczy B, Fulop N, Onay-Besikci A, Des RC and Chatham JC.** Acute Regulation of Cardiac Metabolism by the Hexosamine Biosynthesis Pathway and Protein O-GlcNAcylation. *PLoS One* 6: e18417, 2011.
171. **Laforet P, Acquaviva-Bourdain C, Rigal O, Brivet M, Penisson-Besnier I, Chabrol B, Chaigne D, Boespflug-Tanguy O, Laroche C, Bedat-Millet AL, Behin A, Delevaux I, Lombes A, Andresen BS, Eymard B and Vianey-Saban C.** Diagnostic assessment and long-term follow-up of 13 patients with Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency. *Neuromuscul Disord* 19: 324-329, 2009.
172. **Lang CH, Frost RA, Summer AD and Vary TC.** Molecular mechanisms responsible for alcohol-induced myopathy in skeletal muscle and heart. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2180-2195, 2005.
173. **Langenfeld MR, Forst T, Hohberg C, Kann P, Lubben G, Konrad T, Fullert SD, Sachara C and Pfutzner A.** Pioglitazone decreases carotid intima-media thickness independently of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a controlled randomized study. *Circulation* 111: 2525-2531, 2005.
174. **Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G and Zechner R.** Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3: 309-319, 2006.
175. **Lauzier B, Merlen C, Vaillant F, McDuff J, Bouchard B, Beguin PC, Dolinsky VW, Foisy S, Villeneuve LR, Labarthe F, Dyck JR, Allen BG, Charron G and Des RC.** Post-translational modifications, a key process in CD36 function: Lessons from the spontaneously hypertensive rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 51: 99-108, 2011.
176. **Lauzier B, Vaillant F, Gelinas R, Bouchard B, Brownsey R, Thorin E, Tardif JC and Des RC.** Ivabradine reduces heart rate while preserving metabolic fluxes and energy status of healthy normoxic working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H845-H852, 2011.
177. **Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR and Ventura HO.** Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol* 54: 585-594, 2009.

178. **Lea W, Abbas AS, Sprecher H, Vockley J and Schulz H.** Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1485: 121-128, 2000.
179. **Leaf A.** The electrophysiologic basis for the antiarrhythmic and anticonvulsant effects of n-3 polyunsaturated fatty acids: heart and brain. *Lipids* 36 Suppl: S107-S110, 2001.
180. **Lee J and Goldberg IJ.** Lipoproteini lipase-derived fatty acids: physiology and dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 9: 462-466, 2007.
181. **Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Marchioli R and Harris WS.** Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin Proc* 83: 324-332, 2008.
182. **Lee JW, Park S, Takahashi Y and Wang HG.** The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One* 5: e15394, 2010.
183. **Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H and Gonzalez FJ.** Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15: 3012-3022, 1995.
184. **Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM and Kelly DP.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 106: 847-856, 2000.
185. **Leone TC, Weinheimer CJ and Kelly DP.** A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7473-7478, 1999.
186. **Li Y, Cheng L, Qin Q, Liu J, Lo WK, Brako LA and Yang Q.** High-fat feeding in cardiomyocyte-restricted PPARdelta knockout mice leads to cardiac overexpression of lipid metabolic genes but fails to rescue cardiac phenotypes. *J Mol Cell Cardiol* 47: 536-543, 2009.
187. **Liao R, Jain M, Cui L, D'Agostino J, Aiello F, Luptak I, Ngoy S, Mortensen RM and Tian R.** Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice. *Circulation* 106: 2125-2131, 2002.
188. **Liebig M, Schymik I, Mueller M, Wendel U, Mayatepek E, Rüter J, Strauss AW, Wanders RJ and Spiekerkoetter U.** Neonatal screening for very long-chain acyl-coA dehydrogenase deficiency: enzymatic and molecular evaluation of neonates with elevated C14:1-carnitine levels. *Pediatrics* 118: 1065-1069, 2006.

189. **Lionetti V, Stanley WC and Recchia FA.** Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc Res* 2011.
190. **Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS and Schaffer JE.** Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077-3082, 2003.
191. **Liu L, Shi X, Bharadwaj KG, Ikeda S, Yamashita H, Yagyu H, Schaffer JE, Yu YH and Goldberg IJ.** DGAT1 expression increases heart triglyceride content but ameliorates lipotoxicity. *J Biol Chem* 284: 36312-36323, 2009.
192. **London B, Albert C, Anderson ME, Giles WR, Van Wagoner DR, Balk E, Billman GE, Chung M, Lands W, Leaf A, McAnulty J, Martens JR, Costello RB and Lathrop DA.** Omega-3 fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Office Of Dietary Supplements Omega-3 Fatty Acids and their Role in Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation* 116: e320-e335, 2007.
193. **Lopaschuk GD, Barr R, Thomas PD and Dyck JR.** Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. *Circ Res* 93: e33-e37, 2003.
194. **Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS and Stanley WC.** Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90: 207-258, 2010.
195. **Luiken JJ, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JF and Bonen A.** Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E491-E495, 2002.
196. **Luiken JJ, van Nieuwenhoven FA, America G, van der Vusse GJ and Glatz JF.** Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins. *J Lipid Res* 38: 745-758, 1997.
197. **Luptak I, Balschi JA, Xing Y, Leone TC, Kelly DP and Tian R.** Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. *Circulation* 112: 2339-2346, 2005.
198. **MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD and Kendrick MA.** Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1-15, 2005.

199. **Manchester J, Kong X, Nerbonne J, Lowry OH and Lawrence JC, Jr.** Glucose transport and phosphorylation in single cardiac myocytes: rate-limiting steps in glucose metabolism. *Am J Physiol* 266: E326-E333, 1994.
200. **Mao LF, Chu C, Luo MJ, Simon A, Abbas AS and Schulz H.** Mitochondrial beta-oxidation of 2-methyl fatty acids in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 321: 221-228, 1995.
201. **Marci M and Ajovalasit P.** Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in an Infant with Dilated Cardiomyopathy. *Cardiol Res Pract* 2009: 281389, 2009.
202. **Mardach R, Verity MA and Cederbaum SD.** Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 85: 286-290, 2005.
203. **Marin-Valencia I, Roe CR and Pascual JM.** Pyruvate carboxylase deficiency: Mechanisms, mimics and anaplerosis. *Mol Genet Metab* 2010.
204. **Marionneau C, Aimond F, Brunet S, Niwa N, Finck B, Kelly DP and Nerbonne JM.** PPARalpha-mediated remodeling of repolarizing voltage-gated K⁺ (K_v) channels in a mouse model of metabolic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 44: 1002-1015, 2008.
205. **Massoud AF and Leonard JV.** Cardiomyopathy in propionic acidaemia. *Eur J Pediatr* 152: 441-445, 1993.
206. **Mathur A, Sims HF, Gopalakrishnan D, Gibson B, Rinaldo P, Vockley J, Hug G and Strauss AW.** Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. *Circulation* 99: 1337-1343, 1999.
207. **Matsuo N, Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K and Miyakawa T.** Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Front Behav Neurosci* 4: 29, 2010.
208. **McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A and Hardie DG.** The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9: 23-34, 2009.
209. **McGarry JD, Takabayashi Y and Foster DW.** The role of malonyl-coa in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 253: 8294-8300, 1978.
210. **McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Shioi T and Izumo S.** Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established

- cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* 109: 3050-3055, 2004.
211. **Merkel M, Eckel RH and Goldberg IJ.** Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43: 1997-2006, 2002.
 212. **Merritt JL, Matern D, Vockley J, Daniels J, Nguyen TV and Schowalter DB.** In vitro characterization and in vivo expression of human very-long chain acyl-CoA dehydrogenase. *Mol Genet Metab* 88: 351-358, 2006.
 213. **Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FG and DeLany JP.** Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1695-1700, 2010.
 214. **Minetti C, Garavaglia B, Bado M, Invernizzi F, Bruno C, Rimoldi M, Pons R, Taroni F and Cordone G.** Very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in a child with recurrent myoglobinuria. *Neuromuscul Disord* 8: 3-6, 1998.
 215. **Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Boukaftane Y, Robert MF, Wang SP, Ashmarina L, Lambert M, Lapierre P and Potier E.** Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin Invest Med* 18: 193-216, 1995.
 216. **Mitrega K, Zorniak M, Varghese B, Lange D, Nozynski J, Porc M, Bialka S and Krzeminski TF.** Beneficial effects of l-leucine and l-valine on arrhythmias, hemodynamics and myocardial morphology in rats. *Pharmacol Res* 2011.
 217. **Miyamoto S, Murphy AN and Brown JH.** Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J Bioenerg Biomembr* 41: 169-180, 2009.
 218. **Miyamoto S, Rubio M and Sussman MA.** Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 82: 272-285, 2009.
 219. **Mochel F, DeLonlay P, Touati G, Brunengraber H, Kinman RP, Rabier D, Roe CR and Saudubray JM.** Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Mol Genet Metab* 84: 305-312, 2005.
 220. **Mozaffarian D, Prineas RJ, Stein PK and Siscovick DS.** Dietary fish and n-3 fatty acid intake and cardiac electrocardiographic parameters in humans. *J Am Coll Cardiol* 48: 478-484, 2006.
 221. **Muraski JA, Rota M, Misao Y, Fransioli J, Cottage C, Gude N, Esposito G, Delucchi F, Arcarese M, Alvarez R, Siddiqi S, Emmanuel GN, Wu W, Fischer K, Martindale JJ, Glembotski CC, Leri A, Kajstura J, Magnuson N,**

- Berns A, Beretta RM, Houser SR, Schaefer EM, Anversa P and Sussman MA.** Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nat Med* 13: 1467-1475, 2007.
222. **Nair SS, Leitch J and Garg ML.** Suppression of inositol phosphate release by cardiac myocytes isolated from fish oil-fed pigs. *Mol Cell Biochem* 215: 57-64, 2000.
223. **Nair SS, Leitch J and Garg ML.** N-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alters inositol phosphate metabolism and protein kinase C activity in adult porcine cardiac myocytes. *J Nutr Biochem* 12: 7-13, 2001.
224. **Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ and Morgan HE.** Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* 212: 804-814, 1967.
225. **Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, Le WM, Porte D, Semenkovich CF, Smith S, Young LH and Kahn R.** Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care* 27: 256-263, 2004.
226. **Neubauer S.** The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356: 1140-1151, 2007.
227. **Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, Pabst T, Ertl G, Hahn D, Ingwall JS and Kochsiek K.** Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96: 2190-2196, 1997.
228. **Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS, Jr., Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD and Svetkey LP.** A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9: 311-326, 2009.
229. **Nouws J, Nijtmans L, Houten SM, van den Brand M, Huynen M, Venselaar H, Hoefs S, Gloerich J, Kronick J, Hutchin T, Willems P, Rodenburg R, Wanders R, van den Heuvel L, Smeitink J and Vogel RO.** Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metab* 12: 283-294, 2010.
230. **Nyhan WL, Bay C, Beyer EW and Mazi M.** Neurologic nonmetabolic presentation of propionic acidemia. *Arch Neurol* 56: 1143-1147, 1999.

231. **Nyman LR, Cox KB, Hoppel CL, Kerner J, Barnoski BL, Hamm DA, Tian L, Schoeb TR and Wood PA.** Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab* 86: 179-187, 2005.
232. **O'Neill BT and Abel ED.** Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest* 115: 2059-2064, 2005.
233. **O'Shea KM, Khairallah RJ, Sparagna GC, Xu W, Hecker PA, Robillard-Frayne I, Des RC, Kristian T, Murphy RC, Fiskum G and Stanley WC.** Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 47: 819-827, 2009.
234. **Oey NA, Ruiten JP, IJlst L, Attie-Bitach T, Vekemans M, Wanders RJ and Wijburg FA.** Acyl-CoA dehydrogenase 9 (ACAD 9) is the long-chain acyl-CoA dehydrogenase in human embryonic and fetal brain. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 33-37, 2006.
235. **Offermanns S, Colletti SL, Lovenberg TW, Semple G, Wise A and IJzerman AP.** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXII: Nomenclature and Classification of Hydroxy-carboxylic Acid Receptors (GPR81, GPR109A, and GPR109B). *Pharmacol Rev* 63: 269-290, 2011.
236. **Ogier de BH and Saudubray JM.** Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol* 7: 65-74, 2002.
237. **Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess DJ, Sharov VG, Sabbah HN, Hoit BD, Ernsberger P, Chandler MP and Stanley WC.** Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. *Hypertension* 48: 1116-1123, 2006.
238. **Opie LH.** *The Heart : Physiology, from cell to circulation.* New York: Lippincott-Raven Publisher, 1998,
239. **Orii KO, Aoyama T, Souri M, Orii KE, Kondo N, Orii T and Hashimoto T.** Genomic DNA organization of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase and mutation analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 987-992, 1995.
240. **Owen OE, Kalhan SC and Hanson RW.** The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277: 30409-30412, 2002.
241. **Panagia M, Gibbons GF, Radda GK and Clarke K.** PPAR-alpha activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2677-H2683, 2005.

242. **Papamandjaris AA, MacDougall DE and Jones PJ.** Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci* 62: 1203-1215, 1998.
243. **Pasceri V, Wu HD, Willerson JT and Yeh ET.** Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101: 235-238, 2000.
244. **Patel RR.** Thiazolidinediones and congestive heart failure: a judicious balance of risks and benefits. *Cardiol Rev* 17: 132-135, 2009.
245. **Peuhkurinen KJ and Hassinen IE.** Pyruvate carboxylation as an anaplerotic mechanism in the isolated perfused rat heart. *Biochem J* 202: 67-76, 1982.
246. **Poirier M, Vincent G, Reszko AE, Bouchard B, Kelleher JK, Brunengraber H and Des RC.** Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1379-H1386, 2002.
247. **Polak P and Hall MN.** mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 21: 209-218, 2009.
248. **Pouteau E, Meirim I, Metairon S and Fay LB.** Acetate, propionate and butyrate in plasma: determination of the concentration and isotopic enrichment by gas chromatography/mass spectrometry with positive chemical ionization. *J Mass Spectrom* 36: 798-805, 2001.
249. **Powell PJ, Lau SM, Killian D and Thorpe C.** Interaction of acyl coenzyme A substrates and analogues with pig kidney medium-chain acyl-coA dehydrogenase. *Biochemistry* 26: 3704-3710, 1987.
250. **Primassin S, Ter VF, Mayatepek E and Spiekerkoetter U.** Carnitine supplementation induces acylcarnitine production in tissues of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice, without replenishing low free carnitine. *Pediatr Res* 63: 632-637, 2008.
251. **Primassin S, Tucci S, Herebian D, Seibt A, Hoffmann L, Ter VF and Spiekerkoetter U.** Pre-exercise medium-chain triglyceride application prevents acylcarnitine accumulation in skeletal muscle from very-long-chain acyl-CoA-dehydrogenase-deficient mice. *J Inherit Metab Dis* 33: 237-246, 2010.
252. **Pulinilkunnil T and Rodrigues B.** Cardiac lipoprotein lipase: metabolic basis for diabetic heart disease. *Cardiovasc Res* 69: 329-340, 2006.
253. **Radner FP, Streith IE, Schoiswohl G, Schweiger M, Kumari M, Eichmann TO, Rechberger G, Koefeler HC, Eder S, Schauer S, Theussl HC, Preiss-Landl K, Lass A, Zimmermann R, Hoefler G, Zechner R and Haemmerle G.** Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and

- lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58). *J Biol Chem* 285: 7300-7311, 2010.
254. **RANDLE PJ, GARLAND PB, HALES CN and NEWSHOLME EA.** The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789, 1963.
255. **Rapoport SI, Igarashi M and Gao F.** Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 273-276, 2010.
256. **Rennison JH, McElfresh TA, Chen X, Anand VR, Hoit BD, Hoppel CL and Chandler MP.** Prolonged exposure to high dietary lipids is not associated with lipotoxicity in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 46: 883-890, 2009.
257. **Rennison JH, McElfresh TA, Okere IC, Vazquez EJ, Patel HV, Foster AB, Patel KK, Chen Q, Hoit BD, Tserng KY, Hassan MO, Hoppel CL and Chandler MP.** High-fat diet postinfarction enhances mitochondrial function and does not exacerbate left ventricular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1498-H1506, 2007.
258. **Rinaldo P, Matern D and Bennett MJ.** Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol* 64: 477-502, 2002.
259. **Roe CR and Mochel F.** Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: therapeutic potential. *J Inherit Metab Dis* 29: 332-340, 2006.
260. **Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F and Brunengraber H.** Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest* 110: 259-269, 2002.
261. **Roe CR, Yang BZ, Brunengraber H, Roe DS, Wallace M and Garritson BK.** Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: successful anaplerotic diet therapy. *Neurology* 71: 260-264, 2008.
262. **Romano S, Valayannopoulos V, Touati G, Jais JP, Rabier D, de KY, Bonnet D and de LP.** Cardiomyopathies in propionic aciduria are reversible after liver transplantation. *J Pediatr* 156: 128-134, 2010.
263. **Rosen ED and Spiegelman BM.** PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276: 37731-37734, 2001.
264. **Rousseau-Ralliard D, Moreau D, Guillard JC, Raederstorff D and Grynberg A.** Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, lowers ambulatory blood pressure and shortens interval QT in spontaneously hypertensive rats in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80: 269-277, 2009.

265. **Rupp H and Jacob R.** Metabolically-modulated growth and phenotype of the rat heart. *Eur Heart J* 13 Suppl D: 56-61, 1992.
266. **Russell LK, Finck BN and Kelly DP.** Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 38: 81-91, 2005.
267. **Russell RR, III and Taegtmeyer H.** Changes in citric acid cycle flux and anaplerosis antedate the functional decline in isolated rat hearts utilizing acetoacetate. *J Clin Invest* 87: 384-390, 1991.
268. **Russell RR, III and Taegtmeyer H.** Pyruvate carboxylation prevents the decline in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. *Am J Physiol* 261: H1756-H1762, 1991.
269. **Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA and Kelly DP.** Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 94: 2837-2842, 1996.
270. **Saddik M and Lopaschuk GD.** Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *J Biol Chem* 266: 8162-8170, 1991.
271. **Sakamoto K, Zarrinpashneh E, Budas GR, Pouleur AC, Dutta A, Prescott AR, Vanoverschelde JL, Ashworth A, Jovanovic A, Alessi DR and Bertrand L.** Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPKalpha2 but not AMPKalpha1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E780-E788, 2006.
272. **Sambandam N, Morabito D, Wagg C, Finck BN, Kelly DP and Lopaschuk GD.** Chronic activation of PPARalpha is detrimental to cardiac recovery after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H87-H95, 2006.
273. **Sato T, Arita M and Kiyosue T.** Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectifier K⁺ channels of guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* 7 Suppl 3: 575-584, 1993.
274. **Saudubray JM, Martin D, de LP, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P and Brivet M.** Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis* 22: 488-502, 1999.
275. **Schoiswohl G, Schweiger M, Schreiber R, Gorkiewicz G, Preiss-Landl K, Taschler U, Zierler KA, Radner FP, Eichmann TO, Kienesberger PC, Eder S, Lass A, Haemmerle G, Alsted TJ, Kiens B, Hoefler G, Zechner R and Zimmermann R.** Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fatty acids. *J Lipid Res* 51: 490-499, 2010.

276. **Scholl-Burgi S, Sass JO, Heinz-Erian P, Amann E, Haberlandt E, Albrecht U, Ertl C, Sigl SB, Lagler F, Rostasy K and Karall D.** Changes in plasma amino acid concentrations with increasing age in patients with propionic acidemia. *Amino Acids* 38: 1473-1481, 2010.
277. **Scholl-Burgi S, Sass JO, Zschocke J and Karall D.** Amino acid metabolism in patients with propionic acidemia. *J Inherit Metab Dis* 2010.
278. **Schuler AM, Gower BA, Matern D, Rinaldo P, Vockley J and Wood PA.** Synergistic heterozygosity in mice with inherited enzyme deficiencies of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Mol Genet Metab* 85: 7-11, 2005.
279. **Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, van den Heuvel LP, Drose S, Brandt U, Hoffmann GF, Ter LH, Kolker S and Smeitink JA.** Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J* 398: 107-112, 2006.
280. **Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R and Zimmermann R.** Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* 281: 40236-40241, 2006.
281. **Schwenk RW, Luiken JJ, Bonen A and Glatz JF.** Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res* 79: 249-258, 2008.
282. **Shah AP, Siedlecka U, Gandhi A, Navaratnarajah M, Al-Saud SA, Yacoub MH and Terracciano CM.** Genetic background affects function and intracellular calcium regulation of mouse hearts. *Cardiovasc Res* 87: 683-693, 2010.
283. **Shende P, Plaisance I, Morandi C, Pellioux C, Berthonneche C, Zorzato F, Krishnan J, Lerch R, Hall MN, Ruegg MA, Pedrazzini T and Brink M.** Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation* 123: 1073-1082, 2011.
284. **Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ and Izumo S.** Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 107: 1664-1670, 2003.
285. **Simopoulos AP.** Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 70: 560S-569S, 1999.
286. **Simopoulos AP.** Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Exp Biol Med (Maywood)* 235: 785-795, 2010.

287. **Smith S, Watts R and Dils R.** Quantitative gas-liquid chromatographic analysis of rodent milk triglycerides. *J Lipid Res* 9: 52-57, 1968.
288. **Soesanto W, Lin HY, Hu E, Lefler S, Litwin SE, Sena S, Abel ED, Symons JD and Jalili T.** Mammalian target of rapamycin is a critical regulator of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 54: 1321-1327, 2009.
289. **Solis JO and Singh RH.** Management of fatty acid oxidation disorders: a survey of current treatment strategies. *J Am Diet Assoc* 102: 1800-1803, 2002.
290. **Son NH, Park TS, Yamashita H, Yokoyama M, Huggins LA, Okajima K, Homma S, Szabolcs MJ, Huang LS and Goldberg IJ.** Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest* 117: 2791-2801, 2007.
291. **Souri M, Aoyama T, Hoganson G and Hashimoto T.** Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase subunit assembles to the dimer form on mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett* 426: 187-190, 1998.
292. **Spector AA.** Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *J Mol Neurosci* 16: 159-165, 2001.
293. **Spielerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, Das A, Haase C, Hennermann JB, Karall D, de KH, Knerr I, Koch HG, Plecko B, Roschinger W, Schwab KO, Scheible D, Wijburg FA, Zschocke J, Mayatepek E and Wendel U.** Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop. *J Inherit Metab Dis* 32: 498-505, 2009.
294. **Spielerkoetter U, Ruiten J, Tokunaga C, Wendel U, Mayatepek E, Wijburg FA, Strauss AW and Wanders RJ.** Evidence for impaired gluconeogenesis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *Horm Metab Res* 38: 625-630, 2006.
295. **Spielerkoetter U, Sun B, Zytovicz T, Wanders R, Strauss AW and Wendel U.** MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 143: 335-342, 2003.
296. **Spielerkoetter U, Tokunaga C, Wendel U, Mayatepek E, Exil V, Duran M, Wijburg FA, Wanders RJ and Strauss AW.** Changes in blood carnitine and acylcarnitine profiles of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice subjected to stress. *Eur J Clin Invest* 34: 191-196, 2004.
297. **Spielerkoetter U, Tokunaga C, Wendel U, Mayatepek E, IJlst L, Vaz FM, van VN, Overmars H, Duran M, Wijburg FA, Wanders RJ and Strauss AW.**

- Tissue carnitine homeostasis in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *Pediatr Res* 57: 760-764, 2005.
298. **Spiekerkoetter U and Wood PA.** Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models. *J Inherit Metab Dis* 2010.
299. **Stanley WC and Chandler MP.** Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev* 7: 115-130, 2002.
300. **Stanley WC, Recchia FA and Lopaschuk GD.** Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093-1129, 2005.
301. **Stillwell W and Wassall SR.** Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126: 1-27, 2003.
302. **Strauss AW, Powell CK, Hale DE, Anderson MM, Ahuja A, Brackett JC and Sims HF.** Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10496-10500, 1995.
303. **Straussberg R and Strauss AW.** A novel mutation of late-onset very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Neurol* 27: 136-137, 2002.
304. **Sugden MC, Bulmer K, Gibbons GF, Knight BL and Holness MJ.** Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *Biochem J* 364: 361-368, 2002.
305. **Swigonova Z, Mohsen AW and Vockley J.** Acyl-CoA dehydrogenases: Dynamic history of protein family evolution. *J Mol Evol* 69: 176-193, 2009.
306. **Taegtmeyer H.** Genetics of energetics: transcriptional responses in cardiac metabolism. *Ann Biomed Eng* 28: 871-876, 2000.
307. **Taegtmeyer H.** Switching metabolic genes to build a better heart. *Circulation* 106: 2043-2045, 2002.
308. **Taegtmeyer H and Ballal K.** No low-fat diet for the failing heart? *Circulation* 114: 2092-2093, 2006.
309. **Taegtmeyer H, Hems R and Krebs HA.** Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem J* 186: 701-711, 1980.
310. **Takayama K, Yuhki K, Ono K, Fujino T, Hara A, Yamada T, Kuriyama S, Karibe H, Okada Y, Takahata O, Taniguchi T, Iijima T, Iwasaki H, Narumiya S and Ushikubi F.** Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia. *Nat Med* 11: 562-566, 2005.

311. **Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, Barlera S, Franzosi MG, Latini R, Lucci D, Nicolosi GL, Porcu M and Tognoni G.** Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372: 1223-1230, 2008.
312. **Tolwani RJ, Hamm DA, Tian L, Sharer JD, Vockley J, Rinaldo P, Matern D, Schoeb TR and Wood PA.** Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in gene-targeted mice. *PLoS Genet* 1: e23, 2005.
313. **Touma EH, Rashed MS, Vianey-Saban C, Sakr A, Divry P, Gregersen N and Andresen BS.** A severe genotype with favourable outcome in very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child* 84: 58-60, 2001.
314. **Tucci S, Flogel U, Sturm M, Borsch E and Spiekerkoetter U.** Disrupted fat distribution and composition due to medium-chain triglycerides in mice with a {beta}-oxidation defect. *Am J Clin Nutr* 2011.
315. **Tucci S, Primassin S, Ter VF and Spiekerkoetter U.** Medium-chain triglycerides impair lipid metabolism and induce hepatic steatosis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-deficient mice. *Mol Genet Metab* 101: 40-47, 2010.
316. **Tuunanen H, Engblom E, Naum A, Nagren K, Hesse B, Airaksinen KE, Nuutila P, Iozzo P, Ukkonen H, Opie LH and Knuuti J.** Free fatty acid depletion acutely decreases cardiac work and efficiency in cardiomyopathic heart failure. *Circulation* 114: 2130-2137, 2006.
317. **Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B and Chung JH.** AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59: 554-563, 2010.
318. **Uretzky G, Vinograd I, Freund HR, Schwalb H, Yaroslavsky E, Appelbaum Y and Borman JB.** Protective effect of branched chain-enriched amino acid formulation in myocardial ischemia. *Isr J Med Sci* 25: 3-6, 1989.
319. **Van Der Heide LP, Hoekman MF and Smidt MP.** The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380: 297-309, 2004.
320. **van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC and Reneman RS.** Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 72: 881-940, 1992.
321. **van BM and van Nieuwenhoven FA.** PPARs as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets* 14: 1029-1045, 2010.

322. **van BM, van d, V, Gilde AJ, Lindhout M and van der Lee KA.** Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression. *Mol Cell Biochem* 239: 131-138, 2002.
323. **Veglio M, Chinaglia A and Cavallo-Perin P.** QT interval, cardiovascular risk factors and risk of death in diabetes. *J Endocrinol Invest* 27: 175-181, 2004.
324. **Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, Nada M, Zabet MT, Mathieu M and Roe C.** Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta* 269: 43-62, 1998.
325. **Villacorta L, Schopfer FJ, Zhang J, Freeman BA and Chen YE.** PPARgamma and its ligands: therapeutic implications in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)* 116: 205-218, 2009.
326. **Vincent G, Bouchard B, Khairallah M and Des RC.** Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H257-H266, 2004.
327. **Vincent G, Comte B, Poirier M and Rosiers CD.** Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E846-E856, 2000.
328. **Vincent G, Khairallah M, Bouchard B and Des RC.** Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode. *Mol Cell Biochem* 242: 89-99, 2003.
329. **Viollet B, Athes Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R and Bertrand L.** AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14: 19-44, 2009.
330. **Vockley J, Singh RH and Whiteman DA.** Diagnosis and management of defects of mitochondrial beta-oxidation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 601-609, 2002.
331. **Vockley J and Whiteman DA.** Defects of mitochondrial beta-oxidation: a growing group of disorders. *Neuromuscul Disord* 12: 235-246, 2002.
332. **Voet D and Voet JG.** *Biochemistry*. John Wiley and Sons, 1998,
333. **Wahli W, Braissant O and Desvergne B.** Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more... *Chem Biol* 2: 261-266, 1995.

334. **Wanders RJ, Denis S, Ruiter JP, IJlst L and Dacremont G.** 2,6-Dimethylheptanoyl-CoA is a specific substrate for long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD): evidence for a major role of LCAD in branched-chain fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1393: 35-40, 1998.
335. **Wanders RJ, Ferdinandusse S, Brites P and Kemp S.** Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801: 272-280, 2010.
336. **Wanders RJ, Vreken P, den Boer ME, Wijburg FA, van Gennip AH and IJlst L.** Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis* 22: 442-487, 1999.
337. **Wang RX, Li XR, Guo T, Sun LP, Guo SX, Yang ZY, Yang XJ and Jiang WP.** Docosahexaenoic acid has influence on action potentials and transient outward potassium currents of ventricular myocytes. *Lipids Health Dis* 9: 39, 2010.
338. **Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB and Gerszten RE.** Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17: 448-453, 2011.
339. **Wang Y, Mohsen AW, Mihalik SJ, Goetzman ES and Vockley J.** Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *J Biol Chem* 285: 29834-29841, 2010.
340. **Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, Kodama M, Aizawa Y, Ohta Y, Ono T, Hasegawa G, Naito M, Nakajima T, Kamijo Y, Gonzalez FJ and Aoyama T.** Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *J Biol Chem* 275: 22293-22299, 2000.
341. **Watkins SM, Lin TY, Davis RM, Ching JR, DePeters EJ, Halpern GM, Walzem RL and German JB.** Unique phospholipid metabolism in mouse heart in response to dietary docosahexaenoic or alpha-linolenic acids. *Lipids* 36: 247-254, 2001.
342. **Weber HS, Selimi D and Huber G.** Prevention of cardiovascular diseases and highly concentrated n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). *Herz* 31 Suppl 3: 24-30, 2006.
343. **Werdich AA, Baudenbacher F, Dzhura I, Jeyakumar LH, Kannankeril PJ, Fleischer S, LeGrone A, Milatovic D, Aschner M, Strauss AW, Anderson ME and Exil VJ.** Polymorphic ventricular tachycardia and abnormal Ca²⁺ handling in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2202-H2211, 2007.

344. **Wood PA, Amendt BA, Rhead WJ, Millington DS, Inoue F and Armstrong D.** Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in mice. *Pediatr Res* 25: 38-43, 1989.
345. **Wu P, Blair PV, Sato J, Jaskiewicz J, Popov KM and Harris RA.** Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys* 381: 1-7, 2000.
346. **Wu P, Inskeep K, Bowker-Kinley MM, Popov KM and Harris RA.** Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes* 48: 1593-1599, 1999.
347. **Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM and Harris RA.** Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J* 329 (Pt 1): 197-201, 1998.
348. **Yamada KA, Kanter EM and Newatia A.** Long-chain acylcarnitine induces Ca²⁺ efflux from the sarcoplasmic reticulum. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 14-21, 2000.
349. **Yang B, Saldeen TG, Nichols WW and Mehta JL.** Dietary fish oil supplementation attenuates myocardial dysfunction and injury caused by global ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *J Nutr* 123: 2067-2074, 1993.
350. **Yang Q and Li Y.** Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis. *J Mol Med* 85: 697-706, 2007.
351. **Young ME, Laws FA, Goodwin GW and Taegtmeyer H.** Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem* 276: 44390-44395, 2001.
352. **Young ME, Patil S, Ying J, Depre C, Ahuja HS, Shipley GL, Stepkowski SM, Davies PJ and Taegtmeyer H.** Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) in the adult rodent heart. *FASEB J* 15: 833-845, 2001.
353. **Zhang D, Christianson J, Liu ZX, Tian L, Choi CS, Neschen S, Dong J, Wood PA and Shulman GI.** Resistance to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Cell Metab* 11: 402-411, 2010.
354. **Zhang D, Liu ZX, Choi CS, Tian L, Kibbey R, Dong J, Cline GW, Wood PA and Shulman GI.** Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17075-17080, 2007.

355. **Zhang J, Zhang W, Zou D, Chen G, Wan T, Zhang M and Cao X.** Cloning and functional characterization of ACAD-9, a novel member of human acyl-CoA dehydrogenase family. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 1033-1042, 2002.
356. **Zhou Y, Kelly DP, Strauss AW, Sims H and Zhang Z.** Characterization of the human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene promoter region: a role for activator protein 2. *Mol Genet Metab* 68: 481-487, 1999.
357. **Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G and Zechner R.** Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta* 1791: 494-500, 2009.
358. **Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A and Zechner R.** Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383-1386, 2004.

ANNEXE 1

Medium-chain Fatty Acids as Metabolic Therapy in Cardiac Disease

François Labarthe, Roselle Gélinas and Christine Des Rosiers

Cardiovasc Drugs Ther. 2008 Apr;22(2):97-106.

Article de revue

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Roselle Gélinas a contribué à la revue de littérature de cet article de revue. Dr François Labarthe et Dre Christine Des Rosiers étaient responsables de la revue de littérature et de l'écriture du manuscrit.

Medium-chain Fatty Acids as Metabolic Therapy in Cardiac Disease

François Labarthe · Roselle Gélinas ·
Christine Des Rosiers

© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract

Introduction Medium-chain fatty acids (MCFAs) have physical and metabolic properties that are distinct from those of long-chain fatty acids, which make them a readily available cellular energy source. These properties have been used advantageously in the clinics for more than 50 years for treating lipid absorption disorders, undernourished patients, and more recently subjects with long-chain fatty acid oxidation defects. In these latter subjects, nutritional interventions with MCFA-containing triglycerides have been shown to improve clinical symptoms, particularly cardiomyopathies.

Potential benefits of MCFA metabolism in cardiac diseases There is, however, only a limited number of studies that have considered the potential use of MCFAs as metabolic therapy for cardiac diseases in general. Nevertheless, current experimental evidence does support the notion that the diseased heart is energy deficient and that alterations in myocardial energy substrate metabolism

contribute to contractile dysfunction and cardiac disease development and progression. Hence, this article will review current literature on MCFAs with a specific emphasis on their metabolism and potential benefits for the heart. It will include practical considerations about the potential clinical application of MCFA therapy for the management of patients with cardiac diseases.

Key words medium-chain fatty acid · heart · cardiomyopathy · metabolism · energy · nutrition

Introduction

Medium-chain fatty acids (MCFAs) have a chain length between 6 to 12 carbons and are saturated. In contrast, long-chain FAs (LCFAs) contain 14 or more carbons and often carry one or more double bonds. These structural differences confer to MCFAs distinct metabolic properties such as their unregulated β -oxidation for energy production, which have been used advantageously in various clinical conditions, in which cases MCFAs are traditionally administered as medium-chain triglycerides (MCTs). For clinical use, there are various commercial preparations of MCTs, containing either MCFAs alone in the form of oil or margarine, or in combination with carbohydrates, proteins, essential FAs, vitamins and minerals in the form of milk or enteral solutions [1, 2]. Furthermore, MCT-containing lipid emulsions, which are classically administered as a mix with LCFA-containing triglycerides (LCTs), are also available for parenteral infusion [3]. It is noteworthy that in contrast to LCTs, MCFA-containing triglycerides are minor constituents of the classical diet, except in populations consuming large amounts of coconut oil, which contains over 50% even-carbon MCFAs, as it occurs in Sri Lanka and other

[REDACTED]

developing countries [4]. Milk is also another natural source of MCFAs; their proportion can reach ~50% of FAs in some mammals such as rabbits and rats [5]. Interestingly, results from a prospective cohort study including more than 80,000 US females showed that in contrast to LCFAs, intakes of MCFAs were not significantly associated with the risk of coronary heart disease [6].

Since their first introduction in the 1950s for the treatment of lipid absorption disorders [2], MCT-enriched diets have been proposed for clinical conditions associated with increased energy needs, such as undernourished patients or premature neonates [7, 8], and more recently for the management of obesity [9–12]. Over the past decades, MCTs have also been used for the nutritional management of patients with inherited LCFA β -oxidation disorders [13]. These patients often present in the clinics during their first years of life with fasting-induced hypoketotic hypoglycaemia, myopathy, cardiomyopathy or liver dysfunction. MCFAs, which bypass the enzyme defect and thereby can restore energy production, have been shown to improve clinical symptoms, particularly cardiac hypertrophy and dysfunction, in most patients [14–17]. More recently, MCFAs with an odd number of carbons were reported to be superior to even-carbon MCFAs in improving the cardiomyopathy of one patient with genetic LCFA oxidation deficiency [18]. Beyond being readily oxidized for energy production, odd-carbon MCFAs are anaplerotic for the citric acid cycle (CAC), a process that has been shown to be crucial for maintenance of gluconeogenesis in liver, neurotransmitter synthesis in the brain, insulin signalling in β -cells as well as optimal contraction in the heart [19].

In other cardiomyopathies, unrelated to inherited FA oxidation defects, MCFAs or MCTs have only been used in a restricted number of animal studies. Nevertheless, numerous evidence support the notion that the diseased heart is energy deficient and that alterations in myocardial energy substrate metabolism contribute to contractile dysfunction and cardiac disease development and progression [20–24]. Beyond the potential benefit of pharmacological interventions with “metabolic modulators,” which have been proposed as adjunctive therapies in these diseases [20–24], there appears to be also a potential for nutritional interventions with even- and/or odd-carbon MCFAs in the treatment of cardiac diseases given the reported benefits of MCTs in the management of cardiomyopathies associated with inherited LCFA oxidation defects. Furthermore, findings from recent studies in animals and humans have emphasized the importance of LCFAs as determinant of contractile function, structural remodelling, and mitochondrial energy metabolism in the failing, post-infarcted or hypertrophied heart [25–27].

This article will review current experimental evidence suggesting the potential benefits of MCFAs as metabolic therapy in cardiac diseases. Herein, metabolism of even- and odd-carbon MCFAs will be presented, followed by a description of their reported effects on myocardial substrate metabolism, function and remodelling. Finally, their effects beyond the heart as well as potential limitations in their clinical use will be discussed.

Metabolic effects of MCFAs

This section will describe MCT and MCFA metabolism at the whole-body and cellular levels. Thereafter, their impact on myocardial substrate metabolism, a potential determinant of contractile function, energy status, disease progression, and resistance to ischemia–reperfusion [20, 21, 27], will also be presented. For each section, we will discuss potential differences between even- and odd-carbon MCFAs, although unless specified, the text refers predominantly to even-carbon MCFAs.

MCFA metabolism at the cellular level

MCFAs display numerous unique metabolic properties that contrast with LCFAs and contribute to their metabolic effects [12, 28]. The β -oxidation of LCFAs is highly regulated by substrate availability, transport across plasma and mitochondrial membranes, and specific FA oxidation enzyme activities. Specifically, LCFA uptake is mediated by sarcolemmal transporters, such as FA translocase (FAT/CD36), plasmalemmal FA-binding protein and FA transport protein (Fig. 1) [29]. Subsequently, LCFAs are activated into their corresponding acyl-CoA derivatives, which are either incorporated into intracellular lipid pools or enter the mitochondria for β -oxidation. Transport of long-chain acyl-CoAs (LC-acyl-CoAs) into the mitochondria is mediated by the concerted action of three carnitine-dependent enzymes [30]. The first enzyme of this carnitine shuttle, carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I), is the key regulatory step for LCFA transport and oxidation into mitochondria. In contrast, MCFAs do not rely on membrane transporters for their uptake into cells and mitochondria; they are directly activated in the mitochondrial matrix by medium-chain acyl-CoA (MC-acyl-CoA) synthetase prior to β -oxidation, which is not subject to regulation at the level of CPT-I [12, 28, 31]. Accordingly, MCFAs are rapidly taken up by cells, readily and preferentially β -oxidized in the mitochondria at rate that is determined by their availability, that is their blood concentrations. There appears to be little peroxisomal oxidation or incorporation into triglycerides of MCFAs [10, 32, 33].

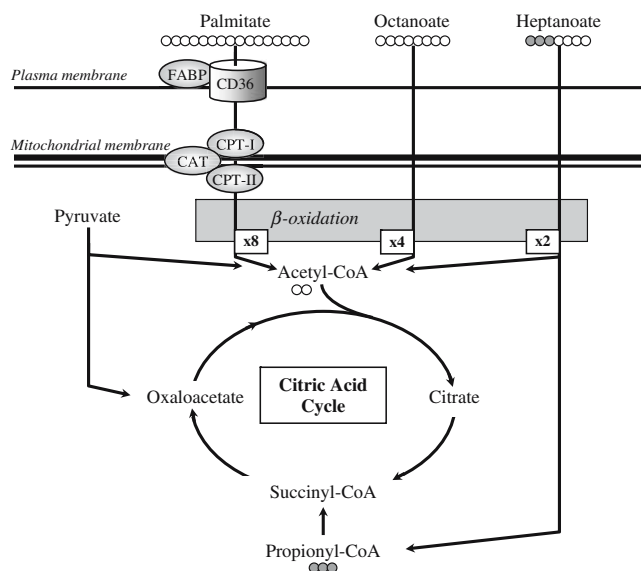


Fig. 1 Long-chain and medium-chain fatty acid oxidation pathways in cardiomyocytes. Compared to long-chain fatty acids, medium-chain fatty acids are directly oxidized into mitochondria. Circles represent atoms of carbon from fatty acids that enter into the citric acid cycle. Complete β -oxidation of one molecule of octanoate yields 4 molecules of acetyl-CoA, while one molecule of heptanoate yields two molecules of acetyl-CoA and one molecule of propionyl-CoA (from carbons 5, 6 and 7), which is anaplerotic in that it enters the pool of citric acid cycle intermediates at the level of succinyl-CoA. FABP, plasmalemmal fatty acid-binding protein; CD36, fatty acid translocase/CD36; CPT, carnitine palmitoyltransferase; CAT, carnitine-acylcarnitine translocase

Recently, the use of odd-carbon MCTs has been proposed as an alternative to even-carbon MCTs in the nutritional management of patients with LCFA oxidation defects [18]. The benefit of odd-carbon MCTs, specifically heptanoate-containing triglycerides or triheptanoin, is attributed to their anaplerotic properties. Anaplerosis is the re-filling of the catalytic intermediates of the CAC that carry acetyl-CoA as it is oxidized. In fact, the oxidation of one molecule of heptanoate, which have seven carbons, yields two acetyl-CoA and one propionyl-CoA molecules, while that of octanoate, a eight-carbon containing MCFAs, yields four acetyl-CoA units (Fig. 1). Propionyl-CoA derived from heptanoate is further metabolised to succinyl-CoA, which is an anaplerotic reaction that feeds the pool of CAC intermediates [19]. Supporting evidence for this metabolic scheme is provided by labelling experiments conducted in perfused hearts with heptanoate differentially labelled with carbon 13 (^{13}C) on carbon 1 or carbons 5, 6 and 7. Indeed, using [$1-^{13}\text{C}$]heptanoate, there was incorporation of label into citrate and the expected fall in enrichment from citrate to succinate concurred with the notion that the carbon-1 of heptanoate enters the CAC via β -oxidation and not through anaplerosis. In contrast, the use of [$5,6,7-^{13}\text{C}_3$]heptanoate resulted in the formation of

[$^{13}\text{C}_3$]succinate in a proportion that supported the notion of heptanoate metabolism to propionyl-CoA [26].

MCFAs metabolism at the whole-body level

While traditionally, MCFAs are given in the form of MCTs, their route of administration, oral or parenteral, has a major impact on the formation of their derived metabolites [2, 12, 34]. When given orally, MCTs which are hydrosoluble, are readily hydrolysed to MCFAs that are absorbed into the portal vein and are rapidly taken up and oxidized by the liver. This contrasts with LCFAs that are packed into chylomicrons, which bypass the liver via the lymphatic system and are delivered to extrahepatic tissues. Accordingly, MCTs are hydrolysed faster and are better absorbed than LCTs [2, 12]. Results from animal and human studies provide also evidence that MCT diets lead to less deposition of body fat than LCT diets. Furthermore, because ingested MCFAs are directed toward oxidation rather than storage, they also influence energy expenditure [2, 12]. In the liver, MCFAs are not significantly incorporated into lipids. Rather, excess formation of acetyl-CoA through β -oxidation of MCFAs leads to ketone body synthesis [2, 12]. In fact, ketone bodies, namely acetoacetate and β -hydroxybutyrate, are the quantitatively most important MCFAs-derived metabolites that become available to non-hepatic organs when MCTs are administered orally. In contrast, intravenous MCTs are hydrolysed presumably by lipoprotein lipase to MCFAs, which are rapidly taken up and oxidized by peripheral tissues, particularly heart, muscles and kidneys, but also liver [33, 35]. The oxidation rate of enterally or parenterally administered MCTs is similar, but it is faster than that of LCTs [35].

Similarly, the hepatic metabolism of odd-carbon MCFAs leads to ketone body synthesis. However, beyond the formation of the classical four carbons (C4) ketone bodies acetoacetate and β -hydroxybutyrate from acetyl-CoA metabolism, odd-carbon MCFAs lead also to the formation of the C-5 ketone body analogs β -ketopentanoate and β -hydroxypentanoate from propionyl-CoA metabolism. Recently, Kinman et al. [34] have demonstrated that heptanoate and C5-ketone bodies were the predominant circulating metabolites when triheptanoin was infused intravenously, whereas only C5-ketone bodies were detected when triheptanoin was given intraduodenally. Irrespective of the route of administration of MCFAs, their hepatic metabolism can contribute to energy production as well as favour anaplerosis and hence gluconeogenesis and thereby induce changes in the availability of other circulating substrates, such as LCFAs or glucose, for non-hepatic organs, a phenomenon that can indirectly modulate cardiac energy substrate metabolism.

Metabolic effects of MCFAs in the heart

Metabolic effects of MCFAs that have been documented in the normal and diseased hearts include modulation of substrate selection, anaplerosis, and energy status. These effects have been described in hearts from rats and pigs perfused *ex vivo* or *in situ*. It is noteworthy that a number of earlier studies that is prior to 2000, have been conducted using MCFAs, principally octanoate, as the sole source of FAs. While results from these studies provide useful metabolic informations, care should be taken in extrapolating conclusions from these studies to the *in vivo* situation. Indeed, as discussed below, the metabolic effects of MCFAs differ when supplied alone or together with LCFAs, a condition that is more physiologically relevant.

Modulation of substrate selection In the heart, as in other tissues, MCFAs are more easily oxidized than LCFAs and their contribution to energy production is related to their coronary concentration [36, 37]. In rat hearts perfused with carbohydrates and FAs, replacing LCFAs by MCFAs at a concentration providing the same quantity of acetyl-CoA units (assuming complete β -oxidation) induced a two- to six-fold increase in the myocardial levels of acetyl-CoA as well in the rate of FA β -oxidation, while the rate of glycolysis and glucose oxidation was decreased [37, 38]. When supplied at concentration greater than 0.5 mM, MCFAs provided more than 80% of acetyl-CoA molecules for oxidation into the CAC [36–39]. Evidence supporting the notion that β -oxidation of MCFAs is uncontrolled when supplied as the sole FA to perfused hearts is supported by our finding of a high rate of ketone body release, representing as much as 25% of acetyl-CoA production, when hearts were perfused with carbohydrates and 0.2 mM octanoate. This ketone body release is attributed to the high activity and reversibility of cardiac 3-oxoacidtransferase [40]. However, the latter metabolic effect of MCFAs, as well as an increased myocardial malonyl-CoA levels [37, 41] are not observed when hearts are perfused with a mixture of MCFAs and LCFAs.

In hearts perfused with 1–1.2 mM LCFA (oleate or palmitate), decreasing LCFA concentration to 0.4–0.6 mM combined with addition of 0.6–1.2 mM MCFA (octanoate) led to the following metabolic changes. First, there was an increased contribution of total exogenous FAs to energy production, which was due to MCFAs since that of LCFAs was decreased [42, 43]. Second, the contribution of carbohydrates, namely glucose, pyruvate and/or lactate, to energy production remained unchanged or was slightly increased, providing about 10% of acetyl-CoA production [42, 43]. Third, glycolytic flux was unaffected, but the cytosolic redox state, as reflected by the lactate-to-pyruvate production rate, was less reduced than with LCFAs alone

[42, 43]. Finally, the myocardial levels of endogenous energy stores, glycogen and triglycerides, were also unchanged [42].

Similar metabolic effects of MCFAs have been reported in animal models of left ventricular hypertrophy, which display enhanced glycolysis and decreased FA oxidation. First, we conducted a study in hearts from 15-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) [44], which also show hypertension, insulin resistance and dyslipidemia, thereby mimicking some of the characteristics of the metabolic syndrome [45]. These rats also exhibit a genetic defect in FAT/CD36, concurring with the reported reduced contribution of exogenous LCFAs to β -oxidation in the heart [44–47]. In our study, SHR hearts were perfused in a working mode with physiological concentrations of substrates, including 0.4 mM oleate, and hormones and subjected to an adrenergic stimulation to increase energy demand (Fig. 2). Addition of 0.2 mM octanoate increased exogenous FA contribution to energy metabolism, principally due to MCFA contribution ($10.5 \pm 0.6\%$), with an equivalent decrease in endogenous non-carbohydrate substrate contribution, probably endogenous LCTs [44]. In contrast, glycolysis and glucose oxidation were unaffected. When octanoate was replaced by 0.2 mM heptanoate, there was a two-fold lower contribution of this odd-carbon MCFA to acetyl-CoA formation for energy production ($4.9 \pm 0.8\%$; $n=4$; Fig. 2, unpublished data), concurring with the notion that oxidation of one molecule of heptanoate yields two times less acetyl-CoA molecules compared to octanoate (Fig. 1). Furthermore, concurring with Okere et al., we detected the formation of M+3 isotopomers of

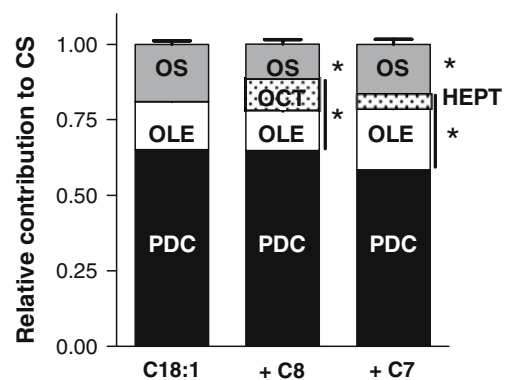


Fig. 2 Relative substrate contribution to acetyl-CoA for citrate synthesis in isolated working SHR hearts perfused with different mixtures of fatty acids. SHR hearts were perfused in a working mode with either 0.49 mM oleate (C18:1), 0.4 mM oleate+0.2 mM octanoate (+C8), or 0.4 mM oleate+0.2 mM heptanoate (+C7) and with physiological concentrations of other substrates and hormones, and subjected to an adrenergic stimulation. Results depicted for groups C18:1 and +C8 were adapted from [44]. Bars represent the relative contribution of carbohydrates (PDC; black bars), exogenous oleate (OLE; white bars), octanoate (OCT) or heptanoate (HEPT; dotted bars); and other non-glucidic endogenous substrates (OS; grey bars) to acetyl-CoA for citrate synthesis. * $p < 0.05$ vs C18:1 group

succinate (MPE $M+3=1.1\pm 0.1\%$; $n=4$) when hearts were perfused with [5,6,7- $^{13}\text{C}_3$]- but not [1- ^{13}C]heptanoate, in agreement with the metabolism of the last three carbons of heptanoate to succinyl-CoA.

More recently Allard et al. [42] have examined the effects of MCFAs in a rat model of left ventricular hypertrophy induced by aortic banding. Hearts were perfused with glucose and 1.2 mM palmitate, or 0.6 mM palmitate plus 1.2 mM octanoate. These two mixtures of FAs supply an equivalent amount of acetyl-CoA molecules. In the presence of octanoate, there was a two-fold increased contribution of exogenous FAs, attributed to MCFAs, reduced glycolysis, whereas glucose oxidation remained unchanged. Collectively, these metabolic effects concurred with our findings in SHR except that they were of greater magnitude, possibly due to the use of a greater octanoate concentration (1.2 versus 0.2 mM in our study).

Anaplerosis Another potential beneficial effect of MCFAs is to increase myocardial levels of CAC intermediates. This anaplerotic effect was reported in different conditions of heart perfusions with the even-carbon MCFA, octanoate or hexanoate [26, 43, 44, 48–50]. This increase in CAC intermediate levels, more specifically that of isocitrate and malate, appears to be due to a preferential partitioning of pyruvate to carboxylation rather than to decarboxylation combined with an increased supply of acetyl-CoA from the MCFAs. There were no reported changes in the cardiac efflux of CAC intermediates, a process that is often referred to as cataplerosis [43, 44, 48, 49].

The magnitude of the anaplerotic effect was more marked with odd- than even-carbon MCFAs. In pig hearts perfused in situ and subjected to ischemia–reperfusion, the addition of 0.4 mM heptanoate induced a 25–50% increase in CAC

intermediate tissue levels, particularly succinate, fumarate and malate [26]. We also obtained similar results in working SHR hearts perfused ex vivo and subjected to adrenergic stimulation [44] in the presence of either 0.49 mM oleate (C18:1), or a mixture of 0.4 mM oleate and 0.2 mM octanoate (+C8) or 0.2 mM heptanoate (+C7; Fig. 3).

Energy production Much remain to be learned, however, on the mechanism by which the aforementioned unique metabolic effects of MCFAs impact on cardiac energy production. In our studies conducted in hearts from SHR and Wistar rats, despite differences in substrate selection for energy production induced by the addition of MCFAs, there was no difference in the absolute CAC flux rates, calculated from oxygen consumption and flux ratios [43, 44, 49]. However, Allard et al. [42] found that the metabolic effects of octanoate were associated with an increased myocardial concentration of adenosine triphosphate (ATP) both in control and hypertrophic rat hearts. Furthermore, the lower glycolytic rate of hypertrophied hearts perfused in the presence of octanoate was associated with a decreased activity of both isoforms of adenosine monophosphate kinase ($\alpha 1$ and $\alpha 2$), suggesting that beyond their metabolic effects, MCFAs may also impact on the activity of this signalling pathway which is considered as a cellular metabolic and energy fuel sensor [20, 42].

Potential benefits of MCFAs in cardiac diseases

The following section will describe the potential benefits of MCFAs on the normal and diseased heart beyond metabolism. This includes contractile function as well as the

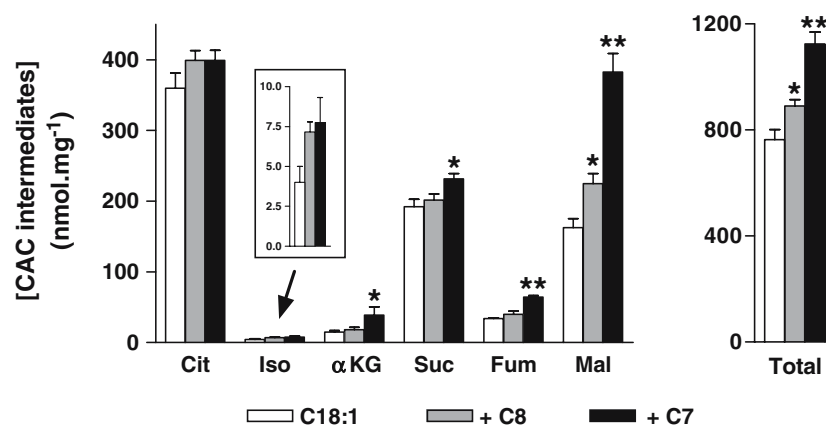


Fig. 3 Effects of medium-chain fatty acids on the myocardial levels of citric acid cycle intermediates. SHR hearts were perfused in a working mode with different mixtures of fatty acids, as described in Fig. 2. Tissue levels of citrate (*Cit*), isocitrate (*Iso*), α -ketoglutarate

(α KG), succinate (*Suc*), fumarate (*Fum*), malate (*Mal*) and total citric acid cycle intermediates were quantified by gas chromatography–mass spectrometry in tissue homogenates spiked with standards. * $p<0.05$, ** $p<0.001$ vs C18:1 group

development of hypertrophy or its progression to failure. First, we will discuss findings related to cardiomyopathy development in subjects with LCFA oxidation defects, principally humans. Then, we will describe findings in studies using other models of cardiomyopathy, which were conducted exclusively in animals. As a whole, while part of the reported benefits of MCFAs may potentially be attributed to the aforementioned metabolic effects on the heart, the contribution of additional indirect effects cannot be excluded and hence will also be discussed.

LCFA oxidation defects

The clinical phenotype of patients affected with genetic FA oxidation defects is very diversified but frequently includes cardiomyopathy and/or heart beat disorders [13, 51]. Interestingly, cardiac symptoms are specifically associated with LCFA oxidation defects, either disorders of carnitine shuttle for transport across the mitochondrial membrane or defects of specific mitochondrial enzymes for LCFA oxidation. In contrast, they are exceptional in MCFA or short-chain FA oxidation disorders. Cardiac decompensation occurs under conditions where LCFAs usually become the major energy source such as fasting or during a stress challenge. The treatment regimen that has been successful in improving the outcome of many patients with LCFA oxidation defects, particularly in alleviating their cardiomyopathy [14–17], include dietary MCTs (~30% of calorie intake) in conjunction with frequent carbohydrate feedings, carnitine supplementation, and reduced consumption of LCTs. In these patients, MCTs was found to restore ketone body production and improves metabolic control following exercise [52]. Among the proposed underlying pathophysiological mechanisms in these patients are defective energy production combined with accumulation of toxic LCFA derivatives, either LC-acyl-CoAs or carnitines [51, 53]. The benefit of MCT administration is attributed to MCFAs and their derived metabolites, which bypass the defective enzyme block and thereby, can restore energy production beyond that provided by carbohydrates. This is suggested by the finding that cold tolerance of mouse with LCFA oxidation defects can be increased by feeding a MCT-enriched diet prior to cold challenge but not by glucose infusion [54]. Furthermore, MCFAs appear also to decrease the accumulation of toxic LCFA-derived metabolites, although the underlying mechanism remains to be clarified. In fact, experiments conducted in fibroblasts from patients with LCFA oxidation deficiencies demonstrated that MCFAs can be normally oxidized in these cells, inducing a decreased accumulation of toxic LCFA derivatives and correction of secondary metabolic disturbances [55–57]. Actually, MCT supplementation is generally considered to be beneficial in FA oxidation defects, even if MCFA

utilization slightly differs between the different enzyme defects [13, 58].

Nevertheless, despite marked improvements in the clinical status of most FA oxidation defective patients, there remain persistent cardiac and muscle dysfunctions in some of these subjects. Recently, Roe et al. [18] reported a dramatic improvement of cardiomyopathy and muscle symptoms after substituting even-carbon (trioctanoin) by odd-carbon (triheptanoin) MCTs in a few patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. In one of these patients, cardiac hypertrophy and dysfunction was normalized after a few weeks of triheptanoin treatment. Triheptanoin ingestion induced a rapid appearance of both C4- and C5-ketone bodies in plasma. There was no evidence for any accumulation of toxicity linked to propionyl-CoA overload. It was postulated that the beneficial effect of triheptanoin results from its anaplerotic property. Presumably this would compensate for a decreased tissue CAC intermediate level attributed to excessive leakage and thereby improve acetyl-CoA metabolism in the CAC and energy production. However, controlled clinical studies appear warranted to substantiate the potential advantageous role of anaplerotic odd-carbon MCTs in patients with LCFA oxidation defects.

Cardiac hypertrophy and failure

Collectively, studies that have examined the effects of MCFAs in animal models of hypertrophy, both using the ex vivo perfused heart model or in vivo, have reported some benefits on cardiac function or disease progression. First, in their rat model of pressure-overload induced hypertrophy, Allard et al. [42] reported an improved contractile function of working hearts perfused with 0.6 mM palmitate and 1.2 mM octanoate compared to 1.2 mM palmitate alone. Similarly, we demonstrated that the capacity of SHR hearts to withstand an acute adrenergic stress, as evidenced by a rapid decline in cardiac functions and enhanced lactate dehydrogenase release (reflecting loss in cell membrane integrity), can be improved by increasing the contribution of exogenous FA oxidation to energy production by supplementation with 0.2 mM octanoate [44]. Replacing octanoate with 0.2 mM heptanoate did not result in additional benefits (unpublished data), in spite of heptanoate's greater anaplerotic effect as illustrated in Fig. 3. Collectively, these results suggest that impaired energy production rather than defective anaplerosis contributes to cardiac dysfunction in this model of acute heart failure.

In addition to these aforementioned effects of acute supplementation with MCFAs, there have been a number of studies reporting some benefits following feeding SHR with a MCT-enriched diet [47, 59, 60]. These benefits include prevention of cardiac hypertrophy and improvement of cardiac function, despite persistent hypertension.

Ischemia and reperfusion

Earlier studies in perfused rat hearts have reported improved functional recovery following an ischemic insult with high concentrations of hexanoate or octanoate [38, 61]. However, using a less severe model of ischemia–reperfusion (i.e. 60% reduction of regional coronary flow) in the pig heart perfused in situ and lower concentrations of MCFAs (0.4 mM hexanoate or heptanoate), Okere et al. [26] did not observe any improvement in cardiac function.

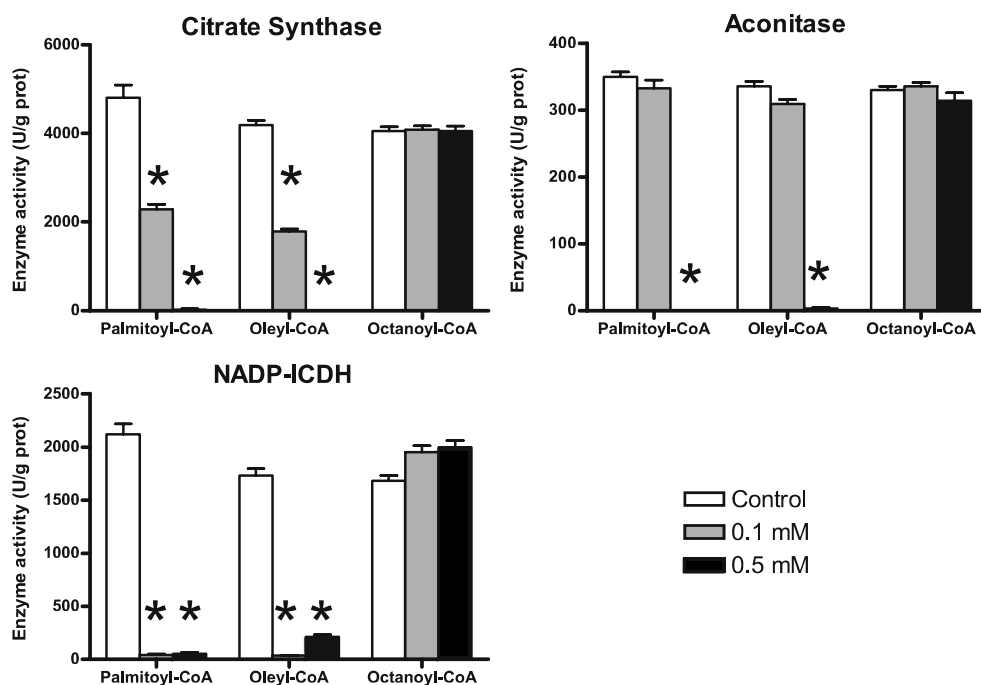
Diabetic cardiomyopathy

To the best of our knowledge, there has been only one study in a rat model of diabetes with MCFAs, in which it was shown that the addition of hexanoate as sole FA source to hearts perfused with glucose alone normalized contractile function [39]. However, interestingly in mice overexpressing peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in a cardiomyocyte specific manner, which recapitulates the diabetic metabolic phenotype, administration of a diet enriched in LCFAs exacerbated the cardiomyopathy and contractile dysfunction, whereas a MCFA-enriched diet rescued these abnormalities [62]. Collectively, these results suggest that MCT-enriched diet may improve the diabetic cardiomyopathy, however further work is necessary to confirm this favourable effect, notably in human diabetic patients.

Other effects of MCFAs

Much remains to be learned about the mechanisms underlying the reported beneficial effects on cardiac function and disease progression. While these effects may result from the aforementioned unique metabolic properties and effects of MCFAs, there are additional potential indirect both cardiac and extra-cardiac effects, which ought also to be considered as potential mechanisms to explain the benefits of MCFAs. For example, replacing LCFAs by MCFAs as energy substrate may contribute to decrease potentially adverse effects of LCFAs, which has been referred to as lipotoxicity [62, 63]. This phenomenon has been proposed to occur whenever there is a mismatch between LCFA uptake and oxidation, leading to their conversion to biologically active metabolites such as ceramide and/or diacylglycerol that may impact on signalling pathways and gene expression. For example, in contrast to LCFAs, MCFAs do not activate PPAR α and genes regulated thereby such as uncoupling protein 3 and pyruvate dehydrogenase kinase 4 [64]. In addition, while LC- and MC-acyl-CoAs differentially activate cardiac K_{ATP} channels, an important regulator of cellular excitability [65], only LC-acylcarnitine derivatives were found to decrease inward K^+ current and elicit electrophysiological alterations [51, 66]. Finally, LC-acyl-CoAs have been shown to inhibit ex vivo the activity of enzymes involved in energy substrate metabolism and its regulation. This includes acetyl-CoA carboxylase, the mitochondrial tricar-

Fig. 4 Effects of acyl-CoAs of different chain lengths on the activity of myocardial mitochondrial enzymes. Data are means \pm SE of four experiments. The enzyme activity of citrate synthase, aconitase and NADP $^+$ -isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) was determined spectrophotometrically as previously described [44] in frozen powered rat hearts in the absence (*open bar*), or in presence of 0.1 (*grey bar*) or 0.5 mM (*black bar*) of different acyl-CoA derivatives. Note that the enzyme activity was unaffected in presence of MCFA derivatives (octanoyl-CoA), in contrast to LC-acyl-CoAs, either palmitoyl-CoA or oleyl-CoA, which induce a drastic reduction in enzyme activity. * $p < 0.0001$ vs control condition



boxylate transporter, and several CAC enzymes [67, 68]. Figure 4 illustrates the inhibitory effects of increasing concentrations of LC-acyl-CoAs, but not MC-acyl-CoAs, on myocardial citrate synthase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺)-isocitrate dehydrogenase and aconitase activities.

At the whole-body level, MCFAs also have other effects that may indirectly impact on cardiac function and metabolism as well as on risk factors for cardiac diseases. For example, MCT-enriched diets have been associated with improved insulin sensitivity and glucose tolerance [47, 69], increased thermogenesis and down-regulation of adipogenic genes, resulting in a reduced fat storage and a decreased body weight [11, 69]. In addition, they may also impact on the immune response or coagulation pathways [70, 71]. Interestingly, MCFAs have recently been reported to be ligands for G-protein coupled receptors acting as signalling molecules, for example to potentiate insulin secretion at the level of β -cells [72, 73]. The potency of MCFAs as agonist appears, however, to be chain length dependent.

Potential limitations or safety of MCFAs

Only few deleterious effects have been reported with the use of MCFAs, many of which have been reported mainly when MCTs were administered as the main dietary energy source representing >50% of the total energy intake. These include decreased absorption of LCTs, which may result in deficiency in essential polyunsaturated LCFA, steatorrhea, gastrointestinal discomfort, increased risk of ketogenesis and acidosis, and in some studies, though not all, changes in blood lipid profile such as a raise in triglycerides or non-high-density lipoprotein cholesterol [1–3, 74, 75]. However, MCTs should be well tolerated while providing an adequate source of energy when given at less than 30% of the total energy intake.

MCFAs may, however, interfere with protein metabolism, as suggested from perfused rat heart experiments [76]. In fact, octanoate being a chemical analogue of 2-ketoisocaproate, is a potent inhibitor of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase, resulting in activation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex and thereby leucine oxidation [77]. Further investigations appear warranted to assess the significance of this effect given that leucine modulates the mammalian target of rapamycin signaling pathway, which governs cell protein synthesis as demonstrated in skeletal muscle [78]. The impact of heptanoate on leucine metabolism should also be further considered. On additional considerations for odd-carbon MCFAs is propionyl-CoA overload, although this has not been reported in recent studies in humans and rats in which triheptanoin was supplied at <30% of the total energy intake [18, 19].

Conclusion

In summary, MCFAs are readily oxidized by cells, including cardiomyocytes, and provide a very efficient source of energy production. MCFAs display metabolic, biological and physical properties that are distinct from LCFAs, which may contribute to their reported benefits on the heart's energy status and contractile function. These properties have been used advantageously for the nutritional management of cardiomyopathies in subjects with inherited LCFA β -oxidation defects [13]. Studies in animal models indicate that MCFAs may favourably modulate cardiac disease progression [42, 44, 62]. Interestingly, these beneficial effects of MCFAs have been reported in animal models for which the expression of myocardial genes coding for FA β -oxidation are decreased (pressure-overload hypertrophy [42]) or increased (diabetic cardiomyopathy [62]). This suggests that MCFAs use would not be restricted to a given condition. However, to the best of our knowledge, the effect of MCT feeding has not yet been examined in patients with coronary diseases or heart failure. While there appear to be many potential beneficial direct and indirect effects linked to substituting dietary LCTs for MCTs as an energy source, much remain to be learned about the metabolic alterations prevailing in patients with such diseases, particularly at the myocardial level. In fact, in contrast to animal models, patients received multiple medications, for which there is little information about their impact on substrate metabolism [20]. Hence, a better understanding of the prevailing metabolic alterations in these patients would help to delineate specific conditions in which MCTs are likely to be beneficial.

Acknowledgements This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Grant # 9575 to C.D.R.) and by the Montreal Heart Institute Foundation. The authors are grateful to Dr Henri Brunengraber, for providing ¹³C-labelled heptanoate, Dr Robert A. Harris for stimulating discussions, and Bertrand Bouchard for technical assistance.

References

1. Ruiz-Sanz JI, Aldamiz-Echevarria L, Arrizabalaga J, et al. Polyunsaturated fatty acid deficiency during dietary treatment of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Rescue with soybean oil. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24:493–503.
2. Bach AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr*. 1982;36:950–62.
3. Ulrich H, Pastores SM, Katz DP, Kvetan V. Parenteral use of medium-chain triglycerides: a reappraisal. *Nutrition*. 1996; 12:231–8.
4. Kaunitz H. Medium chain triglycerides (MCT) in aging and arteriosclerosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1986;6:115–21.
5. Decuyper JA, Dierick NA. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids and exogenous lipolytic

- enzymes as an alternative to in-feed antibiotics in piglets: concept, possibilities and limitations. An overview. *Nutr Res Rev*. 2003; 16:193–209.
6. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr*. 1999;70:1001–8.
 7. Graham GG, Baertl JM, Cordano A, Morales E. Lactose-free, medium-chain triglyceride formulas in severe malnutrition. *Am J Dis Child*. 1973;126:330–5.
 8. Tantibhedhyangkul P, Hashim SA. Medium-chain triglyceride feeding in premature infants: effects on fat and nitrogen absorption. *Pediatrics*. 1975;55:359–70.
 9. St-Onge MP, Jones PJ. Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr*. 2002;132:329–32.
 10. Geliebter A, Torbay N, Bracco EF, Hashim SA, Van Itallie TB. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *Am J Clin Nutr*. 1983;37:1–4.
 11. Baba N, Bracco EF, Hashim SA. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. *Am J Clin Nutr*. 1982; 35:678–82.
 12. Papamandjaris AA, MacDougall DE, Jones PJ. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci*. 1998;62:1203–15.
 13. Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, et al. Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inher Metab Dis*. 1999;22:488–502.
 14. Duran M, Wanders RJ, de Jager JP, et al. 3-Hydroxydicarboxylic aciduria due to long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency associated with sudden neonatal death: protective effect of medium-chain triglyceride treatment. *Eur J Pediatr*. 1991;150:190–5.
 15. Touma EH, Rashed MS, Vianey-Saban C, et al. A severe genotype with favourable outcome in very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 2001;84:58–60.
 16. Brown-Harrison MC, Nada MA, Sprecher H, et al. Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: successful treatment of acute cardiomyopathy. *Biochem Mol Med*. 1996;58:59–65.
 17. Cox GF, Soury M, Aoyama T, et al. Reversal of severe hypertrophic cardiomyopathy and excellent neuropsychologic outcome in very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr*. 1998;133:247–53.
 18. Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F, Brunengraber H. Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest*. 2002;110:259–69.
 19. Brunengraber H, Roe CR. Anaplerotic molecules: current and future. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:327–31.
 20. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005; 85:1093–129.
 21. Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev*. 2002;7:161–73.
 22. Taegtmeyer H, Ballal K. No low-fat diet for the failing heart? *Circulation*. 2006;114:2092–3.
 23. Lopaschuk GD, Wambolt RB, Barr RL. An imbalance between glycolysis and glucose oxidation is a possible explanation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;264:135–44.
 24. Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356:1140–51.
 25. Rennison JH, McElfresh TA, Okere IC, et al. High-fat diet postinfarction enhances mitochondrial function and does not exacerbate left ventricular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1498–1506.
 26. Okere IC, McElfresh TA, Brunengraber DZ, et al. Differential effects of heptanoate and hexanoate on myocardial citric acid cycle intermediates following ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol*. 2006;100:76–82.
 27. Tuunanen H, Engblom E, Naum A, et al. Free fatty acid depletion acutely decreases cardiac work and efficiency in cardiomyopathic heart failure. *Circulation*. 2006;114:2130–7.
 28. Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:477–502.
 29. Coort SL, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF, Luiken JJ. Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol Cell Biochem*. 2007;299:5–18.
 30. Saggerson ED, Carpenter CA. Carnitine palmitoyltransferase and carnitine octanoyltransferase activities in liver, kidney cortex, adipocyte, lactating mammary gland, skeletal muscle and heart. *FEBS Lett*. 1981;129:229–32.
 31. Schulz H. Regulation of fatty acid oxidation in heart. *J Nutr*. 1994;124:165–71.
 32. Bian F, Kasumov T, Thomas KR, et al. Peroxisomal and mitochondrial oxidation of fatty acids in the heart, assessed from the ¹³C labeling of malonyl-CoA and the acetyl moiety of citrate. *J Biol Chem*. 2005;280:9265–71.
 33. Johnson RC, Young SK, Cotter R, Lin L, Rowe WB. Medium-chain-triglyceride lipid emulsion: metabolism and tissue distribution. *Am J Clin Nutr*. 1990;52:502–8.
 34. Kinman RP, Kasumov T, Jobbins KA, et al. Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoic in normal rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E860–866.
 35. Metges CC, Wolfram G. Medium- and long-chain triglycerides labeled with ¹³C: a comparison of oxidation after oral or parenteral administration in humans. *J Nutr*. 1991;121:31–6.
 36. Ala-Rami A, Ylihautala M, Ingman P, Hassinen IE. Influence of calcium-induced workload transitions and fatty acid supply on myocardial substrate selection. *Metabolism*. 2005;54:410–20.
 37. Longnus SL, Wambolt RB, Barr RL, Lopaschuk GD, Allard MF. Regulation of myocardial fatty acid oxidation by substrate supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H1561–1567.
 38. Montessuit C, Papageorgiou I, Tardy-Cantalupi I, Rosenblatt-Velin N, Lerch R. Postischemic recovery of heart metabolism and function: role of mitochondrial fatty acid transfer. *J Appl Physiol*. 2000;89:111–9.
 39. Chatham JC, Forder JR. Relationship between cardiac function and substrate oxidation in hearts of diabetic rats. *Am J Physiol*. 1997;273:H52–58.
 40. Vincent G, Comte B, Poirier M, Des Rosiers C. Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278:E846–856.
 41. Poirier M, Vincent G, Reszko AE, et al. Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1379–1386.
 42. Allard MF, Parsons HL, Saeedi R, Wambolt RB, Brownsey R. AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H140–148.
 43. Vincent G, Bouchard B, Khairallah M, Des Rosiers C. Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H257–266.
 44. Labarthe F, Khairallah M, Bouchard B, Stanley WC, Des Rosiers C. Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1425–1436.

45. Pravenec M, Kren V. Genetic analysis of complex cardiovascular traits in the spontaneously hypertensive rat. *Exp Physiol*. 2005;90:273–6.
46. Vincent G, Khairallah M, Bouchard B, Des Rosiers C. Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode. *Mol Cell Biochem*. 2003;242:89–99.
47. Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, et al. Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem*. 2001;276:23661–6.
48. Panchal AR, Comte B, Huang H, et al. Partitioning of pyruvate between oxidation and anaplerosis in swine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H2390–2398.
49. Comte B, Vincent G, Bouchard B, Bendoric M, Des Rosiers C. Reverse flux through cardiac NADP(+)-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1505–1514.
50. Sundqvist KE, Vuorinen KH, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. Metabolic effects of propionate, hexanoate and propionylcarnitine in normoxia, ischaemia and reperfusion. Does an anaplerotic substrate protect the ischaemic myocardium? *Eur Heart J*. 1994;15:561–70.
51. Bonnet D, Martin D, de Lonlay P, et al. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation*. 1999;100:2248–53.
52. Gillingham MB, Scott B, Elliott D, Harding CO. Metabolic control during exercise with and without medium-chain triglycerides (MCT) in children with long-chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) or trifunctional protein (TFP) deficiency. *Mol Genet Metab*. 2006;89:58–63.
53. Olpin SE. Implications of impaired ketogenesis in fatty acid oxidation disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004;70:293–308.
54. Schuler AM, Gower BA, Matern D, Rinaldo P, Wood PA. Influence of dietary fatty acid chain-length on metabolic tolerance in mouse models of inherited defects in mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Mol Genet Metab*. 2004;83:322–9.
55. Shen JJ, Matern D, Millington DS, et al. Acylcarnitines in fibroblasts of patients with long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and other fatty acid oxidation disorders. *J Inher Metab Dis*. 2000;23:27–44.
56. Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, et al. Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta*. 1998;269:43–62.
57. Jones PM, Butt Y, Bennett MJ. Accumulation of 3-hydroxy-fatty acids in the culture medium of long-chain L-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (LCHAD) and mitochondrial trifunctional protein-deficient skin fibroblasts: implications for medium chain triglyceride dietary treatment of LCHAD deficiency. *Pediatr Res*. 2003;53:783–7.
58. Parini R, Invernizzi F, Menni F, et al. Medium-chain triglyceride loading test in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: insights on treatment. *J Inher Metab Dis*. 1999;22:733–9.
59. Shimojo N, Miyauchi T, Iemitsu M, et al. Effects of medium-chain triglyceride (MCT) application to SHR on cardiac function, hypertrophy and expression of endothelin-1 mRNA and other genes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:S181–185.
60. Rupp H, Schulze W, Vetter R. Dietary medium-chain triglycerides can prevent changes in myosin and SR due to CPT-1 inhibition by etomoxir. *Am J Physiol*. 1995;269:R630–640.
61. Madden MC, Wolkowicz PE, Pohost GM, McMillin JB, Pike MM. Acylcarnitine accumulation does not correlate with reperfusion recovery in palmitate-perfused rat hearts. *Am J Physiol*. 1995;268:H2505–2512.
62. Finck BN, Han X, Courtois M, et al. A critical role for PPAR alpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1226–31.
63. Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the heart. *Curr Hypertens Rep*. 2005;7:412–7.
64. Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, et al. Carnitine palmitoyl transferase-I inhibition is not associated with cardiac hypertrophy in rats fed a high-fat diet. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:113–9.
65. Fox JE, Magga J, Giles WR, Light PE. Acyl coenzyme A esters differentially activate cardiac and beta-cell adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a side-chain length-specific manner. *Metabolism*. 2003;52:1313–9.
66. Yamada KA, Kanter EM, Newatia A. Long-chain acylcarnitine induces Ca²⁺ efflux from the sarcoplasmic reticulum. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:14–21.
67. Paradies G, Ruggiero FM. Enhanced activity of the tricarboxylate carrier and modification of lipids in hepatic mitochondria from hyperthyroid rats. *Arch Biochem Biophys*. 1990;278:425–30.
68. Lai JC, Liang BB, Jarvi EJ, Cooper AJ, Lu DR. Differential effects of fatty acyl coenzyme A derivatives on citrate synthase and glutamate dehydrogenase. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1993;82:331–8.
69. Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res*. 2003;11:734–44.
70. Wanten GJ, Calder PC. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:1171–84.
71. Miller GJ. Effects of diet composition on coagulation pathways. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:542–5.
72. Covington DK, Briscoe CA, Brown AJ, Jayawickreme CK. The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochem Soc Trans*. 2006;34:770–3.
73. Kostenis E. A glance at G-protein-coupled receptors for lipid mediators: a growing receptor family with remarkably diverse ligands. *Pharmacol Ther*. 2004;102:243–57.
74. Hill JO, Peters JC, Swift LL, et al. Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides. *J Lipid Res*. 1990;31:407–16.
75. Wollin SD, Wang Y, Kubow S, Jones PJ. Effects of a medium chain triglyceride oil mixture and alpha-lipoic acid diet on body composition, antioxidant status, and plasma lipid levels in the Golden Syrian hamster. *J Nutr Biochem*. 2004;15:402–10.
76. Buxton DB, Barron LL, Taylor MK, Olson MS. Regulatory effects of fatty acids on decarboxylation of leucine and 4-methyl-2-oxopentanoate in the perfused rat heart. *Biochem J*. 1984;221:593–9.
77. Paxton R, Harris RA. Regulation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Arch Biochem Biophys*. 1984; 231:48–57.
78. Kimball SR, Jefferson LS. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83:500S–7S.

ANNEXE 2

Publications et résumés de communications

PUBLICATIONS

MANUSCITS ACCEPTÉS :

Gélinas R, Thompson-Legault J, Bouchard B, Daneault C, Mansour A, Gillis MA, Charron G, Gavino V, Labarthe et DesRosiers C. ; Prolonged QT interval and lipid alterations beyond {beta}-oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 June 17

Lauzier B, Vaillant F, **Gélinas R**, Bouchard B, Brownsey R, Thorin E, Tardif JC et Christine Des Rosiers

Ivabradine reduces heart rate while preserving metabolic fluxes and energy status of healthy normoxic working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Mar;300(3):H845-52.

Ménard S., Croteau E., **Gélinas R.**, Ouellet R., van Lier J., Des Rosiers C., Lecomte R., Carpentier A.; Abnormal *in vivo* myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats; *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 May; ;298(5):E1049-57.

Khairallah RJ., Khairallah M., **Gélinas R.**, Bouchard B., Young ME., Allen BG., Lopaschuk GD., Deschepper CF., Des Rosiers C. Cyclic GMP signaling in cardiomyocytes modulates fatty acid trafficking and prevents triglyceride accumulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Aug;45(2):230-9.

Labarthe F., **Gélinas R.**, Des Rosiers C.; Medium-chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2008 Apr;22(2):97-106.

Gélinas R., Labarthe F., Bouchard B., McDuff J., Charron G., Young ME., Des Rosiers C.; Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPARalpha null mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Apr; 294(4):H1571-80.

MANUSCRITS EN PRÉPARATION :

Gélinas R, Bouchard B, Daneault C, Gillis MA, Labarthe et DesRosiers C. Mitochondrial allong chain fatty acid oxidation disorders : metabolic implications. 2012

Lauzier B., Bouchard B., Labarthe F., Robillard Frayne I., Thompson-Legault,

Gélinas R., Chatham JC., Des Rosiers C.; The metabolic effects of glutamine in the heart beyond anaplerosis: role of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). 2011

Vaillant F., Lauzier B., **Gélinas R.** Poirier I., Thorin E., Des Rosiers C., Metabolic and functional phenotyping of atherosclerotic mouse hearts. The difference is in the control strain! 2011

RÉSUMÉS DE COMMUNICATIONS

PRÉSENTATIONS ORALES :

Gélinas R., Daneault C., Bouchard B., Gillis MA., Labarthe F., Des Rosiers C. Mitochondrial alterations in VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) deficient mouse hearts Society for Vascular and Heart Metabolism 2011; Bruxelles, Belgique; 18-21 juin; 2011. Présentation orale.

Gélinas R., Bouchard B., Thompson Legault J., Daneault C., Robillard Frayne I., Gavino V., Charron G., Labarthe F., Des Rosiers C.; Altérations métaboliques inattendues dans les cœurs de souris déficients pour VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) : une approche lipidomique ciblée ; 12^{ième} Journée de la Recherche, Institut de Cardiologie de Montréal; Montréal, Québec, 4 juin 2009. Présentation orale.

Gélinas R., Bouchard B., Thompson Legault J., Daneault C., Robillard Frayne I., Gavino V., Charron G., Labarthe F., Des Rosiers C. Unexpected Metabolic Alterations in VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) Deficient Mouse Hearts; Experimental Biology 2009, New-Orleans, USA; 18-22 avril 2009. Présentation orale et par affiche. *FASEB J April 22, 2009 23:506.7*

Gélinas R., Bouchard B., McDuff J., Charron G., Des Rosiers C.; Metabolic alterations beyond fatty acid oxidation defects in PPAR α null mice hearts: effect of workload and fasting; Society for Vascular and Heart Metabolism 2007, Maastricht; the Netherlands; 18-20 juin, 2007. Présentation orale. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2007.

Gélinas R., Bouchard B., McDuff J., Charron G., Des Rosiers C.; Impact de la β -oxydation des acides gras sur la réponse du myocarde à une augmentation de la précharge et à un jeûne. 10^{ième} Journée de la Recherche, ICM; Montréal, Québec, 31 mai; 2007. Présentation orale.

PRÉSENTATION PAR AFFICHE (résumés publiés) :

Gélinas R., Bouchard B., Thompson Legault J., Daneault C., Labarthe F., Des Rosiers C. Very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) null Mouse Hearts Display Prolonged QTc interval and Low Docosahexaenoic acid levels; Experimental Biology 2011, Washington DC, USA; 9-13 avril 2011. Présentation par affiche. *FASEB J March 17, 2011 25:722.3.*

Gélinas R., Bouchard B., Thompson Legault J., Daneault C., Robillard Frayne I., Gavino V., Charron G., Labarthe F., Des Rosiers C. Unexpected Metabolic Alterations in VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) Deficient Mouse Hearts: From Gene Expression to Substrate Fluxes; International Society for Heart Research North American section Meeting 2009, Baltimore, USA; 26-29 mai; 2009. Présentation par affiche. *JMCC.*

Gélinas R., Bouchard B., Charron G., Labarthe F., Des Rosiers C. Impaired Anaplerosis in VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) Deficient Mouse Hearts; Experimental Biology 2009, New-Orleans, USA; 18-22 avril 2009. Présentation par affiche. *FASEB J April 22, 2009 23:506.9.*

Gélinas R., Bouchard B., McDuff J., Charron G., Des Rosiers C.; Metabolic alterations beyond fatty acid oxidation defects in PPAR α null mice hearts: effect of workload and fasting; International Society for Heart Research 2007, Bologna, Italy; 21-25 juin; 2007. Présentation par affiche. *JMCC*, vol 42, supp 1; Juin 2007

Gélinas R., Bouchard B., McDuff J., Charron G., Des Rosiers C.; Metabolic alterations beyond fatty acid oxidation defects in PPAR α null mice hearts. Experimental Biology 2007, Washington D.C., USA; 28 avril- 2 mai; 2007. Présentation par affiche. *FASEB J April 18, 2007 21:A1376*

Gélinas R., Bouchard B., Des Rosiers C., A study of anaplerosis and citric acid cycle in perfused working hearts from peroxisomal proliferator activated receptor α null mice. Society for Vascular and Heart Metabolism; Semiamhoo, Washington State; 6-9 septembre; 2006. Présentation par affiche. Cardiovascular Drugs and Therapy, 20(6); décembre 2006.

