

Université de Montréal

**L'application de la métabolomique à la découverte
de nouveaux biomarqueurs chez les patients
atteints d'acidose lactique**

par

Julie Thompson Legault

Département de nutrition

Faculté de Médecine

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

Avril, 2013

© Julie Thompson Legault, 2013

Résumé

L'acidose lactique du Saguenay-Lac-St-Jean, ou syndrome de Leigh de forme canadienne-française (LSFC), est une maladie mitochondriale neurodégénérative causée par des mutations du gène LRPPRC et caractérisée par des crises d'acidose menant au décès en bas âge. On ne comprend pas encore les causes exactes de ces crises, et aucun traitement n'est actuellement disponible. L'objectif de cette étude a été de comparer le profil des métabolites sanguins et urinaires chez des sujets LSFC et des témoins, avant et après un repas, par une approche métabolomique ciblée. Le projet s'inscrit dans une démarche à long terme visant l'identification de biomarqueurs prédictifs des crises, permettant d'intervenir plus rapidement afin d'éviter le décès.

Les échantillons biologiques ont été prélevés chez 9 sujets atteints du LSFC et 9 témoins appariés, à jeun et 90 minutes après un repas standardisé. Les analyses incluent un bilan biochimique et hormonal, un profil des acides aminés, des acides gras, des acides organiques et des acylcarnitines.

Les métabolites significativement modifiés chez les patients peuvent être classés en deux catégories : (i) le reflet d'une dysfonction mitochondriale, et plus particulièrement de l'accumulation d'équivalents réduits en amont de la chaîne respiratoire, et (ii) des indices de risque cardiométabolique, qui s'observent davantage chez les patients adultes malgré leur jeune âge.

Ainsi, il serait intéressant d'inclure au traitement des stratégies visant la diminution des facteurs de risque cardiométabolique, notamment par une modification des habitudes de vie. Notre étude démontre la pertinence d'avoir recours à la métabolomique dans l'étude des désordres de la phosphorylation oxydative.

Mots-clés : LSFC, LRPPRC, acidose lactique, mitochondrie, cytochrome c oxydase, métabolomique, acides aminés, acides gras, acides organiques, acylcarnitines.

Abstract

Leigh syndrome French Canadian variant (LSFC) is a neurodegenerative mitochondrial disorder caused by mutations in LRPPRC gene and characterized by lactic acidosis crises leading to early death. Factors that trigger these crises are not well understood, and no treatment is currently available. The aim of this study was to compare blood and urine metabolic profiles in LSFC patients and controls, before and after a meal, using a targeted metabolomic approach. The project constitutes a first step in our long-term goal of identifying biomarkers that could predict crises in LSFC patients, allowing faster intervention to avoid death.

Biological samples were collected in 9 LSFC patients and 9 matched controls, in fasting condition and 90 minutes after a standardized meal. Analyzes include biochemical and hormonal assays, profiles of amino acids, fatty acids, organic acids and acylcarnitines.

Metabolites significantly modified in LSFC patients can be classified in two categories: (i) markers of mitochondrial dysfunction, and particularly accumulation of reduced equivalents upstream of the respiratory chain, and (ii) indicators of cardiometabolic risk, observed prominently in adult patients despite their young age.

Thus, it would be of interest to include strategies aimed at lowering cardiometabolic risk factors in the treatment of these patients, especially by lifestyle modification. Our study shows the relevance of using metabolomics in the study of oxidative phosphorylation disorders.

Keywords : LSFC, LRPPRC, lactic acidosis, mitochondria, cytochrome c oxidase, metabolomics, amino acids, fatty acids, organic acids, acylcarnitines.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et des abréviations	ix
Remerciements.....	xii
Introduction	1
1. La mitochondrie	2
1.1. Survol du catabolisme des nutriments	2
1.2. Glucides.....	3
1.3. Lipides	4
1.4. Protéines.....	5
1.5. Cycle de l'acide citrique	6
1.6. Phosphorylation oxydative.....	7
1.6.1. <i>Cytochrome c oxydase</i>	8
2. Désordres de la phosphorylation oxydative	9
2.1. Étiologie et signes cliniques	9
2.2. Pathologies d'intérêt	12
2.2.1. <i>Déficience en cytochrome c oxydase</i>	12
2.2.2. <i>Syndrome de Leigh classique</i>	13
2.2.3. <i>Syndrome de Leigh de forme canadienne-française</i>	14
2.2.3.1. <i>Description</i>	14
2.2.3.2. <i>LRPPRC</i>	17
2.3. Conséquences métaboliques	22
2.4. Traitements.....	25
2.5. La nécessité de biomarqueurs.....	27
3. La métabolomique	28
3.1. Description générale	28
3.2. Applications en nutrition.....	29
3.3. Approches et appareils de mesure.....	30
4. Objectif, hypothèse et approche expérimentale	32

Matériel et méthodes	33
1. Étude pilote : principe général.....	33
2. Étude principale : principe général.....	33
3. Repas standardisé.....	34
4. Prélèvement des échantillons.....	36
5. Génotypage.....	38
6. Analyse des métabolites.....	40
6.1. Bilan biochimique.....	40
6.2. Bilan hormonal.....	40
6.3. Acides aminés.....	41
6.4. Acides gras.....	42
6.5. Acides organiques.....	44
6.6. Acylcarnitines.....	45
7. Analyses statistiques.....	46
7.1. Analyses par permutation.....	46
7.2. Analyses de composantes principales.....	47
Résultats	49
1. Étude pilote.....	49
2. Étude principale.....	55
2.1. Caractéristiques des sujets.....	55
2.2. Contrôle qualité des données métaboliques et analyses par permutation.....	56
2.3. Analyses univariées des données métaboliques.....	58
2.3.1. <i>Bilan biochimique</i>	58
2.3.2. <i>Bilan hormonal</i>	59
2.3.3. <i>Acides aminés</i>	60
2.3.4. <i>Acides gras</i>	61
2.3.5. <i>Acides organiques</i>	63
2.3.5.1. <i>Plasma</i>	63
2.3.5.2. <i>Urine</i>	64
2.3.6. <i>Acylcarnitines</i>	65
2.4. Analyses de composantes principales.....	66
2.5. Signature métabolique.....	70
2.5.1. <i>Métabolisme cytosolique</i>	71
2.5.2. <i>Métabolisme mitochondrial</i>	72
2.5.2.1. <i>Reflète de l'état rédox</i>	72
2.5.2.2. <i>Cycle de l'acide citrique</i>	73

2.5.2.3. <i>Oxydation des acides gras</i>	74
2.5.3. <i>Risque cardiométabolique</i>	75
2.5.4. <i>Changements métaboliques individuels chez les patients</i>	76
Discussion	79
1. Étude pilote	79
2. Étude principale	82
2.1. Résumé global	82
2.2. Considérations conceptuelles	83
2.2.1. <i>Signature métabolique</i>	83
2.2.1.1. <i>Dysfonction mitochondriale</i>	84
2.2.1.2. <i>Risque cardiométabolique</i>	88
2.2.2. <i>Effet du smoothie</i>	92
2.3. Considérations méthodologiques	94
2.3.1. <i>Devis expérimental</i>	94
2.3.2. <i>Approche statistique</i>	95
2.3.3. <i>Approche métabolomique</i>	97
2.4. Perspectives	97
Conclusion	101
Bibliographie	102
Annexe	i

Liste des tableaux

Tableau I : Manifestations cliniques des désordres de la phosphorylation oxydative	10
Tableau II : Valeur nutritive du smoothie.....	35
Tableau III : Composition du smoothie en acides aminés et acides gras.....	36
Tableau IV : Acides gras mesurés et standards utilisés pour la quantification.....	44
Tableau V : Acides organiques mesurés	45
Tableau VI : Acylcarnitines mesurés	46
Tableau VII : Caractéristiques des sujets de l'étude pilote.....	49
Tableau VIII : Variation interindividuelle dans les profils métaboliques de l'étude pilote.....	50
Tableau IX : Tendances postprandiales observées dans les profils métaboliques	52
Tableau X : Caractéristiques des sujets de l'étude principale.....	56
Tableau XI : Bilan biochimique.....	59
Tableau XII : Bilan hormonal	59
Tableau XIII : Profil d'acides aminés.....	60
Tableau XIV : Profil d'acides gras	62
Tableau XV : Profil d'acides organiques plasmatiques.....	64
Tableau XVI : Profil d'acides organiques urinaires	65
Tableau XVII : Profil d'acylcarnitines	66
Tableau XVIII : Classement des métabolites modifiés en deux signatures métaboliques	84
Tableau XIX : Caractéristiques détaillées des sujets de l'étude principale	i

Liste des figures

Figure 1 : Vue d'ensemble du catabolisme des nutriments	3
Figure 2 : Système de navette de la carnitine palmitoyltransférase.....	4
Figure 3 : La β -oxydation mitochondriale	5
Figure 4 : Cycle de l'acide citrique.....	6
Figure 5 : La phosphorylation oxydative	7
Figure 6 : Conséquences métaboliques des désordres de la phosphorylation oxydative.....	22
Figure 7 : Protocole de prélèvement à jeun schématisé.....	37
Figure 8 : Réponse métabolique globale de chaque sujet de l'étude pilote	51
Figure 9 : Effet de la consommation du smoothie sur la concentration d'acides gras totaux des 4 sujets de l'étude pilote	53
Figure 10 : Analyse des composantes principales des données de l'étude pilote.....	54
Figure 11 : Démarche utilisée pour déterminer le seuil de significativité des analyses par permutation	57
Figure 12 : Corrélation de Pearson entre les niveaux de triglycérides et les acides gras totaux à jeun.....	61
Figure 13 : Analyse des composantes principales sur les données du prélèvement à jeun	68
Figure 14 : Analyse des composantes principales sur les données du prélèvement postprandial	69
Figure 15 : Analyse des composantes principales sur les données à jeun et en postprandial...	70
Figure 16 : Changements observés dans le métabolisme cytosolique	71
Figure 17 : Changements observés dans les métabolites qui reflètent l'état rédox mitochondrial	73
Figure 18 : Changements observés dans les métabolites reliés au cycle de l'acide citrique	74
Figure 19 : Changements observés dans certains métabolites reliés à l'oxydation des acides gras.....	75
Figure 20 : Changements observés dans certains composés reliés au risque cardiométabolique	76

Figure 21 : Représentation de type <i>heatmap</i> des métabolites modifiés chez les patients pour le prélèvement à jeun	78
Figure 22 : Schéma mécanistique des changements métaboliques observés chez les patients LSFC	86
Figure 23 : Représentation des métabolites statistiquement différents sur l'analyse des composantes principales du prélèvement à jeun	96

Liste des sigles et des abréviations

AcAc : acide acétoacétique; acétoacétate

ADNmt : ADN mitochondrial

ADP : adénosine diphosphate

AGCL : acide gras à chaîne longue

AGPI : acides gras polyinsaturés

AGS : acides gras saturés

ALT : alanine aminotransférase

AMPK : protéine kinase activée par l'AMP

ANREF : apports nutritionnels de référence

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

AST : aspartate aminotransférase

ATP : adénosine triphosphate

BCKDH : complexe de la déshydrogénase des cétoacides à chaîne ramifiée

BHT : hydroxytoluène butylé

BEE : besoin énergétique estimé

CAC : cycle de l'acide citrique

CAT : carnitine acyltransférase

CC : chaîne courte

CG-SM : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CL : chaîne longue

CL-SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

CL-SM-SM : CL-SM en tandem

CM : chaîne moyenne

CoA : coenzyme A

COX : cytochrome c oxydase

COX I : sous-unité I de la COX

COX II : sous-unité II de la COX
COX III : sous-unité III de la COX
CPT : carnitine palmitoyltransférase
CV : coefficient de variation
Cyt c : cytochrome c
DGLA : acide dihomog- γ -linoléique
FADH₂ : flavine adénine dinucléotide
GDP : guanosine diphosphate
GTP : guanosine triphosphate
HbA1c : hémoglobine glyquée
IMC : indice de masse corporelle
L2HGDH : L-2-hydroxyglutarate déshydrogénase
LRPPRC : *leucine-rich pentatricopeptide motif-containing protein*
LSFC : syndrome de Leigh de forme canadienne-française
MELAS : syndrome de myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique et pseudo-épisodes vasculaires cérébraux
MTBE : méthyl-tert-butyl éther
MtBSTFA : N-méthyl-N-T-butyldiméthylsilyl trifluoroacétamide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NAP : niveau d'activité physique
NF κ -B : facteur nucléaire κ -B
PCA : analyse des composantes principales
PGC-1 α : coactivateur 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
Pi : phosphate inorganique
PDH : pyruvate déshydrogénase
PPAR : récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
PPR : pentatricopeptide
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SLIRP : *SRA-stem loop interacting RNA-binding protein*
SLSJ : Saguenay-Lac-Saint-Jean
TBMCS : T-butyldiméthyl-chlorosilane

TNF- α : facteur de nécrose tumorale- α

UCP1 : protéine découplante 1

$\Delta\psi$: potentiel de membrane

2-CG : 2-cétoglutarate

2-OHG : 2-hydroxyglutarate

3-HB : acide 3-hydroxybutyrique; 3-hydroxybutyrate

3-HB/AcAc : ratio hydroxybutyrate/acétoacétate

Remerciements

Je désire exprimer mes sincères remerciements à Dre Christine Des Rosiers pour m'avoir confié la responsabilité de ce projet unique et passionnant. Son attitude toujours positive m'a aidé à cheminer tant sur le plan professionnel que personnel depuis les trois dernières années. Merci également à Roselle Gélinas pour m'avoir transmis sa passion contagieuse pour la recherche alors que j'étais au tout début de mon cursus universitaire.

Ce projet n'aurait été rendu possible sans la collaboration des patients atteints de l'acidose lactique et de leur famille. Merci pour votre confiance et pour m'avoir fait réaliser que travailler en recherche, c'est aussi semer des étincelles d'espoir.

Merci à l'équipe de Chicoutimi : Chantale Aubut, Jeannine Landry, Julie Duval, Vanessa Tremblay-Vaillancourt et Jessica Tardif pour leur implication dans le recrutement et le prélèvement des échantillons. Merci à Caroline Daneault et Isabelle Robillard Frayne pour leur participation aux analyses par CG-SM, ainsi qu'aux autres membres de mon laboratoire : Marie-Eve Rivard, Dominic Lachance, Matthieu Ruiz, Bertrand Bouchard, Anik Forest, Sarah Cherkaoui, Lise Coderre et Yvette Mukaneza pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans une atmosphère aussi agréable et conviviale. Merci à Gabrielle Boucher, Annie Tardif, Denis Cyr et Paula Waters pour leur collaboration dans les diverses analyses. Merci également à tous les membres du Consortium de l'acidose lactique pour leur support et leurs conseils. Ce fut un plaisir de travailler avec vous tous.

Merci du fond du cœur à mes parents Ann et Robert, ainsi qu'à mon copain Kenny. L'intérêt que vous avez porté à mon projet a su nourrir ma motivation, et votre soutien m'a été très précieux tout au long de cette belle aventure.

Enfin, merci aux organismes subventionnaires qui ont soutenu mes travaux : le FRSQ, la Fondation GO, CORAMH, la Faculté de médecine, le département de nutrition et la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal.

Introduction

Les maladies mitochondriales constituent un important groupe de troubles du métabolisme énergétique. La plupart d'entre elles affectent la chaîne de transport d'électrons [1,2]. De ce fait, les désordres de la phosphorylation oxydative sont parmi les maladies métaboliques héréditaires les plus fréquentes, avec une prévalence d'environ 1/5000 [3]. Il y a une grande hétérogénéité dans la présentation de ces maladies. Plusieurs mutations peuvent mener au même phénotype, et inversement, une mutation identique peut causer des symptômes différents parmi les individus atteints. Les désordres de la chaîne de transport affectent principalement les tissus et les organes ayant une demande énergétique élevée et dont le fonctionnement repose surtout sur le métabolisme oxydatif [4,5,6]. Le système nerveux est souvent le plus affecté, entraînant dans la plupart des cas une neurodégénérescence et un décès en bas âge [7]. Malgré une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de ces pathologies, l'approche thérapeutique demeure encore inadéquate [8]. Le développement de traitements repose notamment sur une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent les altérations du métabolisme des sujets atteints.

Au Québec, plus précisément dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean (SLSJ), on retrouve un désordre de la phosphorylation oxydative particulier, le syndrome de Leigh de forme canadienne-française (LSFC), aussi communément appelé l'acidose lactique du SLSJ. Le but de la présente étude a été d'identifier des altérations métaboliques à jeun et après un repas chez des patients atteints de cette maladie. Le projet constitue un premier pas vers un objectif à long terme consistant à identifier des biomarqueurs circulants prédictifs des crises d'acidose menant souvent au décès de ces patients. Dans cette optique, un bref rappel du métabolisme des nutriments sera présenté, suivi d'un survol des désordres de la phosphorylation oxydative et des connaissances accumulées à ce jour sur le LSFC. L'approche analytique utilisée, la métabolomique, sera également abordée afin de faciliter l'interprétation des résultats.

1. La mitochondrie

Les mitochondries sont des organites dont le nombre varie en fonction du métabolisme énergétique des différents tissus [9]. La mitochondrie est dotée de deux membranes, une externe et une interne, formant ainsi deux compartiments : la matrice et l'espace intermembranaire. La membrane externe est perméable à la plupart des ions et petites molécules, alors que la membrane interne y est imperméable. De nombreux systèmes de navette sont nécessaires pour le transport des métabolites à travers cette dernière [10].

La mitochondrie constitue la centrale énergétique de la cellule : elle permet la production d'énergie, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), à partir de l'oxydation des nutriments de l'alimentation (glucides, lipides et protéines). Elle joue également des rôles très importants dans l'homéostasie du calcium, la régulation de la mort cellulaire et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [2,11].

1.1. Survol du catabolisme des nutriments

L'ensemble des réactions menant à la production d'énergie à partir de l'oxydation des nutriments de l'alimentation est regroupé sous le terme général du catabolisme. Plusieurs voies métaboliques sont impliquées dans ce processus. Toutefois, l'oxydation complète des nutriments nécessite deux voies finales communes, soit le cycle de l'acide citrique (CAC) et la phosphorylation oxydative (sections 1.5 et 1.6), qui ont respectivement lieu dans la matrice et la membrane mitochondriale interne [10,12] (figure 1, p. 3).

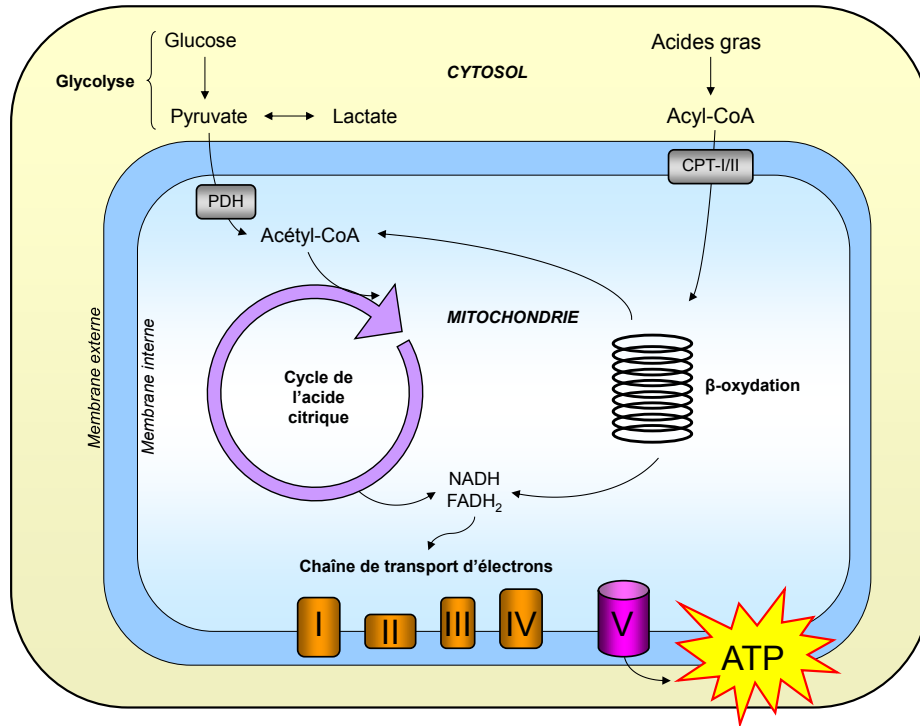


Figure 1 : Vue d'ensemble du catabolisme des nutriments. L'oxydation du glucose et des acides gras produit de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de l'acide citrique. La β -oxydation et le cycle de l'acide citrique fournissent des équivalents réduits à la chaîne respiratoire, menant à la production d'énergie sous forme d'ATP. Adaptée de [8]. ATP : adénosine triphosphate; CPT : carnitine palmitoyltransférase; $FADH_2$: flavine adénine dinucléotide; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide; PDH : pyruvate déshydrogénase.

1.2. Glucides

Le catabolisme des glucides commence par leur dégradation en glucose et autres sucres simples [10]. La glycolyse, par une succession de réactions enzymatiques s'effectuant dans le cytosol, transforme une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, en plus de produire deux molécules d'ATP et deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) [12]. Le fructose et le galactose entrent dans la glycolyse à des étapes intermédiaires, menant aux mêmes produits que l'oxydation du glucose.

Le pyruvate formé lors de la glycolyse peut ensuite entrer dans la mitochondrie (condition aérobie) ou être transformé en lactate (condition anaérobie). En condition

aérobie, le pyruvate sera transformé en acétyl-CoA par le complexe multienzymatique de la pyruvate déshydrogénase (PDH) [13]. Cette réaction produit une molécule de NADH. En condition d'oxygène limité, le pyruvate est plutôt transformé en lactate, qui peut ensuite être transformé en glucose par les cellules hépatiques [12]. Lorsque l'oxygène redevient disponible, le lactate peut être converti en pyruvate, puis transformé en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA entre ensuite dans le CAC.

1.3. Lipides

Les lipides alimentaires, principalement composés de triglycérides, sont dégradés en acides gras et en glycérol [10]. Les acides gras à chaîne longue, principaux acides gras retrouvés dans la diète, sont d'abord captés par des protéines qui effectuent leur transport jusque dans le cytoplasme. Ils sont ensuite transformés en acyl-CoA par une enzyme, l'acyl-CoA synthétase. Afin d'outrepasser l'imperméabilité de la membrane mitochondriale, les acyl-CoA formés utilisent le système de la carnitine palmitoyltransférase (CPT), qui comprend entre autres les protéines de transfert CPT I et II (figure 2, p. 4). La première enzyme catalyse la réaction entre l'acyl-CoA et la carnitine, menant à la formation d'acylcarnitine; la seconde enzyme retourne ensuite l'acylcarnitine sous forme d'acyl-CoA qui pourra entrer dans la β -oxydation [14].

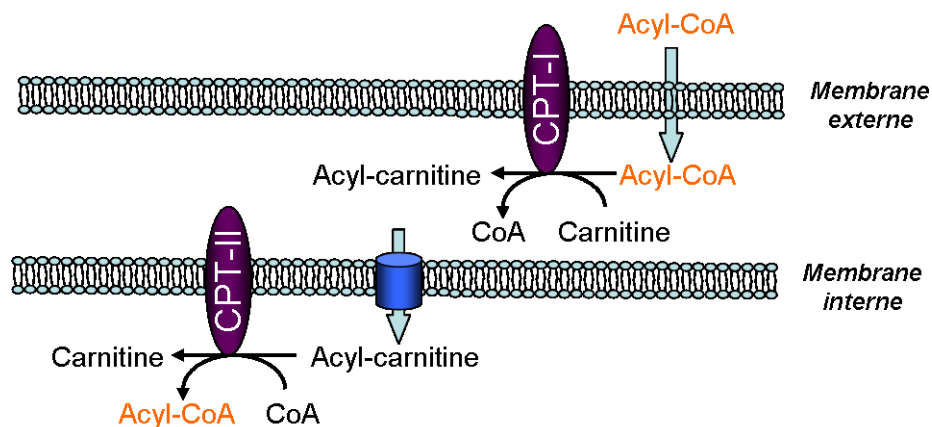


Figure 2 : Système de navette de la carnitine palmitoyltransférase. Ce processus permet le transport des acides gras à travers la double membrane mitochondriale. Adaptée de [15]. CoA : coenzyme A; CPT : carnitine palmitoyltransférase.

La β -oxydation mitochondriale peut être représentée comme une spirale impliquant quatre réactions enzymatiques distinctes : une déshydrogénation, une hydratation, une autre déshydrogénation et enfin un clivage thiolitique (figure 3, p. 5). Chaque tour de cycle de β -oxydation raccourcit l'acyl-CoA de 2 carbones et produit une molécule de NADH, une molécule de flavine adénine dinucléotide ($FADH_2$) et une molécule d'acétyl-CoA qui pourra entrer dans le CAC. L'acyl-CoA réduit de deux carbones retournera quant à lui dans la β -oxydation pour effectuer un autre cycle; ce processus se répètera jusqu'à sa dégradation complète [10,16].

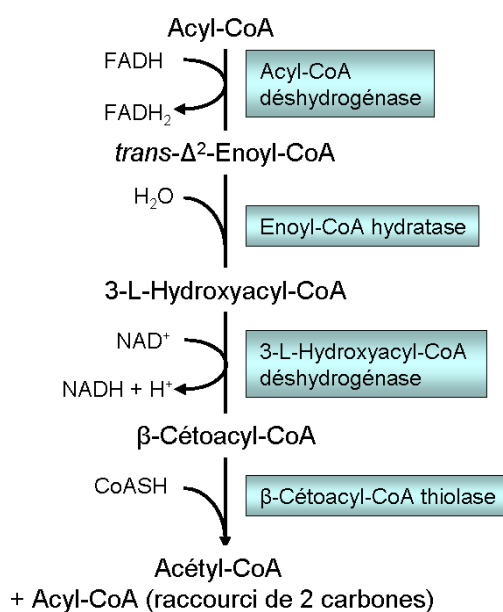


Figure 3 : La β -oxydation mitochondriale. Adaptée de [13]. CoA/CoASH : coenzyme A; FAD : flavine adénine dinucléotide; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide.

1.4. Protéines

Les protéines alimentaires sont dégradées en acides aminés par des enzymes protéolytiques [10]. Le groupement aminé est d'abord clivé (désamination), puis converti en urée qui pourra être excrétée par les reins [12]. Selon la nature de l'acide aminé dont il est issu, le squelette carboné restant est transformé en intermédiaire métabolique comme le pyruvate, l'acétyl-CoA, l'acétoacétyl-CoA ou encore en intermédiaire du CAC [10]. Il est à noter que la fonction principale des acides aminés n'est pas la production d'énergie, mais

plutôt de servir d'élément de base pour la synthèse des protéines et des composés azotés [12]. Toutefois, dans certaines conditions, notamment le jeûne, les acides aminés peuvent être transformés en glucose et utilisés comme source d'énergie via la néoglucogenèse.

1.5. Cycle de l'acide citrique

Le CAC, ou cycle de Krebs, consiste en une série de huit réactions enzymatiques ayant lieu dans la mitochondrie. Chaque tour de cycle permet l'oxydation d'une molécule d'acétyl-CoA provenant de la dégradation du glucose, des acides gras ou des acides aminés. Le cycle produit également deux molécules de CO₂, trois molécules de NADH, une molécule de FADH₂ et une molécule de guanosine triphosphate (GTP) [12,13] (figure 4, p. 6). Les équivalents réduits (NADH et FADH₂) générés par le cycle seront ensuite utilisés par la chaîne respiratoire pour créer de l'ATP.

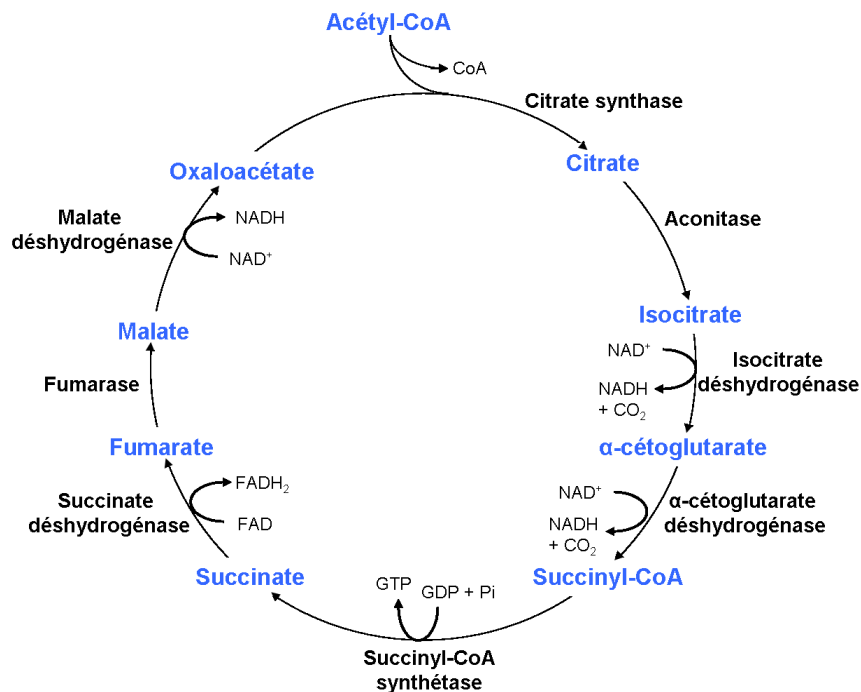


Figure 4 : Cycle de l'acide citrique. Adaptée de [13]. CoA : coenzyme A; FAD : flavine adénine dinucléotide; GDP : guanosine diphosphate; GTP : guanosine triphosphate; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide; Pi : phosphate inorganique.

1.6. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative, appelée aussi chaîne respiratoire ou chaîne de transport d'électrons, est une étape clé du métabolisme des nutriments. Elle produit plus de 90% de l'ATP de la cellule, ce qui en fait la principale source d'énergie des organismes aérobies [10]. Le système comprend cinq complexes enzymatiques (I à V) et deux transporteurs d'électrons, soit le coenzyme Q et le cytochrome c (figure 5, p. 7). Les complexes respiratoires sont constitués de sous-unités qui sont codées à la fois par le génome nucléaire et le génome mitochondrial, à l'exception du complexe II qui est entièrement codé par l'ADN nucléaire [17].

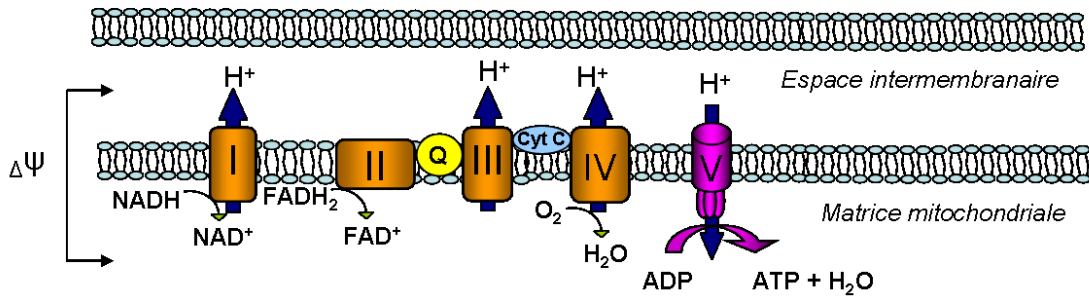


Figure 5 : La phosphorylation oxydative. Adaptée de [18]. Cyt c : cytochrome c; FAD : flavine adénine dinucléotide; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide; Q : coenzyme Q; $\Delta\Psi$: potentiel de membrane.

Le NADH et le FADH₂ produits par le CAC et la β -oxydation entrent respectivement au niveau du complexe I (NADH:ubiquinone oxydoréductase) et II (succinate déshydrogénase). Les électrons sont ensuite transférés au coenzyme Q, puis au complexe III (ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase). Le cytochrome c permet le transfert des électrons entre les complexes III et IV. Une fois au complexe IV (cytochrome c oxydase; COX), les électrons sont transférés à l'oxygène moléculaire pour produire de l'eau [17]. Durant le transport des électrons, les complexes I, et III et IV pompent des protons (H⁺) de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui crée une force protomotrice constituée par un gradient de pH et un potentiel de membrane. Ce gradient électrochimique est ensuite utilisé par le

complexe V (ATP synthétase) afin de produire de l'ATP grâce à l'afflux de protons qui retournent dans la matrice [10].

1.6.1. Cytochrome c oxydase

La COX, ou complexe IV de la chaîne respiratoire, est composée de 13 sous-unités, dont 10 sont codées par l'ADN nucléaire et 3 par l'ADN mitochondrial (ADNmt) [19]. Deux sous-unités nucléaires (VIa et VIIa) existent en deux isoformes, soit H (*heart*) et L (*liver*), qui diffèrent de par leur séquence et leur patron d'expression. Le cœur et le muscle squelettique expriment l'isoforme H, tandis que plusieurs autres tissus, dont le foie et le cerveau, expriment l'isoforme L [19]. Le noyau catalytique de la COX est formé des trois sous-unités codées par l'ADNmt (COX I, II et III). COX I et COX II possèdent deux sites de liaison pour le cuivre (Cu_A et Cu_B) et deux hèmes (α et α_3) [19,4]. Afin de répondre à la demande énergétique de la cellule, l'activité de la COX est régulée par plusieurs éléments, dont certaines hormones, des lipides membranaires et des seconds messagers. Son activité est également modulée par le ratio ATP/ADP, la concentration en oxygène de même que par la phosphorylation des différentes sous-unités [17,20].

L'assemblage des sous-unités de la COX en un complexe enzymatique fonctionnel est un processus qui n'est pas encore complètement élucidé [4]. Celui-ci requiert la participation de plusieurs protéines auxiliaires, dont COX10, COX15, COX17, SCO1, SCO2 et SURF1 [4,17]. COX10 et COX15 seraient nécessaires pour la biosynthèse de l'hème α , tandis que COX17, SCO1 et SCO2 ont été identifiées comme des protéines chaperonnes pour le cuivre [4,17]. Le rôle exact de SURF1 reste encore à déterminer, mais on croit qu'il serait impliqué dans les premières étapes d'assemblage de COX [4,17]. Plus d'une trentaine de protéines auxiliaires codées par le génome nucléaire ont pu être identifiées grâce à des études chez la levure [17]. Les recherches actuelles laissent d'ailleurs supposer que d'autres facteurs d'assemblage pourraient bientôt être découverts.

2. Désordres de la phosphorylation oxydative

2.1. Étiologie et signes cliniques

Considérant le rôle prépondérant des mitochondries dans la production d'énergie, de même que pour d'autres processus biologiques, notamment l'apoptose, il va sans dire qu'un mauvais fonctionnement des mitochondries aura des conséquences importantes, qui seront discutées plus loin. Bien que la majorité des maladies mitochondriales soient causées par des mutations qui affectent la chaîne de transport d'électrons, elles peuvent également être causées par d'autres phénomènes, notamment une mauvaise importation des protéines dans la mitochondrie, ou encore par une altération de la dynamique mitochondriale (ex : motilité, fusion, fission) [1,2].

Dans plusieurs cas, les désordres de la phosphorylation oxydative entraînent une neurodégénérescence menant au décès en bas âge [7]. Outre le système nerveux, les structures anatomiques les plus affectées sont le muscle squelettique, le cœur, le système endocrinien et les reins [21]. Les manifestations cliniques peuvent aussi inclure d'autres systèmes, comme le démontre le tableau I (p. 10).

Tableau I : Manifestations cliniques des désordres de la phosphorylation oxydative

Structure affectée	Manifestations cliniques
Système nerveux	Système nerveux central : retard de développement, retard mental, démence, ataxie, pseudo-épisodes vasculaires cérébraux, épilepsie, troubles mentaux Système nerveux périphérique : neuropathie
Muscle	Faiblesse musculaire, hypotonie, myalgie, intolérance à l'exercice, myopathie proximale
Coeur	Cardiomyopathie hypertrophique, troubles du rythme, insuffisance cardiaque
Système endocrinien	Nanisme, diabète, troubles de la glande thyroïde et de la parathyroïde, dysfonction pancréatique exocrine
Reins	Tubulopathie proximale, glomérulonéphrite, insuffisance rénale
Foie	Insuffisance hépatique, stéatose
Tractus gastro-intestinal	Vomissements récurrents, diarrhée chronique, dysmotilité gastro-intestinale, insuffisance pancréatique
Système hématopoïétique	Anémie, neutropénie, thrombopénie, leucopénie
Yeux	Rétinopathie pigmentaire, atrophie optique, ophtalmoplégie, cataractes, glaucome, cécité
Oreilles	Surdité neurosensorielle

Informations tirées de [22,2,6,23,21,24]

Les désordres de la phosphorylation oxydative peuvent être causés par des mutations du génome mitochondrial ou nucléaire. On estime que 10 à 15% de ces pathologies seraient causées par des mutations de l'ADNmt, le reste résultant de mutations de l'ADN nucléaire [2,6]. Les deux types de mutations sont soumis à des principes génétiques différents.

Chez l'humain, l'ADNmt est constitué d'un double brin circulaire comportant $16,5 \times 10^3$ paires de bases. Il contient 37 gènes, dont 13 codent pour des protéines de la chaîne respiratoire, 22 codent pour des ARN de transfert (ARNt) et deux pour des ARN ribosomiques (ARNr). Les mutations de l'ADNmt sont transmises de façon exclusivement maternelles [2]. Contrairement à l'ADN nucléaire qui contient deux copies, entre deux et dix copies d'ADNmt

sont présentes dans chaque mitochondrie. Ainsi, dépendamment du nombre de mitochondries qu'elle contient, une cellule peut contenir plusieurs centaines, voire milliers, de copies d'ADNmt [21]. En absence de mutation, toutes les copies d'ADNmt sont identiques (homoplasmie). Toutefois, le génome mitochondrial possède un taux de mutation élevé, et cela peut mener à la coexistence d'ADNmt normal et muté au sein d'une même cellule ou d'un même organe, phénomène qu'on nomme hétéroplasmie [22]. Lorsque la quantité d'ADNmt muté dépasse 80-90% [1], l'ADNmt normal ne peut plus compenser l'effet de la mutation (effet de seuil), d'où l'apparition d'une dysfonction mitochondriale. Les symptômes de cette dysfonction sont très variés, et dépendent notamment de la pathogénicité de la mutation en cause, du gène affecté, de la charge mutationnelle, de sa distribution de même que de la demande énergétique de chaque tissu [22,2]. Le diagnostic des maladies mitochondriales est donc complexe et nécessite une investigation poussée comprenant plusieurs tests cliniques, biochimiques et génétiques.

Les mutations de l'ADN nucléaire associées à des désordres de la phosphorylation oxydative respectent la transmission mendélienne [2]. Elles peuvent affecter les sous-unités structurales des complexes de la chaîne de transport; des mutations de ce type ont le plus fréquemment été rapportées pour les complexes I et II. Toutefois, la plupart des mutations découvertes jusqu'à maintenant affectent plutôt des gènes codant pour des protéines auxiliaires nécessaires à l'assemblage des différentes sous-unités des complexes de la chaîne [2,1,25]. Plusieurs de ces mutations ont été rapportées pour le complexe IV [17] et seront discutées plus loin.

Par ailleurs, il est à noter que la dysfonction mitochondriale n'est pas exclusive aux désordres de la phosphorylation oxydative. En effet, une altération de la fonction mitochondriale a également été démontrée dans plusieurs autres conditions pathologiques, notamment dans la résistance à l'insuline [26] et les maladies neurodégénératives telles le Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique et l'Alzheimer. Une perturbation du fonctionnement de la mitochondrie est aussi proposée comme phénomène physiologique se produisant lors du vieillissement [2,1].

2.2. Pathologies d'intérêt

Le désordre sur lequel porte la présente étude, le LSFC, est un type particulier du syndrome de Leigh caractérisé par une déficience en COX; afin de permettre une meilleure compréhension de cette pathologie, une description générale des déficiences en COX et du syndrome de Leigh classique est d'abord présentée.

2.2.1. Déficience en cytochrome c oxydase

Les déficiences héréditaires en COX sont des désordres génétiques encore mal compris, et dont plusieurs formes cliniques et biochimiques ont été décrites chez l'humain [27]. Les mutations à l'origine de cette déficience peuvent provenir du génome mitochondrial ou nucléaire; les symptômes sont très diversifiés, et les individus atteints décèdent souvent en bas âge [17]. À l'instar de la plupart des désordres de la chaîne de transport, les tissus les plus touchés lors d'une déficience en COX sont ceux ayant une demande énergétique élevée, comme le cerveau, le muscle et le cœur [20]. Les mutations du génome mitochondrial affectent les sous-unités catalytiques de l'enzyme; leurs manifestations cliniques incluent notamment une myopathie, une encéphalomyopathie, un syndrome MELAS (myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique et pseudo-épisodes vasculaires cérébraux) et parfois des symptômes ressemblant au syndrome de Leigh classique (voir section suivante) [17]. La sévérité de la déficience peut varier selon le tissu et serait dépendante de la charge hétéroplasmique et de l'effet de seuil de la mutation en cause.

En 2008, une mutation de la sous-unité COX6b1 a été identifiée, ce qui est venu contredire l'idée véhiculée jusque-là voulant que les mutations des sous-unités de COX codées par le génome nucléaire ne soient pas viables. La plupart des déficiences génétiques en COX ont plutôt été identifiées au niveau de gènes nucléaires codant pour les protéines auxiliaires, ou facteurs d'assemblage, décrites précédemment (COX10, COX15, COX17, SCO1, SCO2 et SURF1). Les manifestations cliniques de ces mutations sont encore une fois très variées et comprennent un syndrome de Leigh classique, une leucodystrophie, une tubulopathie (affection rénale), une cardiomyopathie hypertrophique, une hépatopathie (affection hépatique), une acidose métabolique et une encéphalopathie [17,19]. La présence d'acidose

lactique est fréquente et de sévérité variable selon la mutation à l'origine de la déficience [19]. Les symptômes sont souvent spécifiques à certains tissus, ce qui laisse supposer que les voies régulant l'assemblage de COX pourraient différer d'un tissu à l'autre [4].

2.2.2. *Syndrome de Leigh classique*

Le syndrome de Leigh, aussi appelé encéphalomyélopathie nécrosante subaigüe, est une maladie mitochondriale neurodégénérative initialement décrite par Denis Leigh en 1951 [28]. Elle est typiquement caractérisée par un déclin progressif du système nerveux central en raison de lésions nécrosantes focales et symétriques bilatérales des noyaux gris centraux, du diencephale, du cervelet et du tronc cérébral [29]. Cette atteinte neurologique se manifeste par un retard psychomoteur, des troubles oculaires, de la dystonie et des troubles respiratoires. Certains individus ont également une atteinte du système nerveux périphérique ou d'autres anomalies non neurologiques. Sur le plan biochimique, les taux de lactate et de pyruvate du sang et du liquide cébrospinal sont souvent augmentés; le ratio lactate/pyruvate y est aussi élevé dans certains cas. Il arrive également que le taux de lactate urinaire soit augmenté.

Si la maladie est hétérogène dans ses symptômes cliniques, elle l'est également sur le plan génétique. En effet, plusieurs mutations affectant la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment au niveau des complexes I, II, IV et V ont été identifiées [29,30]. Ces mutations peuvent affecter l'ADN nucléaire ou mitochondrial codant pour des sous-unités structurales ou encore des facteurs d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. Des mutations du coenzyme Q et du complexe de la pyruvate déshydrogénase ont aussi été rapportées [29]. Bien que nos connaissances de cette maladie doivent encore être approfondies, on croit que les symptômes seraient la conséquence d'une déficience dans la production d'ATP induite par ces mutations [31].

On estime l'incidence du syndrome de Leigh à une naissance sur 40 000. Les symptômes apparaissent généralement dans les deux premières années de vie, et dans la majorité des cas, les patients décèdent avant d'avoir atteint l'âge de 5 ans. À ce jour, aucun traitement efficace n'est disponible. Certaines études ont toutefois démontré un effet bénéfique de la thiamine, du coenzyme Q ou de la L-carnitine administrés à fortes doses [29].

2.2.3. *Syndrome de Leigh de forme canadienne-française*

2.2.3.1. Description

Le LSFC est une forme particulière du syndrome de Leigh retrouvée au SLSJ. Dans cette région, l'incidence la maladie est d'environ 1/2000 naissances, et l'on estime qu'un individu sur 23 en serait porteur [32]. La mutation responsable aurait été introduite par un effet fondateur lors de la colonisation. Ce phénomène démographique se produit lorsque le pool génétique des premiers colonisateurs contribue fortement et de façon disproportionnée à celui de la population actuelle d'une région [33]. L'immigration au SLSJ fut limitée en raison de sa situation géographique isolée, et, en parallèle, la population a rapidement augmenté grâce aux familles nombreuses [34]. Le bagage génétique a donc été très conservé, et la mutation s'est transmise de génération en génération. Cet effet fondateur est également à l'origine de plusieurs autres maladies génétiques dans la région.

Les premières recherches sur cette maladie orpheline neurodégénérative ont eu lieu au début des années 1990 par le Dr Morin et ses collaborateurs, qui ont rapporté une forme distincte de déficience en COX au SLSJ [27]. Au niveau cérébral, les patients présentent des lésions typiques du syndrome de Leigh, d'où le nom donné à la maladie. Les organes les plus sévèrement atteints sont le cerveau et le foie, où l'activité de COX est estimée à 10-20% de la normale [34]. L'activité dans les fibroblastes cutanés et le muscle squelettique est d'environ 50%, tandis que les reins et le cœur présentent une activité presque normale [27]. Cette distribution hétérogène de la déficience en COX suggère l'implication d'un facteur d'assemblage de l'enzyme dont le rôle serait plus important dans le cerveau et le foie que dans les autres tissus [34]. Le fait que la COX joue un rôle important dans la production d'énergie (ATP) de la cellule laisse également supposer que les individus atteints ont un métabolisme énergétique altéré.

En plus des lésions cérébrales, les manifestations cliniques incluent un retard de développement, de l'hypotonie, un dysmorphisme facial modéré, une stéatose microvésiculaire et une acidose métabolique compensée [27,32]. Toutefois, la particularité de cette maladie comparativement au syndrome de Leigh classique et d'autres formes de

déficience en COX réside en la survenue de crises métaboliques caractérisées par des épisodes d'acidose sévère, représentant la cause majeure de décès [32,35]. Les patients peuvent également être atteints de crises neurologiques, sans toutefois être accompagnées d'acidose lactique ou métabolique sévère [35].

Dans une étude rassemblant tous les cas de LSFC nés entre 1956 et 2007, Debray et collaborateurs [35] ont rapporté que 90% des patients ont fait au moins un épisode de crise. Près de la moitié des patients sont décédés suite à la première crise, et la plupart des survivants en ont subi une seconde dans les semaines qui ont suivi. Le taux de mortalité associé à ces épisodes se situerait entre 68% et 82% [35]. Ces crises surviennent souvent avant l'âge de 2 ans. L'espérance de vie des enfants est donc courte, soit environ de 3 à 5 ans [34] avec un âge médian au décès de 1,6 an. Les enfants plus âgés demeurent tout de même à risque, et ceux qui survivent aux crises présentent un handicap mental modéré [32]. Cependant, aucune crise acidotique n'a été rapportée après l'âge de 7 ans, ce qui laisse fortement supposer que la petite enfance est une période critique de vulnérabilité.

On ne comprend pas encore très bien les causes exactes des crises, mais celles-ci surviennent souvent lors d'un épisode de stress métabolique, le plus souvent suite à une infection [32,35]. Les parents des individus atteints ont également rapporté qu'un exercice physique intense, un jeûne prolongé ou un stress psychologique pouvaient agir comme élément déclencheur [36]. Les symptômes d'une crise apparaissent rapidement, et l'acidose s'installe en une heure ou moins. Lors de ces épisodes, les patients présentent typiquement un taux de bicarbonate sanguin inférieur à 12 mmol/L, et le profil d'acides organiques urinaires montre la présence de lactate et parfois de corps cétoniques et d'intermédiaires du CAC [32,35]. Les patients ont une respiration de Kussmaul, un type de respiration souvent associé à l'acidose métabolique, puis survient une perte de conscience ou un coma [32]. Il s'ensuit généralement un syndrome de détresse respiratoire aiguë associé à une défaillance multiviscérale, menant rapidement au décès [35]. Une hyperglycémie en début de crise, un état de conscience altéré et un taux élevé d'aminotransférases plasmatiques ont été associés à une mortalité accrue lors des crises [35]. Le traitement généralement employé comprend une

ventilation mécanique, une thérapie à l'oxygène, une infusion de bicarbonate et, au besoin, de l'insuline [32,35] (Dr Charles Morin, communication personnelle).

Les crises neurologiques, quant à elles, surviennent plus rarement que les crises métaboliques, et peuvent être (i) semblables à celles observées dans le syndrome de Leigh classique (attaques psychomotrices) [6], ou encore (ii) des pseudo-épisodes vasculaires cérébraux, qui constituent des attaques neurologiques dont les lésions ne sont pas associées au territoire vasculaire. Les patients atteints de crise neurologique présentent typiquement des anomalies respiratoires et des signes de dysfonction du tronc cérébral. La détérioration neurologique est progressive, et le décès survient généralement en un mois [35]. Chez les patients atteints de LSFC, aucune crise neurologique n'a été rapportée après l'âge de 13 ans [35].

En dehors des épisodes de crise, les patients semblent relativement stables sur le plan métabolique. En effet, plusieurs paramètres sanguins normaux ont été rapportés, notamment la formule sanguine complète, l'ammoniac, la créatinine ainsi que les enzymes hépatiques aspartate et alanine aminotransférases (AST/ALT) [32,35]. Il arrive que le taux de bicarbonate soit légèrement diminué, mais le pH sanguin est souvent normal. À l'état stable, les patients peuvent toutefois présenter une alcalose respiratoire [35], et les taux de lactate sanguin et du liquide cébrospinal sont généralement augmentés de façon modérée, et sont variables d'un individu à l'autre, voire chez un même patient [32]. Par ailleurs, à l'exception d'une légère lactaturie, il a été rapporté que le profil des acides organiques urinaires ne présente souvent aucune anomalie particulière [35].

À l'état stable, la prise en charge des patients comprend la prévention des infections par la vaccination et les conseils d'usage afin d'éviter la transmission des agents pathogènes. L'activité physique est permise en autant qu'elle respecte les capacités de l'enfant. Des périodes de repos sont recommandées, et tout effort excessif est à proscrire. Les parents doivent être à l'affût des événements qui peuvent créer de l'anxiété, et préparer l'enfant à tout ce qui pourrait constituer un stress émotif, comme un changement de routine par exemple. Les parents doivent également respecter la routine de sommeil de l'enfant, puisque les patients ont généralement besoin de beaucoup de sommeil pour bien fonctionner. La prise en charge

comprend également un volet alimentaire. À ce sujet, il est conseillé de fractionner les apports en entrecoupant les repas de collations nutritives. Les repas légers et équilibrés sont à privilégier, de même que les plats préparés à la maison. Les repas lourds, de même que les aliments à haute densité énergétique, sont à éviter. Enfin, les périodes de jeûne prolongé (plus de 12 heures) ne sont pas recommandées [36] (Dr Charles Morin, communication personnelle).

Aucun traitement curatif n'existe pour la maladie; l'approche thérapeutique actuelle vise à traiter les symptômes et prévenir les infections afin d'éviter une demande énergétique trop grande pouvant entraîner un épisode de crise. Une étude chassé-croisée randomisée à double insu a été conduite en 2003 avec le diméthylglycine, une composante de l'acide pangamique (vitamine B₁₅). Toutefois, les résultats de cette étude n'ont montré aucune modification des paramètres mesurés, dont la consommation d'oxygène, le pH sanguin et les taux de lactate, de pyruvate et de bicarbonate [37]. Par ailleurs, une étude récente a évalué l'effet du bleu de méthylène sur des fibroblastes issus de biopsies cutanées de deux patients [38]. Cette étude a montré qu'à faible concentration (125 nM), le bleu de méthylène pouvait prévenir un déclin progressif de l'activité métabolique observé lors de la mise en culture des cellules. Il permettait notamment de maintenir le niveau d'ATP cellulaire et l'état rédox, en plus d'améliorer la survie des deux lignées cellulaires en milieu stable comme en milieu acide. Le fait que le bleu de méthylène pourrait participer au transfert des électrons dans la mitochondrie et augmenter le contenu en COX constituent des pistes d'explication intéressantes en regard de ces résultats. Cette étude laisse donc entrevoir l'intérêt de poursuivre les recherches avec cet agent, notamment sur un effet potentiellement thérapeutique *in vivo* chez les patients atteints du LSFC.

2.2.3.2. LRPPRC

Le gène responsable de la maladie a été identifié en 2003 par Mootha et ses collaborateurs [39]. Il code pour une protéine de 130 kDa appelée LRPPRC (*leucine-rich pentatricopeptide motif-containing protein*) et il est localisé sur le chromosome 2p16 de l'ADN nucléaire. LRPPRC appartient à une famille de protéines contenant des motifs répétés d'une séquence de 35 acides aminés, les pentatricopeptides (PPR); elle contient 11 de ces

motifs. Plus de 400 protéines PPR ont été identifiées chez les plantes, tandis que seulement 7 ont été rapportées chez l'humain [40,41]. Bien qu'on comprenne mieux le rôle de certaines de ces protéines, les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore clairs [42].

Les protéines PPR se retrouvent généralement dans les mitochondries et les chloroplastes [43]. LRPPRC est localisée principalement dans la mitochondrie, mais de faibles quantités sont aussi retrouvées dans le noyau [44]. Les protéines de cette famille ont la capacité de se lier à l'ARN messager (ARNm), et seraient impliquées dans plusieurs étapes du traitement de ce dernier [45,40,46]. Une étude effectuée en 2003 a démontré que LRPPRC avait la capacité de se lier aux ARN polyadénylés mitochondriaux et nucléaires [44], appuyant ainsi les études menées sur d'autres protéines PPR. De plus, cette étude a proposé qu'étant donné sa localisation, LRPPRC serait susceptible de coordonner l'expression génique mitochondriale et nucléaire.

La mutation la plus fréquente, nommée A354V, est causée par la substitution d'une alanine par une valine. Plus de 98% des cas de LSFC rapportés jusqu'à maintenant sont homozygotes pour cette mutation [35]. Cette dernière se transmet par un mode récessif, et aurait été introduite au SLSJ par un effet fondateur, tel que mentionné précédemment. La grande hétérogénéité des manifestations cliniques parmi les sujets atteints suggère que d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux pourraient également influencer leur phénotype [35]. Une deuxième mutation, une délétion de 8 nucléotides dans l'exon 35 de LRPPRC qui forme un codon stop prématuré à la position 1277 (C1277STOP), a été identifiée chez un sujet atteint du LSFC [39]. Cet hétérozygote composé présente des symptômes similaires aux patients homozygotes, à l'exception d'avoir survécu à plus d'une dizaine de crises [38]. On comprend encore mal les conséquences de cette délétion de même que son implication en regard du tableau clinique particulier et unique de ce patient [35].

L'expression de LRPPRC est diminuée de plus de 75% chez les patients atteints du LSFC [47,48]. Dans les fibroblastes, cette diminution est associée à une réduction des niveaux de la plupart des ARNm mitochondriaux, dont COX I, II et III, qui sont les trois sous-unités structurales de COX codées par le génome mitochondrial [47,48]. Dans une moindre mesure, l'expression de COX IV, une sous-unité de COX codée par l'ADN nucléaire, est également

diminuée chez les patients [47]. Une étude avec l'homologue de LRPPRC chez la levure, Pet309, a démontré que les motifs PPR étaient nécessaires pour la traduction de l'ARNm de COX I, mais pas pour sa stabilité [43]. Des résultats similaires ont aussi été observés avec des cellules HeLa dont l'expression de LRPPRC a été réduite, suggérant que cette dernière favoriserait la synthèse de l'ARNm mitochondrial et de plusieurs ARNt, sans toutefois affecter les ARNr [49]. Proposant un rôle de LRPPRC dans le processus transcriptionnel, les travaux de Liu et collaborateurs ont montré que LRPPRC forme un complexe avec POLRMT, une polymérase mitochondriale impliquée dans l'initiation de la transcription [50]. De ce fait, LRPPRC activerait la transcription mitochondriale, ce qui augmenterait l'expression génique et contribuerait à la biogenèse des complexes de la chaîne respiratoire. Selon les auteurs, la stimulation de la phosphorylation oxydative par LRPPRC contribuerait à augmenter l'oxydation des acides gras et la cétogenèse. Ceci est d'ailleurs illustré par le fait que dans cette étude, une invalidation de LRPPRC au niveau du foie dans un modèle murin perturbait la capacité de l'organe à synthétiser des corps cétoniques.

Sondeimer et collaborateurs [49] proposent aussi que LRPPRC serait nécessaire pour la transcription mitochondriale et n'affecterait pas la stabilité des ARNm mitochondriaux préexistants, contrairement à ce qui avait été évoqué par Xu et collaborateurs en 2004 [48]. Ces derniers ont d'ailleurs récemment identifié un segment spécifique de l'ARNm de COX I comme étant la cible de liaison de LRPPRC [51]. Poursuivant avec l'hypothèse qu'ils avaient émise en 2004, ils suggèrent également que LRPPRC serait impliquée dans la maturation de COX et qu'elle jouerait un rôle dans la stabilisation et/ou la traduction des ARNm mitochondriaux qui codent pour des transcrits de COX, particulièrement pour COX I. À la lumière de ces travaux, il ne semble donc pas y avoir consensus quant à la possibilité que LRPPRC soit impliquée dans la stabilité des ARNm mitochondriaux.

En dépit d'une diminution générale des ARNm mitochondriaux, le défaut dans la synthèse protéique mitochondriale affecterait particulièrement les sous-unités de COX, ce qui mènerait à un défaut de son assemblage [47]. Par contre, en réduisant davantage les niveaux de LRPPRC, une diminution plus importante des niveaux d'ARNm a été observée, résultant en un défaut d'assemblage généralisé pour les complexes de la chaîne contenant des sous-

unités codées par l'ADNmt. Les auteurs de cette étude proposent donc que dans le LSFC, la phosphorylation oxydative serait perturbée en fonction des niveaux de LRPPRC.

Sasarman et collaborateurs [47] ont également démontré que LRPPRC interagit avec SLIRP (*SRA-stem loop interacting RNA-binding protein*) au sein d'un complexe de poids moléculaire élevé. Les niveaux de SLIRP sont également réduits chez les patients LSFC. Cette protéine serait impliquée dans l'homéostasie de l'ARN mitochondrial et pourrait agir comme régulateur de la phosphorylation oxydative [52]. De plus, tout comme LRPPRC, SLIRP est connue pour se lier à l'ARN, et les deux protéines pourraient jouer un rôle dans le maintien des niveaux d'ARN mitochondrial. Une étude conduite subséquemment a suggéré que le complexe protéique que forment LRPPRC et SLIRP serait nécessaire au maintien d'un pool d'ARNm mitochondriaux non traduits [42]. Dans cette étude utilisant un modèle de souris déficiente pour LRPPRC au niveau cardiaque, l'absence de LRPPRC entraînait une importante diminution de l'activité de COX, ce qui laisse supposer que la diminution des niveaux de LRPPRC observée dans le LSFC est bel et bien à l'origine de la déficience en COX. Cette observation est toutefois paradoxale, étant donné que les patients atteints du LSFC ne montrent pas de déficience en COX au niveau cardiaque [27]. L'étude a également montré que la diminution de LRPPRC entraînait une réduction de la stabilité et de la polyadénylation de l'ARNm mitochondrial, et engendrait un dérèglement du processus de traduction. Les auteurs concluent que LRPPRC constitue un important régulateur post-transcriptionnel de l'expression génique mitochondriale.

Dans le noyau, LRPPRC ferait partie du complexe protéique du coactivateur 1 α du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes (PGC-1 α), un important régulateur de la biogenèse mitochondriale [53]. LRPPRC coopérerait avec PGC1- α pour réguler l'expression de certains gènes mitochondriaux de même que certains gènes gluconéogéniques. Dans le tissu adipeux brun, LRPPRC pourrait également jouer un rôle dans le découplage de la chaîne respiratoire et la thermogenèse [54]. En effet, une diminution des niveaux de LRPPRC dans les cellules adipeuses perturbe l'expression de plusieurs gènes, dont la protéine découplante 1 (UCP1). Cette protéine, située dans la membrane mitochondriale interne, utilise le gradient de protons généré par la chaîne de transport pour produire de la chaleur plutôt que

de l'ATP. Les niveaux réduits de LRPPRC dans les adipocytes étaient également associés à une diminution de la respiration totale, sans toutefois affecter la densité mitochondriale.

Une étude effectuée en 2010 a démontré que la diminution graduelle de LRPPRC dans un modèle cellulaire était associée à une expression accrue de gènes glycolytiques, notamment ceux du métabolisme du fructose et du mannose [55]. Des gènes codant pour des dérivés métaboliques de l'acide eicosapentaénoïque et de l'acide arachidonique étaient également augmentés, tandis que l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse et le métabolisme des glycosphingolipides était diminuée. Toutefois, on ne sait pas encore si ces altérations constituent un mécanisme compensatoire à la dysfonction mitochondriale, ou si au contraire elles contribuent à la pathogenèse dans le LSFC.

Une étude a rapporté un rôle anti-apoptotique de LRPPRC dans des cellules hépatiques cancéreuses, ce qui pourrait l'impliquer dans le phénomène de résistance aux médicaments rencontré dans cette pathologie [56]. Par ailleurs, cette étude a également proposé qu'une induction de l'apoptose dans un modèle cellulaire invalidé pour LRPPRC était associée à une diminution importante de l'activité de COX. En ce sens, les auteurs proposent que la perturbation du métabolisme mitochondrial dans le LSFC pourrait sensibiliser les cellules aux signaux apoptotiques et faciliter leur entrée dans ce processus de mort cellulaire programmée. En accord avec cette étude, Tian et collaborateurs suggèrent également que LRPPRC jouerait un rôle important dans la formation des tumeurs par un phénomène de résistance à l'apoptose et de capacité d'invasion [57].

En somme, plusieurs hypothèses ont été émises relativement au rôle que LRPPRC pourrait jouer dans la cellule. D'autres recherches sont nécessaires afin de mieux cerner les mécanismes moléculaires affectés par sa mutation dans le contexte du LSFC. Pour l'instant, l'hypothèse la plus plausible consiste en un défaut d'assemblage de COX; l'avancée de la recherche dans ce domaine permettra assurément de clarifier son rôle et de mieux cerner son implication dans la maladie.

2.3. Conséquences métaboliques

Les altérations métaboliques résultant d'un désordre de la phosphorylation oxydative sont nombreuses et variables d'une pathologie à l'autre. La présente section regroupe celles qui sont fréquemment observées; ces conséquences sont également illustrées à la figure 6 (p. 22).

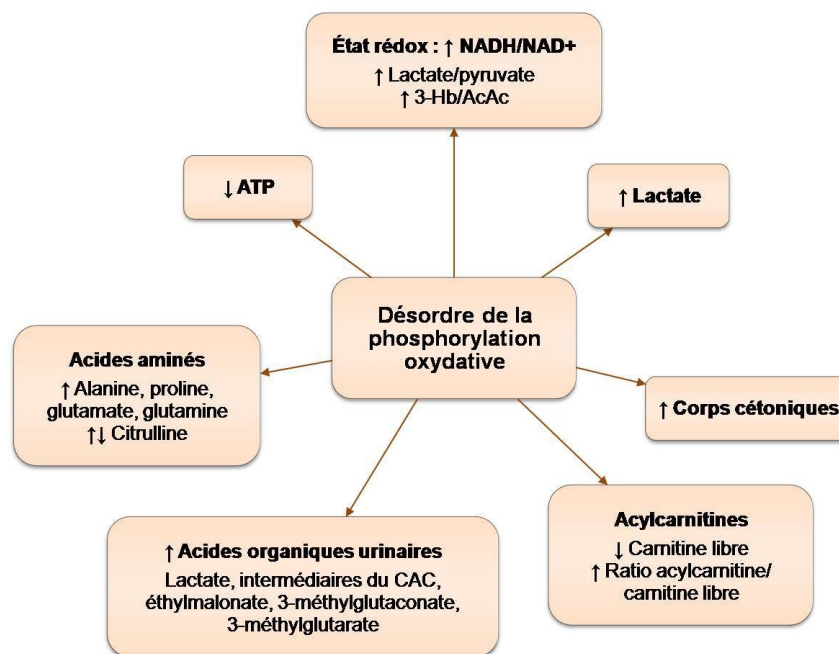


Figure 6 : Conséquences métaboliques des désordres de la phosphorylation oxydative. AcAc : acétoacétate; ATP : adénosine triphosphate; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide; 3-HB : 3-hydroxybutyrate; ↑ : augmentation; ↓ : diminution.

La déficience en ATP est, logiquement, la première conséquence attendue des maladies mitochondriales, étant donné l'incapacité de la mitochondrie à générer suffisamment d'énergie pour répondre aux besoins de la cellule. Cependant, de façon surprenante, la diminution des niveaux d'ATP n'est pas toujours observée, et si tel est le cas, cela constitue rarement la conséquence la plus importante [58]. D'autres événements métaboliques peuvent survenir lorsque le fonctionnement de la chaîne de transport est perturbé, notamment une augmentation des équivalents réduits dans le cytosol et la mitochondrie, menant à un ratio élevé de NADH/NAD⁺ [6]. Dans la circulation sanguine, ceci se traduit par un ratio élevé de

lactate/pyruvate et de 3-hydroxybutyrate/acétoacétate (3-HB/AcAc) [2], reflétant le statut rédox cytoplasmique et mitochondrial respectivement [59]. La perturbation de l'équilibre rédox, en favorisant le maintien d'un état réduit, peut affecter plusieurs processus biologiques. Notamment, ceci peut engendrer une altération de l'homéostasie du calcium, pouvant ultimement mener à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial et à l'apoptose [60]. Le débalancement de l'équilibre rédox peut également affecter certaines voies de signalisation, comme par exemple celle de protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), un important senseur métabolique impliqué dans la régulation de la balance énergétique cellulaire [61,62].

Puisque la mitochondrie ne peut oxyder efficacement les substrats, le ralentissement de l'activité de la chaîne respiratoire est susceptible d'entraîner une augmentation de la contribution de la glycolyse pour la production d'ATP [55]. En ce sens, l'élévation du lactate sanguin est un symptôme fréquent des désordres du métabolisme mitochondrial, sans toutefois constituer un critère essentiel à leur diagnostic [9,2,21]. En effet, si cette condition est très présente dans certains cas, elle l'est moins pour d'autres, voire même parfois absente du tableau clinique. À l'état stable, le niveau maximal de lactate chez ces patients est généralement observé à l'état nourri [59]. Une acidose lactique peut par contre être déclenchée par une infection, un stress ou un trauma. En plus d'être néfaste pour le système nerveux [8], cette surproduction d'acide lactique peut causer un déséquilibre du pH cellulaire et entraîner une acidose métabolique qui peut perturber plusieurs processus biologiques [58]. En outre, il est maintenant reconnu que le lactate peut activer certains récepteurs liés aux protéines G, notamment le HCA₁, et exercer un effet anti-lipolytique dans le tissu adipeux [63,64], ce qui pourrait contribuer au stockage à long terme des réserves énergétiques dans ce tissu [63].

Une perturbation de la phosphorylation oxydative est également susceptible d'engendrer plusieurs autres changements métaboliques. Notamment, une accumulation de corps cétoniques a été suggérée comme conséquence potentielle; ce phénomène résulterait d'une lipolyse des réserves adipeuses afin de fournir de l'énergie supplémentaire à la cellule [21]. Une augmentation de la synthèse de corps cétoniques en période postprandiale peut également être observée; cette situation est désignée comme hypercétonémie paradoxale,

puisqu'en condition normale les corps cétoniques diminuent après les repas sous l'action de l'insuline. Ceci serait notamment expliqué par une dysfonction du CAC résultant en une accumulation d'acétyl-CoA qui se transforme en corps cétonique au niveau hépatique [6].

Une perturbation du profil d'acylcarnitines plasmatiques constitue une autre conséquence possible. Ces métabolites sont des dérivés d'acides gras estérifiés qui sont générés lors de la translocation des acides gras dans la membrane mitochondriale interne. Les acylcarnitines peuvent aisément passer dans le cytosol et subséquemment dans la circulation sanguine [65]. Ainsi, leur profil en milieu extracellulaire est considéré comme un reflet des acyl-CoA présents dans la mitochondrie [66]. L'analyse du profil d'acylcarnitines plasmatiques est traditionnellement utilisée pour le diagnostic des désordres de l'oxydation des acides gras et de certains désordres du métabolisme des acides aminés. Toutefois, elle peut s'avérer pertinente en contexte de désordre mitochondrial primaire (i.e. une mutation affectant directement la chaîne respiratoire), où un désordre secondaire de l'oxydation des lipides ainsi qu'une déficience en carnitine sont susceptibles d'être observés [67]. Ainsi, une diminution du niveau de carnitine libre, de même que des ratios élevés de certains acylcarnitines par rapport à la carnitine libre, sont possibles chez les sujets atteints de dysfonction mitochondriale.

Ensuite, les niveaux d'acides organiques sont susceptibles d'être altérés; ceux-ci sont des intermédiaires ou des produits finaux du métabolisme des acides aminés, des glucides et des lipides [68]. L'urine est le spécimen biologique de choix pour leur analyse étant donné qu'ils y sont présents en plus grande quantité comparativement au plasma. Leur profil plasmatique donne rarement des informations diagnostiques supérieures au profil urinaire, mais peut toutefois être utile dans le cadre d'études cliniques [67]. Il est reconnu que les désordres de la phosphorylation oxydative engendrent des profils variables d'acides organiques urinaires [68]. Ceux-ci sont toutefois souvent caractérisés par une excrétion accrue d'acide lactique, d'intermédiaires du CAC, d'éthylmalonate, de 3-méthylglutaconate et de 3-méthylglutarate [68,59,67]. Une acidurie lactique, qu'elle soit pathologique ou non, est souvent accompagnée d'une augmentation de l'excrétion de pyruvate, de *p*-hydroxyphenyllactate, de 2-hydroxyisovalérate, de 2-hydroxybutyrate, et parfois de 2-cétoacides à chaîne ramifiée [68]. Dans certains désordres métaboliques héréditaires,

notamment lorsqu'un patient est cliniquement stable, il peut cependant arriver que le profil d'acides organiques dans l'urine soit normal ou ne montre qu'une légère augmentation de certains composés [68,67].

Enfin, les niveaux sanguins de certains acides aminés peuvent également être affectés. Notamment, les taux d'alanine sont souvent augmentés [58,59], ceci étant notamment expliqué par le fait qu'en condition de perturbation métabolique, cet acide aminé peut être produit à partir du pyruvate, tout comme le lactate d'ailleurs [58]. L'augmentation du niveau d'alanine plasmatique peut donc indiquer une accumulation de pyruvate [67]. Une augmentation des niveaux de proline peut également être observée, puisque l'oxydation de cet acide aminé est perturbée lorsque la concentration de lactate est augmentée. Ainsi, une augmentation de l'alanine et de la proline est souvent considérée comme un indice indirect d'hyperlactatémie [6]. Par ailleurs, une élévation des niveaux de glutamate et de glutamine a été rapportée chez des patients atteints d'une maladie de la chaîne respiratoire avec présence d'acidose lactique [59]. Enfin, certains chercheurs ont rapporté une augmentation modérée des niveaux de citrulline [59], alors que d'autres ont plutôt rapporté une diminution [58].

2.4. Traitements

Malgré une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des désordres de la phosphorylation oxydative, l'approche thérapeutique demeure encore inadéquate et principalement symptomatique [8]. Néanmoins, la prise en charge des diverses manifestations cliniques peut améliorer la qualité de vie et le pronostic des sujets atteints [22].

Sur le plan pharmacologique, les épisodes d'acidose métabolique aiguë résultant d'une surproduction de lactate peuvent être traités, à court terme, avec du bicarbonate de sodium [58]. Le dichloroacétate est un médicament pouvant également réduire le taux de lactate [58]. Il peut être utile comme traitement à court terme des épisodes d'acidose sévère; son usage chronique est toutefois à proscrire en raison d'un risque de neuropathie périphérique [2,21]. L'administration de pyruvate a également été suggérée comme approche thérapeutique. En effet, selon Tanaka et collaborateurs [69], il pourrait diminuer le ratio NADH/NAD dans le cytoplasme et ainsi permettre une production d'ATP par la glycolyse, ce qui pourrait

contribuer à atténuer la déficience énergétique due au ralentissement de la phosphorylation oxydative. D'autres mécanismes d'action sont également possibles pour expliquer l'effet bénéfique du pyruvate, notamment son activité antioxydante [69,70]. Par ailleurs, la supplémentation en L-arginine a été proposée comme traitement des pseudo-épisodes vasculaires cérébraux, qui constituent une manifestation neurologique commune à plusieurs désordres mitochondriaux, dont le LSFC [58,71]. Certains chercheurs soutiennent que ces événements seraient causés par une perturbation de la vasodilatation dans le cerveau; l'arginine étant un précurseur de l'oxyde nitrique, un puissant vasodilatateur, son utilisation pourrait donc être bénéfique [58].

Sur le plan nutritionnel, des cocktails de vitamines, suppléments, cofacteurs et/ou antioxydants sont parfois administrés. Ceux-ci peuvent inclure, tel que mentionné précédemment pour le syndrome de Leigh classique, le coenzyme Q, la thiamine et la carnitine, mais également l'acide ascorbique, la riboflavine, la vitamine E, la créatine et le succinate [21,72]. Ces composés sont donnés dans le but d'améliorer la fonction de la chaîne respiratoire. Toutefois, excepté lors d'une déficience clairement démontrée, l'efficacité de ces agents thérapeutiques demeure limitée et parfois controversée [2]. Une récente revue exhaustive des interventions pharmacologiques et nutritionnelles a d'ailleurs suggéré qu'il n'y avait aucune évidence claire soutenant l'utilisation d'un traitement en particulier chez les patients atteints de désordres mitochondriaux [73]. Peu d'études randomisées contrôlées ont été menées, et davantage de recherche est nécessaire pour mieux comprendre le rôle des diverses approches thérapeutiques actuellement proposées.

Tel que mentionné pour le LSFC, malgré le fait qu'aucun traitement efficace ne soit disponible, certains éléments de la prise en charge, notamment au niveau des habitudes de vie, peuvent contribuer à améliorer l'état clinique des patients atteints d'une maladie mitochondriale, ou du moins à ne pas l'aggraver. Parmi ceux-ci, un apport énergétique et nutritionnel optimal est susceptible d'améliorer la fonction mitochondriale des patients atteints de désordres de la phosphorylation oxydative. En effet, une étude a démontré qu'une intervention visant l'atteinte des besoins nutritionnels chez ces patients pouvait augmenter l'activité des complexes de la chaîne et la production d'ATP, diminuer les niveaux de lactate

et améliorer la tolérance à l'exercice [74]. En outre, tel que mentionné précédemment, plusieurs maladies mitochondriales prédisposent à des épisodes aigus d'acidose ou encore à des crises neurologiques. Ces événements surviennent souvent suite à un stress physique, nutritionnel ou infectieux [2]. En ce sens, le fait d'éviter les efforts physiques trop intenses, les longues périodes de jeûne et les repas trop chargés peut contribuer à améliorer l'évolution clinique [2]. On recommande également aux patients de manger à des heures régulières [21]. Enfin, la prévention et le traitement des infections est également un élément important à considérer afin d'éviter le déclenchement d'un de ces épisodes [2]. Les recommandations relatives aux habitudes de vie qui ont été décrites précédemment pour les patients LSFC s'inscrivent donc dans les lignes directrices générales de la prise en charge des sujets atteints d'un désordre de la phosphorylation oxydative.

2.5. La nécessité de biomarqueurs

Étant donné l'absence de traitement efficace actuellement disponible pour les maladies mitochondriales, et plus particulièrement pour le LSFC, des marqueurs biologiques sont nécessaires afin d'assurer un suivi optimal des patients en regard de leur évolution clinique. Dans le cas du LSFC, les crises d'acidose représentant la principale cause de décès, la prévention et le traitement de ces épisodes constituent une priorité d'intervention. En ce sens, un des grands défis de la recherche sur la maladie consiste en l'identification de marqueurs prédictifs de la survenue des crises, ce qui permettrait aux cliniciens d'intervenir plus rapidement afin d'éviter le décès. Morin et collaborateurs ont proposé que le taux de lactate du liquide cébrospinal pourrait être un bon marqueur de la maladie, étant donné qu'à l'état stable il est généralement plus élevé que celui du sang [32]. La fiabilité supérieure du lactate du liquide cébrospinal comparativement au lactate sanguin a également été rapportée par d'autres chercheurs en contexte de maladie mitochondriale avec atteinte neurologique [2]. Cette mesure requiert toutefois une ponction lombaire, qui constitue une procédure relativement invasive. En ce sens, la découverte de biomarqueurs dans le sang ou l'urine constitue une alternative qui faciliterait grandement le suivi des patients atteints du LSFC et d'autres désordres de la chaîne respiratoire, tout en nécessitant des techniques minimalement invasives.

3. La métabolomique

3.1. Description générale

La métabolomique est la plus jeune des sciences dites « omiques », qui incluent entre autres la génomique, la transcriptomique et la protéomique [75]. Cette discipline vise l'identification, la quantification et l'analyse comparative des métabolites, i.e. des produits du métabolisme cellulaire, dans les systèmes biologiques [76]. Le métabolome, soit l'ensemble des métabolites retrouvés dans un échantillon biologique, est le produit final de la transcription, de la traduction et du métabolisme, et peut ainsi refléter le phénotype d'un individu [75]. En effet, le concept à la base de cette science veut que le statut métabolique soit représentatif du statut physiologique global de l'organisme [77]. Un grand intérêt de la métabolomique provient de son potentiel de découverte de nouveaux biomarqueurs pouvant être utilisés dans le cadre du dépistage, du diagnostic et du suivi de plusieurs pathologies, et ce, de façon minimalement invasive. Les tests métaboliques de routine (ex : glucose, créatinine, lactate) constituent des mesures uniques, ce qui peut limiter le diagnostic de certaines maladies métaboliques. En revanche, l'approche métabolomique vise l'analyse simultanée d'un nombre élevé de molécules issues de plusieurs voies métaboliques afin d'identifier les changements caractérisant une pathologie [78,77]. Il a été démontré que cette approche peut mener à l'identification de biomarqueurs circulants pouvant représenter la signature d'une pathologie en développement; ces biomarqueurs peuvent ensuite constituer une cible pour le développement de nouveaux médicaments et le suivi thérapeutique [77]. L'approche métabolomique est d'ailleurs à l'origine de programmes de dépistage des maladies métaboliques héréditaires reconnus et utilisés mondialement chez les nouveaux-nés [78]. En outre, ces dernières années, la métabolomique a également permis d'identifier des nouveaux biomarqueurs dans le domaine des maladies cardiovasculaires et du cancer [75]. Il ne fait donc aucun doute que la métabolomique est une approche à l'avenir prometteur et dont les applications iront en grandissant dans les années à venir.

3.2. Applications en nutrition

La métabolomique est également de plus en plus utilisée dans le cadre d'interventions nutritionnelles. En effet, le profil métabolique des fluides biologiques représente une source d'information privilégiée pour étudier les effets de l'alimentation [79]. Par exemple, des modifications du métabolome plasmatique et urinaire ont été rapportées suivant la consommation d'aliments fonctionnels, et certains métabolites ont été identifiés comme étant caractéristiques des habitudes alimentaires d'un individu. Des changements dans le niveau de certains métabolites ont aussi été identifiés suivant une perte de poids ou encore suite à une supplémentation vitaminique [80,81]. Le recours à une perturbation de type alimentaire est de plus en plus utilisé en combinaison avec le profilage métabolique. En effet, l'étude de la modification du métabolisme suite à la consommation alimentaire, à court ou à long terme, est un domaine d'intérêt grandissant. Dépendamment de sa composition, le repas peut même agir à titre de stress métabolique, et ainsi contribuer à mieux comprendre la physiopathologie de certaines maladies [82]. À ce sujet, Shaham et collaborateurs ont identifié plusieurs voies métaboliques qui sont affectées suite à l'ingestion d'une solution de glucose chez des sujets sains et pré-diabétiques [83]. Des changements dans le métabolisme lipidique ont également été démontrés par Zivkovic et collaborateurs suivant l'ingestion d'un smoothie standardisé [82]. Il a également été démontré que des échantillons urinaires prélevés après la consommation d'un repas dont la composition lipidique varie pouvaient être distingués d'après leur profil métabolique [79]. Cependant, peu d'études ont investigué le profil métabolomique global, c'est à dire un grand nombre de molécules impliquées dans plusieurs voies métaboliques (ex : acides aminés, acides gras, acides organiques, acylcarnitines), chez des sujets humains suite à un repas complet et standardisé.

Si la métabolomique offre un grand potentiel de découverte de nouveaux biomarqueurs, son application requiert une analyse complexe. En effet, considérant le nombre de métabolites mesurés, allant parfois jusqu'à plusieurs centaines, la probabilité d'identifier des biomarqueurs potentiels chez des sujets qui sont en fait des faux positifs ou des faux négatifs s'en trouve augmentée [84,85]. Il existe une relation complexe entre le génotype, le phénotype métabolique, l'alimentation et les habitudes de vie d'un individu [80]. Une

variation biologique dans le profil clinique et métabolique existe suivant le sexe, l'âge et l'indice de masse corporelle [75,80,86]. Dans les études nutritionnelles chez l'humain, une grande variation biologique est particulièrement susceptible d'être observée [87]. L'alimentation pouvant affecter les niveaux de métabolites, la standardisation de la diète avant le prélèvement d'échantillons peut diminuer la variation interindividuelle [80]. Le fait de prélever des échantillons avant et après une perturbation, e.g. un repas, chez un même individu, peut également contribuer à diminuer la variabilité due à la génétique, l'environnement et les habitudes de vie [75]. Enfin, une attention spéciale doit être portée à la manipulation et au traitement des échantillons, le profil métabolique pouvant être influencé par les conditions de prélèvement et la technique d'analyse des spécimens biologiques [88,78,79].

3.3. Approches et appareils de mesure

Deux approches peuvent être utilisées dans le cadre des études métabolomiques, soit ciblée et non ciblée. L'approche ciblée, comme son nom l'indique, cible certains métabolites ou classes de métabolites connues (ex : acides aminés, acides gras) [88]. L'approche non ciblée, quant à elle, vise à acquérir de l'information sur le plus grand nombre de métabolites possible, sans nécessairement savoir *a priori* quels métabolites sont susceptibles d'être altérés par la condition à l'étude [75,81]. En plus de couvrir les altérations métaboliques détectées par l'approche ciblée, l'approche non ciblée permet de repérer des changements dans les niveaux de métabolites jusque-là insoupçonnés par les investigateurs, et peut ainsi permettre d'identifier de nouvelles molécules et voies métaboliques impliquées dans le modèle étudié. Une combinaison des deux approches est aussi possible, dans laquelle une partie du métabolome est analysée quantitativement avec l'approche ciblée, tandis que le reste est analysé par l'approche non ciblée [81]. Une synergie entre les deux approches est également illustrée par le fait que les métabolites identifiés par l'approche non ciblée peuvent ensuite faire l'objet d'études ciblées ayant un potentiel d'application clinique [75].

Parallèlement aux approches décrites ci-haut, trois stratégies sont couramment appliquées dans les études métabolomiques : (i) le *metabolic fingerprinting*, ou signature métabolique; (ii) le profilage métabolique, et (iii) le *metabolic footprinting* [89]. La première

visé à comparer des changements dans les signatures métaboliques en réponse à une pathologie, un traitement pharmacologique ou un changement environnemental, par exemple. Le profilage métabolique implique la présélection d'un ensemble de métabolites ou d'une classe spécifique de composés pouvant participer à une voie métabolique précise. Enfin, le *metabolic footprinting* concerne la mesure des métabolites qui sont sécrétés ou qui ne parviennent pas à être incorporés dans les cellules ou les tissus.

Malgré des avancées technologiques importantes, le métabolome en son entier ne peut pas être mesuré à l'aide d'un seul appareil. Les métabolites sont des composés hétérogènes aux propriétés physiques et chimiques variées [78]; l'application de plusieurs plateformes analytiques est donc nécessaire afin d'assurer une couverture du métabolome qui soit la plus complète possible [81,77,80]. De plus, les subtils changements métaboliques qui sont observés dans les études nutritionnelles, contrairement aux études toxicologiques par exemple, et la grande variation interindividuelle dans le métabolisme chez les humains requièrent l'utilisation de plateformes d'analyse hautement reproductibles [79].

La spectrométrie de masse est l'une des techniques analytiques les plus utilisées en métabolomique [79]. Il s'agit d'une méthode sensible permettant de caractériser, d'identifier et de quantifier un nombre élevé de métabolites aux concentrations variées dans les échantillons biologiques [77]. Elle est généralement précédée d'une étape de séparation; ainsi, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) sont des technologies couramment employées. La CG-SM est surtout utilisée en métabolomique ciblée [78,88], où elle est considérée comme l'une des plateformes les plus polyvalentes [90]. En effet, c'est une méthode hautement reproductible permettant d'analyser jusqu'à 500 métabolites dans un seul échantillon biologique [90]. C'est la technique de choix pour l'identification et la quantification des composés volatiles et thermostables [78]. Toutefois, l'analyse de métabolites par CG-SM nécessite souvent un laborieux pré-traitement des échantillons, ce qui limite son application dans les études à grande échelle [78]. Quant à la CL-SM, c'est une méthode très sensible et spécifique permettant d'analyser un large éventail de composés [76]. Elle est particulièrement indiquée pour l'analyse des métabolites non volatiles et ne pouvant

être dérivés [89]. La CL-SM-SM, ou CL-SM en tandem, permet la quantification simultanée de différentes classes de métabolites sans nécessiter un long pré-traitement des échantillons [78]. La spectrométrie de masse en tandem est d'ailleurs utilisée dans le cadre de plusieurs programmes de dépistage des erreurs innées du métabolisme chez les nouveaux-nés [91,92].

4. Objectif, hypothèse et approche expérimentale

La présente étude s'inscrit dans un objectif à long terme consistant à identifier des biomarqueurs métaboliques circulants qui pourraient s'avérer prédictifs de la survenue d'épisodes d'acidose sévère pouvant mener au décès chez les sujets atteints du LSFC. Les recherches actuelles ayant démontré une diminution de l'activité de COX, et donc de la capacité mitochondriale chez ces patients, ceci laisse supposer que ces derniers ont un métabolisme énergétique altéré. Le projet ici présenté constitue un premier pas vers cet objectif à long terme en étudiant d'abord le métabolisme des sujets à l'état stable. L'objectif spécifique du projet a été de comparer le profil des métabolites chez des sujets LSFC et des sujets témoins, à jeun et après un repas, en utilisant une approche métabolomique ciblée. L'hypothèse de travail est que les sujets atteints du LSFC présentent des altérations métaboliques ou une « signature métabolique » qui leur est propre, particulièrement en réponse à un repas.

Afin de valider le repas-test utilisé dans le cadre de ce projet, une étude pilote a d'abord été réalisée chez des sujets sains. Par la suite, des prélèvements ont été effectués chez 9 patients atteints du LSFC et 9 témoins appariés selon le sexe, l'âge, l'indice de masse corporel (IMC) et le niveau d'activité physique. Ces prélèvements ont été réalisés à jeun et 90 minutes suivant la consommation du repas standardisé afin de couvrir les changements potentiels dans plusieurs classes de composés reliées au métabolisme des nutriments. Un total de 199 métabolites a été mesuré par une combinaison d'approches analytiques ciblées principalement basées sur la spectrométrie de masse, incluant un profil des acides aminés, des acides gras, des acides organiques et des acylcarnitines.

Matériel et méthodes

Les sections suivantes décrivent la méthodologie employée pour la réalisation de l'étude pilote et de l'étude principale. La composition du repas standardisé est ensuite présentée, suivie du protocole de prélèvement des échantillons et des techniques utilisées pour le génotypage et l'analyse des métabolites. La dernière section décrit les analyses statistiques utilisées.

1. Étude pilote : principe général

Le repas standardisé utilisé dans le cadre de ce projet est un smoothie ayant été conçu avec la collaboration des familles des patients atteints du LSFC. Les changements métaboliques résultant de sa consommation ne sont donc pas connus. En ce sens, préalablement à l'étude principale, une étude pilote a été effectuée chez 4 sujets sains afin de déterminer quels sont les métabolites plasmatiques dont les niveaux sont susceptibles d'être modifiés suite à l'ingestion du repas. Les participants à cette étude sont des volontaires ayant été recrutés à l'Université du Québec à Chicoutimi. Ils ont consenti à y prendre part en signant le formulaire d'information et de consentement de l'étude principale. Le protocole incluait des prélèvements sanguins à jeun (12h) et 90 minutes suivant la consommation du smoothie. Les mesures effectuées ont inclus un profil plasmatique des acides aminés, des acides gras, des acides organiques et des acylcarnitines.

2. Étude principale : principe général

Dans l'étude principale, les prélèvements ont été effectués chez 9 sujets atteints du LSFC et 9 sujets témoins. Le protocole de recherche a été approuvé par le Comité d'éthique de la recherche du Centre de Santé et de Services Sociaux de Chicoutimi. Les sujets atteints du LSFC ont été recrutés par le biais de Dr Charles Morin, pédiatre au Centre de Santé et de Services Sociaux de Chicoutimi en charge du suivi de la plupart de ces patients. Les témoins ont été recrutés par une infirmière de recherche; ils ont été appariés avec les patients pour le

sexe, l'âge (± 2 ans pour les enfants et ± 5 ans pour les adultes), l'IMC (± 10 percentiles de l'IMC selon l'âge pour les enfants et ± 3 kg/m² pour les adultes) et le niveau d'activité physique (NAP). Aucun sujet apparenté avec un patient n'a été sélectionné à titre de témoin. Les critères d'exclusion de ces derniers comprenaient le fait d'être porteur de la mutation A354V ou C1277STOP du gène LRPPRC, le fait de présenter une condition pathologique connue et l'usage de tabac. Le protocole comprenait deux visites au domicile de chaque participant. La première incluait l'administration d'un questionnaire général sur la santé et les habitudes de vie, visant essentiellement à permettre l'appariement des sujets selon les critères mentionnés ci-haut. Pour les témoins, un prélèvement de salive a également été effectué en vue du génotypage des mutations associées à la maladie. La deuxième visite visait à récolter les échantillons biologiques à jeun (12h) et 90 minutes après le repas standardisé. Les analyses effectuées étaient un peu plus élaborées que pour l'étude pilote, et comprenaient, en plus du profil plasmatique des acides aminés, des acides gras, des acides organiques et des acylcarnitines, un bilan biochimique et hormonal de même qu'un profil urinaire des acides organiques.

3. Repas standardisé

Le smoothie standardisé était composé de boisson de soya, de fraises, de jus d'orange et d'huile de canola. Le volume administré représentait environ 9% des besoins énergétiques quotidiens de chaque sujet, calculés d'après la formule du besoin énergétique estimé (BEE) des apports nutritionnels de référence (ANREF) [93] permettant de calculer le besoin approximatif en énergie selon le sexe, l'âge, le poids, la taille et le NAP. Le smoothie avait une densité énergétique de 0,55 kcal/mL, avec 42% de l'énergie provenant des glucides, 46% provenant des lipides et 12% provenant des protéines. La composition nutritionnelle, calculée d'après les informations fournies sur les étiquettes nutritionnelles des ingrédients, est illustrée dans le tableau II (p. 35). La valeur nutritive y est affichée pour 100 mL, mais il est à garder à l'esprit que chaque sujet a reçu une quantité de smoothie différente, en fonction de ses besoins énergétiques.

Tableau II : Valeur nutritive du smoothie

Éléments nutritifs	Valeur nutritive par 100 mL
Énergie (kcal)	55
Glucides totaux (g)	5,7
Fibres (g)	0,7
Sucres (g)	4,0
Protéines (g)	1,6
Lipides totaux (g)	2,8
Gras saturés (g)	0,2
Gras trans (g)	0
Gras monoinsaturés (g)	1,6
Gras polyinsaturés (g)	1,1
Acides gras oméga-6 (g)	0,8
Acides gras oméga-3 (g)	0,2
Cholestérol (mg)	0
Sodium (mg)	16
Potassium (mg)	115

La composition du smoothie en acides aminés et acides gras est illustrée dans le tableau III (p. 36). Ces informations ont été obtenues à l'aide du logiciel « AlimenthèqueTM »; toutefois, il est à noter que les valeurs affichées demeurent des estimations, et que des valeurs étaient manquantes pour certains nutriments, dont la glutamine.

Tableau III : Composition du smoothie en acides aminés et acides gras

Acides aminés	% total	Acides gras	% total
Acide aspartique	13%	Acide myristique (C14:0)	0%
Acide glutamique	20%	Acide palmitique (C16:0)	7%
Alanine	4%	Acide stéarique (C18:0)	3%
Arginine	8%	Acide palmitoléique (C16:1)	0%
Cystine	0%	Acide oléique (C18:1)	51%
Glycine	4%	Acide linoléique (C18:2)	30%
Histidine	2%	Acide linoléique (C18:3)	9%
Isoleucine	5%	Acide eïcosatriénoïque (C20:3)*	0%
Leucine	7%	Acide arachidonique (C20:4)	0%
Lysine	5%	Acide éicosapentaénoïque (C20:5)	0%
Méthionine	1%	Acide docosapentaénoïque (C22:5)	0%
Phénylalanine	5%	Acide docosahénoïque (C22:6)	0%
Proline	6%	Total	100%
Serine	6%		
Thréonine	4%	Acides gras saturés	10%
Tryptophane	1%	Acides gras monoinsaturés	52%
Tyrosine	4%	Acides gras polyinsaturés	38%
Valine	5%	Total	100%
Total	100%		

*Valeur manquante

4. Prélèvement des échantillons

Pour l'étude pilote, la collecte des échantillons a eu lieu à l'Université du Québec à Chicoutimi, alors que pour l'étude principale, les prélèvements ont été effectués au domicile de chaque participant, pour un meilleur confort et afin de créer un contexte qui soit le plus représentatif possible de la vie quotidienne des sujets. Le protocole de prélèvement a été appliqué de façon rigoureuse par l'équipe de recherche; ainsi, l'étude pilote a permis d'identifier les problèmes potentiels et d'apporter les modifications nécessaires avant que ne débute l'étude principale. Le protocole conçu initialement a notamment dû être simplifié pour des raisons de faisabilité, considérant que l'étude principale aurait lieu à domicile et donc que les ressources matérielles y seraient plus limitées. La figure 7 (p. 37) illustre le protocole retenu pour les prélèvements à jeun réalisés dans le cadre de l'étude principale.

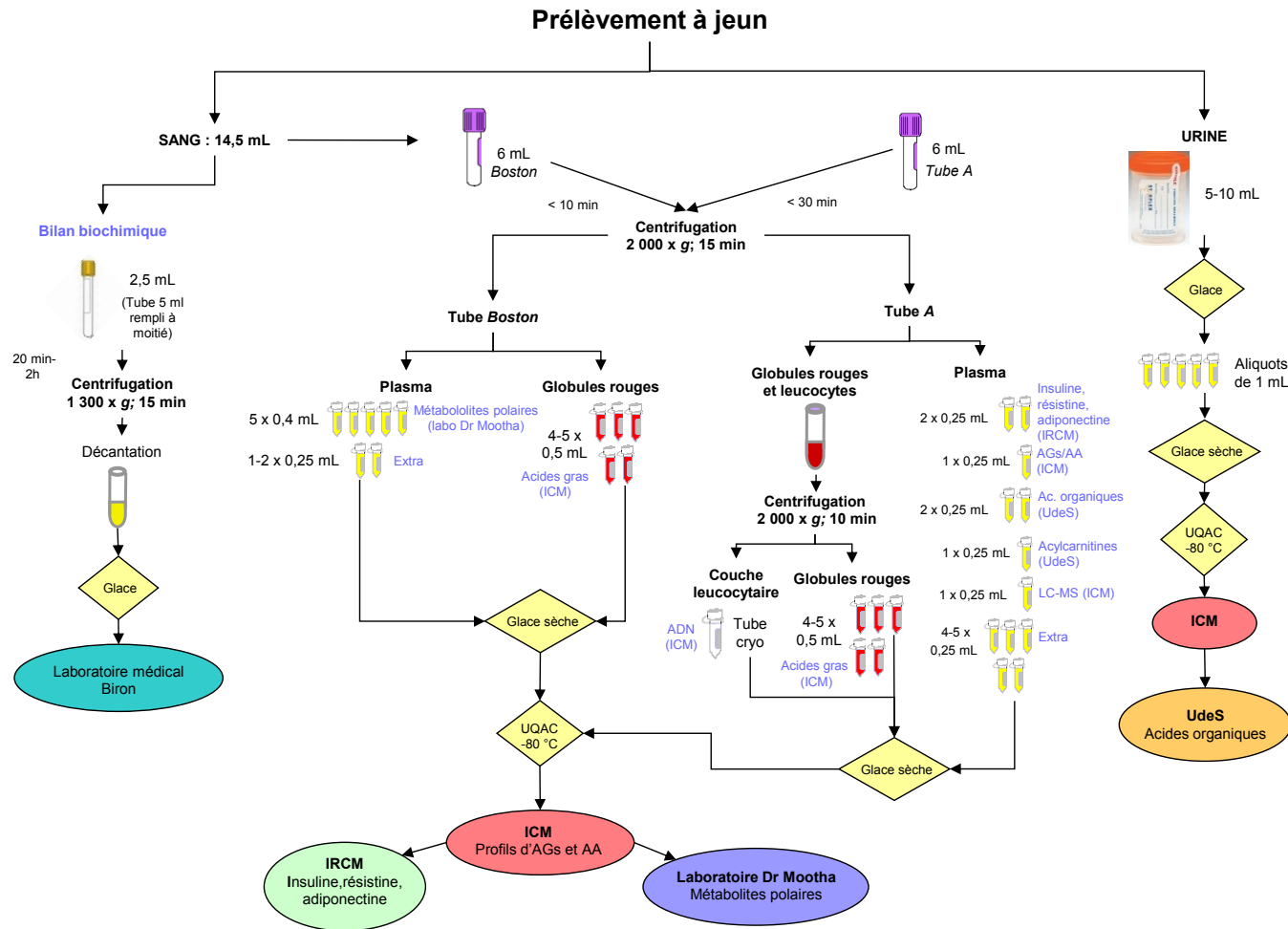


Figure 7 : Protocole de prélèvement à jeun schématisé. Le plasma destiné au laboratoire de Dr Mootha ainsi que le prélèvement des globules rouges en vue de leur dosage d'acides gras sont illustrés à titre indicatif seulement; leur analyse sera effectuée ultérieurement. AA : acides aminés; Ac. : acides; AGs : acides gras; ICM : Institut de cardiologie de Montréal; IRCM : Institut de recherches cliniques de Montréal; LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse; UQAC : Université du Québec à Chicoutimi.

Les deux études comprenaient des prélèvements sanguins à jeun (12h) et 90 minutes après la consommation du smoothie. Le sang prélevé dans le but d'isoler le plasma a été récolté dans des tubes BD Vacutainer contenant de l'acide éthylène diamine tétraacétique comme anticoagulant. Suite au prélèvement, les tubes ont été gardés sur glace et centrifugés dans un délai maximal de 30 minutes. La centrifugation a été effectuée à 2 000 x g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse VWR de modèle Clinical 100, suite à quoi le plasma, les globules rouges et la couche leucocytaire ont été récoltés dans des microtubes Sarstedt.

En plus des prélèvements inclus dans l'étude pilote, l'étude principale comprenait un bilan biochimique sérique ainsi qu'un dosage des acides organiques urinaires. Ces deux analyses ont été effectuées dans la condition à jeun seulement. L'échantillon urinaire a été récolté à partir de la première miction matinale, dans un pot de collecte stérile sans préservatif. L'échantillon sanguin en vue du bilan biochimique a été prélevé dans un tube BD Vacutainer SST contenant un gel pour la séparation du sérum. Suite à un délai d'environ 30 minutes permettant la coagulation, les tubes ont été centrifugés à 1 300 x g pendant 15 minutes. Le sérum a ensuite été transféré dans un tube de décantation et conservé à 4° C jusqu'à son acheminement dans une succursale du laboratoire Biron. Mis à part le sérum destiné au bilan biochimique, tous les aliquots ont été congelés immédiatement après la centrifugation. Ceux de l'étude pilote ont été directement entreposés à -80 °C, tandis que ceux de l'étude principale ont d'abord été conservés sur glace sèche pour le transport, puis entreposés à -80° C.

5. Génotypage

La salive a été prélevée dans un tube Oragene®-DNA OG-300 (DNA Genotek, Kanata, Ont, Canada) spécifiquement conçu pour la collecte d'ADN. L'ADN a été extrait et stabilisé selon les instructions fournies par le fabricant. Le génotypage de la mutation A354V a été effectué par PCR quantitatif en utilisant une approche de type Taqman. Les expériences ont été réalisées au laboratoire de biologie moléculaire du Centre de Santé et de Services Sociaux de Chicoutimi. Pour ce faire, une quantité de 37,5 ng d'ADN génomique a été mélangée au GTXpress Master Mix 2X (Applied Biosystems # cat 4403311, Life

Technologies, Burlington, Ont, Canada) et au mélange de réactifs AL-1 40X conçu sur mesure (Applied Biosystems # cat 4331349) contenant les amorces et les sondes. Les séquences des amorces sens et anti-sens étaient respectivement TCCCAGATGCAATGAACCTCATTTT et TGGGCCATCTTCCTTTGATACG. Les séquences des sondes sauvages et mutées étaient TTGGAAGATGTAG_cGTTGCA et TTGGAAGATGTAG_tGTTGCA respectivement (les nucléotides qui diffèrent sont soulignés). Le volume final du cocktail de réaction était de 6,2 µL. La réaction de génotypage a été effectuée à l'aide du 7500 Fast real-time PCR et du logiciel 7500 version 2.0.4 (Applied Biosystems). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 60°C pendant 1 minute, suivi de 95°C pendant 20 secondes, puis de 40 cycles d'amplification (95°C pour 3 secondes suivi de 60°C pour 30 secondes), et enfin 60°C pendant 1 minute. Les fluorophores utilisés étaient le Vic pour la sonde sauvage et le FAM-6 pour la sonde mutée, et étaient normalisés par rapport au Tamra. L'acquisition de la fluorescence a eu lieu après chaque minute à 60°C et à la fin de chaque cycle d'amplification. Le génotypage a été effectué en parallèle avec un contrôle sauvage et un contrôle hétérozygote pour la mutation A354V. Le résultat obtenu, sous forme de nuages de points, a été analysé en fonction du positionnement attendu de ces contrôles.

Le génotypage d'individus porteurs de la mutation A354V est couramment réalisé au CSSS de Chicoutimi; toutefois, ce protocole utilise habituellement du sang comme spécimen biologique, alors que notre protocole prévoyait l'utilisation d'un échantillon de salive. En ce sens, afin de s'assurer de la reproductibilité de cette nouvelle méthode, le génotypage a été répété dans un laboratoire indépendant. Ainsi, la confirmation des résultats obtenus ainsi que le génotypage pour la mutation C1277STOP ont été effectués au laboratoire de génétique et médecine génomique en inflammation de l'Institut de cardiologie de Montréal, sous la direction de Dr John Rioux. Ces expériences ont été réalisées par PCR quantitatif avec le kit Platinum Sybr Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen # cat 11733-046, Life Technologies, Burlington, Ont, Canada), où le Sybr Green est utilisé comme lecture et le Rox comme référence. Pour chaque réaction, 10 ng d'ADN génomique préalablement traité au Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a été mélangé à 10 µL de Sybr Green, 7 µL d'eau exempte de nucléase (IDT, Coralville, IA, USA) et 0,02 µL de Rox. Les amorces suivantes ont été utilisées en paires (10 µM; 1 µL/puit) : (i) Hum-LSFC-exon9-wt-01-anti 100 uM

CACTGCCAATTACATTGTCTACAA (IDT # cat 57305246) et Hum-LSFC-exon9-354V-03-sens 100 uM CTGAAAATTGGAAGATGTTATG (IDT # cat 58546487), (ii) Hum-LSFC-exon35-wt-01-sens 100 uM TTTAGAGATGTGGTGCAATTGC (IDT # cat 57305250) et Hum-LSFC-exon35-wt-01-anti 100 uM AGCAAGGCACGTACAGTATCATTG (IDT # cat 57305252), et (iii) Hum-CXCL12-02-sens 100 uM ACATCTAACCTCATCTTCTTCAC (IDT # cat 56273705) et Hum-CXCL12-02-anti 100 uM CTTACTCTTCACATAGCACATTG (IDT # cat 56273706). Ces amorces permettaient de détecter la présence de l'allèle mutée pour la mutation A354V et de l'allèle sauvage de la mutation C1277STOP. La détection de C1277STOP a été rapportée sur l'expression de CXCL12, qui corrige pour la quantité d'ADN génomique dans le puits. L'ADN génomique du patient hétérozygote composé et un pool de contrôles Italiens provenant de la cohorte ITACC du Dr. John Rioux ont été utilisé comme contrôle positif et négatif respectivement. Le génotypage a été réalisé à l'aide d'un appareil de qPCR Stratagene MX3005P. Le profil thermique de la réaction a été le suivant : 95°C pendant 10 minutes, suivi de 40 cycles de (95°C pendant 30 secondes, 50°C pendant 45 secondes puis 72°C pendant 45 secondes), 55°C pendant 30 secondes, et finalement 95°C pendant 30 secondes.

6. Analyse des métabolites

6.1. Bilan biochimique

Cette analyse a été réalisée par le laboratoire Biron, dans le cadre de l'étude principale seulement. Les dosages biochimiques ont été effectués sur un analyseur Advia 1650 (Siemens, Montréal, Qc, Canada) en utilisant les réactifs du manufacturier.

6.2. Bilan hormonal

Cette analyse a également été réalisée uniquement dans l'étude principale. Les dosages ont été effectués dans le laboratoire du Dr Rémi Rabasa-Lhoret à l'Institut de recherches cliniques de Montréal. L'insuline plasmatique a été dosée par à l'aide du kit Insulin ELISA de Mercodia (Uppsala, Suède), la résistine avec le Human resistin ELISA kit 96-Well Plate

(EMD Millipore # cat EZHR-95K, St. Charles, Missouri, USA), et l'adiponectine avec le Human adiponectin ELISA kit 96-Well Plate (EMD Millipore # cat EZHADP-61K), selon les instructions fournies par le fabricant.

6.3. Acides aminés

L'extraction des acides aminés plasmatiques a été effectuée selon une adaptation de la méthode décrite par Fiehn et collaborateurs [94]. D'abord, un volume de 50 µL de plasma a été ajouté à un mélange d'eau, de standards marqués et de méthanol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Pour l'étude pilote, les standards internes suivants ont été utilisés : $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}$ -acide glutamique, $^{13}\text{C}_4^{15}\text{N}$ -acide aspartique, $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}_2$ -glutamine, $^{13}\text{C}_3$ -alanine, $^{13}\text{C}_5$ -valine, $^{13}\text{C}_9$ -tyrosine, $^{13}\text{C}_6$ -isoleucine, $^{13}\text{C}_{11}^{15}\text{N}_2$ -tryptophane, $^{13}\text{C}_5$ -méthionine, 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -glycine (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA), $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}$ -leucine et d_5 -phénylalanine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pour l'étude principale, des standards internes supplémentaires ont été utilisés afin d'obtenir un profil plus complet. Ainsi, des standards de $^{13}\text{C}_5$ -proline, $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ -sérine, $^{13}\text{C}_4^{15}\text{N}$ -thréonine, $^{13}\text{C}_4^{15}\text{N}_2$ -asparagine, $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -lysine et $^{13}\text{C}_6$ -arginine (Cambridge Isotope Laboratories) ont également été ajoutés. La quantité de standard interne ajouté variait entre 2 et 100 nmol, en fonction de la concentration physiologique attendue dans les échantillons. Suite à l'ajout des standards internes, les échantillons ont été homogénéisés pendant 20 secondes à deux reprises à l'aide d'une tige ultrason (Sonics & Materials, Danbury, CT, USA). Un volume de 25 µL d'acide chlorhydrique (Sigma-Aldrich) à 1 M a été ajouté, puis les échantillons ont été agités pendant 15 minutes dans un bain à 70°C. Une centrifugation à 18 850 x g pendant 10 minutes a été effectuée, suite à quoi le surnageant a été récupéré et évaporé sous jet d'azote jusqu'à environ 100 µL. Un volume de 2 ml de méthanol a ensuite été ajouté, puis les échantillons ont été asséchés avec du sulfate de sodium (EMD, Darmstadt, Allemagne). Ils ont ensuite été transférés dans des vials puis évaporés à sec. Un volume de 25 µL de pyridine (Sigma-Aldrich) a été ajouté, et suite à un délai de 90 minutes à 45°C, 75 µL de N-méthyl-N-T-butyl-diméthylsilyl trifluoroacétamide + 1% T-butyl-diméthyl-chlorosilane (MtBSTFA + TBDMCS) (Regis, Morton Grove, IL, USA) ont été ajoutés afin de permettre la dérivation. Cette réaction a eu lieu pendant 4 heures à 90°C, puis les échantillons ont été injectés dans un appareil de CG-SM.

Le chromatographe (Agilent 6890N) couplé à un spectromètre de masse (5973N) était équipé d'une colonne capillaire Agilent HP-5 (longueur : 50 m; diamètre intérieur 0,2 mm; épaisseur : 0,5 μm). L'appareil a été utilisé en mode d'ionisation à impact électronique. L'hélium a servi de gaz vecteur à un débit de 20,2 mL/min, en mode de division de flux à un ratio de 23,2:1. Un volume de 2 μL de chaque échantillon a été injecté dans l'appareil. Les conditions de température ont été les suivantes : 150°C pendant 3 minutes, suivi d'une augmentation de 7°C/min jusqu'à 210°C, puis de 7°C/min jusqu'à 310°C, et enfin de 10°C/min jusqu'à 320°C. Les acides aminés ont été identifiés à l'aide de leur ratio masse/charge et leur temps de rétention respectifs, et la concentration de chacun a été calculée à partir de celle de son standard interne marqué correspondant.

6.4. Acides gras

L'extraction des lipides totaux a été effectuée selon une adaptation de la méthode proposée par Matyash et collaborateurs [95], telle que décrite dans une étude de Gélinas et collaborateurs [96] réalisée dans notre laboratoire. Pour ce faire, un volume de 750 μL d'une solution de méthanol (Fisher Scientific) contenant 0,004% d'hydroxytoluène butylé (BHT) (Sigma-Aldrich) a été ajouté à 100 μL de plasma. Un mélange de standards marqués a ensuite été ajouté; celui-ci était composé de d_{27} -acide myristique, de d_{35} -acide stéarique, de $^{13}\text{C}_{18}$ -acide oléique (Sigma-Aldrich), de $^{13}\text{C}_{16}$ -acide palmitique (Cambridge Isotope Laboratories), de d_3 -acide arachidique et de d_3 -acide béhénique (C/D/N Isotopes, Pointe-Claire, Qc, Canada). Il n'y avait pas de standard interne marqué (homologue) commercialement disponible pour tous les acides gras mesurés. Dans certains cas, le standard interne disponible dont la structure s'apparentait le mieux à la molécule à être dosée a donc été utilisé (tableau IV, p. 44); on parle alors de « standard externe ». Par la suite, un volume de 2,5 mL de méthyl-tert-butyl éther (MTBE) (Fisher Scientific) a été ajouté, puis les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant une heure sur une plaque agitatrice. Un volume de 625 μL d'eau a été rajouté afin de permettre la séparation des phases, et une agitation sur plaque a été effectuée à température ambiante pendant 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 1 000 x g pendant 10 minutes, suite à quoi la phase supérieure (organique) a été récoltée. La phase inférieure a ensuite été ré-extraite avec 1 mL de la phase supérieure d'une solution de

MTBE/méthanol/eau (10:3:2,5), suivi d'une incubation à température ambiante sur plaque agitatrice pendant 10 minutes et d'une centrifugation à 1 000 x g pendant 10 minutes. La phase supérieure a été récoltée, puis les deux phases supérieures combinées ont été asséchées à sec sous jet d'azote.

La trans-méthylation des acides gras a ensuite été effectuée selon une adaptation de la méthode décrite par Lepage et Roy [97]. À chaque échantillon ont été ajoutés 2 mL d'un mélange hexane/méthanol (1:4) (l'hexane provenant de Laboratoire Mat, Québec, Qc, Canada) contenant 0,004% BHT, suivi de 200 µL de chlorure d'acétyle (Sigma-Aldrich) sous agitation magnétique. Les tubes ont ensuite été placés à 100°C pour 60 minutes, toujours sous agitation. Après refroidissement, 5 mL d'une solution de carbonate de potassium (K₂CO₃) (Sigma-Aldrich) à 6% ont été ajoutés à chaque échantillon, permettant de neutraliser le chlorure d'hydrogène généré par le chlorure d'acétyle. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 1 200 x g pour 5 minutes, après quoi la phase supérieure (hexane) contenant les esters méthyliques d'acides gras a été prélevée dans une vial. Les échantillons ont finalement été injectés dans l'appareil de CG-SM.

Le chromatographe (Agilent 6890N) couplé à un spectromètre de masse (5975N) était équipé d'une colonne capillaire Varian CP7420 (longueur : 100 m; diamètre intérieur : 0,25 mm; épaisseur : 0,23 µm). L'appareil a été utilisé en mode d'ionisation chimique positif. L'ammoniac a servi de gaz réactif, et l'hélium de gaz vecteur à un débit de 14,8 mL/min, en mode de division de flux à un ratio de 21,7:1. Un volume de 2 µL de chaque échantillon a été injecté dans l'appareil. Les échantillons ont été soumis aux conditions de température suivantes : 190°C pendant 25 minutes, suivi d'une augmentation de 2°C/min jusqu'à 236°C. Les acides gras ont été identifiés à l'aide de leur ratio masse/charge et de leur temps de rétention respectifs. La concentration de chacun a été calculée à partir de celle du standard interne ou externe selon le cas (tableau IV, p. 44).

Tableau IV : Acides gras mesurés et standards utilisés pour la quantification

Acide gras à quantifier	Standard utilisé
Acide myristique (C14:0)	d ₂₇ -Acide myristique
Acide palmitique (C16:0)	¹³ C ₁₆ -Acide palmitique
Acide palmitoléique (C16:1n-7)	¹³ C ₁₆ -Acide palmitique
Acide stéarique (C18:0)	d ₃₅ -Acide stéarique
Acide oléique (C18:1n-9)	¹³ C ₁₈ -Acide oléique
Acide vaccénique (C18:1n-7)	¹³ C ₁₈ -Acide oléique
Acide linoléique (C18:2n-6)	¹³ C ₁₈ -Acide oléique
Acide γ -linoléique (C18:3n-6)	¹³ C ₁₈ -Acide oléique
Acide α -linoléique (C18:3n-3)	¹³ C ₁₈ -Acide oléique
Acide dihomogamma-linoléique (C20:3n-6)	d ₃ -Acide arachidique (d ₃ -C20:0)
Acide de Mead (C20:3n-9)	d ₃ -Acide arachidique (d ₃ -C20:0)
Acide arachidonique (C20:4n-6)	d ₃ -Acide arachidique (d ₃ -C20:0)
Acide eicosapentaénoïque (C20:5n-3)	d ₃ -Acide arachidique (d ₃ -C20:0)
Acide docosapentaénoïque (C22:5n-3)	d ₃ -Acide béhénique (d ₃ -C22:0)
Acide docosahexaénoïque (C22:6n-3)	d ₃ -Acide béhénique (d ₃ -C22:0)

6.5. Acides organiques

Le dosage des acides organiques plasmatiques et urinaires a été effectué dans le laboratoire de biochimie génétique du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. Les composés qui ont été mesurés sont présentés dans le tableau V (p. 45). Un volume de 500 μ L de plasma ou de 1 mL d'urine a été utilisé, parallèlement à un contrôle positif et négatif. À chaque échantillon a d'abord été ajouté un volume de 50 μ L de standard interne d'acide homovératrique et d'acide 2-cétohexanoïque (1mg/mL). Un volume de 100 μ L de chlorhydrate de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (50 mg/mL) a été ajouté, suivi de 40 μ L d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 0,25 M. Après incubation pendant une heure à température pièce, 40 μ L d'acide chlorhydrique (HCl) à 5N ont été ajoutés, puis les tubes ont été saturés avec du chlorure de sodium (NaCl). Une double extraction avec 2 mL d'acétate d'éthyle a été effectuée, suivie d'une extraction avec 2 mL d'éther. Les phases organiques extraites ont été combinées, puis évaporées sous jet d'azote. Un volume de 100 μ L de BSTFA-Regisil® (N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide + 10% triméthylchlorosilane) a été

ajouté, suivi d'une dérivation à 70°C pendant une heure. Les échantillons ont ensuite été injectés dans un appareil de CG-SM.

Tableau V : Acides organiques mesurés

Acétoacétique	Méthylsuccinique	2-méthyl-3-hydroxybutyrique
Adipique	Mévalonolactone	2-méthylacétoacétique
Benzoïque	N-acétylaspartique	2-méthylbutyrylglycine
Butyrylglycine	Oxalique	2-oxoadipique
Citrique	Oxoproline (pyroglutamique)	2-oxoglutarique
Éthylmalonique	Phénylpropionylglycine	2-oxoisovalérique
Fumarique	Phénylacétique	3-hydroxybutyrique
Glutarique	Phényllactique	3-hydroxyglutarique
Glycérique	Phénylpyruvique	3-hydroxyisovalérique
Glycolique	Propionylglycine	3-hydroxy-3-méthylglutarique
Hexanoylglycine	Pyruvique	3-hydroxypropionique
Hippurique	Sébacique	3-méthylcrotonylglycine
Homogentisique	Subérique	3-méthylglutaconique
Homovanillique	Succinylacétone	3-méthylglutarique
Isobutyrylglycine	Vanillymandélique	4-hydroxybutyrique
Isovalérylglycine	2-hydroxyadipique	4-hydroxyphénylacétique
Lactique	2-hydroxyglutarique	4-hydroxyphényllactique
Malonique	2-hydroxyisocaproïque	4-hydroxyphénylpyruvique
Méthylcitrique	2-hydroxyisovalérique	
Méthylmalonique	2-hydroxyphénylacétique	

6.6. Acylcarnitines

Le dosage des acylcarnitines a également été réalisé dans le laboratoire de biochimie génétique du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. Les composés qui ont été mesurés sont présentés dans le tableau VI (p. 46). Brièvement, un volume de 20 µL de plasma a été mélangé à 400 µL d'une solution de méthanol contenant des standards internes deutérés. Après avoir reposé pendant 5 minutes, les échantillons ont été centrifugés à 13 500 x g pendant 5 minutes, suite à quoi le surnageant a été prélevé et évaporé sous jet d'azote. Un volume de 100 µL de butanolique-HCl 3N a été ajouté, puis les échantillons ont été chauffés à 55°C pendant 20 minutes. Après évaporation sous azote, les échantillons ont été reconstitués

dans 100 µL de phase mobile (ACN : H₂O à un ratio 80:20 + 0.05% acide formique). Les échantillons reconstitués ont ensuite été transférés dans des vials pour HPLC puis injectés dans un appareil de CL-SM-SM.

Tableau VI : Acylcarnitines mesurés

C0 (Carnitine libre)	C8 (Octanoyl)	C14:2 (Tétradécadiénoyl)*
C2 (Acétyl)	C3-DC (Malonyl)*	C14:1 (Tétradécénoyl)*
C3 (Propionyl)	C10:2 (Décadiénoyl)*	C14-OH (3-OH-tétradécénoyl)*
C4 (Butyryl/Isobutyryl)	C10:1 (Décénoyl)*	C16 (Palmitoyl)
C5:1 (Tiglyl/Méthylcrotonyl)*	C10 (Décénoyl)*	C16-OH (3-OH-palmitoyl)*
C5 (Isovaléryl/2-Méthylbutyryl)	C8/C10 (Ratio C8:C10)	C18:1 (Oléoyl)*
C4-OH (3-OH-butyryl)*	C4-DC (Méthylmalonyl/succinyl)*	C18:1-OH (3-OH-oléoyl)*
C6 (Hexanoyl)*	C5-DC (Glutaryl)*	
C5-OH (3-OH-isovaléryl/3-OH-2-méthylbutyryl)*	C6-DC (Adipoyl/Méthylglutaryl)*	

*Exprimé en fonction du ratio acylcarnitine/standard interne deutéré non homologue; (semi quantitatif)

7. Analyses statistiques

Les résultats des deux études sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type (SD), ou, dans le cas de certains graphiques, sous forme de médiane et d'étendue afin de visualiser la distribution. Les données ont été analysées par des approches statistiques univariées et multivariées.

Pour l'étude pilote, un test de *t* bilatéral pour données appariées a été utilisé afin d'évaluer la différence entre les niveaux de métabolites à jeun et ceux mesurés après la consommation du smoothie. Une différence statistiquement significative a été déclarée lorsque $P < 0,05$. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel « GraphPad Prism » 5.

7.1. Analyses par permutation

Pour l'étude principale, les données ont été soumises à un test de permutation. Ce type de test crée des réarrangements à partir d'un ensemble de données préexistantes. Il est réalisé en trois étapes : (i) le test statistique est d'abord effectué sur les observations originales, (ii)

l'identification des groupes (e.g. statut patient/témoin) est inversée, puis le test est effectué à nouveau et répété jusqu'à l'obtention d'une distribution du test pour tous les réarrangements possibles, et finalement (iii) le pourcentage de réarrangements générant des valeurs de test qui sont équivalentes ou plus extrêmes que les valeurs originales est déterminé. Pour les petits échantillons, il s'agit d'un des tests les plus puissants [85]. Un de ses avantages réside dans le fait que les valeurs de P qui sont générées ne reposent pas sur la distribution sous-jacente des observations.

Le test a été réalisé à l'aide d'un script rédigé en langage de programmation R version 2.15.1 (*Roasted Marshmallows* ©, R Foundation for Statistical Computing). Un total de 256 (2^8) permutations non équivalentes a été effectué. Les permutations ont été effectuées par paires, i.e. patient et témoin correspondant. Cette approche augmente la puissance du test en éliminant les sources indésirables de variation [85]. Quatre questions expérimentales ont été générées, soit (i) la différence entre les patients et les témoins, à jeun seulement; (ii) la différence entre les patients et les témoins, à jeun et en postprandial simultanément; (iii) la différence entre l'état à jeun et l'état postprandial, peu importe le groupe, et (iv) la différence d'effet de la consommation du smoothie entre les patients et les témoins. Le seuil de significativité a été déterminé sur la base de l'estimation du nombre de vrais positifs comparativement au nombre de faux positifs générés lors de la réalisation du test (voir section 2.2 dans Résultats).

7.2. Analyses de composantes principales

L'analyse des données représente un défi pour toutes les sciences « omiques ». Dans le domaine de la métabolomique, un nombre élevé de données quantitatives est généré pour l'analyse de chaque échantillon. Ainsi, des outils informatiques sont nécessaires pour gérer et interpréter cette grande quantité de données [78]. Les approches statistiques conventionnelles constituent souvent un bon point de départ, mais des analyses plus sophistiquées, comme les méthodes statistiques multivariées non supervisées, sont généralement employées afin de simplifier et de mieux visualiser graphiquement les données [78,79]. L'analyse des composantes principales (PCA) est l'une de ces méthodes non supervisées; elle permet de réduire les grands ensembles de données à un petit nombre d'indices, appelés composantes

principales, qui sont des combinaisons linéaires des variables originales. La première combinaison linéaire est la première composante principale; elle a la plus grande variance possible. La deuxième composante principale a la plus grande variance possible sans être corrélée à la première composante, et ainsi de suite [98]. Graphiquement, les échantillons dont le profil métabolique est similaire auront donc tendance à se regrouper [80]. Ainsi, les données de l'étude pilote et de l'étude principale ont également été analysées de façon exploratoire par PCA à l'aide du logiciel « SIMCA-P+ » 13.0 de Umetrics. Le nombre de composantes principales générées a été calculé par validation croisée. Pour l'étude principale, seuls les métabolites considérés dans les tests de permutation ont été inclus dans l'analyse. Pour des raisons de visualisation graphique, seules les deux premières composantes principales sont illustrées.

Résultats

1. Étude pilote

Préalablement à l'étude principale, une étude pilote a été conduite afin d'investiguer la réponse métabolique au smoothie standardisé chez des sujets sains. Ainsi, des prélèvements sanguins ont été effectués chez 4 individus à jeun et 90 minutes après la consommation du smoothie. Les caractéristiques de chaque sujet sont présentées dans le tableau VII (p. 49). Trois hommes et une femme ont été recrutés; l'âge moyen (\pm l'écart-type) était de $24,5 \pm 6,8$ ans et l'IMC moyen était de $22,5 \pm 4,1$ kg/m².

Tableau VII : Caractéristiques des sujets de l'étude pilote

# Sujet	Sexe	Âge	IMC	NAP
1	H	17	19,4	Sédentaire
2	F	21	19,7	Sédentaire
3	H	32	28,1	Très actif
4	H	28	22,7	Faiblement actif

Le tableau VIII (p. 50) montre les coefficients de variation (écart-type/moyenne; CV) interindividuels des différentes classes de métabolites analysées. Ce calcul a été effectué sur les concentrations brutes mesurées à jeun et en postprandial. Nous avons également calculé les CV sur la réponse au smoothie (concentration postprandiale/concentration à jeun) pour chaque métabolite, afin d'évaluer la variabilité dans les changements métaboliques induits par la consommation. Les valeurs affichées représentent les moyennes obtenues pour chaque classe de métabolites. Ainsi, d'importants CV ont été observés sur les concentrations brutes mesurées à jeun et en postprandial (tableau VIII, p. 50). Sauf pour les acylcarnitines, les CV calculés sur la réponse au smoothie (effet de la consommation) étaient plus faibles que les CV calculés sur les concentrations brutes de métabolites dans chacune des deux conditions nutritionnelles, i.e. à jeun et postprandial. Puisqu'une seule femme était incluse dans l'échantillon, les CV ont

également été calculés en ne considérant que les hommes; les deux approches ont toutefois mené à des résultats similaires.

Tableau VIII : Variation interindividuelle dans les profils métaboliques de l'étude pilote

	CV chez tous les sujets			CV chez les hommes seulement		
	À jeun	Post-prandial	Réponse	À jeun	Post-prandial	Réponse
Acides aminés	25%	24%	11%	22%	24%	12%
Acides gras	51%	53%	10%	52%	51%	9%
Acides organiques	49%	51%	44%	52%	53%	44%
Acylcarnitines	35%	31%	37%	39%	33%	37%
Moyenne	40%	40%	26%	41%	40%	25%

La figure 8 (p. 51) illustre la réponse métabolique globale de chaque sujet; ainsi, il est possible de constater que pour les 4 individus, la majorité des métabolites mesurés ne montrent pas de modification suite à la consommation du smoothie. On observe néanmoins une légère perturbation du profil métabolique chez chaque sujet, illustrée par le fait que les niveaux de certains métabolites soient modifiés à la hausse ou à la baisse. Les 3 hommes semblent montrer une perturbation similaire, avec relativement autant de métabolites qui augmentent que de métabolites qui diminuent. La femme, quant à elle, se distingue par le fait que davantage de métabolites montrent une diminution à l'état postprandial par rapport à ceux montrant une augmentation. Par conséquent, les données ont subséquemment été traitées en ne considérant que les hommes en plus de considérer tous les sujets. Ces résultats doivent toutefois être interprétés en considérant le fait que diminuer la taille de l'échantillon puisse engendrer une perte de puissance statistique.

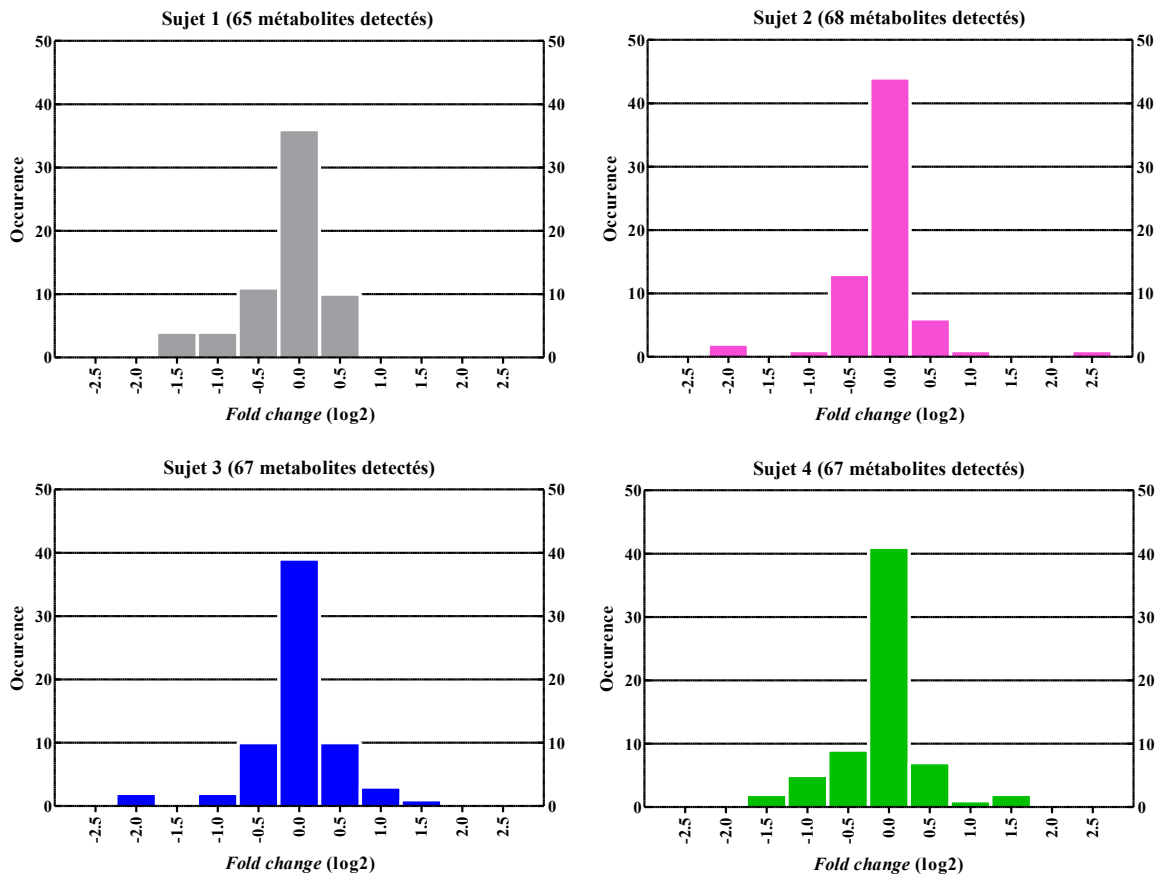


Figure 8 : Réponse métabolique globale de chaque sujet de l'étude pilote. Chaque graphique représente l'occurrence (i.e. le nombre) de métabolites en fonction du *fold-change* (valeur postprandiale/valeur à jeun) exprimé sous forme logarithmique en base 2. Une valeur de 0 en abscisse indique qu'aucun changement n'est observé; une valeur de 1 indique une augmentation de 2 fois, tandis qu'une valeur de -1 indique une diminution de 2 fois.

Bien que peu de différences significatives aient été obtenues dans les profils métaboliques suite à la consommation du smoothie, certaines tendances ont tout de même pu être observées. Celles-ci sont présentées au tableau IX (p. 52), qui indique quels métabolites montraient une tendance similaire, i.e. une augmentation ou une diminution, chez tous les individus et chez les 3 hommes. Le fait de ne considérer que ces derniers engendre qu'un nombre plus élevé de métabolites montre des tendances semblables, ceci étant expliqué par

une importante modification du profil des acides gras en postprandial chez les sujets masculins.

Tableau IX : Tendances postprandiales observées dans les profils métaboliques

	Tous les sujets	Hommes seulement
Acides aminés	↑ Alanine (17±9%)* ↓ Leucine (5±4%)	↑ Alanine (17±11%) ↓ Leucine (6±3%)*
Acides gras	↑ C18:3n-3 (45±40%)	↑ C18:0 (15±13%) ↑ C18:1n-9 (14±6%) ↑ C18:1n-7 (22±16%) ↑ C18:2n-6 (17±3%)* ↑ C18:3n-3 (58±36%) ↑ Total des AGS (5±1%)* ↑ Total des AGPI (16±4%)*
Acides organiques	↓ 2-oxoisovalérique (31±20%)*	↓ 2-oxoglutarique (16±3%)* ↓ 2-oxoisovalérique (30±24%)
Acylcarnitines	↑ C3 (30±37%) ↓ C18:1 (20±7%)	↑ C3 (37±42%) ↓ C18:1 (22±7%)
Total	3 ↑ 3 ↓	9 ↑ 4 ↓

* $P < 0,05$ à jeun vs postprandial

↑ : augmentation; ↓ : diminution; AGS : acides gras saturés; AGPI : acides gras polyinsaturés

Parmi les 12 acides aminés analysés, seuls les niveaux d'alanine ont été modifiés significativement chez les 4 sujets, avec une augmentation à l'état postprandial (tableau IX, p. 52). Lorsque seuls les hommes sont considérés, les niveaux de leucine étaient significativement diminués; or, la différence dans les niveaux d'alanine n'était plus significative.

Aucune différence significative n'a été observée dans le profil des 15 acides gras en considérant les 4 sujets. Une tendance à la hausse, mais non statistiquement significative ($P = 0,158$) était toutefois présente pour l'acide α -linoléique (C18:3n-3) (tableau IX, p. 52). Toutefois, chez les hommes, une augmentation significative était observée dans les niveaux d'acide linoléique (C18:2n-6), du total des acides gras saturés (AGS; C14:0, C16:0 et C18:0) et du total des acides gras polyinsaturés (AGPI; C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C20:3n-6, C20:3n-9, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:5n-3 et C22:6n-3).

Une importante variation interindividuelle a été observée dans le profil des acides gras, reflétée par de grandes valeurs d'écart-types (données brutes non montrées; certains écarts-type relatifs sont présentés au tableau IX, p. 52). Ainsi, il est également pertinent de considérer la réponse individuelle de chaque sujet suite à la consommation du smoothie. La figure 9 (p. 53) permet de constater que cette grande variation interindividuelle est due au fait que le sujet 3 présente des niveaux d'acides gras particulièrement élevés, autant à jeun qu'en postprandial. Cette tendance est d'ailleurs observée pour tous les acides gras mesurés chez cet individu (données non montrées).

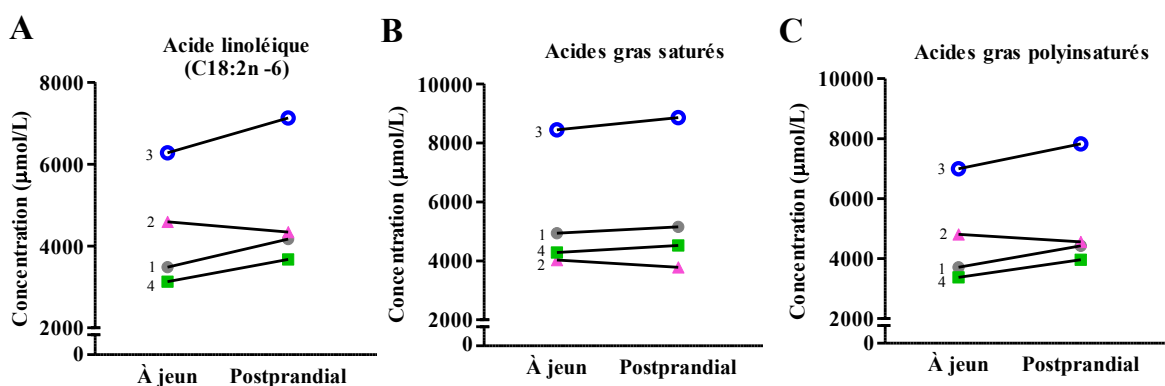


Figure 9 : Effet de la consommation du smoothie sur la concentration d'acides gras totaux des 4 sujets de l'étude pilote. Chaque sujet est représenté individuellement. (A) représente l'acide linoléique, (B) représente le total des acides gras saturés mesurés, et (C) représente le total des acides gras polyinsaturés mesurés. Le triangle rose représente la femme.

Parmi les 58 acides organiques mesurés, une moyenne de 18 composés a été détectée pour chaque sujet, les autres composés étant sous la limite de détection. Un seul acide organique a été significativement modifié suite à l'ingestion du smoothie. Il s'agit de l'acide 2-oxoisovalérique, dont les niveaux étaient diminués en postprandial (tableau IX, p. 52). Lorsque seulement les hommes étaient considérés, les niveaux d'acide 2-oxoglutarique étaient significativement diminués; or, la différence dans les niveaux d'acide 2-oxoisovalérique n'était plus significative.

Parmi les 24 acylcarnitines ayant été mesurés, une moyenne de 21 composés a été détectée pour chaque sujet. Ce profil n'a montré aucune modification significative suite à la consommation du smoothie, et ce, autant en considérant tous les sujets que les hommes seulement. Par contre, dans les deux groupes, une tendance à la hausse non statistiquement significative a été observée pour le propionylcarnitine (C3; $P = 0,068$ avec tous les sujets et $P = 0,125$ chez les hommes seulement), de même qu'une tendance à la baisse non statistiquement significative pour l'oléoylcarnitine (C18 :1; $P = 0,058$ avec tous les sujets et $P = 0,130$ chez les hommes seulement) (tableau IX, p. 52).

Afin de permettre une visualisation plus globale, les données de l'étude pilote ont ensuite été soumises à une analyse des composantes principales exploratoire (figure 10, p. 54). L'ensemble de données a ainsi été réduit à quelques composantes principales décrivant la plus grande partie de la variation dans les résultats. Les deux premières composantes ont été respectivement responsables de 33% et 30% de la variation. On observe un regroupement des données propres à chaque sujet, et non en fonction de la condition nutritionnelle. En ce sens, la variation interindividuelle observée à jeun et en postprandial était plus importante que la perturbation métabolique engendrée par la consommation du smoothie.

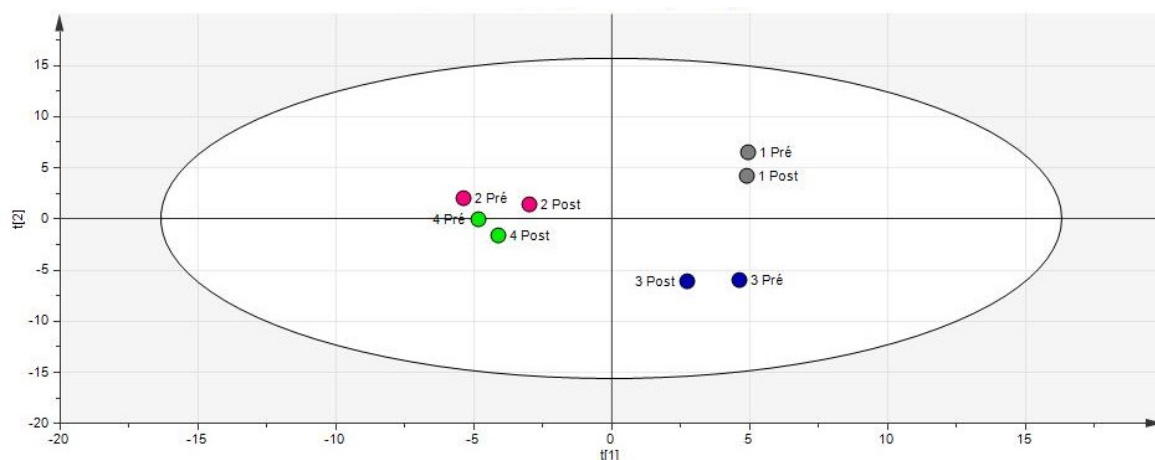


Figure 10 : Analyse des composantes principales des données de l'étude pilote. Les deux premières composantes expliquent 63% de la variation dans les données. Les métabolites non détectés n'ont pas été considérés dans l'analyse. L'ellipse représente l'intervalle de confiance à 95%. t[1] : première composante; t[2] : deuxième composante; Pré : à jeun; Post : postprandial.

En somme, cette étude pilote a permis de montrer qu'une importante variabilité interindividuelle était présente dans le profil métabolique des sujets de notre échantillon, et ce, même après la consommation du repas standardisé. Bien qu'une seule femme était incluse dans l'échantillon, il semble que le sexe ait pu influencer les niveaux de métabolites que nous avons mesurés. De plus, même si le smoothie n'a pas eu d'effet très important sur le profil métabolique, l'étude a montré la reproductibilité et la faisabilité de notre protocole de prélèvement. Suite à ce projet pilote, la composition du smoothie aurait pu être modifiée de façon à en augmenter la charge calorique, mais puisque les sujets LSFC sont susceptibles d'avoir une capacité réduite à métaboliser les nutriments, il a été convenu de conserver la même recette et la même quantité administrée afin de s'assurer que l'étude principale se déroule de la façon la plus sécuritaire possible. Enfin, la grande variabilité observée dans les résultats de l'étude pilote a consolidé notre choix d'apparier les sujets pour l'âge, le sexe, l'IMC et le niveau d'activité physique lors de la réalisation de l'étude principale.

2. Étude principale

2.1. Caractéristiques des sujets

Les caractéristiques des patients et des témoins appariés sont présentées dans le tableau X (p. 56), sous forme de moyenne \pm écart-type. Tel que mentionné à la section 2.2.3.2, le patient hétérozygote composé possède un génotype différent de même qu'un tableau clinique particulier comparativement aux autres sujets atteints; les données de ce patient et de son témoin sont ainsi présentées séparément. Les caractéristiques détaillées pour chaque sujet sont disponibles en annexe. Une importante hétérogénéité a été observée dans le temps qu'ont pris les patients pour consommer le smoothie. En effet, celui-ci variait de 2 à 63 minutes (données individuelles non montrées); de plus, dans ce dernier cas, la patiente n'a consommé que 22% de la quantité lui ayant été offerte. Afin de conserver un appariement optimal entre les sujets de l'étude, le smoothie a été administré sur un laps de temps identique chez les témoins comparativement aux patients avec lesquels ils étaient appariés. Le délai de 90 minutes a été calculé à partir du moment où les sujets finissaient de consommer le smoothie. De plus, dans

le cas unique de la patiente n'ayant pas consommé toute la quantité offerte, un volume correspondant à 22% de la quantité prévue a été administrée au témoin.

Tableau X : Caractéristiques des sujets de l'étude principale

	Témoins				Patients			
	Tous (n=9)	Enfants (n=4)	Adultes (n=4)	Hét. composé	Tous (n=9)	Enfants (n=4)	Adultes (n=4)	Hét. composé
Sexe (H:F)	4:5	2:2	1:3	H	4:5	2:2	1:3	H
Âge	20,3± 10,2	10,1± 3,6	28,5± 3,8	27,8	19,6± 9,2	10,5± 2,8	25,9± 4,0	30,5
IMC¹	N/A	58,5± 42,3	24,5± 3,6	24,0	N/A	60,0± 44,6	24,9± 1,8	22,3
Activité physique (min/jour)	19,3± 13,1	30,0± 12,6	12,0± 4,2	6,0	20,2± 17,7	30,0± 11,5	12,3± 21,9	12,9
Délai de consommation du smoothie (min)	22,6± 19,1	21,3± 23,2	27,5± 18,0	8,0	27,8± 21,3	26,5± 25,9	34,0± 19,0	8,0

Hét. : hétérozygote; N/A : non applicable

¹Les valeurs d'IMC sont en percentile de l'IMC pour l'âge chez les enfants et en kg/m² chez les adultes

2.2. Contrôle qualité des données métaboliques et analyses par permutation

En considérant les différentes classes de métabolites, 141 composés ont été mesurés dans le plasma. Avec les 58 acides organiques dosés dans l'urine, un total de 199 composés a donc été mesuré. Parmi eux, 142 ont été détectés lors des différentes analyses, ou en d'autres mots, avaient une valeur non nulle pour au moins un des 18 sujets. Par la suite, une vérification des données a été effectuée afin d'éliminer les métabolites dont les niveaux se situaient près de la limite de détection, représentant ainsi un risque élevé de faux positif. De plus, les métabolites qui montraient une valeur extrême ou aberrante ont également été exclus,

car les tests de permutation sont sensibles à ce type de données. Au final, 108 métabolites ont été conservés pour les analyses subséquentes, incluant 88 métabolites plasmatiques et 20 métabolites urinaires.

Le seuil à utiliser pour déclarer une différence statistiquement significative a été déterminé sur la base de l'estimation du nombre de vrais et de faux positifs lors de la réalisation des tests par permutation, en comparant les données des patients et des témoins pour le prélèvement à jeun. La figure 11 (p. 57) illustre cette démarche. Ainsi, de façon à maximiser le nombre de vrais positifs tout en minimisant le risque de faux positif, un seuil α de 0,03 a été choisi. Ce processus engendre un taux estimé de faux positif de près de 10%, soit environ 3 métabolites.

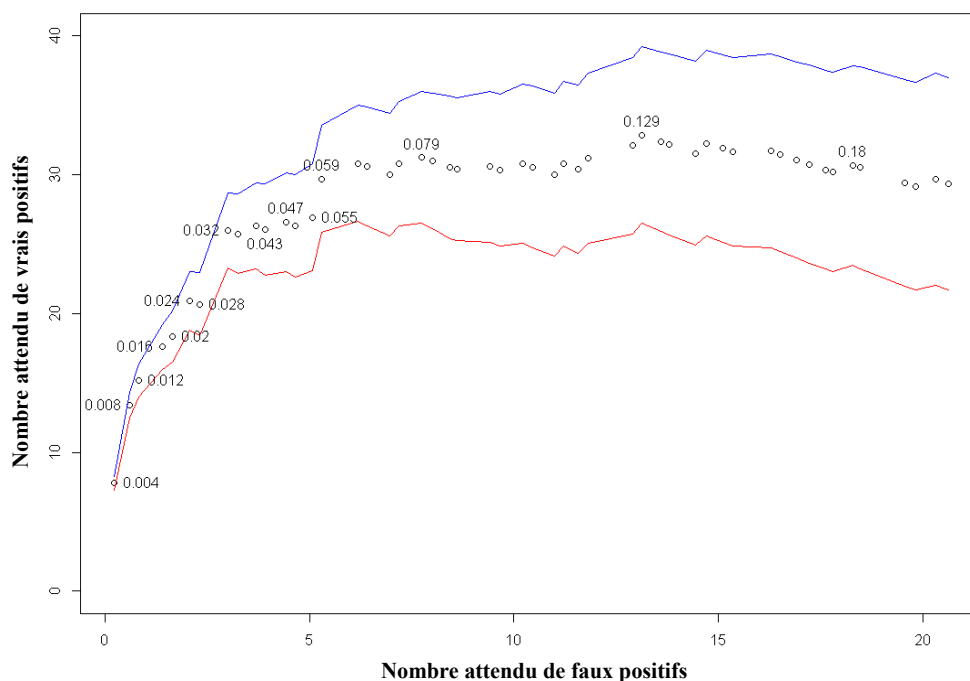


Figure 11 : Démarche utilisée pour déterminer le seuil de significativité des analyses par permutation. Le graphique correspond aux données du prélèvement à jeun. Cette analyse a été effectuée avec le logiciel R version 2.15.1.

La prochaine section montre les résultats des analyses univariées effectuées à partir des tests de permutation, et la subséquente illustre les résultats des analyses multivariées. Les

différences observées seront d'abord présentées de façon détaillée dans la section des analyses univariées, puis de façon plus globale dans celle des analyses multivariées. Une attention plus importante sera portée sur les différences entre les patients et les témoins.

2.3. Analyses univariées des données métaboliques

Cette section présente les résultats pour chaque classe de métabolites chez les patients et les témoins, dans les conditions nutritionnelles dans lesquelles les composés ont été analysés. Dans chaque tableau sont identifiées les différences statistiquement significatives entre les patients et les témoins, et, lorsque cela s'applique, entre la condition à jeun et postprandiale. Afin de repérer plus facilement les différences statistiquement significatives entre les patients et les témoins, celles-ci sont indiquées en gras dans les différents tableaux.

2.3.1. Bilan biochimique

Les données du bilan biochimique à jeun sont présentées dans le tableau XI (p. 59). Parmi les 19 variables mesurées, seulement 2 ont montré des différences significatives entre les patients et les témoins. Ainsi, le ratio cholestérol total/HDL était significativement augmenté chez les patients, alors que les niveaux de HDL-cholestérol étaient significativement diminués comparativement aux témoins. À noter que les valeurs du débit de filtration glomérulaire estimé ne se retrouvent pas dans le tableau, l'équation permettant de le calculer n'étant pas validée chez la population pédiatrique; les valeurs indiquaient toutefois une fonction rénale normale pour tous les sujets adultes.

Tableau XI : Bilan biochimique

	Témoins	Patients
Glucose (mmol/L)	4,7±0,2	4,9±0,5
Urée (mmol/L)	5,3±0,9	5,1±0,7
Créatinine (µmol/L)	61±14	53±13
Acide urique (µmol/L)	283±68	284±67
Calcium (mmol/L)	2,43±0,11	2,43±0,07
Phosphore (mmol/L)	1,47±0,26	1,43±0,39
Cholestérol total (mmol/L)	4,44±0,60	4,85±1,12
Triglycérides (mmol/L)	0,97±0,36	1,86±1,17
HDL-Cholestérol (mmol/L)	1,49±0,32	1,10±0,24*
LDL-Cholestérol (mmol/L)	2,51±0,56	2,90±0,80
Cholestérol total/HDL	3,09±0,67	4,58±1,34*
Protéines totales (g/L)	73±4	73±4
Albumine (g/L)	45±3	46±2
Bilirubine totale (µmol/L)	12±7	9±3
Phosphatase alcaline (U/L)	146±117	161±76
Lactate déshydrogénase (U/L)	168±46	159±44
Aspartate aminotransférase (U/L)	30±24	23±6
Alanine aminotransférase (U/L)	27±17	24±11
γ-Glutamyl-transpeptidase (U/L)	16±10	27±27

* $P < 0,03$ patients vs témoins

2.3.2. Bilan hormonal

Les résultats du dosage de l'insuline, de la résistine et de l'adiponectine sont présentés au tableau XII (p. 59). Dans les deux conditions nutritionnelles, la concentration d'insuline était significativement augmentée chez les patients, tandis que celle de l'adiponectine était diminuée.

Tableau XII : Bilan hormonal

Concentration	À jeun		Postprandial	
	Témoins	Patients	Témoins	Patients
Insuline (mU/L)	5,65±2,98	10,78±7,04*	5,99±3,22	10,89±8,31*
Résistine (ng/mL)	8,73±2,12	9,02±2,42	8,21±1,77	9,00±2,05
Adiponectine (µg/mL)	12,7±10,2	4,92±3,34*	12,3±9,3	4,70±2,69*

* $P < 0,03$ patients vs témoins

2.3.3. Acides aminés

Les profils d'acides aminés plasmatiques à jeun et postprandiaux sont présentés dans le tableau XIII (p. 60). Dans les deux conditions nutritionnelles, les concentrations d'alanine étaient significativement augmentées, tandis que les concentrations d'asparagine étaient diminuées chez les patients comparativement aux témoins.

En considérant conjointement les patients et les témoins, les concentrations d'alanine et d'arginine étaient significativement plus élevées à l'état postprandial comparativement à la condition à jeun. De plus, les concentrations de valine, de leucine et de méthionine étaient plus faibles suite à la consommation du smoothie.

Tableau XIII : Profil d'acides aminés

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	À jeun		Postprandial	
	Témoins	Patients	Témoins	Patients
Alanine	297 \pm 60	434\pm100*	341 \pm 89 ^S	460\pm74*^S
Glycine	195 \pm 33	170 \pm 30	192 \pm 32	161 \pm 30
Valine	216 \pm 39	213 \pm 16	208 \pm 31 ^S	201 \pm 16 ^S
Leucine	137 \pm 33	135 \pm 16	127 \pm 21 ^S	123 \pm 13 ^S
Isoleucine	61,0 \pm 10,9	57,6 \pm 7,7	59,0 \pm 9,8	57,6 \pm 7,9
Proline	154 \pm 39	193 \pm 59	163 \pm 31	196 \pm 50
Méthionine	23,3 \pm 4,1	22,0 \pm 3,9	20,0 \pm 3,4 ^S	18,5 \pm 3,2 ^S
Sérine	88,6 \pm 18,9	101 \pm 24	91,9 \pm 15,8	99,4 \pm 26,5
Thréonine	124 \pm 32	114 \pm 29	125 \pm 36	111 \pm 28
Phénylalanine	48,9 \pm 8,5	49,1 \pm 5,5	49,8 \pm 5,1	50,9 \pm 6,7
Aspartate	2,21 \pm 1,06	2,67 \pm 1,24	1,86 \pm 0,74	2,13 \pm 1,04
Glutamate	27,3 \pm 22,4	34,0 \pm 18,9	25,1 \pm 13,4	31,8 \pm 17,1
Asparagine	35,0 \pm 4,0	29,0\pm4,9*	39,9 \pm 8,1	33,0\pm6,8*
Lysine	175 \pm 29	164 \pm 16	179 \pm 38	171 \pm 16
Glutamine	563 \pm 46	518 \pm 82	572 \pm 47	490 \pm 88
Arginine	116 \pm 17	104 \pm 24	131 \pm 23 ^S	115 \pm 23 ^S
Tyrosine	49,8 \pm 12,9	54,3 \pm 10,9	53,2 \pm 19,2	53,2 \pm 15,4
Tryptophane	55,4 \pm 12,3	47,2 \pm 8,3	54,2 \pm 14,7	49,8 \pm 7,3

* $P < 0,03$ patients vs témoins; ^S $P < 0,03$ à jeun vs postprandial

2.3.4. Acides gras

D'entrée de jeu, il convient de mentionner qu'une grande variabilité a été observée dans les niveaux de triglycérides à jeun chez les patients (voir bilan biochimique, tableau XI, p. 59). Ceci est également illustré à la figure 12 (p. 61), où une corrélation positive est observée entre les niveaux de triglycérides et les acides gras totaux à jeun. Dans cette optique, de façon à s'affranchir des différences quantitatives, les profils d'acides gras sont présentés sous forme de proportion relative du total des acides gras mesurés (tableau XIV, p. 62).

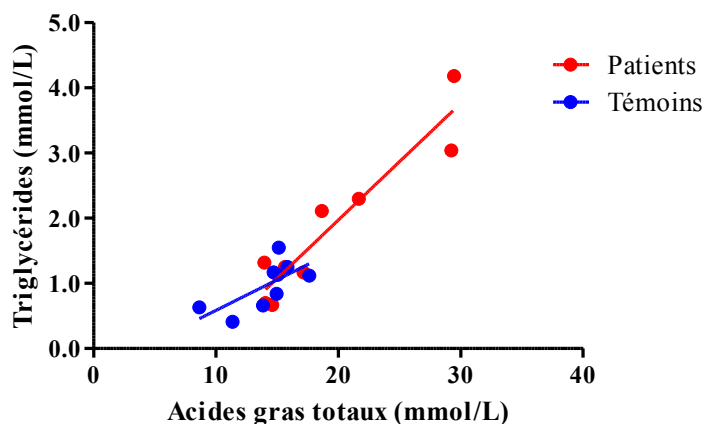


Figure 12 : Corrélation de Pearson entre les niveaux de triglycérides et les acides gras totaux à jeun. Les valeurs des triglycérides sont celles fournies par le laboratoire Biron. Chez les témoins, $r^2 = 0,4717$ et $P = 0,0410$; chez les patients, $r^2 = 0,8922$ et $P = 0,0001$.

Ainsi, les patients présentaient une augmentation significative de la proportion d'acide vaccénique (C18:1n-7) et d'acide dihomog- γ -linoléique (DGLA; C20:3n-6) à jeun et en postprandial comparativement aux témoins (tableau XIV, p. 62). Les patients montraient également une tendance à la hausse pour le total des acides gras n-7 (i.e. somme de C16:1n-7 et C18:1n-7) et une tendance à la baisse pour le ratio C20:4n-6/C20:3n-6; toutefois, ces données n'ont pas été considérées dans les analyses statistiques. En considérant les deux groupes, la consommation du smoothie a engendré une diminution significative de la proportion d'acide myristique (C14:0), d'acide palmitoléique (C16:1n-7) et de DGLA (C20:3n-6). À noter que l'acide palmitoléique a montré une différence d'effet significative

entre les patients et les témoins suite à l'administration du smoothie, ce qui signifie que, statistiquement, l'ampleur de la différence entre les niveaux à jeun et postprandiaux n'était pas la même entre les patients et les témoins.

Tableau XIV : Profil d'acides gras

Concentration relative (%)	À jeun		Postprandial	
	Témoins	Patients	Témoins	Patients
C14:0	0,57±0,21	0,67±0,25	0,53±0,20 ^S	0,60±0,27 ^S
C16:0	21,5±2,5	21,0±1,6	20,4±1,7	20,4±2,1
C16:1n-7	2,05±1,20	3,26±1,39	1,85±1,03 ^S	2,78±1,35 ^{SΔ}
C18:0	5,51±2,09	5,73±1,11	5,78±0,88	5,28±1,06
C18:1n-9	21,4±4,2	20,2±2,6	20,8±3,1	19,8±5,8
C18:1n-7	0,94±0,23	1,33±0,39*	0,90±0,18	1,28±0,28*
C18:2n-6	41,8±7,2	41,9±5,5	43,4±4,9	44,8±8,9
C18:3n-6	0,26±0,13	0,20±0,10	0,24±0,12	0,19±0,12
C18:3n-3	0,56±0,28	0,67±0,27	0,67±0,30	0,70±0,14
C20:3n-6	0,28±0,05	0,44±0,17*	0,27±0,06 ^S	0,36±0,14*^S
C20:4n-6	4,29±0,99	3,93±1,59	4,10±1,15	3,08±0,85 ^S
C20:5n-3	0,21±0,11	0,15±0,08	0,20±0,10	0,13±0,08
C22:5n-3	0,09±0,03	0,09±0,03	0,10±0,06	0,08±0,04
C22:6n-3	0,46±0,11	0,50±0,24	0,60±0,50	0,45±0,20
Total n-3ⁱ	1,32±0,36	1,40±0,43	1,58±0,56	1,37±0,32
Total n-6ⁱ	46,6±6,6	46,5±4,7	48,1±4,7	48,5±8,5
Total n-7ⁱ	3,00±1,26	4,58±1,70	2,75±1,07	4,06±1,52
Total n-9ⁱ	21,5±4,2	20,2±2,6	20,9±3,1	19,8±5,8
Ratio C20:4n-6/ C20:3n-6ⁱ	15,8±4,7	9,19±2,66	15,8±6,2	9,04±3,21

* $P < 0,03$ patients vs témoins; ^S $P < 0,03$ à jeun vs postprandial; ^Δ $P < 0,03$ pour l'effet de la consommation du smoothie entre les patients et les témoins; ⁱ Données indiquées à titre informatif; n'ont pas été incluses dans les tests statistiques.

2.3.5. Acides organiques

2.3.5.1. Plasma

Les résultats des acides organiques plasmatiques à jeun et postprandiaux sont présentés au tableau XV (p. 64). Dans les deux conditions, les patients montraient une augmentation des concentrations d'acide lactique, pyruvique, 2-oxoisovalérique et 3-hydroxybutyrique (3-HB). Le ratio 3-HB/AcAc montrait également une tendance à l'augmentation non statistiquement significative ($P = 0,03125$). Toutefois, la valeur de l'AcAc étant nulle pour certains patients, ceci a résulté en une valeur de ratio manquante pour ces individus, alors qu'en réalité ceci entraîne plutôt une valeur qui tend vers l'infini. En analysant les données simultanément à jeun et en postprandial, l'acide citrique devenait significativement plus élevé chez les patients comparativement aux témoins. Enfin, en considérant conjointement les patients et les témoins, la concentration d'acide citrique était également plus élevée en condition postprandiale comparativement à la condition à jeun.

Tableau XV : Profil d'acides organiques plasmatiques

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	À jeun		Postprandial	
	Témoins	Patients	Témoins	Patients
Acétoacétique	2,78 \pm 2,82	2,89 \pm 2,71	2,11 \pm 2,32	2,89 \pm 2,37
Benzoïque	209 \pm 111	324 \pm 149	235 \pm 55	276 \pm 127
Citrique	29,6 \pm 8,3	38,9\pm13,5[#]	35,0 \pm 10,4 ^{#S}	51,2\pm14,7^{#S}
Glycérique	0,00 \pm 0,00	4,00 \pm 8,49	5,11 \pm 7,67	6,22 \pm 9,52
Glycolique	12,9 \pm 4,3	13,6 \pm 5,3	14,7 \pm 3,1	11,4 \pm 2,8
Lactique	688 \pm 372	1941\pm1209*	968 \pm 413	1923\pm987*
Oxalique	10,7 \pm 6,4	10,4 \pm 4,7	10,2 \pm 6,4	9,33 \pm 2,78
Oxoproline (pyroglutamique)	3,67 \pm 2,18	7,00 \pm 5,57	3,44 \pm 2,24	6,89 \pm 4,14
Pyruvique	86,0 \pm 37,8	169\pm57*	101 \pm 58	187\pm85*
2-hydroxyisovalérique	3,89 \pm 2,47	6,22 \pm 3,35	4,78 \pm 1,99	5,33 \pm 1,94
2-oxoglutarique	1,33 \pm 1,80	1,44 \pm 0,53	0,89 \pm 0,93	1,67 \pm 0,71
2-oxoisovalérique	4,44 \pm 1,01	6,89\pm1,69*	4,33 \pm 1,32	6,44\pm1,59*
3-hydroxybutyrique	15,8 \pm 7,1	81,6\pm58,6*	15,8 \pm 5,6	48,7\pm42,2*
3-hydroxyisovalérique	1,44 \pm 0,73	2,33 \pm 2,29	1,56 \pm 0,53	1,56 \pm 1,51
3-hydroxypropionique	3,00 \pm 1,00	4,22 \pm 1,30	3,89 \pm 1,05	3,78 \pm 0,97
Ratio lactique/ pyruvique	8,64 \pm 5,36	10,9 \pm 3,2	10,4 \pm 3,1	10,4 \pm 3,2
Ratio 3-hydroxybutyrique/ acétoacétique ¹	9,48 \pm 6,63 (n=8)	27,5 \pm 8,4 (n=7)	11,2 \pm 8,5 (n=8)	18,2 \pm 6,7 (n=8)

* $P < 0,03$ patients vs témoins; [#] $P < 0,03$ patients vs témoins seulement lorsque les données sont analysées à jeun et en postprandial simultanément; ^S $P < 0,03$ à jeun vs postprandial

¹Puisque la valeur de l'acide acétoacétique était nulle dans certains cas, le calcul a été effectué avec le nombre de sujets indiqué entre parenthèses.

2.3.5.2. Urine

Les résultats des acides organiques urinaires, mesurés à jeun seulement, sont présentés dans le tableau XVI (p. 65). À noter que le prélèvement d'urine n'a pas été possible chez un patient; son témoin respectif a donc été également exclu des analyses statistiques. Ainsi, en considérant les 16 sujets, les niveaux urinaires d'acide lactique, d'acide n-acétylaspartique et d'acide pyruvique étaient significativement augmentés. La concentration d'acide 2-hydroxyglutarique montrait également une tendance à la hausse, mais non statistiquement significative ($P = 0,03125$).

Tableau XVI : Profil d'acides organiques urinaires

	Témoins	Patients
Concentration ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ créatinine)	Tous (n=8)	Tous (n=8)
Benzoïque	3,63 \pm 1,69	3,25 \pm 1,91
Citrique	255 \pm 130	303 \pm 200
Fumarique	0,00 \pm 0,00	1,63 \pm 2,45
Glycérique	1,38 \pm 1,77	1,88 \pm 1,46
Glycolique	59,3 \pm 37,8	58,4 \pm 21,1
Hippurique	109 \pm 74	294 \pm 480
Homovanillique	2,75 \pm 1,04	2,38 \pm 0,92
Lactique	5,88 \pm 2,59	14,0\pm5,8*
N-acétylaspartique	4,63 \pm 2,83	8,63\pm3,54*
Oxalique	25,4 \pm 16,8	23,1 \pm 9,3
Oxoproline (pyroglutamique)	15,1 \pm 3,8	16,0 \pm 10,4
Pyruvique	5,63 \pm 2,13	15,9\pm5,6*
2-hydroxyglutarique	2,38 \pm 1,30	6,38 \pm 5,04
2-méthyl-3-hydroxybutyrique	6,50 \pm 4,57	12,1 \pm 8,0
2-oxoglutarique	13,5 \pm 9,7	118 \pm 193
3-hydroxyisovalérique	9,38 \pm 6,07	13,0 \pm 13,0
3-hydroxy-3-méthylglutarique	13,6 \pm 13,4	10,0 \pm 3,8
3-hydroxypropionique	6,75 \pm 3,45	11,6 \pm 9,1
4-hydroxyphénylacétique	8,38 \pm 4,14	13,9 \pm 10,6
4-hydroxyphénylpyruvique	5,63 \pm 4,07	9,25 \pm 5,99

* $P < 0,03$ patients vs témoins

2.3.6. Acylcarnitines

Le profil des acylcarnitines plasmatiques est présenté au tableau XVII (p. 66). Dans les deux conditions nutritionnelles, les patients montraient une augmentation significative des niveaux d'acétylcarnitine (C2), tétradécénoylcarnitine (C14:1), palmitoylcarnitine (C16) et oléoylcarnitine (C18:1), alors que la concentration de décadiénoylcarnitine (C10:2) était diminuée en condition à jeun uniquement. En analysant les données simultanément à jeun et en postprandial, les concentrations de 3-hydroxybutyrylcarnitine (C4-OH), hexanoylcarnitine (C6) et octanoylcarnitine (C8) devenaient significativement augmentées chez les patients comparativement aux témoins. Enfin, en considérant conjointement les patients et les témoins, la carnitine libre (C0) et le propionylcarnitine (C3) étaient significativement plus élevés en postprandial comparativement à la condition à jeun.

Tableau XVII : Profil d'acylcarnitines

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	À jeun		Postprandial	
	Témoins	Patients	Témoins	Patients
C0	26,4 \pm 3,4	30,5 \pm 6,8	28,2 \pm 4,2 ^S	31,3 \pm 6,2 ^S
C2	3,12 \pm 0,61	5,42\pm1,71*	2,96 \pm 0,60	4,98\pm1,48*
C3	0,29 \pm 0,10	0,35 \pm 0,07	0,31 \pm 0,12 ^S	0,40 \pm 0,07 ^S
C3-DC	0,05 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,03
C4	0,14 \pm 0,06	0,17 \pm 0,05	0,15 \pm 0,04	0,17 \pm 0,05
C4-OH	0,02 \pm 0,01	0,04\pm0,02[#]	0,02 \pm 0,01	0,04\pm0,02[#]
C4-DC	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02
C5	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03	0,08 \pm 0,02
C5-DC	0,06 \pm 0,03	0,06 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02
C6	0,04 \pm 0,02	0,06\pm0,02[#]	0,03 \pm 0,01	0,05\pm0,02[#]
C6-DC	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
C8	0,11 \pm 0,05	0,15\pm0,06[#]	0,10 \pm 0,03	0,14\pm0,07[#]
C10	0,30 \pm 0,17	0,36 \pm 0,14	0,29 \pm 0,11	0,33 \pm 0,16
Ratio C8/C10	0,40 \pm 0,12	0,43 \pm 0,07	0,38 \pm 0,08	0,48 \pm 0,12
C10:1	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,05
C10:2	0,06 \pm 0,01	0,04\pm0,01*	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02
C14:1	0,06 \pm 0,03	0,10\pm0,03*	0,05 \pm 0,02	0,09\pm0,05*
C14:2	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02
C16	0,04 \pm 0,01	0,08\pm0,02*	0,05 \pm 0,01	0,08\pm0,02*
C18:1	0,05 \pm 0,01	0,08\pm0,02*	0,05 \pm 0,01	0,07\pm0,02*

* $P < 0,03$ patients vs témoins; [#] $P < 0,03$ patients vs témoins seulement lorsque les données sont analysées à jeun et en postprandial simultanément; ^S $P < 0,03$ à jeun vs postprandial

2.4. Analyses de composantes principales

Les données présentées dans les sections précédentes ont également été soumises à une analyse des composantes principales, dont les résultats les plus éloquents sont présentés ici. Dans un premier temps, cette méthode a été appliquée sur les données du prélèvement à jeun. Suite à la validation croisée, trois composantes principales ont été générées, contribuant à expliquer 44% de la variation dans l'ensemble de données. Les deux premières composantes sont présentées à la figure 13 (p. 68). Le *score plot* (figure 13A) illustre où se situent les

individus en fonction des deux premières composantes, tandis que le *loading plot* (figure 13B) montre la contribution des différents métabolites à chacune des composantes. Le tableau des *loading scores* (figure 13C) indique les scores de contribution les plus élevés pour les métabolites de la première composante. Dans le *score plot*, on remarque que les sujets se séparent (i) par la première composante (axe horizontal), en fonction du statut patient/témoin, et (ii) par la deuxième composante (axe vertical), en fonction de l'âge. À noter que le patient hétérozygote composé se situe avec les patients enfants plutôt qu'avec les adultes. Dans le *loading plot*, les métabolites situés aux extrémités de la première composante sont ceux qui contribuent à expliquer le plus fortement la variation au sein de l'ensemble de données. Ces métabolites sont également affichés dans le tableau (figure 13C) pour faciliter la visualisation.

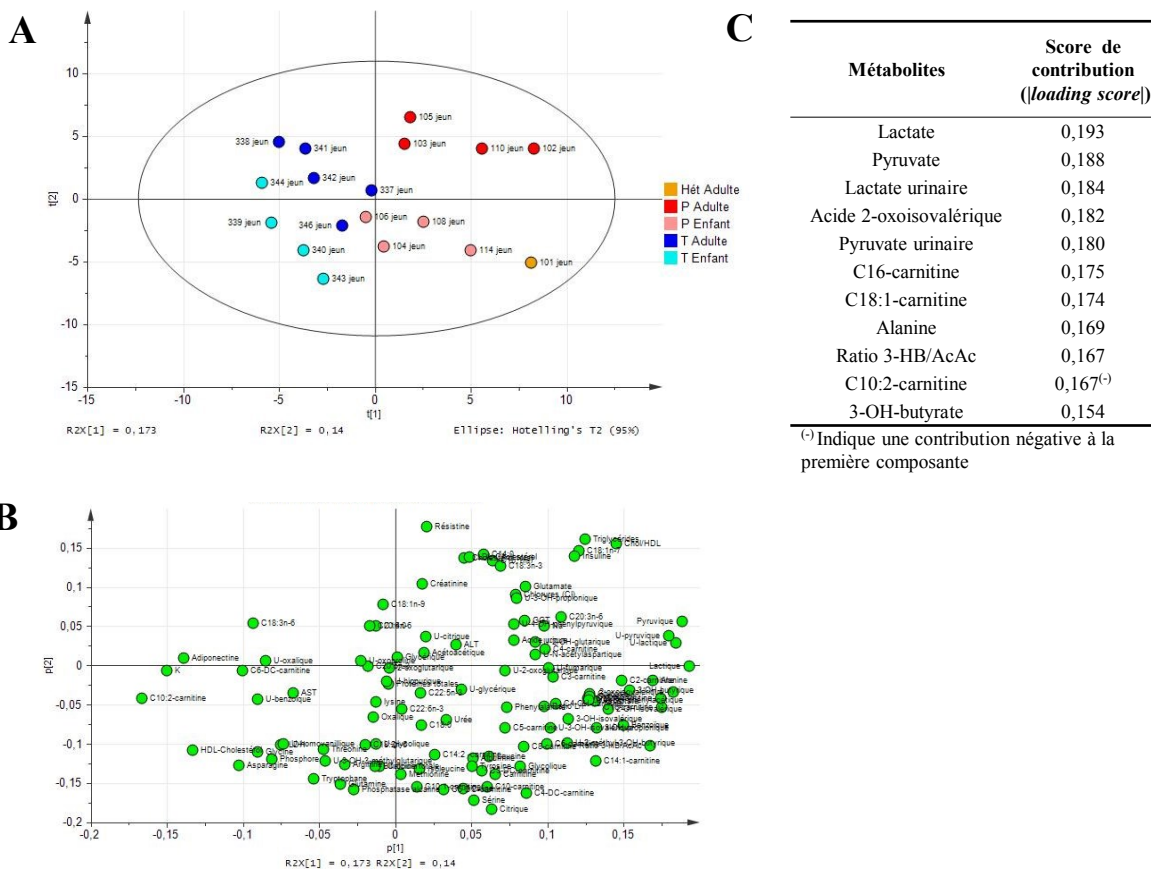


Figure 13 : Analyse des composantes principales sur les données du prélèvement à jeun. Les deux premières composantes expliquent 31% de la variation dans les données. (A) représente le *score plot*, (B) le *loading plot*, et (C) montre les scores de contribution (*loading scores*) supérieurs à $|0,15|$ pour la première composante, en ordre décroissant. L'ellipse représente l'intervalle de confiance à 95%. P : patient; T : témoin; Hét : patient hétérozygote composé; t[1] : première composante; t[2] : deuxième composante.

La figure 14 (p. 69) montre la PCA effectuée sur les données à l'état postprandial. Quatre composantes principales ont été générées par la validation croisée, contribuant à expliquer 58% de la variation dans les données. Le *score plot* (figure 14A) illustre encore une fois un regroupement des sujets en fonction du groupe et de l'âge, mais la séparation est moins nette que pour le prélèvement à jeun. De plus, le patient hétérozygote composé se situe maintenant avec les autres patients d'âge adulte. Le *loading plot* (figure 14B) et le tableau des

scores de contribution (figure 14C) montrent que ce sont surtout des acylcarnitines qui contribuent à expliquer la variation dans les données.

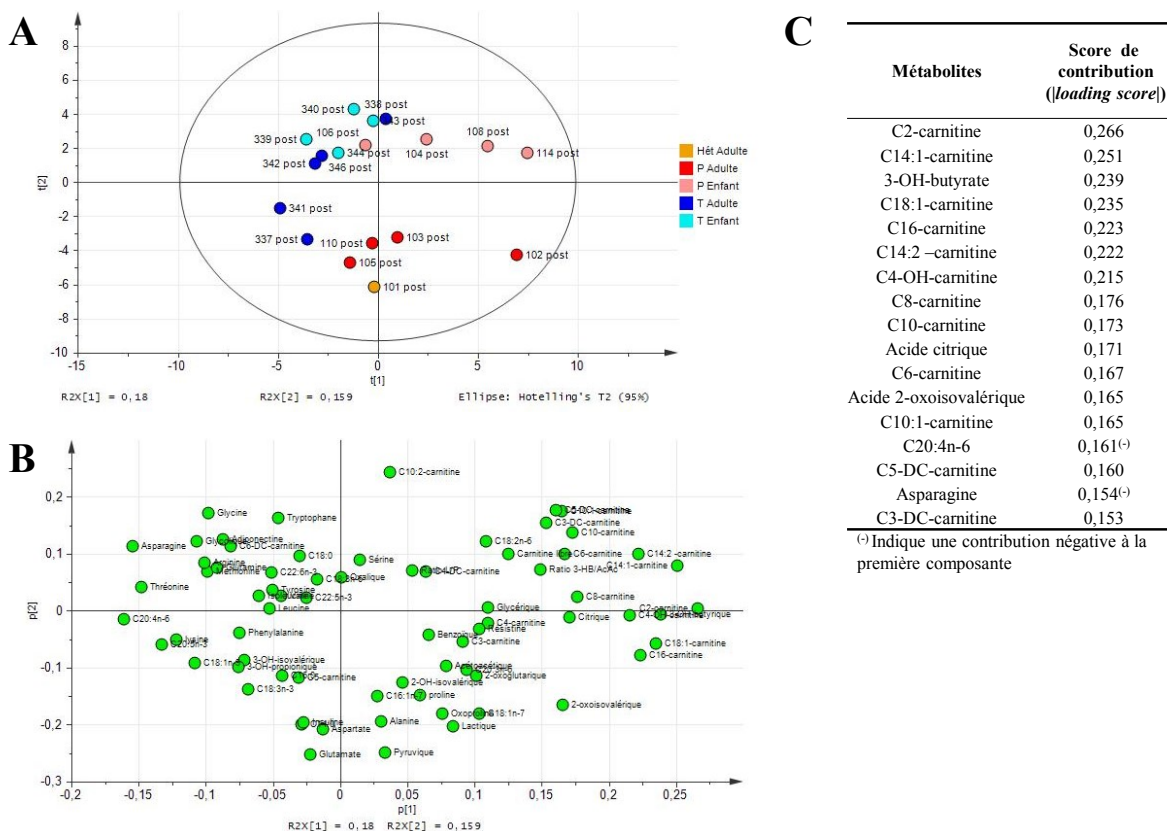


Figure 14 : Analyse des composantes principales sur les données du prélèvement postprandial. Les deux premières composantes expliquent 34% de la variation dans les données. (A) représente le *score plot*, (B) le *loading plot*, et (C) montre les scores de contribution (*loading scores*) supérieurs à |0,15| pour la première composante, en ordre décroissant. P : patient; T : témoin; Hét : patient hétérozygote composé; t[1] : première composante; t[2] : deuxième composante.

La figure 15 (p. 70) montre la PCA effectuée sur les données à jeun et postprandiales conjointement. Suite à la validation croisée, 5 composantes principales ont été générées, contribuant à expliquer 59% de la variation dans l'ensemble de données. Puisque les données se situent majoritairement dans le premier et le quatrième quadrant, seul le *score plot* est

illustré, car une rotation des données serait nécessaire afin d'interpréter adéquatement le *loading plot*. La séparation entre les patients et les témoins est toujours présente, mais celle selon l'âge apparaît moins évidente. On remarque également que la variation intraindividuelle (i.e. entre les données à jeun et postprandiales) est inférieure à la variation interindividuelle. Par ailleurs, bien que le patient hétérozygote composé se situe près des autres patients d'âge adulte, son profil demeure différent, et particulièrement pour le prélèvement à jeun, où il se situe même à l'extérieur de l'ellipse de confiance.

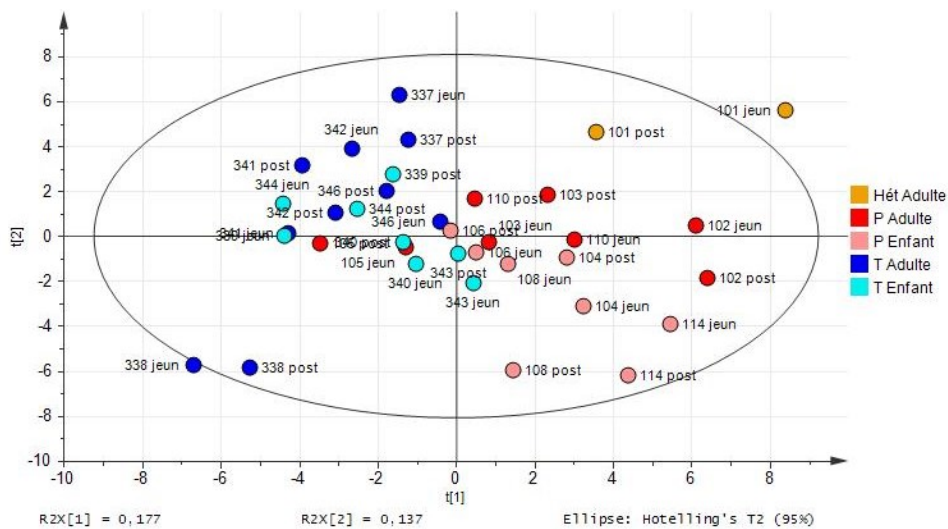


Figure 15 : Analyse des composantes principales sur les données à jeun et en postprandial. Les deux premières composantes expliquent 31% de la variation dans les données. P : patient; T : témoin; Hét : patient hétérozygote composé; t[1] : première composante; t[2] : deuxième composante.

2.5. Signature métabolique

Les résultats obtenus suite aux analyses univariées et multivariées appuient l'hypothèse d'une signature métabolique révélée de façon plus marquée en condition à jeun chez les sujets LSFC, et d'un effet plus modeste du smoothie sur le profil métabolique. La présente section illustre maintenant les principaux changements métaboliques observés chez les patients comparativement aux témoins en faisant le lien avec leur fonction métabolique. Les

graphiques sont présentés sous forme de diagramme en boîtes illustrant la médiane et l'étendue afin de visualiser la distribution des données.

2.5.1. Métabolisme cytosolique

La figure 16 (p. 71) résume les principaux changements observés dans les métabolites cytosoliques. Ainsi, les concentrations d'acide lactique et d'acide pyruvique étaient significativement augmentées chez les patients comparativement aux témoins. Le ratio acide lactique/pyruvique, reflétant l'état rédox cytosolique, ne s'en trouvait toutefois pas modifié. La concentration d'alanine était également plus élevée chez les patients.

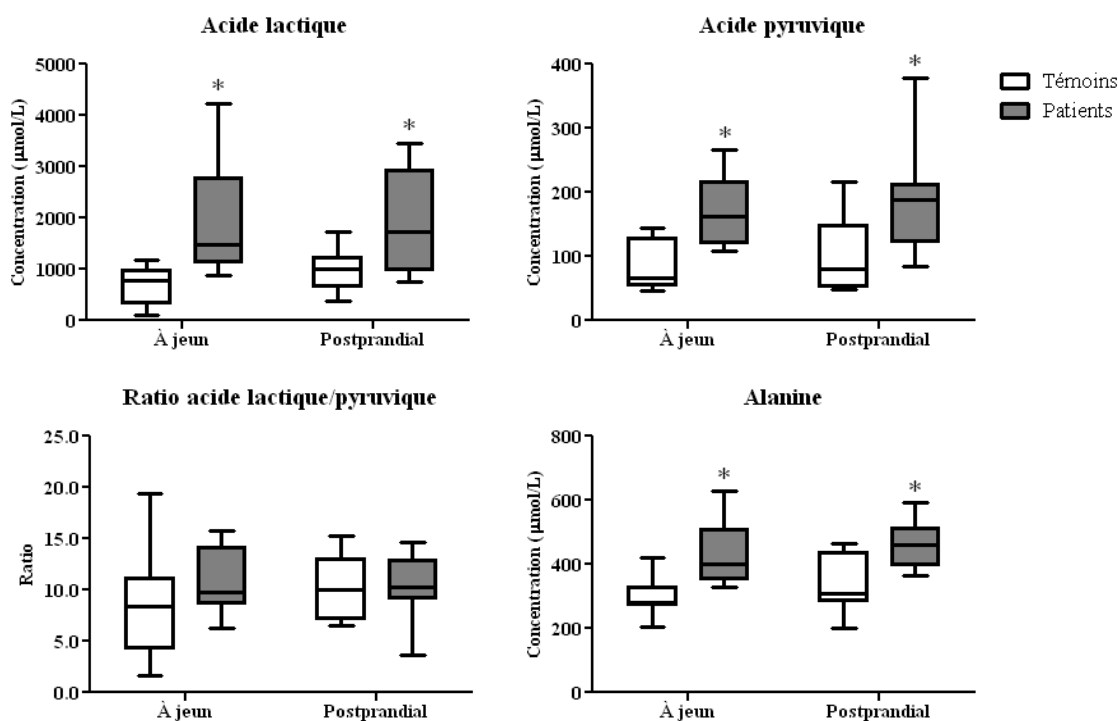


Figure 16 : Changements observés dans le métabolisme cytosolique. Les diagrammes montrent la médiane et l'étendue des données. Le ratio de l'acide lactique/pyruvique est illustré à titre indicatif seulement. * $P < 0,03$ patients vs témoins.

2.5.2. Métabolisme mitochondrial

Cette section présente les principaux changements observés dans les composés impliqués dans le métabolisme mitochondrial. Les résultats qui y sont illustrés ont été classés en trois sous-groupes : ceux reflétant l'état rédox, ceux reliés au CAC et ceux reliés à l'oxydation des acides gras.

2.5.2.1. Reflet de l'état rédox

La figure 17 (p. 73) illustre les changements dans les niveaux de métabolites reliés à l'état rédox, i.e. le ratio NADH/NAD, dans la mitochondrie. Le 3-HB, le 3-hydroxybutyrylcarnitine et l'acide 2-oxoisovalérique étaient significativement plus élevés chez les patients. Le ratio 3-HB/AcAc plasmatique et l'acide 2-hydroxyglutarique urinaire montraient aussi une tendance à la hausse, mais qui n'était pas statistiquement significative.

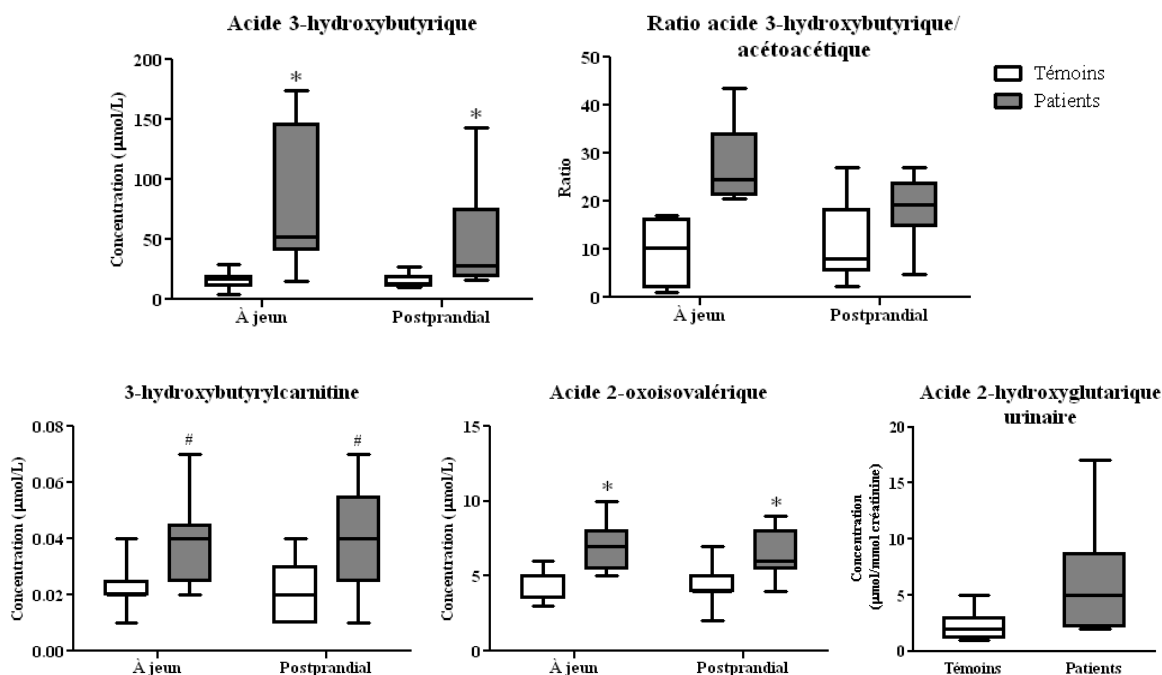


Figure 17 : Changements observés dans les métabolites qui reflètent l'état rédox mitochondrial.

* $P < 0,03$ patients vs témoins; # $P < 0,03$ patients vs témoins seulement lorsque les données sont analysées à jeun et en postprandial simultanément. Pour le ratio de l'acide 3-hydroxybutyrique/acétoacétique, $n = 8$ pour chaque boîte, sauf pour celle représentant les patients à jeun, où $n = 7$.

2.5.2.2. Cycle de l'acide citrique

La figure 18 (p. 74) illustre les changements observés dans certains métabolites liés directement ou indirectement au CAC. Ainsi, les concentrations d'acylcarnitine, un acylcarnitine dérivé de l'acétyl-CoA, et d'acide citrique étaient significativement plus élevées chez les patients. La concentration d'asparagine, un acide aminé précurseur de l'oxaloacétate [13], était quant à elle significativement diminuée.

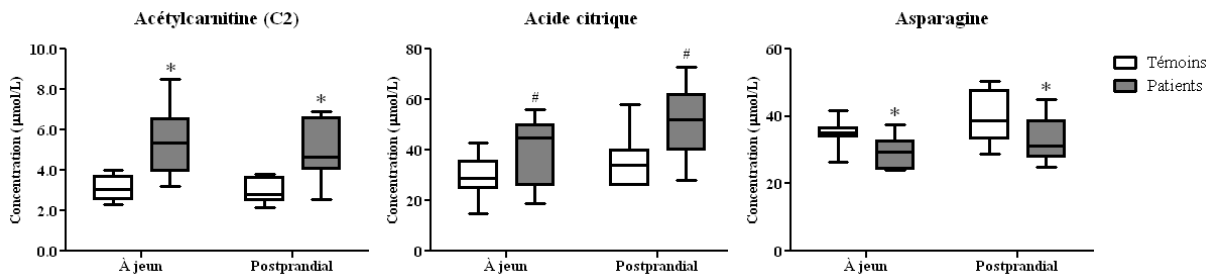


Figure 18 : Changements observés dans les métabolites reliés au cycle de l'acide citrique.
 * $P < 0,03$ patients vs témoins; # $P < 0,03$ patients vs témoins seulement lorsque les données sont analysées à jeun et en postprandial simultanément.

2.5.2.3. Oxydation des acides gras

La figure 19 (p. 75) montre les changements observés dans les concentrations de certains acylcarnitines, qui constituent des dérivés d'acides gras estérifiés. Chez les patients, les concentrations de deux acylcarnitines à chaîne moyenne, soit l'hexanoylcarnitine (C6) et l'octanoylcarnitine (C8), et de trois acylcarnitines à chaîne longue, soit le tétradécénoylcarnitine (C14:1), le palmitoylcarnitine (C16) et l'oléoylcarnitine (C18 :1), étaient significativement augmentées.

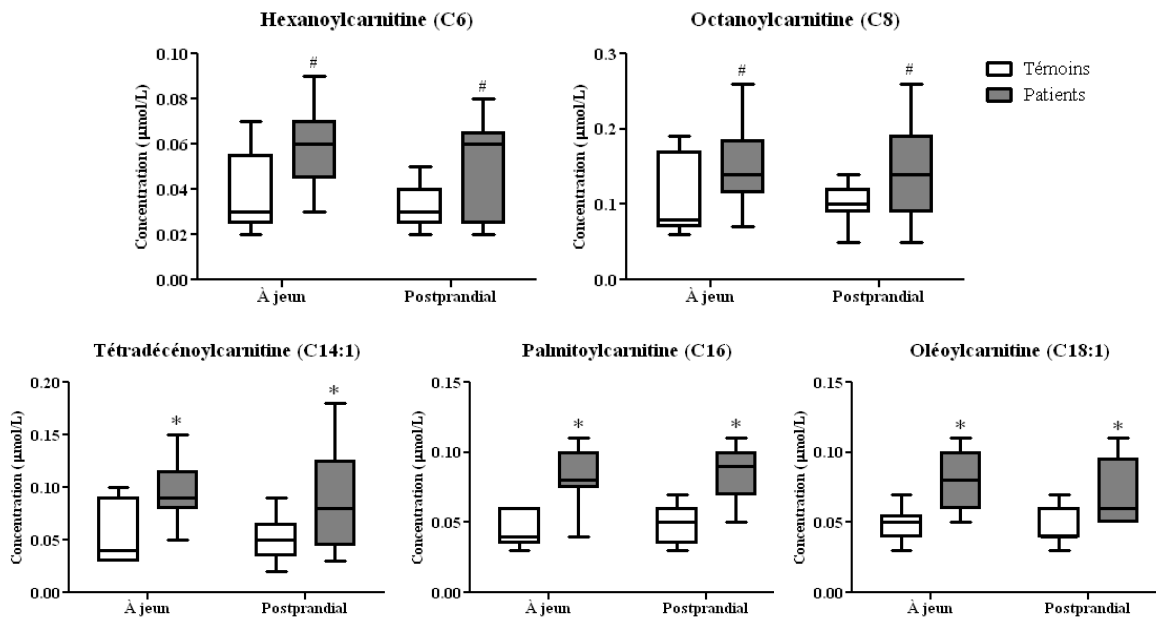


Figure 19 : Changements observés dans certains métabolites liés à l’oxydation des acides gras.
 * $P < 0,03$ patients vs témoins; # $P < 0,03$ patients vs témoins seulement lorsque les données sont analysées à jeun et en postprandial simultanément.

2.5.3. Risque cardiométabolique

La figure 20 (p. 76) résume les changements observés dans les niveaux de certains composés liés au risque cardiométabolique. Ce concept réfère à l’ensemble des facteurs augmentant le risque de développer une maladie cardiovasculaire et/ou un diabète de type II [99]. Les résultats, illustrés sous forme de médiane et d’étendue et où chaque sujet est représenté par un point, permettent de visualiser la distribution des données entre les enfants, les adultes et l’hétérozygote composé. Le HDL-cholestérol et l’adiponectine étaient significativement diminués chez les patients, alors que le ratio cholestérol total/HDL, l’insuline, l’acide vaccénique (C18:1n-7) et le DGLA (C20:3n-6) étaient augmentés. Par ailleurs, le ratio C20:4n-6/C20:3n-6, bien que n’ayant pas été considéré dans les analyses statistiques, montrait une tendance à la baisse chez les patients. L’implication de ces acides gras en lien avec le risque cardiométabolique sera plus amplement abordée dans la section Discussion.

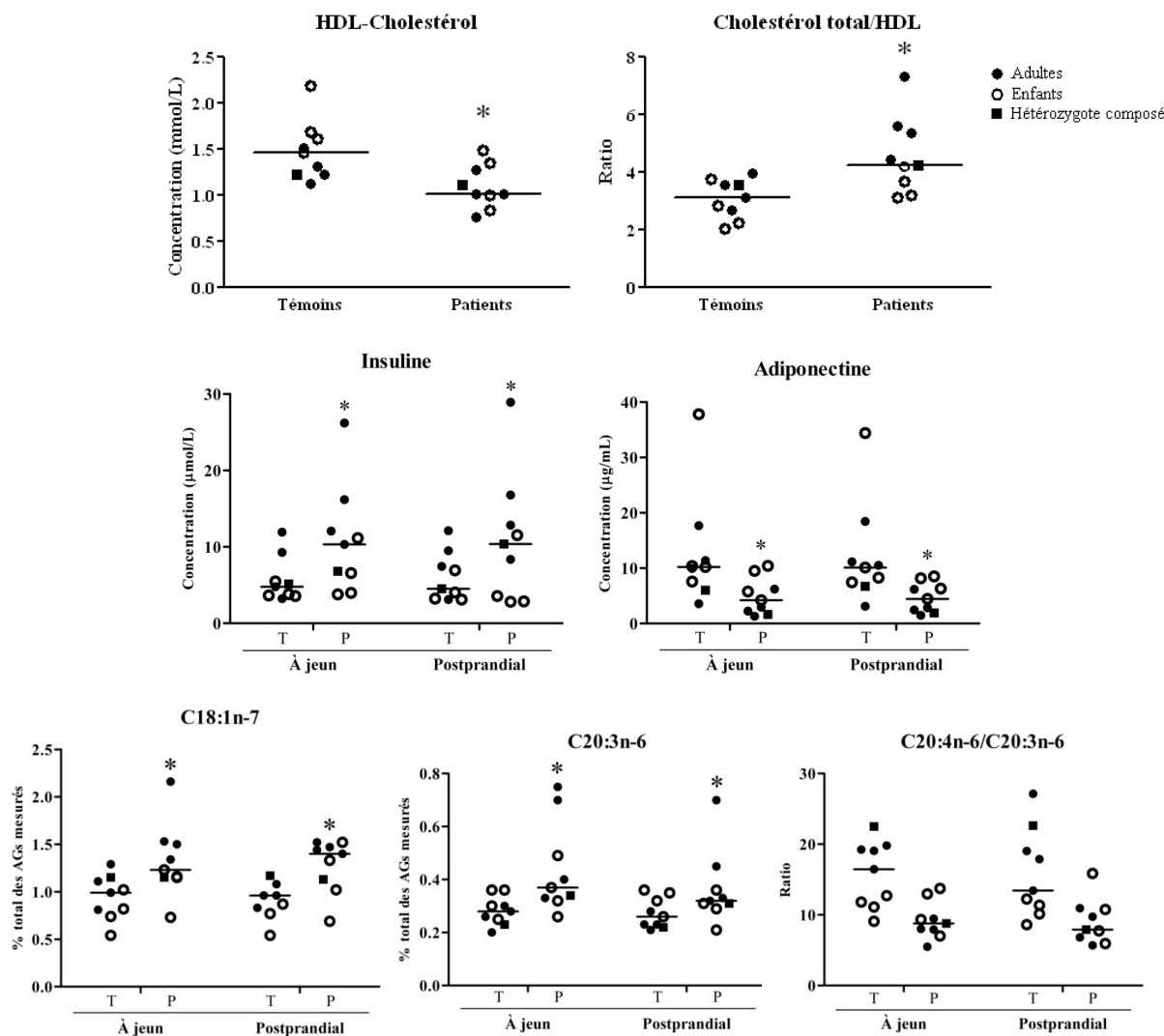


Figure 20 : Changements observés dans certains composés liés au risque cardiométabolique. Les résultats sont présentés sous forme de médiane et d'étendue. * $P < 0,03$ patients vs témoins. T : témoins; P : patients. Le ratio C20:4n-6/C20:3n-6 n'a pas été inclus dans les analyses statistiques.

2.5.4. Changements métaboliques individuels chez les patients

En guise de résumé, la figure 21 (p. 78) illustre les principaux changements obtenus en comparant les patients à leurs témoins appariés pour le prélèvement à jeun. Pour chaque composé, l'intensité de la couleur représente l'ampleur de la différence entre chaque patient et son témoin. Les sujets ont été regroupés selon l'âge afin de mieux visualiser les similitudes

et/ou les différences au sein d'un même groupe d'âge. Ainsi, il est possible de constater que les patients adultes montrent davantage de différences dans les composés reliés au risque cardiométabolique. De plus, le 3-HB montre une augmentation variable, mais présente chez l'ensemble des patients. Le ratio 3-HB/AcAc montre également une augmentation chez tous les patients sauf un et, de façon intéressante, il s'agit du patient avec l'IMC le plus faible (voir en annexe). Cet individu montre d'ailleurs une signature métabolique globale considérablement atténuée par rapport aux autres patients.

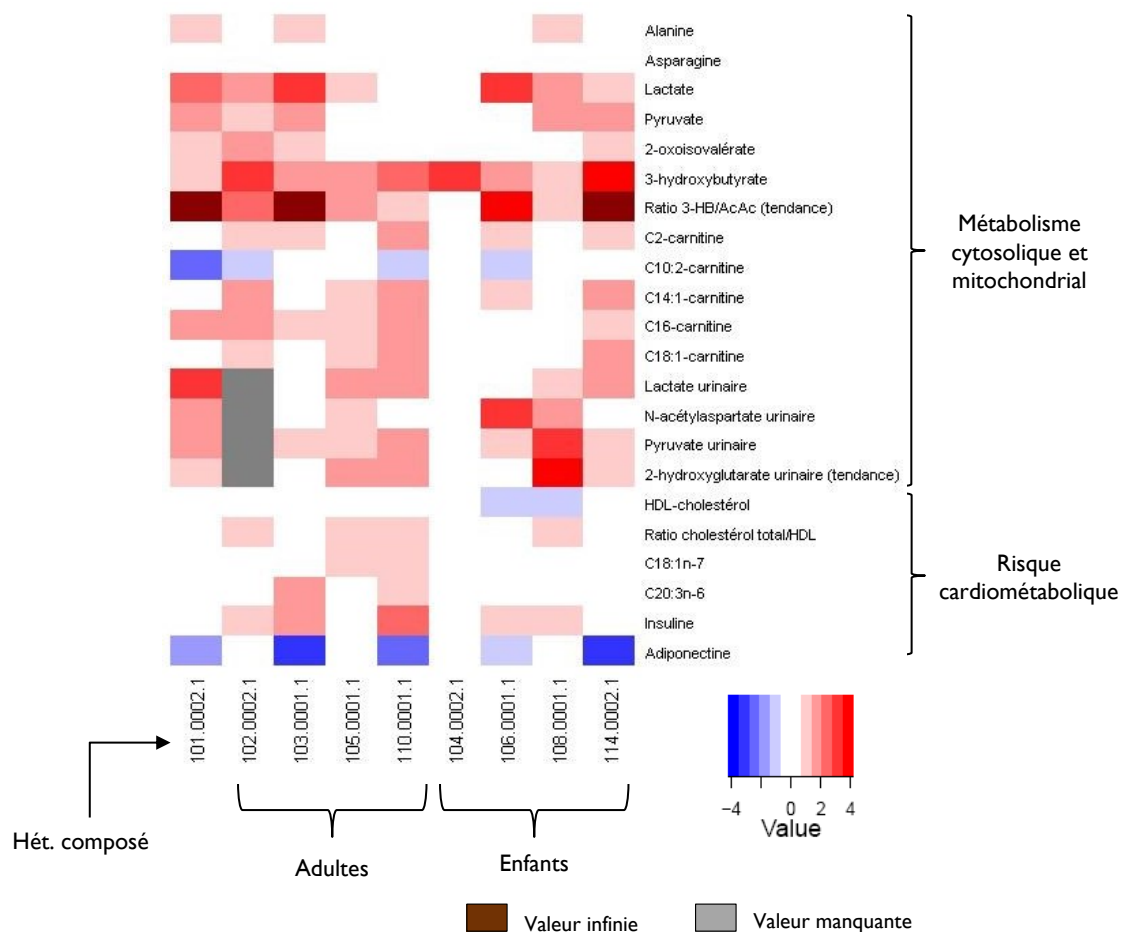


Figure 21 : Représentation de type *heatmap* des métabolites modifiés chez les patients pour le prélèvement à jeun. Les données sont des *fold-change* (patient/témoin apparié) exprimés sous forme logarithmique en base 2. Chaque colonne correspond à un patient identifié par un code. À l'exception du ratio 3-hydroxybutyrate/acétoacétate (3-HB/AcAc) et du 2-hydroxyglutarate urinaire, tous les composés montrent des différences statistiquement significatives entre les patients et les témoins. Dans les cas où la valeur de l'acide acétoacétique était nulle, le ratio 3HB/AcAc a été considéré comme infini. Le prélèvement urinaire n'a pas été obtenu chez le patient 102-0002-1.

Discussion

Au fil des prochaines sections seront discutés les résultats de l'étude pilote, suivi de ceux de l'étude principale. Par la suite seront abordées les considérations méthodologiques du projet, et enfin les perspectives futures.

1. Étude pilote

L'étude pilote a été réalisée dans le but de valider notre protocole de prélèvement préalablement à l'étude principale et de déterminer quels sont les métabolites susceptibles d'être modifiés par la consommation du smoothie. Dans l'ensemble, les résultats indiquent que le smoothie n'a pas eu d'effet important sur le profil métabolique des sujets. Parmi les 109 métabolites mesurés, seulement 2, soit l'alanine et l'acide 2-oxoisovalérique, montraient une différence significative en considérant tous les sujets (tableau IX, p. 52).

Une importante variation interindividuelle a été observée sur les concentrations de métabolites avant et après le smoothie (tableau VIII, p. 50). Ceci n'est pas surprenant, étant donné que plusieurs études ont montré qu'il existe une grande variation dans le profil métabolique des sujets humains [87,82]. Dans une étude comprenant 6 sujets masculins en bonne santé, d'âge et d'IMC similaire, Burdge et collaborateurs ont obtenu des coefficients de variation jusqu'à 98% pour les triglycérides plasmatiques mesurés après la consommation d'un repas mixte [100] (données calculées et rapportées par Zivkovic et collaborateurs [82]). De façon générale, la variation interindividuelle sur les concentrations de métabolites en postprandial était similaire à celle des métabolites mesurés à jeun. Une diminution aurait pu être observée, puisqu'il est reconnu que la standardisation de la diète avant un prélèvement peut contribuer à diminuer la variation entre les individus [80].

De façon générale, la variation sur la réponse au smoothie (concentration postprandiale/concentration à jeun) était plus faible que la variation sur les concentrations de métabolites mesurés dans chacune des deux conditions nutritionnelles (tableau VIII, p. 50). Ceci est également illustré par la PCA, qui montre que le profil métabolique de chaque

individu demeure relativement stable suivant la consommation du smoothie, mais que les sujets peuvent être clairement distingués les uns des autres (figure 10, p. 54). Malgré le fait que la variation sur la réponse au smoothie soit généralement plus faible, celle-ci demeure tout de même élevée pour le profil des acides organiques et des acylcarnitines (tableau VIII, p. 50). Toutefois, plusieurs métabolites n'ont pas été détectés pour ces profils, ce qui était attendu puisque l'étude a été menée chez des sujets sains; en effet, les acides organiques et les acylcarnitines sont des composés qui peuvent s'accumuler dans certaines conditions pathologiques, notamment les maladies métaboliques héréditaires [101,102,68].

La principale limite de l'étude pilote consiste en la faible taille d'échantillon de même que de l'hétérogénéité de ce dernier. Les sujets n'ont pas été sélectionnés sur la base de critères précis, excepté le fait d'être en bonne santé. Ceci a donc mené au recrutement de sujets d'âge, d'IMC et de niveau d'activité physique variés, ce qui pourrait expliquer l'importante variation interindividuelle observée dans les profils métaboliques. Même avec seulement une femme dans l'échantillon, il appert que le sexe ait pu influencer les résultats obtenus, étant donné que davantage de métabolites étaient significativement modifiés en postprandial lorsque seuls les hommes étaient considérés. Ceci semble notamment expliqué par le fait que le profil des acides gras était différemment affecté par la consommation du smoothie selon le sexe (figure 9, p. 53, et tableau IX, p. 52). Ceci concorde avec plusieurs études montrant que le métabolisme des acides gras diffère entre les hommes et les femmes [103,104,105]. Un effet du sexe semble également présent pour le profil des acides aminés et des acides organiques. Un échantillon comprenant un plus grand nombre de femmes aurait contribué à confirmer ces observations. Néanmoins, ceci témoigne de l'importance d'inclure le sexe comme critère d'appariement pour l'étude principale.

La faible perturbation métabolique engendrée par la consommation du smoothie permet de poser l'hypothèse que la charge calorique n'était peut-être pas assez importante. Toutefois, il est à garder à l'esprit que ce repas a d'abord et avant tout été élaboré afin d'être administré aux sujets atteints du LSFC. Les patients atteints de maladies mitochondriales ont souvent une capacité réduite à métaboliser les nutriments, et donc les formules utilisées dans d'autres études, comme un bolus de glucose ou un repas riche en lipides [83,82], ont souvent

une charge calorique trop élevée pour leur être administrés de façon éthiquement sécuritaire. De plus, le fait de standardiser la quantité à administrer en fonction des besoins énergétiques quotidiens semblait la façon la plus logique de procéder étant donné l'âge varié des sujets LSFC. Si l'étude principale avait été conduite chez des individus sains, il aurait été possible, suite à l'étude pilote, d'augmenter la quantité de smoothie à administrer afin de mieux cerner les changements métaboliques résultant de sa consommation. Toutefois, la densité énergétique et la quantité à administrer prévues au protocole initial ont été standardisées afin de s'assurer que ce repas n'agisse pas comme un « stresser métabolique » chez les patients LSFC.

Par ailleurs, le fait de choisir le temps unique de 90 minutes pour mesurer la réponse postprandiale limite quelque peu l'ampleur avec laquelle les résultats peuvent être interprétés. Dépendamment des composés, le pic métabolique aurait pu se situer avant ou après ce délai; ainsi, nous avons peut-être raté des changements dans les niveaux de certains métabolites. Ce délai avait été choisi en raison de la composition mixte du smoothie (glucides, lipides et protéines) et du fait qu'il représentait une charge glucidique inférieure à celle utilisée dans les tests d'hyperglycémie orale provoquée, où un délai de 120 minutes est traditionnellement utilisé. Shaham et collaborateurs [83] avaient d'ailleurs rapporté des changements dans plusieurs classes de métabolites 90 minutes suivant l'ingestion d'une solution de glucose. De plus, ce délai nous semblait plus acceptable pour les patients, étant donné qu'il ne leur était pas permis de consommer d'autres aliments durant la période d'attente et que le protocole avait été conçu afin de perturber le moins possible la routine des sujets atteints. En outre, suite aux résultats obtenus avec l'étude pilote, un protocole de type *time-course*, incluant par exemple des prélèvements sanguins toutes les 30 minutes suivant la consommation du smoothie, aurait été un choix intéressant à considérer pour la réalisation de l'étude principale. Toutefois, ceci aurait nécessité l'utilisation de techniques plus invasives (ex : installation d'un cathéter), ce qui aurait probablement compromis la participation de certains patients LSFC.

Le fait que peu de différences significatives aient été observées avec l'application de notre approche métabolomique ciblée laisse entrevoir l'intérêt d'avoir également recours à une approche non ciblée. De plus, considérant que le profil des acides gras totaux semble affecté par la consommation du smoothie, il pourrait être pertinent de mesurer davantage de

métabolites, et particulièrement diverses classes lipidiques. En revanche, la faible variation interindividuelle sur la réponse au smoothie témoigne de la reproductibilité de notre plateforme d'analyse.

En somme, l'étude pilote a montré la faisabilité de mesurer la réponse métabolique à un repas de faible charge calorique, et ce, malgré une grande variation interindividuelle. Les résultats appuient notre choix d'apparier les patients et les témoins pour la réalisation de l'étude principale afin de diminuer la variabilité due à des facteurs tels que le sexe, l'âge, l'IMC et le niveau d'activité physique. La réalisation de cette étude préalablement à l'étude principale a également permis de raffiner notre protocole de prélèvement avant qu'il ne soit appliqué chez les sujets LSFC. Étant donné la sensibilité potentielle de ces patients à la charge énergétique des repas, nous avons décidé de conserver la même recette de smoothie et la même quantité à administrer pour la réalisation de l'étude principale.

2. Étude principale

2.1. Résumé global

L'étude principale visait à comparer le profil des métabolites, à jeun et après la consommation du smoothie, chez des patients atteints du LSFC et des sujets témoins appariés pour l'âge, le sexe, l'IMC et le niveau d'activité physique. Cette étude a été réalisée avec l'objectif à long terme d'identifier des biomarqueurs circulants pouvant s'avérer indicateurs de la survenue d'une crise acidotique, représentant la cause principale de décès chez les sujets atteints du LSFC.

Ce projet a permis d'identifier des altérations métaboliques n'ayant pas été rapportées jusqu'à maintenant chez ces patients. Sans nécessairement indiquer la survenue éventuelle d'une crise d'acidose, ces résultats permettent de mieux comprendre la façon dont le métabolisme est affecté dans cette maladie. Au fil des prochaines sections seront abordées les considérations conceptuelles de l'étude, les aspects méthodologiques et les perspectives reliées au projet.

2.2. Considérations conceptuelles

2.2.1. Signature métabolique

Parmi les 108 composés inclus dans les analyses statistiques, 24 étaient significativement modifiés chez les patients dans l'une ou l'autre des conditions nutritionnelles. On peut donc affirmer que les sujets LSFC montraient un profil métabolique différent de celui des témoins appariés. Ceci est également appuyé par les PCA, qui ont montré une séparation des patients et des témoins, confirmant une altération du statut métabolique même à l'état stable (figures 13 à 15, p. 68 à 70). Plus spécifiquement, les métabolites significativement différents peuvent être classés en deux catégories, créant ainsi deux signatures métaboliques distinctes chez les patients : (i) le reflet d'une dysfonction mitochondriale, et (ii) des indices de risque cardiométabolique (tableau XVIII, p. 84).

Tableau XVIII : Classement des métabolites modifiés en deux signatures métaboliques

Dysfonction mitochondriale	Risque cardiométabolique
<p>Acides aminés</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Alanine • ↓ Asparagine 	<p>Bilan biochimique</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Ratio cholestérol total/HDL • ↓ HDL-cholestérol
<p>Acides organiques plasmatiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Lactate • ↑ Pyruvate • ↑ Citrate • ↑ 3-HB • ↑ 2-oxoisovalérate • ↑ Ratio 3-HB/AcAc (tendance; $P = 0,03125$) 	<p>Bilan hormonal</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Insuline • ↓ Adiponectine
<p>Acides organiques urinaires</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Lactate • ↑ Pyruvate • ↑ N-acétylaspartate • ↑ 2-hydroxyglutarate (tendance; $P = 0,03125$) 	<p>Acides gras</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Vaccénate (C18:1n-7) • ↑ DGLA (C20:3n-6) • ↓ Ratio arachidonate/ DGLA (C20:4n-6/C20:3n-6) (tendance)ⁱ
<p>Acylcarnitines</p> <p>Chaînes courtes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Acétylcarnitine (C2) • ↑ 3-hydroxybutyrylcarnitine (C4-OH) <p>Chaînes moyennes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Hexanoylcarnitine (C6) • ↑ Octanoylcarnitine (C8) • ↓ Décadiénoylcarnitine (C10:2) <p>Chaînes longues :</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Tétradécénoylcarnitine (C14 :1) • ↑ Palmitoylcarnitine (C16) • ↑ Oléoylcarnitine (C18:1) 	

ⁱ Indiqué à titre informatif; non compris dans les tests statistiques

2.2.1.1. Dysfonction mitochondriale

La figure 22 (p. 86) résume les changements métaboliques associés à une dysfonction de la mitochondrie chez les sujets LSFC. D'abord, au niveau cytosolique, les patients montrent une augmentation des concentrations de lactate, de pyruvate et d'alanine, ce qui a déjà été rapporté chez d'autres patients atteints de désordres de la phosphorylation oxydative [2,58].

L'alanine est formée à partir du pyruvate en fonction des niveaux de lactate intracellulaire; c'est pourquoi son augmentation accompagne souvent celle de lactate chez les patients atteints de pathologies mitochondriales [106]. Toutefois, le ratio lactate/pyruvate demeure inchangé, ce qui indique que l'état rédox cytosolique n'est pas affecté. En revanche, plusieurs changements sont observés dans les métabolites mitochondriaux. Notamment, l'augmentation significative des concentrations de 3-HB, de 3-hydroxybutyrylcarnitine et de 2-oxoisovalérate, de même que la tendance à la hausse observée pour le 2-hydroxyglutarate, pourraient refléter une augmentation d'équivalents réduits, notamment de NADH, en amont de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. En effet, ces métabolites pourraient être produits afin d'aider la mitochondrie à éliminer l'excès de NADH dû au ralentissement de la chaîne respiratoire, particulièrement au niveau de la COX. En outre, il a été suggéré que le lactate pourrait inhiber l'activité du complexe de la déshydrogénase des cétoacides à chaîne ramifiée (*branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex*; BCKDH) [107], ce qui pourrait expliquer l'augmentation de 2-oxoisovalérate. L'hypothèse d'une augmentation de NADH dans la mitochondrie est également appuyée par le fait que le ratio 3-HB/AcAc, un reflet de l'état rédox mitochondrial, montre une forte tendance à la hausse (figures 17 et 21, p. 73 et 78). Cette augmentation de NADH pourrait avoir comme conséquence un ralentissement du CAC et de l'oxydation des acides gras. Au niveau du CAC, ceci se traduit par une modification des niveaux d'acétylcarnitine, de citrate et d'asparagine, tandis que l'augmentation d'acylcarnitines à chaîne moyenne et à chaîne longue pourrait être interprétée comme une surcharge de capacité de la voie d'oxydation des acides gras.

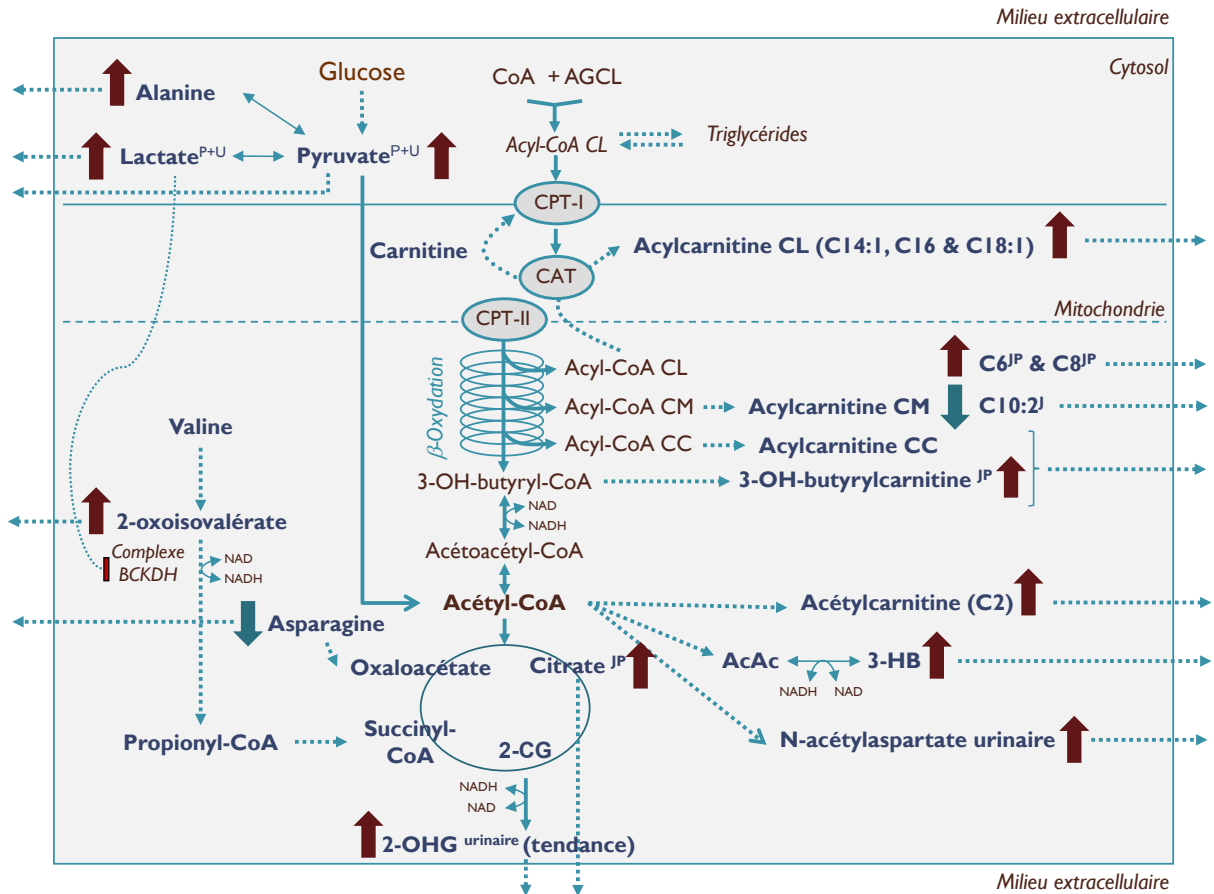


Figure 22 : Schéma mécanistique des changements métaboliques observés chez les patients LSFC. Adaptée de [108,13,109,107,110,111]. Les flèches rouges indiquent une augmentation et les flèches bleues indiquent une diminution. AcAc : acétoacétate; AGCL : acide gras à chaîne longue; BCKDH : complexe de la déshydrogénase des cétoacides à chaîne ramifiée; CAT : carnitine acyltransférase; CC : chaîne courte; CL : chaîne longue; CM : chaîne moyenne; CoA : coenzyme A; CPT : carnitine palmitoyltransférase; ^J : significatif à jeun seulement; ^{JP} : significatif lorsque les données sont considérés à jeun et en postprandial conjointement; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide; ^{P+U} : significatif dans le plasma et l'urine; 2-CG : 2-cétoglutarate; 2-OHG : 2-hydroxyglutarate; 3-HB : 3-hydroxybutyrate.

Parmi les changements métaboliques mentionnés dans le paragraphe précédent, il est intéressant de noter que, pour le prélèvement à jeun, l'augmentation de 3-HB est observée chez tous les patients comparativement à leurs témoins respectifs (figure 21, p. 78). Cet acide

organique est aussi un corps cétonique, et joue ainsi un rôle important dans la production d'énergie en condition de jeûne, principalement pour le système nerveux central [111]. Tel que mentionné précédemment, le ratio 3-HB/AcAc, reflétant le ratio NADH/NAD dans la mitochondrie, montre une tendance à la hausse chez les patients. Une étude récente a suggéré que le 3-HB pourrait agir comme inhibiteur des déacétylases [112]. Les sirtuines, une famille de déacétylases dont certains membres régulent l'activité d'enzymes du métabolisme mitochondrial, nécessitent du NAD pour fonctionner. Leur activation favoriserait la biogenèse et la respiration mitochondriale [113]. Ainsi, la diminution de NAD, reflétée par un ratio NADH/NAD élevé, pourrait favoriser l'acétylation des enzymes mitochondriales et diminuer leur activité [114]. En ce sens, dans notre modèle, l'accumulation de 3-HB, jumelée à l'augmentation du ratio NADH/NAD, pourrait potentiellement aussi contribuer à cette hyperacétylation et ainsi nuire au métabolisme mitochondrial.

Une autre étude suggère que le 3-HB pourrait être converti en 3-hydroxybutyrylcarnitine (C4-OH) [111], alors qu'il est plutôt traditionnellement reconnu que cet acylcarnitine est formé à partir du 3-hydroxybutyryl-CoA, un intermédiaire de la β -oxydation (figure 22, p. 86). L'abondance de 3-hydroxybutyryl-CoA reflèterait à son tour directement les niveaux cellulaires de 3-HB [115]. Soeters et collaborateurs [111] ont émis l'hypothèse que la transformation du 3-HB en acylcarnitine pourrait prévenir la formation de « trappe à CoA » dans la mitochondrie, de la même façon que la formation d'acétylcarnitine (C2) permet d'éviter une accumulation trop importante d'acétyl-CoA. Les auteurs proposent également que cette conversion pourrait prévenir une acidocétose durant les périodes de jeûne.

En outre, le N-acétylaspartate et le 2-hydroxyglutarate, deux acides organiques urinaires augmentés chez les patients, nous paraissent particulièrement intéressants. Le N-acétylaspartate est un composé formé à partir d'aspartate et d'acétyl-CoA [116]. Ce métabolite est présent exclusivement dans les neurones; ainsi, il est considéré comme un marqueur de l'intégrité neuronale [117]. Une diminution au niveau cérébral a été rapportée dans plusieurs pathologies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique [116]. Une accumulation dans l'urine est observée dans la maladie de Canavan, une déficience en aspartoacylase, l'enzyme responsable d'hydrolyser le N-

acétylaspartate [118]. Les individus atteints de cette maladie présentent une leucodystrophie accompagnée d'un tableau clinique de neurodégénérescence, et décèdent habituellement en bas âge [118]. Ceci nous semble particulièrement intéressant étant donné que les patients LSFC peuvent aussi montrer une leucodystrophie (Dr Charles Morin, communication personnelle).

Une accumulation urinaire de 2-hydroxyglutarate (2-OHG) est présente dans l'acidurie L-2-hydroxyglutarique, un désordre neurométabolique dans lequel l'incidence de tumeurs cérébrale est particulièrement élevée [119]. La maladie est causée par des mutations au niveau du gène de la L-2-hydroxyglutarate déshydrogénase (L2HGDH), l'enzyme responsable de la formation de 2-OHG à partir du 2-cétoglutarate, un intermédiaire du CAC [110]. La L2HGDH est localisée dans la mitochondrie, où elle est associée à la membrane. Elle est exprimée dans plusieurs tissus, mais principalement dans le cerveau. Par ailleurs, le 2-OHG est considéré comme un oncométabolite, c'est-à-dire un composé issu du métabolisme normal dont l'accumulation engendre une dysfonction métabolique favorisant le développement du cancer [120]. Ceci paraît d'autant plus pertinent étant donné le rôle récemment suggéré de LRPPRC en lien avec la formation des tumeurs [57].

2.2.1.2. Risque cardiométabolique

Les résultats du bilan biochimique, du bilan hormonal et du profil des acides gras suggèrent que les patients montrent des indicateurs de risque cardiométabolique plus élevés que les témoins (figure 20, p. 76, et tableau XVIII, p. 84). Tel que mentionné précédemment, le risque cardiométabolique est un terme général qui regroupe les facteurs qui prédisent le développement de la maladie cardiovasculaire et/ou du diabète de type II [99]. Ces facteurs de risque peuvent agir en interaction, et les deux événements pathologiques prédits par ces facteurs peuvent se chevaucher, puisque le diabète de type II constitue lui-même un facteur de risque de maladie cardiovasculaire. Plusieurs mécanismes physiopathologiques ont été proposés, impliquant principalement la résistance à l'insuline, l'adiposité viscérale et une perturbation des adipokines [99].

Les résultats présentés aux figures 20 et 21 (p. 76 et 78) montrent que ce sont principalement les adultes qui contribuent à expliquer la différence entre les patients et les témoins pour les composés associés au risque cardiometabolique. Ces indicateurs sont ainsi observés de façon plus éloquente chez les patients plus âgés. À noter que le patient hétérozygote composé se distingue des autres adultes, car il ne semble pas montrer de signature de risque cardiometabolique aussi évidente.

Plus spécifiquement, parmi les anomalies cardiometaboliques typiquement associées au risque de maladie cardiovasculaire, les patients montrent des signes de dyslipidémie, reflétés par un ratio cholestérol total/HDL élevé ainsi que des concentrations plus faibles de HDL-cholestérol. Ceci n'avait jamais été rapporté dans la littérature pour les patients LSFC. Toutefois, dans un groupe de 130 adultes atteints de désordres de la chaîne respiratoire, Finsterer et collaborateurs [24] ont rapporté la présence d'hyperlipidémie chez 45% des patients; 71% des patients étaient hypercholestérolémiques, et 44% étaient hypertriglycéridémiques. Par contre, les auteurs proposent que ces observations puissent être dues au taux élevé d'hyperlipidémie dans la population en général. Dans une autre publication, Finsterer mentionne également qu'il n'est pas encore clairement établi si l'hyperlipidémie constitue une manifestation des maladies mitochondriales en soi [22].

Pourtant, les indicateurs de risque cardiometabolique mesurés dans la présente étude vont bien au-delà de l'hyperlipidémie. En effet, le profil des acides gras totaux a montré une augmentation de la proportion d'acide vaccénique (C18:1n-7) chez les patients. Dans la circulation, cet acide gras est principalement issu de la lipogenèse *de novo* à partir du palmitate (C16:0) [121]. Il pourrait notamment être impliqué dans le risque d'arrêt cardiaque [121], mais son association avec le risque cardiovasculaire reste à être clairement démontrée, d'autres études ayant rapporté des résultats contradictoires [122]. Par contre, d'autres auteurs ont aussi proposé qu'il serait impliqué dans la résistance à l'insuline et la transition vers la condition diabétique [123]. Le profil des acides gras a également montré une proportion de DGLA (20:3n-6) plus élevée chez les patients. Au même titre que l'acide vaccénique, le DGLA circulant est majoritairement synthétisé de façon endogène [124]. De plus, le ratio d'acide arachidonique/dihomo- γ -linoléinique (C20:4n-6/C20:3n-6), reflétant l'activité de

l'enzyme $\Delta 5$ -désaturase dans la biosynthèse des acides gras [124], montre une tendance à la baisse chez les patients. Plusieurs études ont associé des proportions élevées de DGLA et une diminution du ratio C20:4n-6/C20:3n-6 au syndrome métabolique et à la résistance à l'insuline [124,125,126]. Toutefois, il convient de mentionner que ces études rapportent des résultats issus du dosage des acides gras dans diverses classes lipidiques (ex : phospholipides [121,124], triglycérides [123] et esters de cholestérol [125,126]) et non dans les lipides totaux, comme c'est le cas dans la présente étude.

Les résultats du bilan hormonal ont montré une augmentation des concentrations d'insuline et une diminution des concentrations d'adiponectine, venant appuyer les résultats mentionnés précédemment qui tendent à suggérer que les patients montrent un risque cardiométabolique accru [99]. Par ailleurs, il est à noter que les concentrations de glucose à jeun se sont avérées normales pour tous les sujets LSFC (données individuelles non montrées), indiquant que les patients ne sont pas diabétiques, mais montrent plutôt des signes de résistance à l'insuline. L'adiponectine est une hormone sécrétée par les cellules adipeuses; elle est reconnue pour inhiber l'inflammation, améliorer la sensibilité à l'insuline et avoir des effets protecteurs contre l'athérosclérose [127,128]. Ses niveaux circulants sont diminués dans la résistance à l'insuline [128], et ont été inversement associés à l'incidence de diabète et au risque de maladie coronarienne [127]. Son effet protecteur serait notamment lié à sa capacité d'activer l'AMPK [128]. De façon intéressante, Enzenbach et collaborateurs [129] ont rapporté que la proportion de DGLA dans les érythrocytes était associée à des niveaux plasmatiques plus faibles d'adiponectine et plus élevés de la protéine C réactive, une protéine impliquée dans l'inflammation. En ce sens, considérant les résultats obtenus pour le DGLA et l'adiponectine, il pourrait être intéressant de mesurer certains marqueurs d'inflammation chez les patients LSFC, comme par exemple les cytokines, le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et la protéine C réactive.

En plus d'être le reflet d'une dysfonction mitochondriale, les perturbations observées dans le profil des acylcarnitines (tableau XVII, p. 66) peuvent également constituer des anomalies métaboliques contribuant à la résistance à l'insuline, et donc au risque cardiométabolique. En effet, rappelons que la résistance à l'insuline est une condition connue

pour engendrer une perturbation du fonctionnement de la mitochondrie [26,128], caractérisée notamment par des anomalies morphologiques, une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire et une diminution de l'expression de PGC-1 α , un régulateur-clé de la biogenèse mitochondriale [128]. Ainsi, de façon similaire à la présente étude, Adams et collaborateurs [109] ont rapporté une augmentation d'acétylcarnitine (C2), d'acylcarnitines à chaîne moyenne et à chaîne longue chez des sujets diabétiques de type II. Dans cette étude, les niveaux d'acétylcarnitine étaient significativement corrélés avec la concentration d'hémoglobine glyquée (HbA1c), suggérant une production d'acétylcarnitine accrue en fonction de la sévérité de l'atteinte diabétique. Les auteurs proposent un paradigme où la résistance à l'insuline est présentée comme une condition de surcharge métabolique dans laquelle la production d'acétyl-CoA est supérieure à la capacité du CAC, menant à sa conversion en acétylcarnitine. Dans ce modèle, l'oxydation incomplète des acides gras à chaîne longue et l'accumulation de chaînes carbonées raccourcies favoriseraient la production d'acylcarnitines à chaîne moyenne. Cette étude suggère également que les acylcarnitines pourraient stimuler des voies pro-inflammatoires associées au facteur nucléaire κ -B (NF κ -B), et ainsi nuire à l'action de l'insuline. Dans le même ordre d'idées, Muoio et Newgard [128] proposent qu'en condition de suralimentation, l'afflux d'acides gras et l'activation de gènes régulés par les récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes α et δ (PPAR α/δ) favoriseraient la β -oxydation des acides gras sans une augmentation concomitante du flux dans le CAC. Par conséquent, des sous-produits de l'oxydation incomplète des acides gras, comme les acylcarnitines, s'accumuleraient dans la mitochondrie. Ces composés agiraient à leur tour comme des « stressseurs » mitochondriaux, et entraveraient la signalisation de l'insuline. Enfin, dans une revue de littérature, Hoppel mentionne qu'une augmentation des acylcarnitines peut être observée en contexte de pathologie cardiaque; leur accumulation pourrait notamment altérer la perméabilité de la membrane mitochondriale, ce qui pourrait affecter le bon fonctionnement de récepteurs hormonaux, dont celui de l'insuline [130].

Ainsi, en considérant l'ensemble des changements métaboliques identifiés chez les patients, et plus particulièrement chez les adultes, il est possible d'émettre l'hypothèse que la dysfonction mitochondriale présente dans le LSFC agirait comme une surcharge chronique de nutriments, ce qui précipiterait l'apparition de marqueurs de risque cardiometabolique. Plus

spécifiquement, pour un même apport de substrats énergétiques, puisque la mitochondrie fonctionne moins bien, il y aurait une diminution de la capacité métabolique globale, ce qui entraînerait le développement de marqueurs de risque cardiométabolique. En ce sens, nous postulons que la perturbation du métabolisme mitochondrial chez les patients LSFC constituerait un modèle accéléré d'anomalies métaboliques menant à un état d'insulino-résistance précoce. Bien que novateur, ce paradigme pourrait ne pas être unique au LSFC et être observé dans d'autres pathologies mitochondriales. Ainsi, en utilisant la même approche, un profil métabolique similaire pourrait être obtenu avec des patients atteints d'autres désordres de la phosphorylation oxydative. En ce sens, la signature métabolique que nous avons identifiée ne permet pas de prédire la survenue d'une crise d'acidose, mais constitue plutôt le reflet d'une dysfonction mitochondriale et des conséquences qu'elle peut entraîner à long terme.

2.2.2. Effet du smoothie

Parmi les 69 métabolites plasmatiques ayant été mesurés dans les deux conditions nutritionnelles, onze d'entre eux ont été significativement modifiés dans l'un ou l'autre des groupes (i.e. patients et/ou témoins) suite à la consommation du smoothie. De façon similaire à l'étude pilote, la concentration d'alanine était augmentée en condition postprandiale. Dans l'étude pilote, la leucine montrait une tendance à la diminution suite à la consommation du smoothie, tendance qui s'est avérée significative chez les sujets de l'étude principale. Le propionylcarnitine (C3), significativement augmenté en postprandial dans l'étude principale, montrait également une tendance à la hausse chez les sujets de l'étude pilote. Par contre, les deux études ont présenté des résultats divergents pour le profil des acides gras et des acides organiques. Ces disparités sont possiblement expliquées par la faible taille d'échantillon dans l'étude pilote, ou encore par le fait que le temps de consommation du smoothie ait été très variable dans l'étude principale, alors que le délai de 90 minutes a été respecté rigoureusement dans l'étude pilote.

L'analyse en composantes principales a montré une séparation plus nette des patients et des témoins dans la condition à jeun. C'est également dans cette condition qu'est observée la

meilleure séparation des sujets en fonction de l'âge (figure 13, p. 68). L'analyse à l'état postprandial a montré une contribution importante des acylcarnitines dans la variation des données (figure 14, p. 69), suggérant potentiellement un métabolisme des lipides plus lent chez les patients. De plus, les résultats présentés aux figures 17 et 19 (p. 73 et 75) montrent que la consommation du smoothie a eu un effet différent dépendamment des métabolites. Par exemple, la forte augmentation du ratio 3-HB/AcAc observée chez les patients à jeun est atténuée en condition postprandiale, alors que les différences observées dans les concentrations d'acylcarnitines chez les patients comparativement aux témoins demeurent très stables suivant la consommation du smoothie. Ceci suggère que l'état rédox mitochondrial serait régulé à plus court terme comparativement aux acylcarnitines chez les sujets LSFC. Les acylcarnitines étant des métabolites issus de la β -oxydation, ceci témoigne également du fait que le catabolisme des lipides soit généralement plus lent que celui des autres nutriments [12].

La PCA des données mesurées à jeun et en postprandial (figure 15, p. 70) indique que, de façon similaire à l'étude pilote, la variation due à la consommation du smoothie était inférieure à la variation entre les individus. Ceci suggère que le smoothie n'a pas produit un effet très important sur le profil métabolique plasmatique des sujets de l'étude principale. En contrepartie, ceci témoigne de la robustesse et de la reproductibilité de notre plateforme d'analyse, car dans plusieurs cas, les niveaux de métabolites mesurés en condition postprandiale étaient pratiquement identiques à ceux mesurés à jeun.

En somme, notre hypothèse de départ, à savoir que la signature métabolique des patients LSFC serait plus évidente suite à la consommation du smoothie, n'a pas été confirmée. Au contraire, les changements métaboliques ont été observés de façon plus éloquente dans la condition à jeun, possiblement expliqué par une contribution plus importante des corps cétoniques, principalement le 3-hydroxybutyrate. Par contre, sur le plan clinique, ceci concorde bien avec les recommandations nutritionnelles qui sont déjà données aux familles, à savoir de consommer fréquemment des petits repas [36], car les résultats indiquent que la prise d'un repas de faible charge énergétique ne perturberait pas le métabolisme chez les patients LSFC.

2.3. Considérations méthodologiques

2.3.1. *Devis expérimental*

La présente étude a permis l'identification d'une signature métabolique fiable, relativement facile à mesurer et minimalement invasive chez les patients atteints du LSFC. Le caractère cas-témoin du projet de recherche a fort probablement contribué à l'obtention de ces résultats. Bien que notre échantillon ne comprenne que 9 patients, le fait d'apparier chacun d'eux avec un témoin montrant des caractéristiques semblables pour l'âge, le sexe, l'IMC et le NAP permet de diminuer l'effet de variables confondantes. Il va sans dire que le LSFC étant une maladie rare avec un taux de mortalité élevé, la taille de notre échantillon était limitée par le nombre d'individus présentement répertoriés au Québec. Toutefois, tous les patients contactés ont accepté de participer à l'étude, ce qui témoigne de l'importance de l'esprit de confiance et de collaboration qui doit exister entre l'équipe de recherche et les familles des sujets atteints d'une maladie comme le LSFC.

D'après les résultats de l'étude pilote et de l'étude principale, on peut conclure que le smoothie n'a pas engendré de réponse métabolique importante. Tel que mentionné précédemment, considérant la capacité métabolique réduite des patients LSFC et les éléments potentiellement déclencheurs d'une crise ayant été rapportés par les parents, il nous apparaissait non éthique d'administrer un repas plus lourd, sans compter que nous n'aurions sûrement pas obtenu une aussi bonne collaboration des familles. De plus, après coup, considérant le temps très variable associé à la consommation du smoothie, qui constituait à toute fin pratique un petit repas de style collation, l'interprétation des résultats en postprandial aurait été d'autant plus complexe si un plus gros repas avait été administré.

Enfin, il convient de mentionner que la méthode utilisée pour le dosage des acides organiques et des acylcarnitines était semi-quantitative, ce qui implique que tous les composés n'étaient pas mesurés à l'aide d'un standard interne homologue (voir Matériel et méthodes, sections 6.5 et 6.6). En effet, le laboratoire ayant effectué ces analyses se veut un centre de référence pour le dépistage des maladies métaboliques héréditaires chez les nouveaux-nés. Ainsi, ce dosage est habituellement réalisé afin de détecter des composés anormalement élevés

par rapport à des valeurs de référence, ce qui permet d'orienter le diagnostic. Dans la présente étude, l'objectif était plutôt de déceler des différences entre un échantillon de patients déjà diagnostiqués et des témoins appariés afin d'améliorer notre compréhension des voies métaboliques affectées dans le LSFC. Ainsi, nous avons dû éliminer certains composés des analyses statistiques en raison du risque de faux positif qu'ils représentaient; de ce fait, il y a donc probablement certains changements métaboliques qui nous ont échappés.

2.3.2. *Approche statistique*

L'analyse des données de l'étude principale représentait un défi considérable sur le plan statistique. En effet, le fait de mesurer un grand nombre de métabolites chez un petit nombre de sujets peut limiter la capacité à détecter des différences cliniquement significatives [131]. Ainsi, l'analyse par permutation apparaissait l'approche la mieux adaptée à notre type de données afin d'obtenir une bonne puissance malgré notre faible taille d'échantillon [85]. Toutefois, nous avons initialement analysé les données par une approche plus conventionnelle : les composés mesurés à jeun seulement étaient analysés par test de t non pairé, et ceux mesurés dans les deux conditions nutritionnelles étaient soumis à une analyse de variance à deux voies (ANOVA) pour mesures répétées. Ces analyses ont mené à des résultats assez similaires à ceux obtenus suite aux tests de permutation, mais leur application ne permettait pas de tirer le maximum d'informations du fait que les sujets étaient appariés et qu'un grand nombre de variables était mesuré chez chacun d'eux. L'application d'un test de permutation traitant les données par paires, combiné à l'utilisation d'un seuil de significativité choisi en fonction de la réalisation de tests multiples, s'avérait donc l'approche la plus appropriée. Bien que nous ayons dû éliminer certaines variables des tests statistiques en raison de leur risque élevé de faux positif, les résultats obtenus avec les variables conservées sont très robustes sur le plan statistique.

Par ailleurs, bien que deux approches statistiques distinctes aient été utilisées, à savoir les tests de permutation et les analyses de composantes principales, ces deux méthodes sont complémentaires et permettent ainsi de dégager davantage d'information à partir des résultats obtenus. Ceci est illustré à la figure 23 (p. 96), qui montre les métabolites significativement modifiés chez les patients sur le *loading plot* de la PCA du prélèvement à jeun. On remarque

2.3.3. *Approche métabolomique*

Il est maintenant largement reconnu que les études de métabolomique contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques [77]. Un concept important à la base de cette science veut qu'un biomarqueur permettant de prédire une maladie ou encore d'aider au suivi thérapeutique ne constitue souvent pas une seule molécule, mais plutôt un ensemble de composés qui créent une signature métabolique [77]. Les données métabolomiques complètent les informations obtenues grâce à d'autres disciplines telles la génomique, la transcriptomique et la protéomique, s'intégrant ainsi dans une approche systémique pour l'étude des mécanismes physiopathologiques [77]. De ce fait, la métabolomique est une discipline à l'avenir prometteur avec des retombées non seulement dans la recherche biomédicale mais également dans la pratique de la médecine [77,89].

Ainsi, nous avons eu recours à une approche métabolomique ciblée, et plus particulièrement au *metabolic fingerprinting* [89], afin d'identifier une signature métabolique chez les patients LSFC. Les approches ciblées s'intéressent à des classes spécifiques de métabolites sur la base d'une connaissance préalable du système biologique à l'étude et des voies métaboliques dans lesquelles ces composés sont impliqués [88,75]. En ce sens, bien que le choix d'une méthode ciblée engendre qu'un nombre plus restreint de métabolites soit mesuré comparativement à une méthode non ciblée, cette approche permet de travailler sur des molécules déjà connues, ce qui accélère l'interprétation des résultats. De plus, la compréhension des mécanismes s'en trouve facilitée en vue de la transposition des résultats en application clinique, ce qui s'avère particulièrement important dans le cas présent, étant donné le peu de connaissances sur la maladie et l'absence de traitement efficace.

2.4. **Perspectives**

Les résultats de la présente étude ouvrent la porte sur plusieurs pistes intéressantes que nous souhaitons explorer prochainement. D'abord, tel que mentionné précédemment, nous avons dû éliminer certains composés des analyses statistiques en raison de leur risque élevé de faux positif. Ces composés étaient majoritairement des acides organiques et des acylcarnitines dont les niveaux se situaient près de la limite de détection. Le caractère semi-quantitatif de la

méthode utilisée pour le dosage de ces métabolites en a possiblement limité la précision. En ce sens, nous prévoyons mettre au point dans notre laboratoire un protocole de dosage quantitatif par CG/CL-SM pour les acides organiques et les acylcarnitines montrant des différences significatives (voir tableau XVIII, p.84). Nous prévoyons également inclure dans cette méthode de dosage d'autres métabolites pouvant s'avérer pertinents en regard des résultats obtenus, notamment les intermédiaires du CAC ainsi que des acylcarnitines additionnels. Ce faisant, nous pourrions valider quantitativement les différences observées dans la présente étude et peut-être même identifier des changements additionnels.

En plus de raffiner notre plateforme ciblée, nous avons également établi une collaboration dans le but d'analyser davantage de métabolites polaires. Ces analyses seront effectuées par le laboratoire de Dr Vamsi Mootha, un chercheur ayant participé à la découverte de la mutation de LRPPRC chez les patients LSFC [39]. La plateforme ciblée avec laquelle seront réalisées ces analyses comprendra plus de 250 métabolites plasmatiques, incluant des molécules issues du métabolisme glucidique, des purines et des pyrimidines.

En parallèle, nous prévoyons également analyser les échantillons par une approche lipidomique non ciblée, ce qui pourrait permettre, d'une part, de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la signature métabolique observée avec l'approche ciblée, et d'autre part, d'identifier de nouvelles molécules et/ou voies métaboliques non couvertes par notre première approche. Il est connu que les approches non ciblées, aussi appelées « de découverte », sont particulièrement désignées lorsque la quantité d'échantillon est limitée et que l'on désire étudier le rôle des métabolites en lien avec les interactions entre différents nutriments [81], ce qui s'applique bien au contexte de notre projet. Ainsi, les échantillons de plasma seront analysés sur une plateforme lipidomique de CL-SM (QTOF) actuellement en développement dans notre laboratoire, ce qui permettra de mesurer le profil de plusieurs classes lipidiques, dont les di- et triglycérides, phospholipides, céramides, esters de cholestérol et sphingomyélines.

Par ailleurs, les résultats obtenus dans la présente étude pourront servir d'assise pour d'éventuelles études fondamentales et mécanistiques. En effet, nous avons accès à des fibroblastes issus de biopsies cutanées provenant de patients LSFC et de témoins par

l'entremise de la biobanque de l'acido lactique. Ces cellules sont utilisées pour tester l'effet de facteurs potentiellement inducteurs d'une crise acidotique et d'agents thérapeutiques pouvant la prévenir. De plus, un modèle de souris transgénique devrait être disponible sous peu, ce qui facilitera grandement l'essai de molécules thérapeutiques. Il serait ainsi possible de vérifier si la signature métabolique identifiée chez les patients LSFC est également observée dans les modèles cellulaire et murin. Le cas échéant, il serait pertinent d'évaluer dans quelle mesure la signature est exacerbée dans des conditions pouvant induire une crise (ex : alimentation riche en gras, infection), et si elle est atténuée par l'utilisation d'agents thérapeutiques. De plus, considérant les résultats obtenus dans la présente étude, et plus particulièrement les indices d'accumulation de NADH, il serait intéressant d'investiguer l'effet d'agents qui pourraient rétablir l'état rédox mitochondrial à l'aide de ces modèles.

La présence d'indices de risque cardiométabolique chez les patients LSFC laisse entrevoir l'intérêt d'une intervention au niveau des saines habitudes de vie. En effet, cette approche constitue la stratégie de traitement primaire dans la gestion du risque cardiométabolique [99]. En ce sens, nous souhaitons faire suivre la présente étude d'un projet de recherche qui évaluerait l'impact d'une telle intervention sur la signature métabolique des individus atteints du LSFC, incluant des prélèvements avant et quelques mois suivant l'intervention. Le protocole pourrait inclure la participation conjointe d'un(e) nutritionniste et d'un(e) kinésiologue afin d'adapter les recommandations au contexte particulier du LSFC. L'intervention serait orientée vers la diminution et/ou la prévention des facteurs de risque cardiométabolique par l'alimentation et l'activité physique de faible intensité, en respectant les capacités et les limites de chaque patient. En plus d'améliorer les facteurs de risque, la pratique d'activité physique pourrait également contribuer à une meilleure fonction mitochondriale, notamment par une augmentation de la biogenèse [132,133]. Bien entendu, cette intervention devrait être réalisée avec la participation active des familles des sujets atteints.

Enfin, rappelons que la prévention et le traitement des crises acidotiques constituent une priorité dans la recherche sur le LSFC. En ce sens, il va sans dire que l'obtention d'échantillons en situation de crise permettrait une meilleure compréhension des mécanismes

pathologiques qui précipitent le décès. Ces échantillons étant très rares, et extrêmement précieux lorsqu'ils sont disponibles, l'élaboration d'un protocole de prélèvement standardisé en cas de crise nous paraît particulièrement pertinente. Ce protocole pourrait inclure des prélèvements de sang, d'urine et de liquide cébrospinal à différents stades de la crise en vue de leur analyse par une approche métabolomique mixte (i.e. ciblée et non ciblée). La présente étude ayant étudié le métabolisme à l'état stable, l'analyse d'échantillons en condition de crise constituerait un pas de plus vers notre objectif à long terme d'identification de biomarqueurs circulants prédictifs des crises acidotiques.

Conclusion

Les résultats de la présente étude contribuent à une meilleure compréhension des altérations métaboliques associées à la dysfonction mitochondriale dans le LSFC. En outre, il s'agit de la première étude à identifier des facteurs de risque cardiométabolique chez ces patients. Ainsi, il nous paraît pertinent d'inclure à leur plan de traitement des mesures visant la prévention et/ou la diminution de ces facteurs de risque, notamment par une modification des habitudes de vie. Les résultats suggèrent également que la consommation de petits repas fréquents et équilibrés ne perturberait pas l'équilibre métabolique des sujets atteints du LSFC, témoignant de l'importance d'un suivi nutritionnel chez ces patients.

Les résultats de cette étude pourront aider au suivi et potentiellement au traitement des sujets atteints du LSFC. En effet, les composés que nous avons identifiés comme étant modifiés chez les patients peuvent être mesurés de façon minimalement invasive; ainsi, cette signature métabolique pourra être utilisée pour suivre les patients en regard de leur évolution clinique. Ces marqueurs pourront également servir à mesurer l'effet d'une éventuelle intervention au niveau des habitudes de vie. Par ailleurs, la venue prochaine d'un modèle murin permettra d'étudier plus en profondeur quelles sont les conditions pouvant exacerber et/ou atténuer la signature métabolique dans la perspective de mieux comprendre les événements métaboliques associés aux crises d'acidose. Enfin, si une nouvelle thérapie venait à être proposée, une plateforme fonctionnelle sera déjà établie afin d'évaluer son effet sur le métabolisme.

La métabolomique est une discipline émergente dont l'application permettra assurément des avancées dans plusieurs domaines de recherche dans les années à venir. Notre étude démontre la pertinence d'avoir recours à cette approche dans l'étude d'une maladie orpheline, et à plus grande échelle, dans les désordres de la phosphorylation oxydative.

Bibliographie

- [1] S. DiMauro and E. A. Schon, *Mitochondrial disorders in the nervous system*. *Annu Rev Neurosci* 31, 91-123 (2008).
- [2] F. G. Debray, M. Lambert and G. A. Mitchell, *Disorders of mitochondrial function*. *Curr Opin Pediatr* 20, 471-482 (2008).
- [3] A. M. Schaefer, R. W. Taylor, D. M. Turnbull and P. F. Chinnery, *The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future*. *Biochim Biophys Acta* 1659, 115-120 (2004).
- [4] E. A. Shoubridge, *Cytochrome c oxidase deficiency*. *Am J Med Genet* 106, 46-52 (2001).
- [5] R. McFarland and D. M. Turnbull, *Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease*. *J Intern Med* 265, 210-228 (2009).
- [6] A. Munnich and P. Rustin, *Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders*. *Am J Med Genet* 106, 4-17 (2001).
- [7] S. DiMauro, *Mitochondrial diseases*. *Biochim Biophys Acta* 1658, 80-88 (2004).
- [8] D. Orsucci, M. Filosto, G. Siciliano and M. Mancuso, *Electron transfer mediators and other metabolites and cofactors in the treatment of mitochondrial dysfunction*. *Nutr Rev* 67, 427-438 (2009).
- [9] B. H. Robinson, *Lactic acidemia and mitochondrial disease*. *Mol Genet Metab* 89, 3-13 (2006).
- [10] L. Stryer, J. M. Berg and J. L. Tymoczko. *Biochimie*. Cinquième édition. 2003. Paris, Flammarion Médecine-Sciences.
- [11] Y. Burelle, M. Khairallah, A. Ascah, B. G. Allen, C. F. Deschepper, B. J. Petrof and R. C. Des, *Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart*. *J Mol Cell Cardiol* 48, 310-321 (2010).
- [12] P. Insel, R. E. Turner and D. Ross. *Nutrition*. Second Edition. 2004. Sudbury, Massachusetts, Jones and Bartlett Publishers.
- [13] D. Voet and J. G. Voet. *Biochimie*. Deuxième édition. 2005. Bruxelles, De Boeck.

- [14] I. F. Kodde, J. van der Stok, R. T. Smolenski and J. W. de Jong, *Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 26-39 (2007).
- [15] M. Matera, G. Bellinghieri, G. Costantino, D. Santoro, M. Calvani and V. Savica, *History of L-carnitine: implications for renal disease*. *J Ren Nutr* 13, 2-14 (2003).
- [16] R. J. Wanders, P. Vreken, M. E. den Boer, F. A. Wijburg, A. H. van Gennip and L. IJlst, *Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation*. *J Inherit Metab Dis* 22, 442-487 (1999).
- [17] F. Diaz, *Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models*. *Biochim Biophys Acta* 1802, 100-110 (2010).
- [18] H. Bayir and V. E. Kagan, *Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory*. *Crit Care* 12, 206 (2008).
- [19] B. H. Robinson, *Human cytochrome oxidase deficiency*. *Pediatr Res* 48, 581-585 (2000).
- [20] M. Bohm, E. Pronicka, E. Karczmarewicz, M. Pronicki, D. Piekutowska-Abramczuk, J. Sykut-Cegielska, H. Mierzewska, H. Hansikova, K. Vesela, M. Tesarova, H. Houstkova, J. Houstek and J. Zeman, *Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency*. *Pediatr Res* 59, 21-26 (2006).
- [21] A. L. Gropman, *The neurological presentations of childhood and adult mitochondrial disease: established syndromes and phenotypic variations*. *Mitochondrion* 4, 503-520 (2004).
- [22] J. Finsterer, *Overview on visceral manifestations of mitochondrial disorders*. *Neth J Med* 64, 61-71 (2006).
- [23] J. C. Edmond, *Mitochondrial disorders*. *Int Ophthalmol Clin* 49, 27-33 (2009).
- [24] J. Finsterer, C. Jarius and H. Eichberger, *Phenotype variability in 130 adult patients with respiratory chain disorders*. *J Inherit Metab Dis* 24, 560-576 (2001).
- [25] F. Diaz, H. Kotarsky, V. Fellman and C. T. Moraes, *Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors*. *Semin Fetal Neonatal Med* 16, 197-204 (2011).
- [26] D. L. Johannsen and E. Ravussin, *The role of mitochondria in health and disease*. *Curr Opin Pharmacol* 9, 780-786 (2009).

- [27] F. Merante, R. Petrova-Benedict, N. MacKay, G. Mitchell, M. Lambert, C. Morin, B. M. De, R. Laframboise, R. Gagne and B. H. Robinson, *A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec*. *Am J Hum Genet* 53, 481-487 (1993).
- [28] D. LEIGH, *Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 14, 216-221 (1951).
- [29] J. Finsterer, *Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults*. *Pediatr Neurol* 39, 223-235 (2008).
- [30] S. DiMauro and D. C. De Vivo, *Genetic heterogeneity in Leigh syndrome*. *Ann Neurol* 40, 5-7 (1996).
- [31] H. H. Dahl, *Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome*. *Am J Hum Genet* 63, 1594-1597 (1998).
- [32] C. Morin, G. Mitchell, J. Larochelle, M. Lambert, H. Ogier, B. H. Robinson and B. M. De, *Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean*. *Am J Hum Genet* 53, 488-496 (1993).
- [33] A. M. Laberge, J. Michaud, A. Richter, E. Lemyre, M. Lambert, B. Brais and G. A. Mitchell, *Population history and its impact on medical genetics in Quebec*. *Clin Genet* 68, 287-301 (2005).
- [34] N. Lee, M. J. Daly, T. Delmonte, E. S. Lander, F. Xu, T. J. Hudson, G. A. Mitchell, C. C. Morin, B. H. Robinson and J. D. Rioux, *A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16*. *Am J Hum Genet* 68, 397-409 (2001).
- [35] F. G. Debray, C. Morin, A. Janvier, J. Villeneuve, B. Maranda, R. Laframboise, J. Lacroix, J. C. Decarie, Y. Robitaille, M. Lambert, B. H. Robinson and G. A. Mitchell, *LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency*. *J Med Genet* 48, 183-189 (2011).
- [36] Association de l'acidose lactique du Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Trousse d'information sur l'acidose lactique*. 2011.
- [37] J. M. Liet, V. Pelletier, B. H. Robinson, M. D. Laryea, U. Wendel, S. Morneau, C. Morin, G. Mitchell and J. Lacroix, *The effect of short-term dimethylglycine treatment on oxygen consumption in cytochrome oxidase deficiency: a double-blind randomized crossover clinical trial*. *J Pediatr* 142, 62-66 (2003).

- [38] J. Legault, P. L. Larouche, I. Cote, L. Bouchard, A. Pichette, B. H. Robinson and C. Morin, *Low-concentration methylene blue maintains energy production and strongly improves survival of leigh syndrome French canadian skin fibroblasts*. *J Pharm Pharm Sci* 14, 438-449 (2011).
- [39] V. K. Mootha, P. Lepage, K. Miller, J. Bunkenborg, M. Reich, M. Hjerrild, T. Delmonte, A. Villeneuve, R. Sladek, F. Xu, G. A. Mitchell, C. Morin, M. Mann, T. J. Hudson, B. Robinson, J. D. Rioux and E. S. Lander, *Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 605-610 (2003).
- [40] C. Schmitz-Linneweber and I. Small, *Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression*. *Trends Plant Sci* 13, 663-670 (2008).
- [41] S. M. Davies, O. Rackham, A. M. Shearwood, K. L. Hamilton, R. Narsai, J. Whelan and A. Filipovska, *Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation*. *FEBS Lett* 583, 1853-1858 (2009).
- [42] B. Ruzzenente, M. D. Metodiev, A. Wredenberg, A. Bratic, C. B. Park, Y. Camara, D. Milenkovic, V. Zickermann, R. Wibom, K. Hultenby, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, U. Brandt, J. B. Stewart, C. M. Gustafsson and N. G. Larsson, *LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs*. *EMBO J* (2011).
- [43] F. Tavares-Carreón, Y. Camacho-Villasana, A. Zamudio-Ochoa, M. Shingu-Vazquez, A. Torres-Larios and X. Perez-Martinez, *The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast*. *J Biol Chem* 283, 1472-1479 (2008).
- [44] S. Mili and S. Pinol-Roma, *LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs*. *Mol Cell Biol* 23, 4972-4982 (2003).
- [45] R. N. Lightowers and Z. M. Chrzanowska-Lightowers, *PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression*. *Biochem J* 416, e5-e6 (2008).
- [46] I. Kuhl, L. Dujeancourt, M. Gaisne, C. J. Herbert and N. Bonnefoy, *A genome wide study in fission yeast reveals nine PPR proteins that regulate mitochondrial gene expression*. *Nucleic Acids Res* 39, 8029-8041 (2011).
- [47] F. Sasarman, C. Brunel-Guitton, H. Antonicka, T. Wai and E. A. Shoubridge, *LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria*. *Mol Biol Cell* 21, 1315-1323 (2010).

- [48] F. Xu, C. Morin, G. Mitchell, C. Ackerley and B. H. Robinson, *The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA*. *Biochem J* 382, 331-336 (2004).
- [49] N. Sondheimer, J. K. Fang, E. Polyak, M. J. Falk and N. G. Avadhani, *Leucine-rich pentatricopeptide-repeat containing protein regulates mitochondrial transcription*. *Biochemistry* 49, 7467-7473 (2010).
- [50] L. Liu, M. Sanosaka, S. Lei, M. L. Bestwick, J. H. Frey, Jr., Y. V. Surovtseva, G. S. Shadel and M. P. Cooper, *LRP130 protein remodels mitochondria and stimulates fatty acid oxidation*. *J Biol Chem* 286, 41253-41264 (2011).
- [51] F. Xu, J. B. Addis, J. M. Cameron and B. H. Robinson, *LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model*. *Biochem J* 441, 275-283 (2012).
- [52] J. M. Baughman, R. Nilsson, V. M. Gohil, D. H. Arlow, Z. Gauhar and V. K. Mootha, *A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis*. *PLoS Genet* 5, e1000590 (2009).
- [53] M. P. Cooper, L. Qu, L. M. Rohas, J. Lin, W. Yang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and B. M. Spiegelman, *Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex*. *Genes Dev* 20, 2996-3009 (2006).
- [54] M. P. Cooper, M. Uldry, S. Kajimura, Z. Arany and B. M. Spiegelman, *Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130*. *J Biol Chem* 283, 31960-31967 (2008).
- [55] V. M. Gohil, R. Nilsson, C. A. Belcher-Timme, B. Luo, D. E. Root and V. K. Mootha, *Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression*. *J Biol Chem* 285, 13742-13747 (2010).
- [56] M. Michaud, S. Barakat, S. Magnard, D. Rigal and L. G. Baggetto, *Leucine-rich protein 130 contributes to apoptosis resistance of human hepatocarcinoma cells*. *Int J Oncol* 38, 169-178 (2011).
- [57] T. Tian, J. I. Ikeda, Y. Wang, S. Mamat, W. Luo, K. Aozasa and E. Morii, *Role of leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein (LRPPRC) for anti-apoptosis and tumorigenesis in cancers*. *Eur J Cancer* (2012).
- [58] J. A. Smeitink, M. Zeviani, D. M. Turnbull and H. T. Jacobs, *Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders*. *Cell Metab* 3, 9-13 (2006).

- [59] F. Poggi-Travert, D. Martin, d. Billette, V, J. P. Bonnefont, A. Vassault, D. Rabier, C. Charpentier, P. Kamoun, A. Munnich and J. M. Saudubray, *Metabolic intermediates in lactic acidosis: compounds, samples and interpretation*. J Inher Metab Dis 19, 478-488 (1996).
- [60] F. Reinecke, J. A. Smeitink and F. H. van der Westhuizen, *OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders*. Biochim Biophys Acta 1792, 1113-1121 (2009).
- [61] S. Cardaci, G. Filomeni and M. R. Ciriolo, *Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues*. J Cell Sci 125, 2115-2125 (2012).
- [62] D. G. Hardie, *AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism*. Int J Obes (Lond) 32 Suppl 4, S7-12 (2008).
- [63] C. C. Blad, C. Tang and S. Offermanns, *G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov 11, 603-619 (2012).
- [64] C. Liu, J. Wu, J. Zhu, C. Kuei, J. Yu, J. Shelton, S. W. Sutton, X. Li, S. J. Yun, T. Mirzadegan, C. Mazur, F. Kamme and T. W. Lovenberg, *Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81*. J Biol Chem 284, 2811-2822 (2009).
- [65] A. Floegel, D. Drogan, R. Wang-Sattler, C. Prehn, T. Illig, J. Adamski, H. G. Joost, H. Boeing and T. Pischon, *Reliability of serum metabolite concentrations over a 4-month period using a targeted metabolomic approach*. PLoS One 6, e21103 (2011).
- [66] F. Delolme, C. Vianey-Saban, N. Guffon, J. Favre-Bonvin, P. Guibaud, M. Becchi, M. Mathieu and P. Divry, *[Study of plasma acylcarnitines using tandem mass spectrometry. Application to the diagnosis of metabolism hereditary diseases]*. Arch Pediatr 4, 819-826 (1997).
- [67] R. H. Haas, S. Parikh, M. J. Falk, R. P. Saneto, N. I. Wolf, N. Darin, L. J. Wong, B. H. Cohen and R. K. Naviaux, *The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease*. Mol Genet Metab 94, 16-37 (2008).
- [68] A. Kumps, P. Duez and Y. Mardens, *Metabolic, nutritional, iatrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table*. Clin Chem 48, 708-717 (2002).
- [69] M. Tanaka, Y. Nishigaki, N. Fuku, T. Ibi, K. Sahashi and Y. Koga, *Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases*. Mitochondrion 7, 399-401 (2007).
- [70] H. Komaki, Y. Nishigaki, N. Fuku, H. Hosoya, K. Murayama, A. Ohtake, Y. Goto, H. Wakamoto, Y. Koga and M. Tanaka, *Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency*. Biochim Biophys Acta 1800, 313-315 (2010).

- [71] J. Finsterer, *Management of mitochondrial stroke-like-episodes*. Eur J Neurol 16, 1178-1184 (2009).
- [72] E. A. Schon, S. DiMauro, M. Hirano and R. W. Gilkerson, *Therapeutic prospects for mitochondrial disease*. Trends Mol Med 16, 268-276 (2010).
- [73] G. Pfeffer, K. Majamaa, D. M. Turnbull, D. Thorburn and P. F. Chinnery, *Treatment for mitochondrial disorders*. Cochrane Database Syst Rev 4, CD004426 (2012).
- [74] E. Morava, R. Rodenburg, H. Z. van Essen, V. M. De and J. Smeitink, *Dietary intervention and oxidative phosphorylation capacity*. J Inherit Metab Dis 29, 589 (2006).
- [75] M. Mamas, W. B. Dunn, L. Neyses and R. Goodacre, *The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease*. Arch Toxicol 85, 5-17 (2011).
- [76] T. R. Sana, K. Waddell and S. M. Fischer, *A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 871, 314-321 (2008).
- [77] R. Kaddurah-Daouk, B. S. Kristal and R. M. Weinshilboum, *Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 48, 653-683 (2008).
- [78] U. Ceglarek, A. Leichtle, M. Brugel, L. Kortz, R. Brauer, K. Bresler, J. Thiery and G. M. Fiedler, *Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics*. Mol Cell Endocrinol 301, 266-271 (2009).
- [79] C. Legido-Quigley, C. Stella, F. Perez-Jimenez, J. Lopez-Miranda, J. Ordovas, J. Powell, F. van der Ouderaa, L. Ware, J. C. Lindon, J. K. Nicholson and E. Holmes, *Liquid chromatography-mass spectrometry methods for urinary biomarker detection in metabolomic studies with application to nutritional studies*. Biomed Chromatogr 24, 737-743 (2010).
- [80] J. K. Lodge, *Symposium 2: Modern approaches to nutritional research challenges: Targeted and non-targeted approaches for metabolite profiling in nutritional research*. Proc Nutr Soc 69, 95-102 (2010).
- [81] M. Oresic, *Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction*. Nutr Metab Cardiovasc Dis 19, 816-824 (2009).
- [82] A. M. Zivkovic, M. M. Wiest, U. Nguyen, M. L. Nording, S. M. Watkins and J. B. German, *Assessing individual metabolic responsiveness to a lipid challenge using a targeted metabolomic approach*. Metabolomics 5, 209-218 (2009).

- [83] O. Shaham, R. Wei, T. J. Wang, C. Ricciardi, G. D. Lewis, R. S. Vasan, S. A. Carr, R. Thadhani, R. E. Gerszten and V. K. Mootha, *Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity*. *Mol Syst Biol* 4, 214 (2008).
- [84] M. Sugimoto, M. Kawakami, M. Robert, T. Soga and M. Tomita, *Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis*. *Curr Bioinform* 7, 96-108 (2012).
- [85] P. I. Good, *Resampling methods - A Practical Guide to Data Analysis*. Third Edition. 2006. Boston, Birkhäuser.
- [86] C. M. Slupsky, K. N. Rankin, J. Wagner, H. Fu, D. Chang, A. M. Weljie, E. J. Saude, B. Lix, D. J. Adamko, S. Shah, R. Greiner, B. D. Sykes and T. J. Marrie, *Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles*. *Anal Chem* 79, 6995-7004 (2007).
- [87] S. Bijlsma, I. Bobeldijk, E. R. Verheij, R. Ramaker, S. Kochhar, I. A. Macdonald, O. B. van and A. K. Smilde, *Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation*. *Anal Chem* 78, 567-574 (2006).
- [88] H. J. Issaq, Q. N. Van, T. J. Waybright, G. M. Muschik and T. D. Veenstra, *Analytical and statistical approaches to metabolomics research*. *J Sep Sci* 32, 2183-2199 (2009).
- [89] M. G. Barderas, C. M. Laborde, M. Posada, F. de la Cuesta, I. Zubiri, F. Vivanco and G. Alvarez-Llamas, *Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases*. *J Biomed Biotechnol* 2011, 790132 (2011).
- [90] H. Tsugawa, Y. Tsujimoto, M. Arita, T. Bamba and E. Fukusaki, *GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA)*. *BMC Bioinformatics* 12, 131 (2011).
- [91] B. Wilcken, V. Wiley, J. Hammond and K. Carpenter, *Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry*. *N Engl J Med* 348, 2304-2312 (2003).
- [92] P. Rinaldo, S. Tortorelli and D. Matern, *Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening*. *Curr Opin Pediatr* 16, 427-433 (2004).
- [93] Ordre professionnel des diététistes du Québec.
http://www.opdq.org/extranet/manuel/opdqManuel/contenu/anref_2008/anref_2008.pdf
 f. 2012. Page consultée le 28 mars 2013.

- [94] O. Fiehn, J. Kopka, R. N. Trethewey and L. Willmitzer, *Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry*. *Anal Chem* 72, 3573-3580 (2000).
- [95] V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia, A. Shevchenko and D. Schwudke, *Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics*. *J Lipid Res* 49, 1137-1146 (2008).
- [96] R. Gelinas, J. Thompson-Legault, B. Bouchard, C. Daneault, A. Mansour, M. A. Gillis, G. Charron, V. Gavino, F. Labarthe and R. C. Des, *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* 301, H813-H823 (2011).
- [97] G. Lepage and C. C. Roy, *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction*. *J Lipid Res* 27, 114-120 (1986).
- [98] B. F. J. Manly. *Multivariate Statistical Methods : a primer*. Third Edition. 2005. Boca Raton, Florida, Chapman & Hall/CRC.
- [99] L. A. Leiter, D. H. Fitchett, R. E. Gilbert, M. Gupta, G. B. Mancini, P. A. McFarlane, R. Ross, H. Teoh, S. Verma, S. Anand, K. Camelon, C. M. Chow, J. L. Cox, J. P. Despres, J. Genest, S. B. Harris, D. C. Lau, R. Lewanczuk, P. P. Liu, E. M. Lonn, R. McPherson, P. Poirier, S. Qaadri, R. Rabasa-Lhoret, S. W. Rabkin, A. M. Sharma, A. W. Steele, J. A. Stone, J. C. Tardif, S. Tobe and E. Ur, *Cardiometabolic risk in Canada: a detailed analysis and position paper by the cardiometabolic risk working group*. *Can J Cardiol* 27, e1-e33 (2011).
- [100] G. C. Burdge, A. E. Jones, S. M. Frye, L. Goodson and S. A. Wootton, *Effect of meal sequence on postprandial lipid, glucose and insulin responses in young men*. *Eur J Clin Nutr* 57, 1536-1544 (2003).
- [101] D. Ricquier, *[Inherited metabolic diseases: benefits of metabolomics]*. *Med Sci (Paris)* 21, 512-516 (2005).
- [102] K. A. Kouremenos, J. Pitt and P. J. Marriott, *Metabolic profiling of infant urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography: Application to the diagnosis of organic acidurias and biomarker discovery*. *J Chromatogr A* 1217, 104-111 (2010).
- [103] L. Lauritzen, L. B. Harslof, L. I. Hellgren, M. H. Pedersen, C. Molgaard and K. F. Michaelsen, *Fish intake, erythrocyte n-3 fatty acid status and metabolic health in Danish adolescent girls and boys*. *Br J Nutr* 107, 697-704 (2012).
- [104] L. Bakewell, G. C. Burdge and P. C. Calder, *Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets*. *Br J Nutr* 96, 93-99 (2006).

- [105] E. J. Giltay, L. J. Gooren, A. W. Toorians, M. B. Katan and P. L. Zock, *Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects*. *Am J Clin Nutr* 80, 1167-1174 (2004).
- [106] M. Magner, K. Szentivanyi, I. Svandova, P. Jesina, M. Tesarova, T. Honzik and J. Zeman, *Elevated CSF-lactate is a reliable marker of mitochondrial disorders in children even after brief seizures*. *Eur J Paediatr Neurol* 15, 101-108 (2011).
- [107] Y. Shimomura, H. Fujii, M. Suzuki, N. Fujitsuka, M. Naoi, S. Sugiyama and R. A. Harris, *Branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex activation by tetanic contractions in rat skeletal muscle*. *Biochim Biophys Acta* 1157, 290-296 (1993).
- [108] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*. 1990. New York, John Wiley & Sons.
- [109] S. H. Adams, C. L. Hoppel, K. H. Lok, L. Zhao, S. W. Wong, P. E. Minkler, D. H. Hwang, J. W. Newman and W. T. Garvey, *Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women*. *J Nutr* 139, 1073-1081 (2009).
- [110] R. Rzem, M. F. Vincent, S. E. Van and M. Veiga-da-Cunha, *L-2-hydroxyglutaric aciduria, a defect of metabolite repair*. *J Inherit Metab Dis* 30, 681-689 (2007).
- [111] M. R. Soeters, M. J. Serlie, H. P. Sauerwein, M. Duran, J. P. Ruiten, W. Kulik, M. T. Ackermans, P. E. Minkler, C. L. Hoppel, R. J. Wanders and S. M. Houten, *Characterization of D-3-hydroxybutyrylcarnitine (ketocarnitine): an identified ketosis-induced metabolite*. *Metabolism* 61, 966-973 (2012).
- [112] T. Shimazu, M. D. Hirschey, J. Newman, W. He, K. Shirakawa, M. N. Le, C. A. Grueter, H. Lim, L. R. Saunders, R. D. Stevens, C. B. Newgard, R. V. Farese, Jr., C. R. de, S. Ulrich, K. Akassoglou and E. Verdin, *Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor*. *Science* 339, 211-214 (2013).
- [113] J. H. Hwang, D. W. Kim, E. J. Jo, Y. K. Kim, Y. S. Jo, J. H. Park, S. K. Yoo, M. K. Park, T. H. Kwak, Y. L. Kho, J. Han, H. S. Choi, S. H. Lee, J. M. Kim, I. Lee, T. Kyung, C. Jang, J. Chung, G. R. Kweon and M. Shong, *Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice*. *Diabetes* 58, 965-974 (2009).
- [114] M. D. Hirschey, T. Shimazu, E. Goetzman, E. Jing, B. Schwer, D. B. Lombard, C. A. Grueter, C. Harris, S. Biddinger, O. R. Ilkayeva, R. D. Stevens, Y. Li, A. K. Saha, N. B. Ruderman, J. R. Bain, C. B. Newgard, R. V. Farese, Jr., F. W. Alt, C. R. Kahn and E. Verdin, *SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation*. *Nature* 464, 121-125 (2010).

- [115] J. An, D. M. Muoio, M. Shiota, Y. Fujimoto, G. W. Cline, G. I. Shulman, T. R. Koves, R. Stevens, D. Millington and C. B. Newgard, *Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance*. *Nat Med* 10, 268-274 (2004).
- [116] A. Moreno, B. D. Ross and S. Bluml, *Direct determination of the N-acetyl-L-aspartate synthesis rate in the human brain by (13)C MRS and [1-(13)C]glucose infusion*. *J Neurochem* 77, 347-350 (2001).
- [117] A. Knapman, S. F. Kaltwasser, D. Martins-de-Souza, F. Holsboer, R. Landgraf, C. W. Turck, M. Czisch and C. Touma, *Increased stress reactivity is associated with reduced hippocampal activity and neuronal integrity along with changes in energy metabolism*. *Eur J Neurosci* 35, 412-422 (2012).
- [118] O. Y. Al-Dirbashi, M. S. Rashed, M. A. Al-Mokhadab, K. Al-Qahtani, M. A. Al-Sayed and W. Kurdi, *Stable isotope dilution analysis of N-acetylaspartic acid in urine by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Biomed Chromatogr* 21, 898-902 (2007).
- [119] M. E. Steenweg, C. Jakobs, A. Errami, S. J. van Dooren, M. T. Adeva Bartolome, P. Aerssens, P. Augoustides-Savvapoulou, I. Baric, M. Baumann, L. Bonafe, B. Chabrol, J. T. Clarke, P. Clayton, M. Coker, S. Cooper, T. Falik-Zaccari, M. Gorman, A. Hahn, A. Hasanoglu, M. D. King, H. B. de Klerk, S. H. Korman, C. Lee, L. A. Meldgaard, V. Mejaski-Bosnjak, I. Pascual-Castroviejo, A. Raadhyaksha, T. Rootwelt, A. Roubertie, M. L. Ruiz-Falco, E. Scalais, U. Schimmel, M. Seijo-Martinez, M. Suri, J. Sykut-Cegielska, F. K. Trefz, G. Uziel, V. Valayannopoulos, C. Vianey-Saban, S. Vlaho, J. Vodopiutz, M. Wajner, J. Walter, C. Walter-Derbort, Z. Yapici, D. I. Zafeiriou, M. D. Spreuwwenber, J. Celli, J. T. den Dunnen, M. S. van der Knaap and G. S. Salomons, *An overview of L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2HGDH) variants: a genotype-phenotype study*. *Hum Mutat* 31, 380-390 (2010).
- [120] M. Yang, T. Soga, P. J. Pollard and J. Adam, *The emerging role of fumarate as an oncometabolite*. *Front Oncol* 2, 85 (2012).
- [121] J. H. Wu, R. N. Lemaitre, F. Imamura, I. B. King, X. Song, D. Spiegelman, D. S. Siscovick and D. Mozaffarian, *Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: the Cardiovascular Health Study*. *Am J Clin Nutr* 94, 431-438 (2011).
- [122] L. Djousse, N. R. Matthan, A. H. Lichtenstein and J. M. Gaziano, *Red blood cell membrane concentration of cis-palmitoleic and cis-vaccenic acids and risk of coronary heart disease*. *Am J Cardiol* 110, 539-544 (2012).
- [123] M. A. Zulyniak, J. C. Ralston, A. J. Tucker, K. A. MacKay, L. M. Hillyer, P. D. McNicholas, T. E. Graham, L. E. Robinson, A. M. Duncan, D. W. Ma and D. M. Mutch, *Vaccenic acid in serum triglycerides is associated with markers of insulin resistance in men*. *Appl Physiol Nutr Metab* 37, 1003-1007 (2012).

- [124] O. Y. Kim, H. H. Lim, M. J. Lee, J. Y. Kim and J. H. Lee, *Association of fatty acid composition in serum phospholipids with metabolic syndrome and arterial stiffness*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2011).
- [125] B. Vessby, *Dietary fat and insulin action in humans*. *Br J Nutr* 83 Suppl 1, S91-S96 (2000).
- [126] J. C. Lovejoy, C. M. Champagne, S. R. Smith, J. P. DeLany, G. A. Bray, M. Lefevre, Y. M. Denkins and J. C. Rood, *Relationship of dietary fat and serum cholesterol ester and phospholipid fatty acids to markers of insulin resistance in men and women with a range of glucose tolerance*. *Metabolism* 50, 86-92 (2001).
- [127] N. Sattar, G. Wannamethee, N. Sarwar, J. Tchernova, L. Cherry, A. M. Wallace, J. Danesh and P. H. Whincup, *Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis*. *Circulation* 114, 623-629 (2006).
- [128] D. M. Muoio and C. B. Newgard, *Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 193-205 (2008).
- [129] C. Enzenbach, J. Kroger, V. Zietemann, E. H. Jansen, A. Fritsche, F. Doring, H. Boeing and M. B. Schulze, *Erythrocyte membrane phospholipid polyunsaturated fatty acids are related to plasma C-reactive protein and adiponectin in middle-aged German women and men*. *Eur J Nutr* 50, 625-636 (2011).
- [130] C. Hoppel, *The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism*. *Am J Kidney Dis* 41, S4-12 (2003).
- [131] U. M. Kujala, V. P. Makinen, I. Heinonen, P. Soininen, A. J. Kangas, T. H. Leskinen, P. Rahkila, P. Wurtz, V. Kovanen, S. Cheng, S. Sipila, M. Hirvensalo, R. Telama, T. Tammelin, M. J. Savolainen, A. Pouta, P. F. O'Reilly, P. Mantyselka, J. Viikari, M. Kahonen, T. Lehtimaki, P. Elliott, M. J. Vanhala, O. T. Raitakari, M. R. Jarvelin, J. Kaprio, H. Kainulainen and M. Ala-Korpela, *Long-term Leisure-time Physical Activity and Serum Metabolome*. *Circulation* 127, 340-348 (2013).
- [132] T. Taivassalo and R. G. Haller, *Implications of exercise training in mtDNA defects--use it or lose it?* *Biochim Biophys Acta* 1659, 221-231 (2004).
- [133] J. Finsterer, *Treatment of central nervous system manifestations in mitochondrial disorders*. *Eur J Neurol* 18, 28-38 (2011).
- [134] Organisation mondiale de la Santé.
http://www.who.int/childgrowth/standards/bmi_for_age/fr/index.html. Page consultée le 28 septembre 2011.

Annexe

Tableau XIX : Caractéristiques détaillées des sujets de l'étude principale

Code	Sexe	Âge	IMC (kg/m ²)	Percentile d'IMC selon l'âge [134]	NAP
Patients					
101-0002-1 ¹	M	30,5	22,3	N/A	Sédentaire
102-0002-1	M	30,2	26,1	N/A	Sédentaire
103-0001-1	F	28,5	23,1	N/A	Sédentaire
104-0002-1	M	11,6	13,9	1 ^{er}	Sédentaire
105-0001-1	F	22,1	26,7	N/A	Sédentaire
106-0001-1	F	13,5	19,3	50 ^e	Sédentaire
108-0001-1	F	10,1	21,2	96 ^e	Faiblement actif
110-0001-1	F	22,9	23,5	N/A	Sédentaire
114-0002-1	M	6,8	17,9	93 ^e	Sédentaire
Témoins					
346-0004-1	M	27,8	24,0	N/A	Sédentaire
337-0004-1	M	30,7	25,4	N/A	Sédentaire
338-0003-1	F	32,8	21,6	N/A	Sédentaire
340-0004-1	M	13,8	15,3	2 ^e	Sédentaire
341-0003-1	F	24,8	29,2	N/A	Sédentaire
339-0003-1	F	12,2	18,1	50 ^e	Sédentaire
343-0003-1	F	8,7	18,9	92 ^e	Faiblement actif
342-0003-1	F	25,8	21,6	N/A	Sédentaire
344-0004-1	M	5,8	17,2	90 ^e	Sédentaire

N/A : non applicable

¹Le patient 101-0002-1 est l'hétérozygote composé