

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| RÉSUMÉ | iii |
| REMERCIEMENTS | iv |
| TABLE DES MATIÈRES | v |
| LISTE DES TABLEAUX | vii |
| LISTE DES FIGURES | viii |
| CHAPITRE I | 1 |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 L'énergie cellulaire | 2 |
| 1.2 Les voies du catabolisme | 3 |
| 1.2.1 La glycolyse | 3 |
| 1.2.2 Le cycle de l'acide citrique | 4 |
| 1.2.3 La phosphorylation oxydative | 5 |
| CHAPITRE II | 8 |
| REVUE DE LA LITTÉRATURE SCIENTIFIQUE | 8 |
| 2.1 Description des symptômes associés à la LSFC | 9 |
| 2.2 Rôle de l'enzyme COX dans le métabolisme cellulaire | 10 |
| 2.3 Association du gène LRPPRC à la LSFC | 11 |
| 2.4 Rôle de la protéine LRPPRC dans le métabolisme cellulaire | 11 |
| 2.5 Traitement de la LSFC | 12 |
| 2.6 Problématique et objectifs du projet de recherche | 12 |
| 2.6.1 Problématique du projet de recherche | 12 |
| 2.6.2 Objectif général du projet de recherche | 13 |
| 2.6.3 Objectifs spécifiques du projet de recherche | 13 |
| 2.6.4 Mise en contexte des travaux de recherche | 13 |
| CHAPITRE III | 15 |
| TRAVAUX PRÉLIMINAIRES | 15 |
| 3.1 Matériel et méthodes | 17 |
| 3.1.1 Lignées cellulaires | 17 |
| 3.1.2 Dosage de l'activité COX | 17 |
| 3.1.3 Composition des milieux de culture | 18 |
| 3.1.4 Activité métabolique (réduction de la résazurine) | 18 |
| 3.1.5 Production de dérivés actifs de l'oxygène (Dichlorofluorescein-diacétate) | 19 |
| 3.1.6 Viabilité cellulaire (Calcéine-AM) | 19 |
| 3.1.7 Statistiques | 19 |
| 3.2 Résultats et discussion | 20 |
| 3.2.1 Modulation de l'activité COX de fibroblastes sains par inhibition au KCN | 20 |
| 3.2.2 Mise au point du modèle d'étude sur fibroblastes LSFC | 32 |
| CHAPITRE IV | 41 |
| PUBLICATION | 41 |
| 4.1 Résumé de l'article | 42 |

| | |
|---|----|
| <i>4.2 Low-concentration methylene blue maintains energy production and strongly improves survival of Leigh Syndrome French Canadian skin fibroblasts</i> | 43 |
| CHAPITRE V | 64 |
| CONCLUSION | 64 |
| BIBLIOGRAPHIE | 69 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| TABLEAU 1. PARAMÈTRES SANGUINS D'INDIVIDUS ATTEINTS D'ACIDOSE LACTIQUE EN ÉTAT STABLE ET EN PÉRIODE DE CRISE ACIDOSIQUE..... | 10 |
| TABLEAU 2. COMPOSITION DU « EARL'S SALTS BASE » | 18 |
| TABLEAU 3. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS A LA SECTION 3.2.2..... | 32 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| FIGURE 1. STRUCTURE CHIMIQUE SIMPLIFIÉE DE L'ATP..... | 3 |
| FIGURE 2. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU CYCLE DE L'ACIDE CITRIQUE..... | 5 |
| FIGURE 3. SCHÉMA DE LA MEMBRANE INTERNE MITOCHONDRIAL AVEC SES CYTOCHROMES..... | 6 |
| FIGURE 4. EFFET DU KCN SUR L'ACTIVITÉ COX RELATIVE D'HOMOGÉNATS DE FIBROBLASTES SAINS (WSI)..... | 21 |
| FIGURE 5. EFFET DU KCN SUR L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DE FIBROBLASTES SAINS (WSI) CULTIVÉS AVEC DIFFÉRENTS SUBSTRATS..... | 23 |
| FIGURE 6. EFFET DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT SUR L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DE FIBROBLASTES SAINS SOUMIS OU NON À UN TRAITEMENT DE KCN (2mM)..... | 24 |
| FIGURE 7. PHOTOS DES CELLULES WSI APRÈS 48H D'INCUBATION DANS LES MILIEUX PRÉSENTÉS À LA FIGURE 7 (GROSSISSEMENT 40X)..... | 27 |
| FIGURE 8. EFFET DU KCN SUR LA PRODUCTION DE ROS DE FIBROBLASTES SAINS (WSI) EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES SOURCES D'ÉNERGIE..... | 29 |
| FIGURE 9. EFFET DE LA MÉLATONINE SUR LA PRODUCTION DE ROS DE FIBROBLASTES SAINS (WSI) TRAITÉS À DIFFÉRENTES DOSES DE KCN..... | 31 |
| FIGURE 10. EFFET DU LACTATE SUR LA PRODUCTION DE ROS (COLONNES BLANCHES) ET SUR L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE (COLONNES NOIRES) DE FIBROBLASTES A) COX1 B) COX2 C) WSI..... | 33 |
| FIGURE 11. EFFET DU GLUCOSE DANS UN INTERVALLE DE CONCENTRATIONS DE LACTATE SUR LA PRODUCTION DE ROS (COLONNES BLANCHES) ET SUR L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE (COLONNES NOIRES) DE FIBROBLASTES A) COX1 B) COX2 C) WSI..... | 35 |
| FIGURE 12. EFFET DU STRESS OXYDATIF (TBHP) SUR LA SURVIE (CALCÉINE-AM) DE FIBROBLASTES NORMAUX ET ACIDOSIQUES..... | 37 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

| | |
|--|---|
| ADP : adénosine diphosphate | MB : Bleu de méthylène |
| ARNm : Acide ribonucléique messager | MIM : Mendelian Inheritance in Man |
| ATP : adénosine triphosphate | mM : millimolaire |
| CNS : système nerveux central | NaCN : cyanure de sodium |
| COX : cytochrome c oxydase | NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit |
| CO₂ : dioxyde de carbone | NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé |
| DCFH-DA : Dihydrofluorescein di- acétate | NaHCO₃ : Carbonate de sodium |
| DMEM : Dulbecco's modified essential medium | P_i : Phosphate inorganique |
| DMG : Dimethylglycine | ROS : Reactive oxygen species |
| CTE : Chaîne de transfert des électrons mitochondriale | RZ : Fluorophore Resazurine |
| GSH : Glutathion | SLSJ : région du Saguenay-Lac-Saint- Jean |
| h : heure | TBHP : <i>tert</i> -butylhydroperoxyde |
| HO : Fluorophore Hoescht 33342 | TCA (CAC) : cycle de l'acide citrique |
| H₂O₂ : peroxide d'hydrogène | VO₂ : Test clinique de consommation d'oxygène |
| KCN : Cyanure de potassium | α : Seuil de signification statistique |
| LDH : Lactate déshydrogénase | μM : micromolaire |
| LRPPRC : Leucin-rich pentatricopeptide repeat cassette | |
| LSFC : Leigh Syndrome French Canadian | |

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 L'énergie cellulaire

Comme le disait Ernest Baldwin dans son *Dynamic Aspects of Biochemistry* : « Les organismes vivants [...] obéissent à la loi de la conservation de l'énergie et doivent pour toutes leurs activités payer dans la monnaie du catabolisme ». ⁽¹⁾

Chaque cellule a effectivement besoin d'un apport constant d'énergie pour produire et maintenir l'ordre biologique qui la garde en vie. ⁽²⁾ Le métabolisme est le processus général par lequel les systèmes vivants acquièrent et utilisent l'énergie libre nécessaire à l'accomplissement de leurs différentes fonctions. ⁽³⁾ Ces fonctions sont multiples et elles se répercutent à plusieurs niveaux dans un organisme. Elles comprennent notamment, mais sans exclure : la biosynthèse de molécules complexes, le transport actif de molécules contre leur gradient de concentration, le maintien de la pression osmotique, la reproduction, la motilité et la contraction musculaire. ⁽⁴⁾

L'adénosine triphosphate, ou ATP, constitue la « monnaie » la plus courante de ces processus (figure 1). Son mode d'action général implique des changements conformationnels de protéines ou d'enzymes suivant leur liaison à l'ATP. L'énergie nécessaire aux réactions est emmagasinée dans les liens phosphoanhydride de l'ATP. Son hydrolyse exergonique, en plus de permettre les réactions endergoniques subséquentes, relargue de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (P_i), rendant la réaction irréversible. ⁽³⁾ L'ATP doit donc être constamment régénéré.

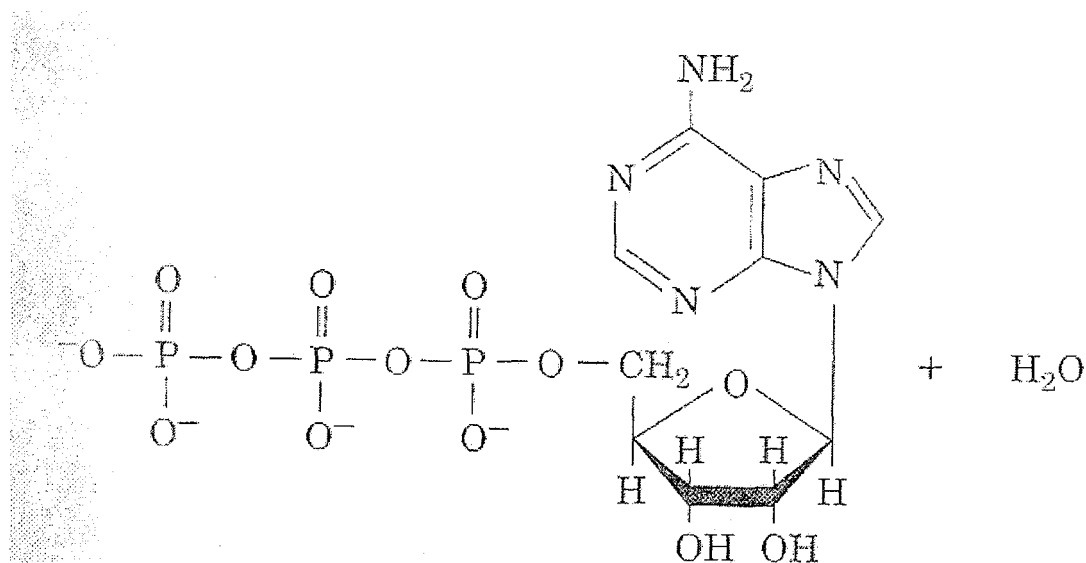


Figure 1. Structure chimique simplifiée de l'ATP. (Copyright © 1995, John Wiley & Sons, Inc.)

1.2 Les voies du catabolisme

Chez les organismes chimiohétérotrophes comme l'humain, l'apport primaire d'énergie et de carbone nécessite l'assimilation de substances organiques. ⁽⁵⁾ Les voies du catabolisme dégradent les substrats carbonés complexes en molécules plus simples pour en extraire l'énergie chimique (ex.: dégradation des protéines en acides aminés, des polysaccharides en glucides, ou des graisses en acides gras et glycérol).

Chez l'homme, la respiration cellulaire aérobie constitue la voie principale pour le renouvellement de l'ATP et elle est assurée par trois processus majeurs, soit : la glycolyse, le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative.

1.2.1 La glycolyse

La glycolyse est un processus catabolique très conservé dans l'évolution et elle est commune à la majorité du monde vivant. ⁽²⁾ Cette voie métabolique dégrade le glucose (hexose, molécule à six carbones) en deux molécules de pyruvate (triose, molécule à trois carbones). Ce processus peut être subdivisé en

deux phases, soit une phase d'investissement, où deux molécules d'ATP sont consommées, et une phase de production, où quatre molécules d'ATP sont générées par phosphorylation au niveau du substrat. ⁽³⁾ La glycolyse possède donc une production nette de deux molécules d'ATP par molécule de glucose dégradée. La réaction de glycolyse peut se résumer par l'équation suivante :



Le NAD^+ est un agent qui récupère des électrons issus de la dégradation du glucose afin de générer le NADH, un transporteur d'électrons à haute énergie. Un transfert des électrons pour régénérer le NADH en NAD^+ est nécessaire au maintien des réactions glycolytiques. ⁽²⁾ En condition aérobie, les électrons du NADH sont transmis à la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, qui réduit l'oxygène moléculaire en eau métabolique. En condition anaérobie, les électrons du NADH servent à convertir de façon enzymatique le pyruvate en lactate. ⁽²⁾

1.2.2 Le cycle de l'acide citrique

La glycolyse ne génère qu'une petite fraction de l'énergie utilisable à partir du glucose. ⁽⁵⁾ Le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs, figure 2) quant à lui est responsable approximativement du deux tiers de l'oxydation totale des carbohydrates dans une cellule ⁽²⁾, en plus d'oxyder les acides gras et les acides aminés. ⁽³⁾ En condition aérobie, ce cycle permet la dégradation complète du pyruvate issu de la glycolyse (trois carbones) en CO_2 (un carbone). À chaque tour du cycle, trois molécules de NADH, une molécule de FADH_2 (un autre transporteur d'électrons à haute énergie), et une molécule de GTP (nucléoside triphosphate proche parent de l'ATP) sont produits. ⁽²⁾

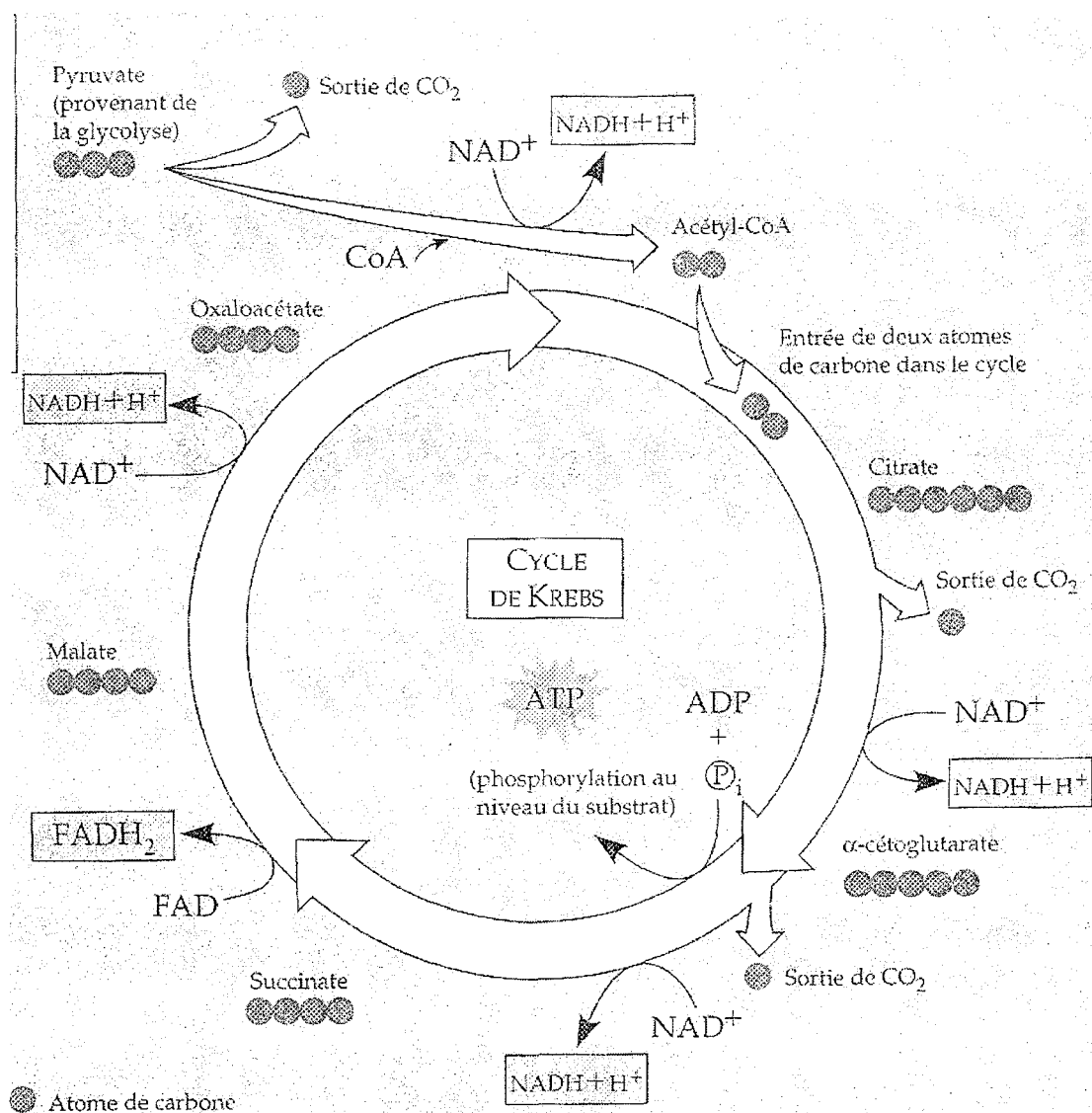


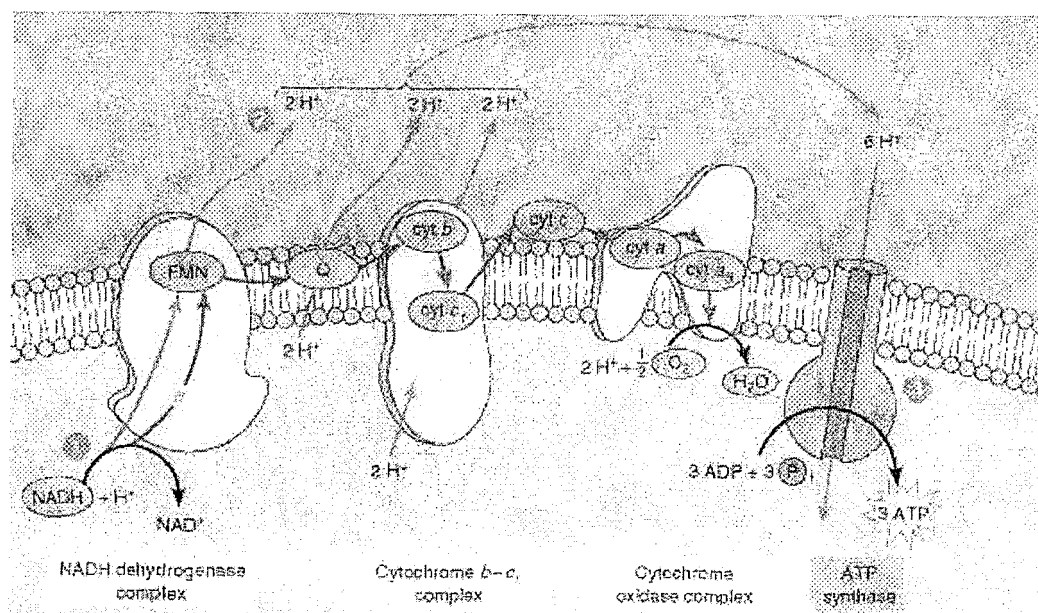
Figure 2. Représentation schématique du cycle de l'acide citrique. (Copyright © 1993 Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.)

1.2.3 La phosphorylation oxydative

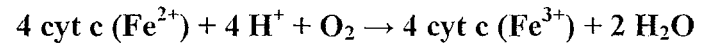
Les voies aérobies permettent la production d'environ 32 molécules d'ATP par molécule de glucose oxydée. ⁽⁴⁾ La glycolyse et le cycle de l'acide citrique produisent directement quatre molécules d'ATP au niveau du substrat. La plus grande partie de l'énergie qui peut être rendue disponible à la suite de réactions d'oxydoréduction est donc contenue dans les transporteurs d'électrons à haute énergie (NADH et FADH₂). ⁽⁵⁾

Les cellules tirent la plus grande partie de leur énergie de réactions qui ont lieu dans les membranes. ⁽²⁾ En effet, près de 90 % de l'ATP engendré par la respiration cellulaire aérobie provient de la phosphorylation oxydative au niveau de la membrane interne mitochondriale. ⁽⁴⁾

L'énergie emmagasinée dans les molécules de nutriment est extraite au moyen de réactions d'oxydoréduction. ⁽⁴⁾ Les substrats du métabolisme énergétique – protéines, sucres et lipides – sont de bonnes sources d'énergie chimique car les atomes de carbone de ces molécules sont dans un état relativement réduit. ⁽⁵⁾ Les électrons qu'ils contiennent transitent par les cofacteurs NADH et FADH₂ avant de passer par la chaîne de transport des électrons mitochondriale où ils participent à l'oxydation et à la réduction successive de plus de 10 centres redox (figure 3) avant de réduire l'O₂ en H₂O. ⁽³⁾ Durant ce processus, l'énergie libre des électrons relâchée par le passage d'un centre à un autre permet le pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Le gradient de pH ainsi généré de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie permet la synthèse enzymatique d'ATP à partir de l'ADP et du Pi. ⁽³⁾



Le complexe IV, ou complexe cytochrome oxydase catalyse la réaction finale de la chaîne de transport des électrons, soit la réduction de l'oxygène moléculaire par quatre électrons pour former l'eau :



Le complexe cytochrome oxydase est au coeur des problèmes rencontrés dans l'acidose lactique. L'altération du fonctionnement de ce complexe engendre une baisse de la production d'ATP, promouvoit l'accumulation d'acide lactique, et possède de nombreuses répercussions au niveau physiologique chez les personnes atteintes. Le chapitre 2 discute en détail de la maladie et expose les objectifs poursuivis dans ce travail de recherche.

CHAPITRE II

REVUE DE LA LITTÉRATURE SCIENTIFIQUE

2.1 Description des symptômes associés à la LSFC

L'acidose lactique, ou LSFC, est une variante de la maladie de Leigh (neurodégénérescence sub-aiguë du tronc cérébral et des ganglions basaux), que l'on retrouve presque exclusivement dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean-Charlevoix, au Québec. ⁽⁶⁻⁷⁾ Il s'agit d'une maladie héréditaire récessive. Dans la population en général, une personne sur quarante mille est porteuse du gène muté de la LSFC. Dans la population du Saguenay-Lac-Saint-Jean-Charlevoix, cette statistique est estimée à une personne sur vingt-trois. Dans cette région, une naissance sur deux mille environ porte à terme un enfant atteint d'acidose lactique. ⁽⁶⁾

La variante canadienne-française du syndrome de Leigh (LSFC, MIM 220111) se distingue par l'expression différentielle de la maladie dans les tissus. Chez les patients LSFC, le foie et le cerveau sont plus affectés que le cœur, les reins, ou les muscles squelettiques. Ces patients n'ont pas de symptômes de cardiomyopathie, de maladies rénales ou de myopathies sévères comme on en retrouve chez les personnes atteintes du syndrome de Leigh. ⁽⁶⁻⁷⁾

Les symptômes de la LSFC se caractérisent par une acidose lactique chronique compensée, un retard de développement, l'hypotonie, un retard psychomoteur, un dimorphisme facial léger, des dommages aux ganglions basaux du système nerveux central (CNS) et des épisodes d'acidose lactique qui sont souvent fatals. ⁽⁶⁻⁷⁾ Les crises d'acidose surviennent typiquement lors d'infections majeures, comme une pneumonie bronchique ou une septicémie. D'autres facteurs, comme un stress intense ou un choc émotionnel, peuvent aussi déclencher les épisodes d'acidose lactique. Durant ces crises, plusieurs paramètres sanguins, comme le pH ainsi que le taux de bicarbonate et de lactate sont affectés. Le tableau 1 présente un aperçu de ces paramètres ainsi que les valeurs normales attendues chez un individu sain. ⁽⁸⁾

Tableau 1. Paramètres sanguins d'individus atteints d'acidose lactique en état stable et en période de crise acidotique. ⁽⁸⁾

| Paramètre sanguin | Patient atteint d'acidose lactique, en état stable | Patient atteint d'acidose lactique, en état de crise | Valeur normale attendue chez un individu sain |
|-------------------|--|--|---|
| pH | 7.42 (7.33-7.49) | 7.10 (6.78-7.49) | 7.35-7.45 |
| Bicarbonate (mM) | 18 (14-19) | 9.0 (7.6-13.2) | 22-26 |
| Lactate (mM) | 3.0-5.6 | 13.5-16.4 | 0.8-2.2 |

Le terme « acidose lactique congénitale » réfère généralement à une gamme de défauts dans le métabolisme mitochondrial par lesquels la conversion de substrats énergétiques en ATP est perturbée. ⁽⁹⁾ Effectivement, l'activité cytochrome c oxydase (COX) dans les fibroblastes de patients atteints de LSFC est diminuée d'environ 50 % par rapport à l'activité normale alors que le foie et le cerveau sont plus fortement atteints, avec une réduction de l'activité COX d'environ 80 % par rapport à l'activité normale. Les reins, le cœur et les muscles squelettiques, quant à eux, présentent un niveau d'activité COX comparable à celui d'un individu sain. ^(7,10)

2.2 Rôle de l'enzyme COX dans le métabolisme cellulaire

Le rôle de l'enzyme COX est de réduire l'accepteur final de la chaîne de transfert des électrons de la mitochondrie, l'oxygène moléculaire, en eau métabolique. ^(6,8) Cet enzyme est composé de treize sous-unités, dont trois sont codées par l'ADN mitochondrial, alors que les dix autres sont codées par l'ADN nucléaire. ^(6,8) L'enzyme requiert aussi dans sa structure deux molécules de hème, ainsi que deux centres de cuivre, avec toutes les modifications nécessaires à leur assemblage. ⁽¹¹⁻¹³⁾

Plusieurs causes peuvent expliquer le défaut de l'enzyme cytochrome c oxydase : la synthèse perturbée d'une sous-unité, l'assemblage défectueux du complexe enzymatique, la dégradation d'une protéine chaperon, le transport ou la synthèse du groupement hème, le transport ou l'insertion de métaux dans la structure (Cuivre, Zinc, Magnésium, Fer), l'affinité réduite de l'enzyme au cytochrome c ou à l'oxygène, un problème au niveau du transfert d'électrons ou encore au niveau de la stabilité du complexe. ⁽¹¹⁾

2.3 Association du gène LRPPRC à la LSFC

Le gène LRPPRC (Leucin-Rich Pentatricopeptide Repeat Cassette) ou LRP130 (MIM 607544) a récemment été associé aux troubles des patients atteints de LSFC. Généralement, les principales mutations affectant l'enzyme COX se retrouvent dans les gènes SURF1 (locus 9q34), SCO2 (locus 22q13) et COX10 (locus 17p11-13). Le gène LRPPRC quant à lui se situe plutôt sur le chromosome deux au locus p16-21. ⁽¹⁴⁾ Aucune des dix sous-unités nucléaires de l'enzyme COX ne correspond à la région du génome où l'on retrouve le gène LRPPRC. ⁽¹⁵⁾ La mutation non-sens A354V dans ce gène provoque le changement d'une alanine très conservée par une valine. ⁽⁶⁾ Cette mutation compte pour la majorité des cas répertoriés de la maladie au Saguenay-Lac-Saint-Jean.

2.4 Rôle de la protéine LRPPRC dans le métabolisme cellulaire

La protéine LRPPRC est constituée de 1361 acides aminés. Celle-ci possède caractéristiques d'une protéine mitochondriale de par sa « lead sequence » clivable et sa série de répétitions de tandem de pentatricopeptides. ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

Il n'y a pas, à ce jour, de consensus clair quant à la fonction précise de la protéine LRPPRC, ni à son rôle exact dans la maladie LSFC. ⁽⁹⁾ Cependant, des études comparatives montrent que cette protéine serait un homologue de la protéine PET309p que l'on retrouve chez la levure. Cette dernière est nécessaire à la bonne expression de l'enzyme COX chez ces organismes. ^(6,18,19) Son mécanisme implique la stabilisation et la translation de l'ARNm de la sous-unité COX I. ⁽¹⁵⁾

Ainsi, on soupçonne que la protéine LRPPRC serait impliquée dans la stabilité de l'ARNm d'une ou plusieurs sous-unités COX. ⁽¹⁵⁾ Le profil d'expression de l'ARNm de LRPPRC est typique d'une protéine mitochondriale, c'est-à-dire : élevé dans le cœur, les muscles et les reins, et faible dans le cerveau et le foie. Cependant, l'impact de la mutation sur l'expression de l'enzyme COX est important dans le foie et le cerveau, intermédiaire dans les fibroblastes et négligeable dans le cœur et les reins. Il semble que

dans les tissus où l'expression de l'ARNm de la sous-unité COX I est la plus basse, la protéine LRPPRC soit requise pour assurer la stabilité de l'enzyme. ⁽¹⁵⁾

Au point de vue médical, les crises d'acidose métabolique sont souvent accompagnées, durant la phase de décompensation, d'un œdème pulmonaire. ⁽⁷⁾ Cette information corrèle avec un faible taux d'ARNm de LRPPRC exprimé dans les poumons des patients atteints, tel que montré par immunobuvardage de type Northern. ⁽¹⁵⁾

2.5 Traitement de la LSFC

Selon Luft (2001), les mesures requises pour pallier à une acidose lactique passent par la neutralisation de l'excès d'ions hydrogène avec du NaHCO_3 , et l'accélération de la métabolisation du lactate. ⁽²⁰⁾ Présentement, il n'existe pas de médication efficace pour prévenir ou traiter l'acidose lactique. Malheureusement 92 % des enfants atteints décèdent avant l'âge de deux ans d'une crise acidotique qui résulte en une dysfonction de plusieurs organes, et ce malgré un support médical intensif. ⁽⁷⁾ Le diméthylglycine (DMG) a fait l'objet d'une étude clinique sur des patients LSFC comme traitement prophylactique potentiel afin d'éviter les crises acidotiques. ⁽²¹⁾ Cependant, aucun effet bénéfique du DMG n'a pu être démontré jusqu'à maintenant sur les niveaux sanguins de lactate, de pyruvate, de bicarbonate, sur le pH ou le VO_2 des patients. ⁽²¹⁾ Des études ont aussi été menées sur le traitement du syndrome de Leigh. ⁽²²⁾ Selon l'une de ces études, de hautes doses de thiamine, de coenzyme-Q ou de L-carnitine auraient des effets bénéfiques, mais seulement chez 8 % des patients. ⁽²³⁾ De façon générale, il n'existe pas de traitement efficace pour le syndrome de Leigh. ⁽²²⁾

2.6 Problématique et objectifs du projet de recherche

2.6.1 Problématique du projet de recherche

On sait que la LSFC implique une déficience de l'enzyme COX. On connaît d'ailleurs le gène responsable et la protéine impliquée. Cependant,

l'impact de cette maladie sur la biochimie des cellules reste peu connu. De plus, il n'existe pas à ce jour de médication efficace pour prévenir ou traiter les crises d'acidose chez les patients. Toutes ces considérations engagent à mener des recherches afin de mieux comprendre cette maladie pour trouver des façons de contrer ses effets.

2.6.2 Objectif général du projet de recherche

Le principal objectif du projet de recherche visait à développer un modèle d'étude *in vitro* utilisant des cellules en culture afin de mieux comprendre l'acidose lactique et d'évaluer des traitements potentiels.

2.6.3 Objectifs spécifiques du projet de recherche

L'objectif général de ce projet se subdivise en objectifs spécifiques :

- Mettre en culture des cellules normales et de cellules déficientes en activité COX.
- Optimiser les conditions de culture afin de mettre en évidence certains paramètres du métabolisme cellulaire.
- Tester des traitements potentiels sur le modèle d'étude et analyser leur effet sur certains paramètres du métabolisme cellulaire.

2.6.4 Mise en contexte des travaux de recherche

Afin de bien situer le contexte de ces travaux, le chapitre 3 s'attardera à présenter certains des résultats préliminaires ayant servi à définir la structure du modèle d'étude *in vitro* ainsi qu'à orienter les pistes de recherche. Le chapitre 4 est constitué d'un article scientifique soumis au *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, qui décrit le modèle d'étude ainsi que les résultats obtenus avec le bleu de méthylène. Le chapitre 5 fait un retour sur les éléments

importants du projet et propose, à la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherches futures.

CHAPITRE III

TRAVAUX PRÉLIMINAIRES

L'objectif global des travaux préliminaires présentés dans ce chapitre était d'établir les conditions de culture propices à l'étude de certains paramètres biochimiques ainsi qu'à l'évaluation d'un traitement potentiel pour la LSFC. La disponibilité des tissus, de même que la facilité à cultiver ce type de cellules ont orienté le choix du modèle vers des cultures de fibroblastes cutanés. Ce modèle possède l'avantage d'offrir un environnement partiellement contrôlé pour l'étude de plusieurs phénomènes biochimiques. Cependant, il est à noter qu'il est aussi implicitement limité par l'absence d'éléments régulateurs pouvant être amenés par d'autres types cellulaires comme on en retrouve dans un modèle *in vivo*. De plus, les milieux synthétisés et les conditions de culture *in vitro* standardisées ne peuvent pas refléter toute l'étendue des paramètres sanguins et la complexité des échanges présents au niveau d'un tissu. Néanmoins, les modèles en culture de cellules demeurent des outils essentiels dans l'étude de plusieurs mécanismes physiologiques et dans la compréhension de plusieurs maladies.⁽²⁴⁾

La première partie de ce chapitre expose l'utilisation sur des cellules saines (fibroblastes de peau humaine, WS1) du cyanure de potassium (KCN) comme agent inhibiteur du complexe COX, dans le but de moduler à divers degrés son activité enzymatique. Ce modèle d'étude, bien qu'il ne représente qu'une simulation de la LSFC, a tout de même permis d'apporter une vision importante sur ce projet, à savoir l'effet d'une déficience enzymatique plus ou moins sévère sur certains paramètres du métabolisme cellulaire.

La deuxième section de ce chapitre relate les travaux utilisant des fibroblastes cutanés de patients atteints de LSFC. Ces fibroblastes montrent un taux d'activité COX d'environ 50 % de l'activité normale.⁽⁶⁻⁷⁾ L'utilisation de neurones, qui sont des cellules plus fortement atteintes avec un taux d'inhibition de COX avoisinant les 80 %, aurait été un choix plus pertinent. Cependant, ce type de cellule n'était pas disponible au moment des travaux.

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1 Lignées cellulaires

Le contrôle utilisé dans cette étude (WS1) est une lignée de fibroblastes cutanés normaux (ATCC #CRL-1502). Les lignées de fibroblastes cutanés LSFC (COX1 et COX2) sont issues de biopsies de peau de patients et elles proviennent d'une collection d'un laboratoire en collaboration. Les résultats présentés au chapitre 4 ont été obtenus sur les lignées LSFC-F1 et LSFC-F2. Elles proviennent elles aussi de biopsies de peau de patients atteints de LSFC. Cependant, elles ont été mises en culture à partir de l'explant primaire au laboratoire. La lignée LSFC-F1 provient d'un patient homozygote portant la mutation A354V. La lignée LSFC-F2 provient d'un patient hétérozygote composé atteint des mutations A354V et C1119T. Ces cellules ont été cultivées de manière routinière tel que décrit au chapitre 4, en se servant d'une solution de trypsine/EDTA 0,25 % pour les sous cultures.

3.1.2 Dosage de l'activité COX

Les résultats de dosage de l'activité COX présentés à la section 3.2 ont été mesurés selon le protocole décrit au chapitre 4, avec quelques modifications.⁽²⁵⁻²⁶⁾ Sommairement, les cellules WS1 ont été cultivées dans du DMEM jusqu'à confluence dans des boîtes de pétri à 37 °C, en présence de 5 % CO₂. Elles ont ensuite été récoltées mécaniquement, ont subi deux lavages au PBS et ont été homogénéisées sur glace dans un tampon d'isolation (0,25 M sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,4). Les membranes des cellules ont par la suite été brisées à l'aide d'une sonde rotative couplée à un tube de type potter. La fraction mitochondriale a été récupérée par centrifugation différentielle. Les homogénats de cellules ont ensuite été mis en contact avec différentes concentrations de KCN. Le taux d'activité COX a été mesuré par l'oxydation du cytochrome c réduit en spectrophotométrie à 550 nm. Le taux d'activité COX relatif a été calculé en

rapportant les valeurs d'activité obtenues avec KCN en fonction du taux d'activité des homogénats non traités.

3.1.3 Composition des milieux de culture

Les milieux de culture composant le modèle ont été préparés au laboratoire et ont subi quelques modifications au fil du projet de recherche. La base du modèle reste invariable d'un milieu à l'autre et est constituée de « Earl's salts base » (tableau 2). À cette base de sels a été ajoutée différentes sources d'énergie en plusieurs concentrations pour générer les milieux de culture. Le pH de chacun des milieux a été ajusté à 7,4, et les solutions ont été stérilisées par filtration sur un filtre 0,2 μm .

Tableau 2. Composition du « Earl's salts base »

| Sel inorganique | Concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|--|---|
| CaCl_2 (anhydre) | 200 |
| $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | 0,1 |
| KCl | 400 |
| MgSO_4 (anhydre) | 97,7 |
| NaCl | 6400 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 125 |
| NaHCO_3 | 3700 |

3.1.4 Activité métabolique (réduction de la résazurine)

Les résultats d'activité métabolique présentés à la section 3.2 ont été mesurés selon le protocole décrit au chapitre 4, ⁽²⁷⁾ selon les traitements décrits dans les figures correspondantes, à la section 3.2.

3.1.5 Production de dérivés actifs de l'oxygène (Dichlorofluorescein-diacétate)

Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS) ont été quantifiés à l'aide de la sonde fluorescente dichlorofluorescein-diacétate (DCFH-DA) tel que décrit dans Dufour et al. 2007 ⁽²⁸⁾, avec quelques modifications. Les cellules ont étéensemencées à une concentration de 1.00E+04 cellules par puit dans des microplaques 96 puits dans 100 μ M de DMEM pendant 24 heures à 37 °C, en présence de 5 % CO₂. La DCFH-DA (20 μ M final) a été incubée directement avec les cellules pendant 1h avant le traitement. Le tapis cellulaire a ensuite été lavé au PBS. Le traitement a été ajouté et les plaques ont été incubées pendant 120 minutes à 37 °C. Une lecture de fluorescence (ex.: 485 nm; em.: 530 nm) a ensuite été prise à l'aide d'un Fluoroskan Ascent^{Fl} plate reader de Labsystems. Une valeur élevée de fluorescence signifie une production accrue de ROS par les cellules. Comme cette valeur est influencée par le nombre de cellules présentes, les données de fluorescence de la DCFH-DA sont rapportées par le nombre estimé de cellules par puit, tel que déterminé par le test au Hoeschst 33342 (HO). Le test de HO est mené tel que décrit au chapitre 4.

3.1.6 Viabilité cellulaire (Calcéine-AM)

La viabilité cellulaire est évaluée par l'activité des estérases intracellulaires, tel que déterminé par la méthode à la calcéine-AM. Les données de viabilité cellulaire présentées à la section 3.2 ont été récoltées selon le protocole décrit au chapitre 4, ⁽²⁹⁾ selon les traitements décrits dans la figure correspondante, à la section 3.2.

3.1.7 Statistiques

Les résultats du chapitre 3 ont été analysés à l'aide d'ANOVA, suivi de comparaisons multiples *a posteriori* de Tukey, Holm-Sidak ou Bonferonni. Le seuil de signification a été établi à $\alpha=0.05$ pour chaque analyse.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Modulation de l'activité COX de fibroblastes sains par inhibition au KCN

La modulation de l'activité COX par le traitement des fibroblastes au KCN a été utilisée pour mimer l'effet d'un taux d'activité enzymatique plus ou moins perturbé, à l'instar de ce que l'on peut observer dans les différents tissus des patients atteints de LSFC. Les fibroblastes de peau ont été choisis comme modèle parce qu'ils sont accessibles et faciles à cultiver. L'utilisation de fibroblastes de patients atteints d'acidose lactique présentant déjà un taux d'activité COX diminué aurait été plus pertinente, cependant ceux-ci n'étaient pas disponibles au moment de ces travaux. La modulation plus ou moins sévère de l'activité COX par le KCN a constitué une alternative simple et accessible ayant permis de dresser un aperçu de la corrélation entre le blocage du complexe COX et la réponse de certains paramètres cellulaires. Le mécanisme impliqué dans l'empoisonnement au KCN prend ancrage principalement dans le blocage de la phosphorylation oxydative. La réaction finale de ce processus est catalysée par l'enzyme COX, qui transfère les électrons issus de la chaîne de transfert à l'oxygène. ^(6,8) L'ion cyanure possède une forte affinité pour l'ion ferrique que l'on retrouve dans le groupement hème de la forme oxydée de l'enzyme. Cette complexation favorisée explique la toxicité observée avec le cyanure car elle compromet l'intégrité structurale de l'enzyme et donc son efficacité. ⁽³⁰⁾

Des tests préliminaires montrent une corrélation inversement proportionnel entre la concentration de KCN et l'activité COX des homogénats de fibroblastes normaux (figure 4). Cette activité se voit réduite de 59 % pour une concentration de 25 μ M KCN, en comparaison à l'activité COX non perturbée. En présence de 1 mM KCN, l'activité COX est inhibée de 97 %. Ces résultats montrent que d'une part l'activité COX des cellules saines est affectée par le KCN, et d'autre part que cette même activité peut être modulée en variant la dose de KCN. Il est à noter que les concentrations de KCN utilisées à la figure 4 ne sont cependant pas

garantes de celles utilisées dans les figures subséquentes, puisque la méthode pour mesurer l'activité COX implique le fractionnement des cellules en homogénats cellulaires, alors que les autres tests ont été menés sur cellules entières.

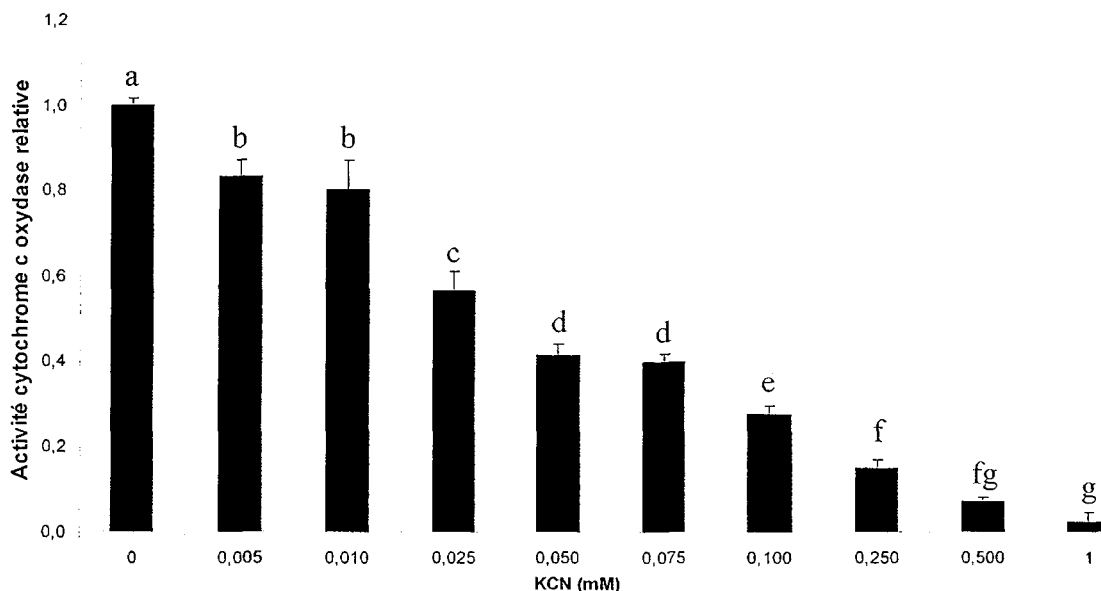


Figure 4. Effet du KCN sur l'activité COX relative d'homogénats de fibroblastes sains (WS1). Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois déterminations. La moyenne associée à une lettre diffère significativement d'un groupe à l'autre. ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Tukey.

Le premier objectif poursuivi dans l'élaboration du modèle d'étude *in vitro* était d'évaluer l'effet de différentes sources d'énergie sur l'activité métabolique des fibroblastes incubés ou non en présence de KCN.

Plusieurs conditions de culture ont fait l'objet d'études dans la portion prospective de cette recherche. Seuls les principaux substrats énergétiques retenus sont présentés ici. Ils ont été sélectionnés car ils s'insèrent à différents points clef dans les voies d'entrée du métabolisme. Le glucose est un substrat étant assimilé directement via la glycolyse. Le mélange de pyruvate et de lactate a été utilisé comme substrat assimilé à l'entrée du cycle de l'acide citrique. Le succinate quant à lui fournit des électrons à la CTE par l'intermédiaire du complexe II. ⁽³¹⁾

L'activité métabolique a été mesurée par la méthode de réduction de la résazurine sur des fibroblastes normaux incubés en présence de l'une ou l'autre des trois sources d'énergie et de KCN (figure 5). La résazurine est un fluorophore non toxique dont la réduction est associée à l'activité mitochondriale, et en partie à la présence d'équivalents réducteurs (NADH), ce qui en fait un indicateur de l'activité métabolique cellulaire. ⁽³²⁾ De façon plus large, elle est aussi un indicateur de viabilité cellulaire.

De premier abord, on observe qu'en absence de KCN (0mM), l'activité métabolique des cellules est plus élevée en présence de glucose qu'en présence de pyruvate/lactate ou de succinate. Ceci suggère que dans les conditions utilisées, la glycolyse est plus sollicitée que les cascades oxydatives, ou plus efficace au maintien de l'activité métabolique des cellules. On observe d'ailleurs que l'activité métabolique des cellules n'est pas diminuée en présence de glucose lorsque l'on augmente la concentration de KCN. Ceci suggère que les cellules utilisent la glycolyse pour répondre à leur besoin en énergie. Les fibroblastes incubés avec le mélange de pyruvate/lactate, quant à eux, montrent un déclin dans l'activité métabolique en fonction de l'augmentation de la concentration de KCN, déclin cependant moins prononcé que dans le cas des fibroblastes incubés en présence de succinate.

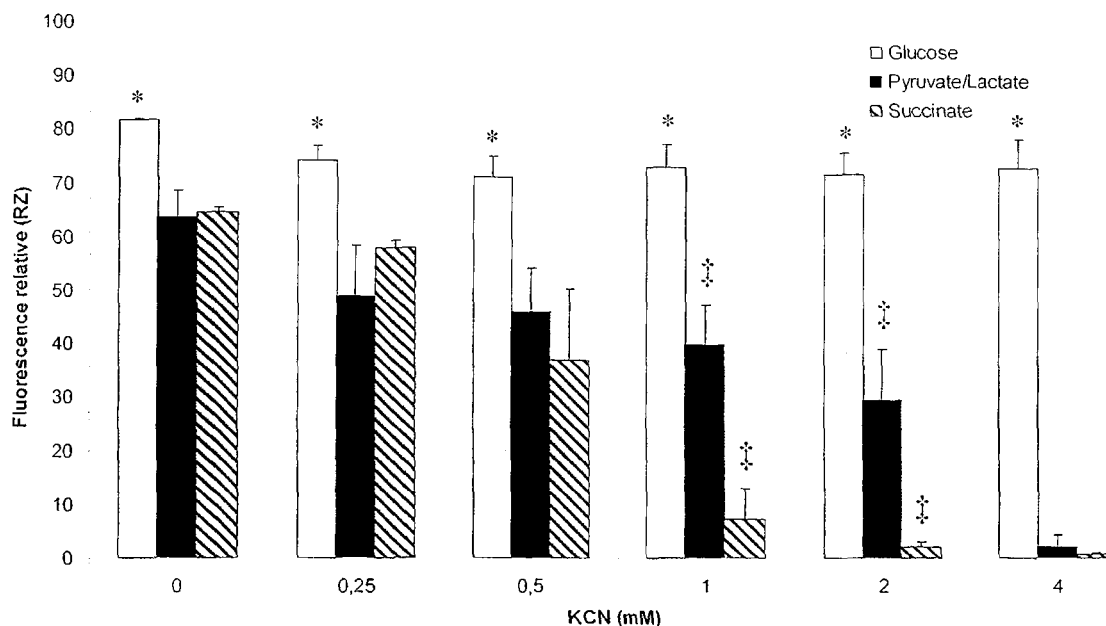


Figure 5. Effet du KCN sur l'activité métabolique de fibroblastes sains (WS1) cultivés avec différents substrats. Les cellules ont été incubées 48 h en présence de glucose (5 mM), d'un mélange de pyruvate/lactate (5 mM/25 mM) ou de succinate (5 mM) avec des concentrations croissantes de KCN. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois déterminations. Le symbole † indique une différence significative entre les traitements pyruvate/lactate et succinate pour une même concentration de KCN. Le symbole * indique une différence significative entre le traitement glucose et les autres sources d'énergie, pour une même concentration de KCN. ANOVA à deux facteurs avec comparaisons multiples de Holm-Sidak.

Les résultats présentés à la figure 5 montrent que le KCN possède un effet différentiel selon le substrat de culture utilisé. Cet effet est le plus marqué lorsque les cellules utilisent le succinate comme source d'énergie, car le déclin dans l'activité métabolique se fait ressentir à plus faibles concentrations de KCN. Ceci suggère que le blocage plus ou moins prononcé de la CTE nuit à l'utilisation de certains substrats énergétiques. Il est connu que lorsque la CTE n'est pas sollicitée, ou lorsqu'elle est défaillante, la glycolyse représente la source principale de production d'ATP cellulaire. ⁽²⁾ Le succinate dépend du métabolisme oxydatif, et donc du fonctionnement de la CTE mitochondriale pour conserver la production d'ATP nécessaire à l'intégrité des cellules. Le blocage de cette chaîne par l'ion cyanide doit être ressenti plus directement dans la production globale d'ATP cellulaire, et, incidemment, sur l'activité métabolique et la survie des cellules.

Afin de bien cerner l'effet des sources énergétiques sur le modèle d'étude, particulièrement lorsque l'activité COX est fortement inhibée, l'activité métabolique des fibroblastes a été mesurée suite à une incubation avec des doses croissantes de substrats, avec ou sans KCN (figure 6). Le taux d'inhibition de l'activité COX par le KCN sur cellules entières n'est pas connu. La concentration 2mM de KCN a donc été sélectionnée pour son effet prononcé sur l'activité métabolique en présence de pyruvate/lactate et de succinate (figure 5), ce qui suggère indirectement un niveau élevé d'inhibition de l'enzyme COX. Le maintien d'un taux basal d'activité métabolique à cette concentration suggère à la fois que le complexe enzymatique n'est pas complètement inhibé.

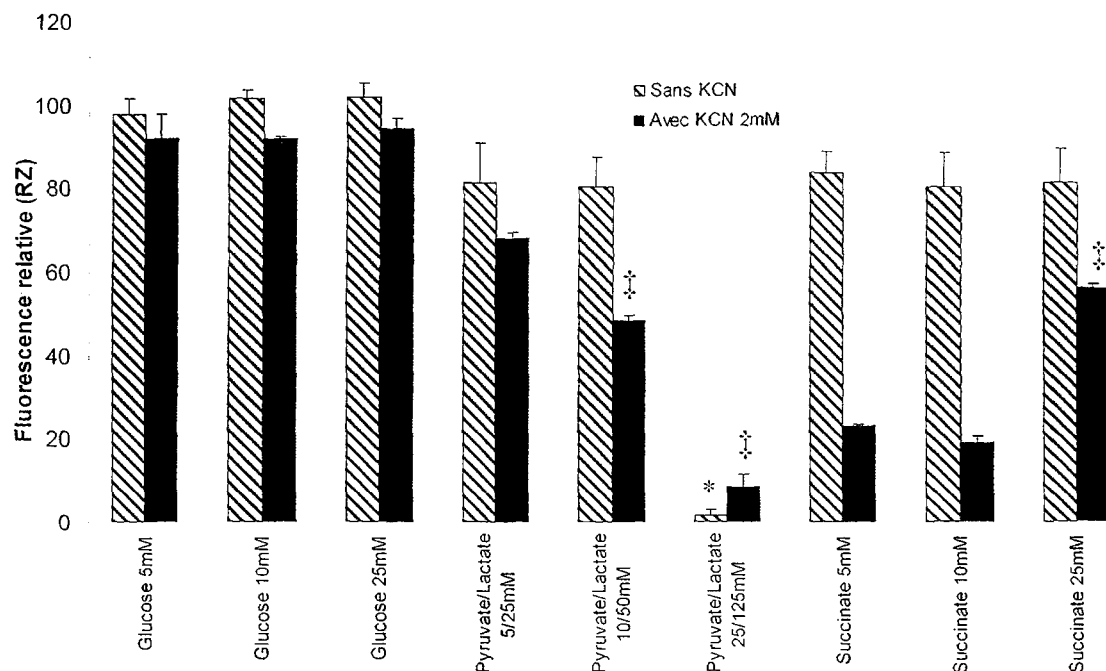


Figure 6. Effet de la concentration du substrat sur l'activité métabolique de fibroblastes sains (WS1) soumis ou non à un traitement de KCN (2 mM). Les cellules ont été incubées 48 h en présence ou en absence de KCN, avec des concentrations croissantes de sources d'énergie (Glucose 5, 10, 25 mM; Pyruvate/Lactate 5/25, 10/50, 25/125 mM; Succinate 5, 10, 25 mM). Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois déterminations. L'analyse statistique a été menée indépendamment entre les différentes sources d'énergie et de traitement au cyanure. Le symbole * indique une différence significative lorsque comparé avec le traitement initial (5 mM), à l'intérieur d'une source d'énergie, pour le traitement sans KCN. Le symbole ‡ indique une différence significative lorsque comparé avec le traitement initial (5mM), à l'intérieur d'une source d'énergie pour le traitement avec KCN 2 mM. ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Tukey.

On note encore une fois l'effet peu marqué d'une forte inhibition de l'activité COX sur l'activité métabolique des fibroblastes incubés en présence de glucose. Dans l'étendue des conditions testées, l'augmentation de la concentration de ce substrat n'engendre pas d'effet significatif lorsque les cellules sont traitées au KCN ($p=0,62$).

Tel qu'anticipé, l'inhibition de l'activité COX possède un effet marqué sur les cellules incubées en présence de succinate. Il est intéressant de souligner que cet effet s'atténue significativement ($p \leq 0,001$) lorsque la concentration du substrat est élevée (25 mM). La figure 7 (B2, B4) suggère que cette augmentation de l'activité métabolique observée à haute concentration corrèle en partie avec une meilleure survie des cellules. Selon un article de Vasilyev paru en 2009, l'acide succinique pourrait aider à maintenir un certain niveau d'activité mitochondriale lorsque l'action de phosphorylation oxydative est limitée, par la stimulation de la voie du succinate oxydase.⁽³³⁾ Cependant, bien que les résultats obtenus semblent pencher en ce sens, cette interprétation demeure spéculative, et le mécanisme du phénomène observé ici reste imprécis.

Pour la combinaison pyruvate/lactate, on observe une perte d'activité métabolique avec l'augmentation de la concentration du substrat, en présence de KCN. Cependant, l'incubation à hautes doses (25 mM pyruvate / 125 mM lactate) possède aussi un effet néfaste sur les fibroblastes non traités au KCN. L'observation visuelle des cellules permet d'associer la diminution d'activité métabolique à une perte de viabilité cellulaire (figure 7 - A3).

Le ratio de pyruvate : lactate normal retrouvé dans le sang d'un individu sain ne dépasse pas généralement 1 : 25.⁽³⁴⁾ Le ratio initial de pyruvate : lactate utilisé (1 : 5) avait été sélectionné pour simuler un ratio normal, tout en évitant d'engendrer une toxicité du lactate sur les cellules. Cependant, à une concentration de 25 mM pyruvate / 125 mM lactate, on peut soupçonner un effet de saturation du lactate entraînant une toxicité au niveau des cellules. L'acide

lactique est considéré comme un acide faible ($pK_{a} 3,86$), mais à cette concentration il est aussi possible que sa présence ait dépassé la capacité tampon du milieu et qu'elle ait induit une diminution marquée du pH, affectant la survie des cellules.

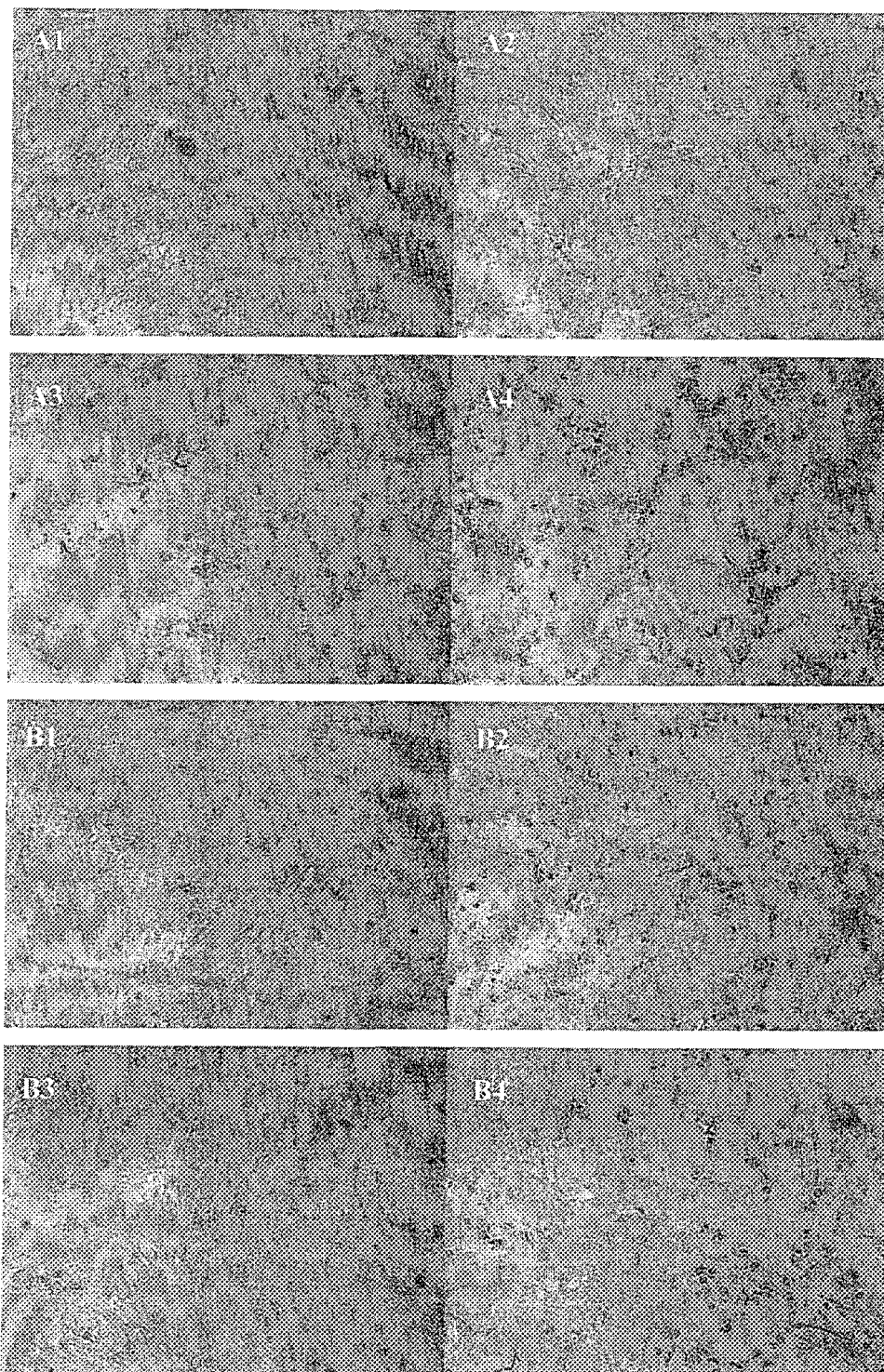


Figure 7. Photos des cellules WSI après 48 h d'incubation dans les milieux présentés à la figure 7 (grossissement 40 X) **A1**: pyruvate/lactate 5/25 mM; **A2**: pyruvate/lactate 5/25 mM avec KCN; **A3**: pyruvate/lactate 25/125 mM; **A4**: pyruvate/lactate 25/125 mM avec KCN; **B1**: Succinate 5 mM; **B2**: Succinate 5 mM avec KCN; **B3**: Succinate 25 mM; **B4**: Succinate 25 mM avec KCN.

Pour faire suite à ces résultats préliminaires, l'un des phénomènes mis de l'avant dans cette étude concerne la production de dérivés actifs de l'oxygène (ROS). On sait, selon Murphy (2009), que la production de ROS, notamment de l'anion superoxyde, est stimulée par une grande force proton-motrice au niveau de la membrane interne mitochondriale, générée lorsque les mitochondries produisent peu d'ATP et que le ratio NADH/NAD^+ est élevé, par exemple lors d'un blocage de la CTE. ⁽³⁵⁾

Les ROS sont des radicaux libres. Ils sont constamment produits dans les mitochondries; ils attaquent et endommagent les molécules à l'intérieur des cellules. Ces dommages sont généralement perçus par la peroxydation des lipides, la carbonylation des protéines, et les fragmentations dans l'ADN. Le stress oxydatif comprend l'ensemble du processus de dommage aux molécules par les radicaux libres. ⁽³⁶⁾

Selon Lenaz (2001), les défauts réduisant l'efficacité de la chaîne respiratoire sont responsables d'une augmentation de la production de ROS. ⁽³⁷⁾ D'ailleurs, il a été montré que le blocage de la chaîne de transfert des électrons des mitochondries d'ostéosarcomes humains avec du NaCN engendre une augmentation de la génération de ROS. ⁽³⁸⁾

L'effet de l'inhibition de l'enzyme COX sur la production de ROS a donc été validé sur le modèle d'étude (figure 8). La sonde fluorescente DCFH-DA a été utilisée pour évaluer la production globale de ROS directement sur les cellules par fluorimétrie. Selon les données préliminaires recueillies à la figure 5, trois traitements au KCN ont été sélectionnés, soit : aucune inhibition (0 mM), faible inhibition (0,25 mM) et forte inhibition (2 mM). En absence de KCN, on observe une production basale de ROS, production significativement plus faible en présence de pyruvate/lactate qu'en présence de glucose ou de succinate ($p=0.002$). Cette différence est probablement attribuable au potentiel antioxydant du pyruvate. ⁽³⁹⁾ En présence de 0,25 mM de KCN, on observe une augmentation de

152 % à 204 % de la production de ROS en comparaison avec les cellules non inhibées. Cette augmentation s'élève jusqu'à 850 % en présence de 2 mM de KCN. À cette concentration, on observe pas de différence entre les conditions de culture pour la production de ROS.

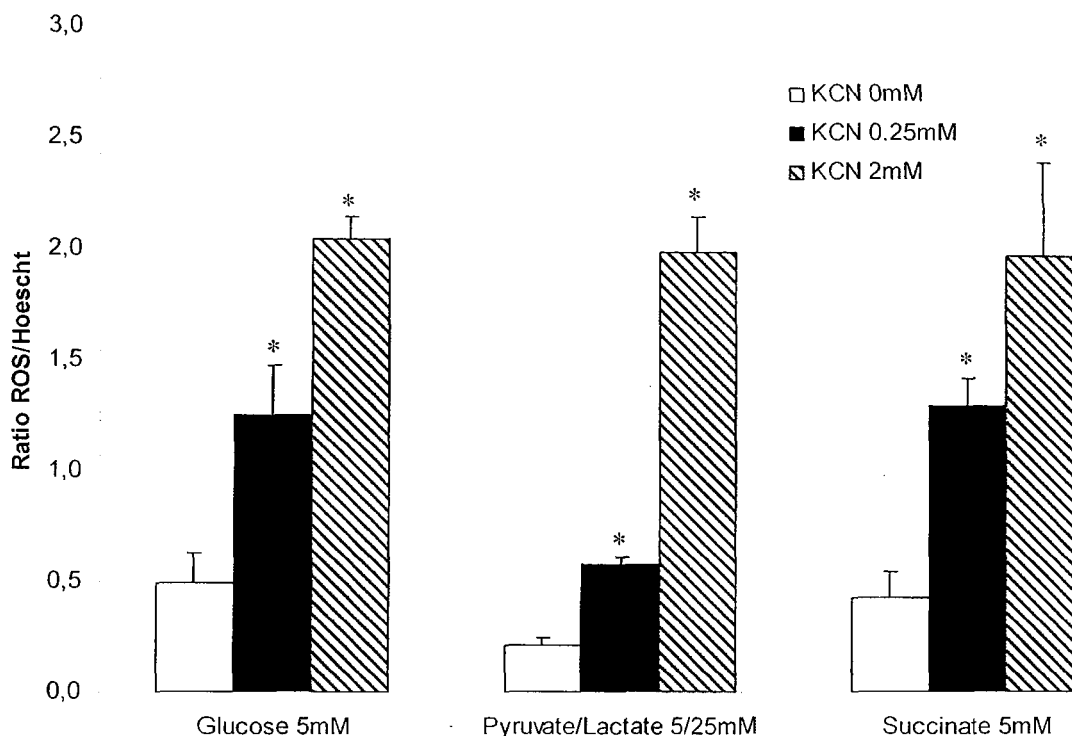


Figure 8. Effet du KCN sur la production de ROS de fibroblastes sains (WSI) en présence de différentes sources d'énergie. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type d'au moins trois déterminations. L'analyse statistique a été menée de façon indépendante pour chaque milieu. Le symbole * indique une différence significative lorsque comparé avec le traitement KCN 0 mM, pour chaque source d'énergie. ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Holm-Sidak. Note: Une transformation en \log_{10} a été nécessaire afin d'assurer la normalité et l'équivariance des données.

Puisque l'augmentation de la production de ROS dans les cellules dont l'activité COX est inhibée par le KCN est considérable, l'effet d'un antioxydant, la mélatonine, a été testé sur les cellules dont l'activité COX est modulée. La mélatonine est une molécule que l'on retrouve naturellement chez l'homme. Elle a été sélectionnée dans cette étude pour ses caractéristique particulières, notamment parce qu'elle aide à l'homéostasie mitochondriale de trois façons : d'une part elle est un puissant éliminateur de ROS, elle améliore le recyclage redox du glutathion (GSH), une molécule du système de défense antioxydant

cellulaire ⁽³⁹⁾, et elle augmente le contenu de la cellule en GSH en favorisant sa synthèse. ⁽⁴⁰⁾ De plus, la mélatonine augmente l'activité des complexes I et IV dans la chaîne respiratoire de façon dose-dépendante, en plus de restaurer les niveaux de cytochrome a+a3. ⁽⁴¹⁾ Il a été montré que l'injection de mélatonine dans des rats normaux accroît de façon significative l'activité des complexes I et IV de la CTE dans les mitochondries isolées obtenues du cerveau et du foie. ⁽⁴⁰⁾ On lui concède aussi un effet anti-apoptotique. ⁽⁴⁰⁾ Ceci en fait une molécule-traitement théoriquement intéressante, dans l'optique où une surproduction de ROS serait impliquée dans le déclin d'activité métabolique et de survie des fibroblastes à l'étude.

L'effet de la mélatonine à faible, moyenne et forte dose a été mis en relation avec la production de ROS de cellules saines dont l'activité COX est modulée par le KCN (figure 9). Cette molécule s'est révélée posséder un double effet. À faibles doses (3,6 μ M), la mélatonine diminue partiellement (18 %) la surproduction de ROS, en présence de 2 mM KCN ($p=0,029$), tandis qu'à hautes doses (200 μ M), la mélatonine potentialise la production de ROS avec une augmentation de 45 % ($p\leq 0,001$). Cette observation est en accord avec la littérature. ⁽⁴²⁾ Cependant, un impact significatif de la mélatonine sur l'activité métabolique ou la survie des cellules n'a pu être montré de façon claire, et ce peu importe le degré d'inhibition de l'activité COX par le KCN (résultats non présentés).

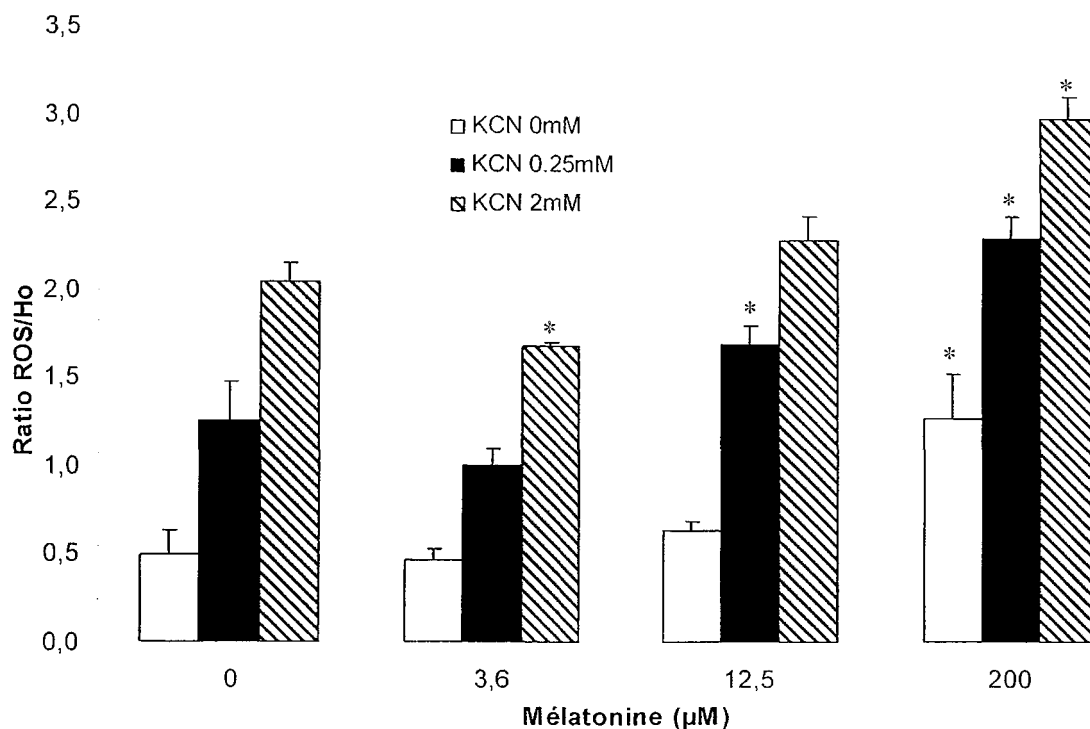


Figure 9. Effet de la mélatonine sur la production de ROS de fibroblastes sains (WS1) traités à différentes doses de KCN. Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype d'au moins trois déterminations. L'analyse statistique a été menée individuellement pour chaque concentration de KCN. Le symbole * indique une différence significative lorsque comparé à la concentration 0 μ M mélatonine pour une même concentration de KCN. ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Tukey.

En résumé, l'utilisation du KCN dans ce modèle d'étude suggère qu'un fort taux d'inhibition du complexe COX entraîne un déficit dans l'utilisation du pyruvate et du succinate comme source d'énergie. Cependant, selon toute vraisemblance, la production d'énergie issue du métabolisme du glucose ne semble pas compromise dans l'éventail des conditions testées. De plus, une forte inhibition du complexe COX par le KCN engendre une surproduction de ROS. Cependant, la capacité de la mélatonine, comme antioxydant, à réduire cette surproduction ou à maintenir l'activité métabolique des cellules n'est pas concluante. La prochaine section de ce chapitre se concentre plus spécifiquement à l'étude de fibroblastes cutanés provenant de patients atteints de LSFC.

3.2.2 Mise au point du modèle d'étude sur fibroblastes LSFC

Les lignées de cellules de patients atteints de LSFC (COX1 & COX2) ont été acquises par l'intermédiaire d'un laboratoire en collaboration. Ces lignées de fibroblastes présentent un taux d'inhibition de l'activité COX de 50 %.⁽⁶⁻⁷⁾

Dans la deuxième portion de cette étude, les conditions de culture entourant le modèle ont été affinées par la combinaison de sources d'énergie dont les proportions sont basées sur des données physiologiques recueillies chez des patients. Selon ces données, on reconnaît qu'en période de crise acidosique on observe entre autres une accumulation de glucose et de lactate sanguin. Les milieux de culture utilisés ont donc consisté en une base de sels « Earl's salts base », à laquelle du lactate et du glucose ont été combinés en différentes proportions. Le tableau 3 résume la composition des milieux utilisés dans cette partie de l'étude.

Tableau 3. Composition des milieux de culture utilisés à la section 3.2.2.

| Milieu de culture | Glucose (mM) | Lactate (mM) | Pyruvate (mM) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|
| A-0 | 0 | 1,5 | 0,15 |
| A-1 | 5 | 1,5 | 0,15 |
| A-2 | 15 | 1,5 | 0,15 |
| A-3 | 30 | 1,5 | 0,15 |
| B-0 | 0 | 5 | 0,5 |
| B-1 | 5 | 5 | 0,5 |
| B-2 | 15 | 5 | 0,5 |
| B-3 | 30 | 5 | 0,5 |
| C-0 | 0 | 20 | 2 |
| C-1 | 5 | 20 | 2 |
| C-2 | 15 | 20 | 2 |
| C-3 | 30 | 20 | 2 |

Les expériences suivantes ont été conçues de manière à mettre l'emphasis d'une part sur l'effet d'une variation plus ou moins importante des substrats sur les deux paramètres à l'étude, soit l'activité métabolique et la production de ROS, tout en gardant comme objectif principal de déceler des différences entre les

lignées LSFC et la lignée contrôle, WS1. L'effet du lactate a d'abord été mesuré indépendamment, avant d'ajouter le paramètre glycémie à l'équation (figure 10).

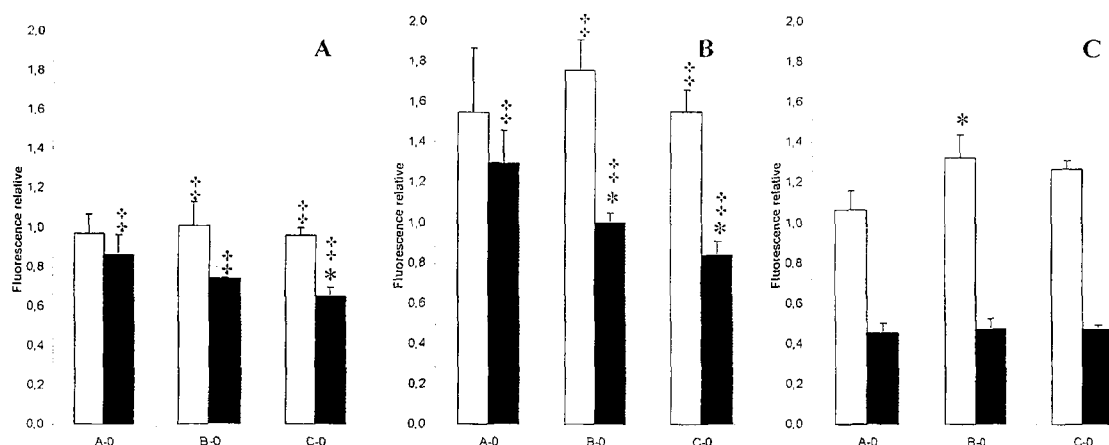


Figure 10. Effet du lactate sur la production de ROS (colonnes blanches) et sur l'activité métabolique (colonnes noires) de fibroblastes A) COX1 B) COX2 C) WS1. Condition A-0 (pyruvate 0,15 mM; lactate 1,5 mM). Condition B-0 (pyruvate 0,5 mM; lactate 5 mM). Condition C-0 (pyruvate 2 mM; lactate 20 mM). Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois déterminations. L'analyse statistique a été menée indépendamment pour chaque test (ROS, RZ). Le symbole * indique une différence significative lorsque comparé au traitement A-0 pour chaque test, dans chaque lignée. Le symbole ‡ indique une différence pour la lignée COX1 ou COX2 lorsque comparé à WS1, à l'intérieur d'un même traitement. ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Tukey.

Fait intéressant, le niveau d'activité métabolique des cellules COX est plus élevé que celui des cellules contrôle ($p \leq 0,001$), dans l'étendue des conditions testées. Il est à noter que le test de réduction de la résazurine pour la quantification de l'activité métabolique cellulaire reflète aussi en partie la présence d'équivalents réducteurs (NADH), en plus d'être parallèlement un indicateur de viabilité. ⁽³²⁾ Dans cette optique, on peut supposer que l'augmentation d'activité métabolique observée chez les cellules COX à la figure 10 implique un phénomène d'accumulation de transporteurs d'électrons à haute énergie (NADH), par le ralentissement de la CTE qui les métabolise plus lentement.

On observe toutefois une tendance significative vers la diminution de l'activité métabolique en fonction de l'augmentation de la concentration en lactate

du milieu (COX1 $p=0,027$; COX2 $p=0,006$). Les cellules saines quant à elles ne présentent pas cette variation ($p=0,65$).

Quant à la production de ROS, on observe une différence entre la lignée contrôle (WS1) et la lignée COX2, cette dernière présentant une production de ROS plus élevée ($p\leq 0,001$). Cependant, cette tendance ne s'observe pas pour la lignée COX1, qui présente quant à elle une production de ROS globale inférieure d'environ 20 % lorsque comparé à la lignée contrôle ($p\leq 0,001$). En contrepartie, on n'observe pas de variation de la production de ROS dans les cellules COX suivant la variation de lactate dans le milieu. Mis en relation, ces résultats suggèrent que la production de ROS chez les cellules COX n'a pas d'impact direct sur l'activité métabolique de ces mêmes cellules, dans l'éventail des conditions testées.

Afin de mieux cerner la complexité des phénomènes observés, les lignées ont été placées à nouveau dans un environnement contenant diverses concentrations de lactate, parallèlement à la simulation de taux de glycémie normaux à élevés, représentés ici par une gradation de la concentration de glucose du milieu (figure 11).

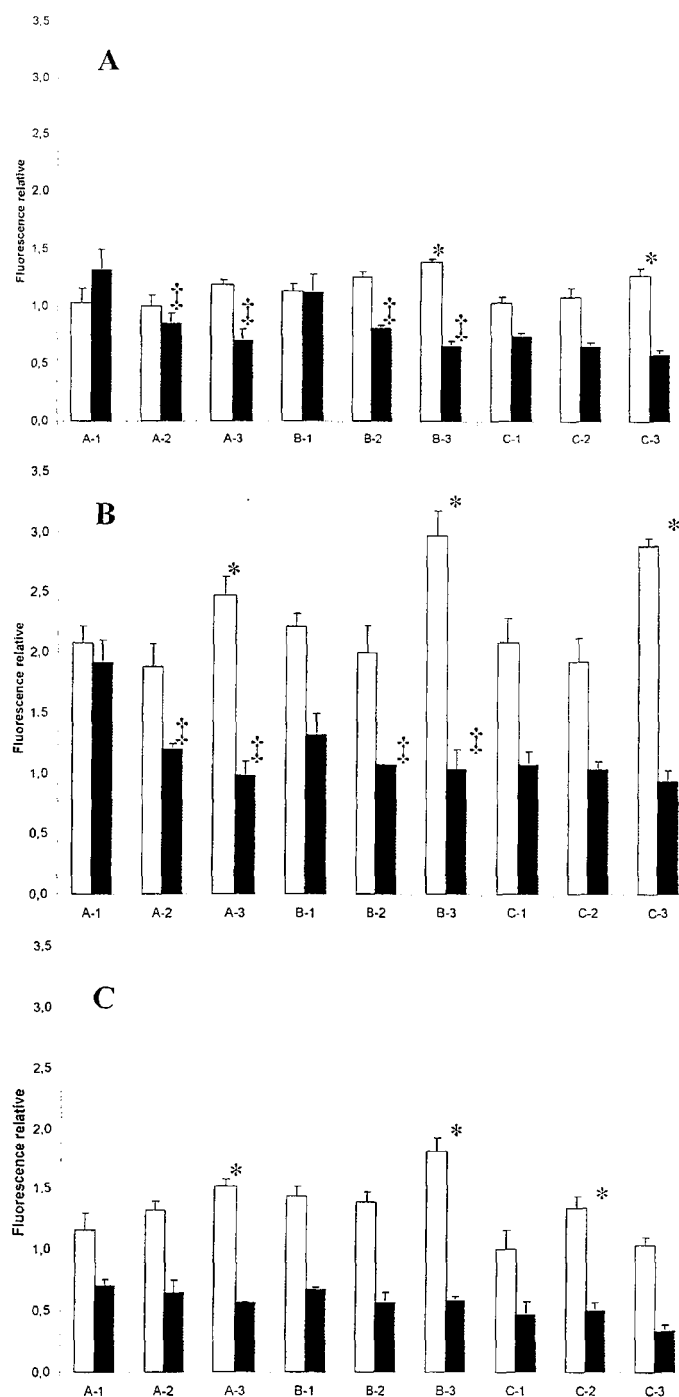


Figure 11. Effet du glucose dans un intervalle de concentrations de lactate sur la production de ROS (colonnes blanches) et l'activité métabolique (colonnes noires) de fibroblastes A) COX1 B) COX2 C) WS1. Condition A (pyruvate 0,15 mM; lactate 1,5 mM). Condition B (pyruvate 0,5 mM; lactate 5 mM). Condition C (pyruvate 2 mM; lactate 20 mM). Condition 1 (glucose 5 mM). Condition 2 (glucose 15 mM). Condition 3 (glucose 30 mM). Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois déterminations. L'analyse statistique a été menée indépendamment pour chaque paramètre. Le symbole * indique une différence significative lorsque comparé à la condition 1, pour le test ROS. Le symbole ‡ indique une différence significative lorsque comparé à la condition 1, pour le test d'activité métabolique. ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Holm-Sidak.

Un des éléments clef observé dans cette figure est la diminution de l'activité métabolique en fonction de l'augmentation de glucose pour les cellules COX1 et COX2. Ce phénomène n'est pas observé avec les cellules normales WS1.

La figure 11 met aussi en évidence le lien entre l'augmentation de la concentration de glucose du milieu et l'augmentation de la production de ROS. Des faits similaires sont également rapportés dans la littérature. Par exemple, l'incubation de cellules de muscle lisse aortique humain en présence de hautes concentrations de glucose (22 mM) engendre une plus forte production de ROS (sous forme de H₂O₂) qu'une faible concentration de glucose (5,5 mM).⁽⁴³⁾

En mettant en relation les différents paramètres mis de l'avant à la figure 11, on observe que l'effet de potentialisation du glucose sur la production de ROS est visible toutes lignées confondues. Cependant, l'effet négatif du glucose sur l'activité métabolique des fibroblastes est notable seulement pour les cellules COX. Cet effet différentiel soulève la question à savoir si les cellules COX sont plus sensibles à un stress oxydatif que les cellules saines, non seulement au niveau de l'activité métabolique, mais aussi de la survie cellulaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, des tests de survie ont été réalisés afin de vérifier la tolérance de chaque lignée à un stress oxydatif. Ce stress a été généré en incubant les cellules en présence de *tert*-butyl hydroperoxyde (TBHP) (figure 12). Le TBHP est un dérivé plus stable du peroxyde d'hydrogène, qui lui est un ROS naturellement produit dans les cellules.⁽⁴⁴⁾ Suite à des tests préliminaires, un taux de stress oxydatif correspondant à 50 µM de TBHP a été sélectionné. À cette concentration, les différences les plus marquées entre les lignées et les conditions utilisées ont été observées avec des taux de mortalité cellulaire variant de 10 % à 100 %, par rapport aux cellules non traitées au TBHP. La viabilité cellulaire est mesurée par le clivage de la calcéine-AM par les estérases intracellulaires et les résultats sont exprimés en pourcentage de survie après

traitement au TBHP, le contrôle sans TBHP étant considéré comme ayant 100% de viabilité cellulaire.

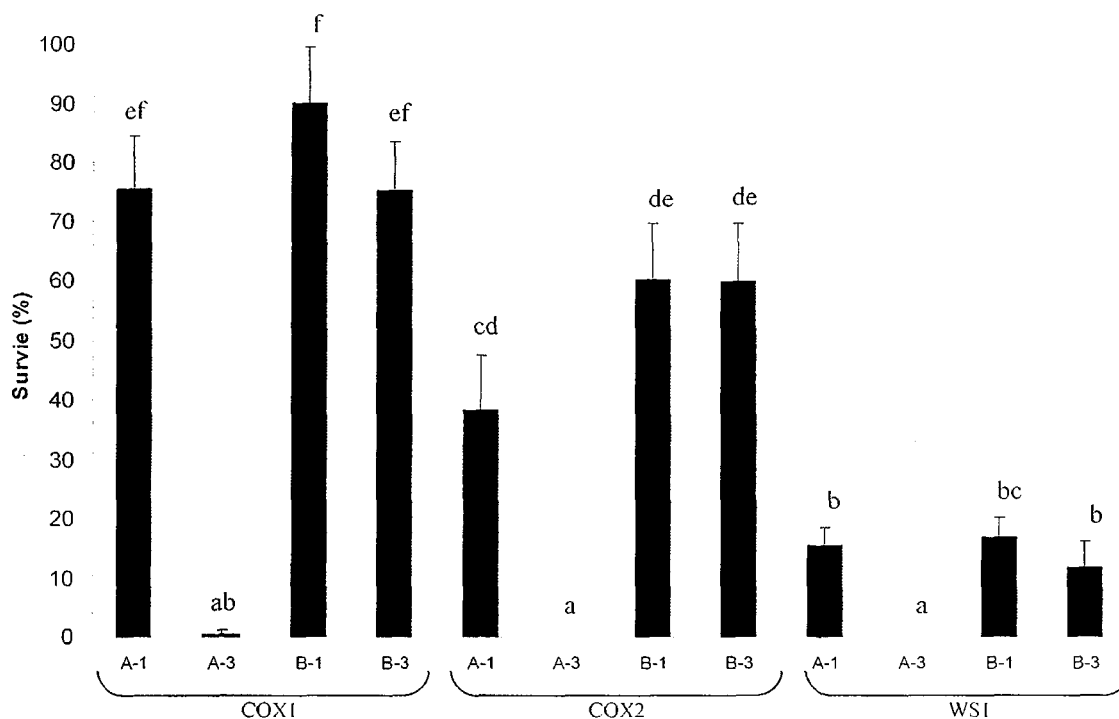


Figure 12. Effet du stress oxydatif (TBHP) sur la survie (calcéine-AM) de fibroblastes normaux et acidotiques. Les cellules sont incubées pendant huit heures dans différentes conditions de milieu avec ou sans 50 μ M de TBHP. Condition A (pyruvate 0,15 mM; lactate 1,5 mM). Condition B (pyruvate 0,5 mM; lactate 5 mM). Condition 1 (glucose 5 mM). Condition 3 (glucose 30 mM). Chaque valeur correspond au pourcentage de survie en présence de 50 μ M de TBHP, le traitement sans TBHP correspondant à 100 % de survie pour chacun des milieux/lignées. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois déterminations. La moyenne associée à une lettre diffère significativement d'un groupe à l'autre. ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Bonferonni.

Paradoxalement, les cellules LSFC semblent survivent mieux à un stress oxydatif généré par une incubation avec 50 μ M de TBHP que les cellules saines, WSI, contrairement à ce que suggéraient les résultats obtenus avec l'activité métabolique (figure 11).

On peut voir que les cellules en condition de culture A-3 (pyruvate 0,15 mM; lactate 1,5 mM; glucose 30 mM) sont les plus affectées par le stress oxydatif imposé, et ce, peu importe la lignée cellulaire. Cette mortalité devient moins importante lorsque l'on diminue la concentration de glucose (de 30 mM à 5 mM) ou lorsque l'on augmente la concentration de lactate (de 1,5 mM à 5 mM).

En considérant qu'il a déjà été montré que l'augmentation du glucose engendre une surproduction de ROS (figure 11), on peut supposer que l'action combinée du stress oxydatif engendré par le TBHP, combiné à l'hyperglycémie doit expliquer, tel qu'observé, l'effet néfaste sur la survie des cellules. Le passage à une concentration de glucose de 5 mM permet de récupérer de façon appréciable le niveau de survie cellulaire.

Quant à la tendance observée pour le lactate, elle est intéressante puisque son augmentation, qui était associée précédemment à une baisse d'activité métabolique (figure 11), se répercute ici par une augmentation de la survie cellulaire lorsque les cellules sont en condition de stress.

Le lactate possède donc, à une concentration de 5 mM (comparativement à 1,5 mM), un effet bénéfique sur la survie des cellules en conditions de stress oxydatif et d'hyperglycémie. Cet élément est particulièrement intéressant, puisqu'il a été montré que chez des lignées de fibroblastes comportant des défauts dans l'activité COX, le taux de lactate est supérieur et le ratio lactate/pyruvate est plus élevé que chez des fibroblastes sains.⁽⁴⁵⁾ Il est aussi connu qu'en condition de crise d'acidose métabolique chez les patients LSFC, le taux de lactate sanguin peut augmenter considérablement.⁽⁷⁾

Le métabolisme des monocarboxylates (lactate et pyruvate) occupe effectivement une place centrale dans le statut énergétique cellulaire. Son rôle est crucial dans l'équilibre entre les cascades glycolytiques et oxydatives.⁽⁴⁶⁾ Ces composés sont aussi en équilibre avec plusieurs autres systèmes redox dans la cellule, comme le ratio de NADH/NAD⁺.⁽⁴⁷⁾ En effet, la lactate déshydrogénase (LDH) catalyse l'interconversion entre le lactate et le pyruvate. Le système cofacteur NADH/NAD⁺ échange l'atome d'hydrogène relâché ou consommé dans la réaction, rendant le ratio NADH/NAD⁺ proportionnel au ratio lactate/pyruvate.

(32)

Selon Brambilla (1998), la mortalité cellulaire engendrée par un stress au TBHP est moins importante lorsque la chaîne de transfert des électrons mitochondriale est inhibée. Dans cet article, l'auteur mentionne que ce phénomène s'explique par l'accumulation de transporteurs activés NADH dans les mitochondries. Les substrats générant du NADH comme le pyruvate, et indirectement le lactate, contrecarrent l'effet délétère du TBHP sur les taux de GSH, d'ATP, et sur le potentiel membranaire mitochondrial. ⁽⁴⁴⁾

Tous les éléments d'information recueillis et les phénomènes observés dans le modèle d'étude laissent sous-entendre que le défaut de l'enzyme COX retrouvé chez les cellules de patients LSFC se répercute dans le statut redox cellulaire, particulièrement au niveau du taux intracellulaire de NADH. Cette information entraîne dans la foulée des avenues de recherches supplémentaires en lien avec le statut redox cellulaire, et met au jour des molécules-traitement potentielles à tester, dont le bleu de méthylène qui est un agent redox aux usages médicaux multiples.

Qui plus est, le paramètre « stress » semble constituer un élément clef de discrimination dans cette étude. Ainsi, un nouveau modèle a été mise au point, afin de simuler des états dits « stable » et « acidotiques » sur les cellules. Ces états, représentés par deux conditions de culture différentes, sont constitués à partir de données cliniques recueillies auprès de patients LSFC et fournies par le Dr. Charles Morin, pédiatre au complexe hospitalier de la Sagamie. Ce changement de modèle coïncide avec la disponibilité de cellules LSFC issues de biopsies de peau de patients, dont la culture à partir d'explants primaires a été faite au laboratoire, et dont le profil génétique est connu.

Ce modèle, ainsi que plusieurs résultats concernant le bleu de méthylène (MB), ont fait l'objet d'une publication soumise au *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, qui est présentée au chapitre 4.

CHAPITRE IV

PUBLICATION

Ce chapitre présente un article scientifique soumis au *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, concernant le détail du modèle d'étude de LSFC sur cultures de fibroblastes, ainsi que l'effet du bleu de méthylène (MB) sur certains paramètres biochimiques et cellulaires. L'article est d'abord précédé d'un résumé en français.

4.1 Résumé de l'article

La LSFC (Leigh Syndrome French Canadian) est une maladie récessive causée par une ou plusieurs mutations dans le gène LRPPRC. Ces mutations induisent une déficience à l'enzyme cytochrome c oxydase (COX), résultant en une accumulation excessive d'acide lactique dans le sang qui peut mener au coma. Il n'existe pas actuellement de traitement pour cette maladie. Le bleu de méthylène (MB) est un agent redox pouvant augmenter *in vivo* la quantité et l'activité de l'enzyme COX, ce qui suggère que le MB pourrait prévenir et traiter la LSFC. Dans cette étude, l'effet protecteur d'une faible dose de MB (125 nM) a été testé sur deux lignées cellulaires de patients atteints de LSFC, dont LSFC-F1, un patient homozygote pour la mutation A354V et LSFC-F2, un patient hétérozygote composé pour les mutations A354V et C1119T. L'activité COX de ces deux lignées cellulaires s'élève à environ 52 % de l'activité COX des cellules saines (WS1). L'effet du MB sur l'activité métabolique a été mesuré par la méthode de réduction de la résazurine pour deux conditions de culture (milieu stable, milieu acidotique) pour des temps d'incubation de 24 h et 96 h. Les résultats montrent que le MB prévient complètement la diminution du métabolisme de LSFC-F1. Parallèlement, l'activité métabolique de WS1 et LSFC-F2 n'a quant à elle pas chuté. Le contenu en ATP a aussi été mesuré après 24 h et 96 h d'incubation dans chacun des deux milieux de culture par la méthode de réaction à la luciférin-luciférase. Les résultats montrent qu'après 96 h en milieu acidotique le contenu cellulaire en ATP diminue de 97 % pour LSFC-F1 et de 91 % pour LSFC-F2. Le MB à faible dose fait complètement regagner le contenu en ATP aux deux lignées de cellules. Finalement, l'effet du MB a été mesuré sur la survie des cellules après 96 h par la méthode de la calcéine-AM. Les résultats montrent clairement que le traitement au MB améliore radicalement la survie des deux lignées LSFC. En conclusion, le MB à faible dose

pourrait être utilisé pour prévenir la chute en énergie et les crises acidotiques dans la maladie LSFC.

4.2 Low-concentration methylene blue maintains energy production and strongly improves survival of Leigh Syndrome French Canadian skin fibroblasts

Rapport-Gratuit.com

**Low-concentration methylene blue maintains energy
production and strongly improves survival of Leigh Syndrome
French Canadian skin fibroblasts**

Jean Legault^a, Pierre-Luc Larouche^a, Isabelle Côté^a, Line Bouchard^a,
André Pichette^a, Brian H. Robinson^b and Charles Morin^{a,c}

^aDepartment of fundamental sciences
Université du Québec à Chicoutimi,
Chicoutimi, Québec,
Canada G7H 2B1

^bDepartment of Paediatrics
The Hospital for Sick Children,
Research Institute,
Toronto, Canada M5G1X8

^cDepartment of Pediatrics and Clinical Research Unit,
Complexe hospitalier de la Sagamie,
Chicoutimi, QC,
Canada G7H 5H6

Correspondence: J. Legault, PhD
Department of fundamental sciences
Université du Québec à Chicoutimi
555, boulevard de l'Université
Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1
E-mail: Jean_Legault@uqac.ca

Acknowledgment and funding: We thank the *Association de parents d'enfants avec acidose lactique* for funding the project.

Running Title: MB restores survival of LSFC fibroblasts.

Abstract

Leigh syndrome French Canadian (LSFC) is a recessive disease caused by mutations in the LRPPRC gene (leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein). These mutations induce a cytochrome c oxidase (COX) deficiency resulting in episodes of acute acidotic crisis that will often lead to death. There is no effective treatment. Methylene blue (MB) is a redox dye that increases COX content and activity *in vitro* and *in vivo* suggesting that MB could prevent and treat LSFC. In this study, the protective effect of low-concentration MB was tested on two LSFC cell lines, including LSFC-F1, homozygous for the mutation A354V, and LSFC-F2 a compound heterozygous for the mutations A354V and C12775STOP. MB effect on metabolic activity was assessed on both LSFC cells in stable and acidotic conditions. For LSFC-F1, results showed that metabolic activity drastically decline after 96 hours in both conditions but not LSFC-F2 and normal cells. MB completely prevents the decrease of metabolic activity in LSFC-F1. Intracellular ATP content was also measured in both culture media. After 96 hours in acidotic medium, ATP content was almost completely depleted for both LSFC cells. Interestingly, MB completely restores ATP content in LSFC-F1 and LSFC-F2 cells. Finally, MB strongly improves the survival of both LSFC cells.

Key words: Leigh syndrome French Canadian, LRPPRC, lactic acidosis, mitochondria, cytochrome c oxidase, COX, ATP, skin fibroblast, methylene blue.

Abbreviations

COX: cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1)

LSFC: Leigh syndrome French Canadian

LRPPRC: leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein

MB: Methylene blue or Methylthioninium chloride

Introduction

The French Canadian variant of Leigh syndrome (Leigh Syndrome French Canadian, or LSFC), also commonly called lactic acidosis, is a recessive disease caused by mutations in the LRPPRC gene (leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein) on chromosome 2p16-21. One mutation (Ala³⁵⁴ → Val) [C¹¹¹⁹ → T] was found responsible for 95% of the cases of LSFC in the Saguenay-Lac-St-Jean region (1, 2). One individual had an 8bp deletion in exon 35 creating a premature stop codon thus producing one compound heterozygote. Children who suffer from this illness are hypotonic and have psychomotor delay (3). Classical Leigh syndrome presents with typical characteristics such as ataxia, dystonia, optic nerve atrophy, ophthalmoplegia, ptosis, nystagmus, trembling and respiratory system alterations. However, the LSFC symptoms are less severe than those observed in the “classical” Leigh syndrome (3). In LSFC, energy production is altered since the cells of children suffering from this disease produce less energy (ATP) than normal cells (4). This reduced energy production is caused by a deficit in cytochrome c oxidase (COX), an enzyme involved in the electron transfer chain of mitochondria (4). Recently, Sasarman et al., showed that the level of mutated LRPPRC is reduced in LSFC cells resulting in decreased steady-state levels of most mitochondrial mRNAs and proteins which lead to a COX assembly defect (5). In a normal, unstressful situation, afflicted children can overcome this deficiency. However, a sustained physical effort, an emotional shock or an infection can all prove fatal. These stresses may result in an acute acidotic crisis with excessive accumulation of lactic acid that leads to coma and death (3). Many tissues isolated from LSFC children express low COX activity, noticeably in the brain and liver (10 to 20% of the normal activity) (4). Some tissues, such as skin (fibroblasts) and skeletal muscle, maintain 50% of their normal COX activity, while tissues such as heart and kidney show almost normal levels of COX activity (4). To date, there is no effective treatment available.

The redox agent methylthioninium chloride or methylene blue (MB) is an organic dye from the thiazine family with cationic and lipophilic properties that acts as an electron transfer mediator in the mitochondria (6-8). Atamna et al. (9) demonstrated that

nanomolar range of MB delays cellular senescence of normal human fibroblasts and increases oxygen consumption, heme synthesis and resistance to oxidative damage. Interestingly, MB could also increase the cellular contents of cytochrome c oxidase. The promising properties of MB prompted us to evaluate its potential on cells affected by LSFC.

The objective of this study was to evaluate the protective effect of MB on two skin fibroblast cell lines isolated from LSFC patients. The effect of MB on metabolic activity, ATP content and cell survival was assessed with regard to two culture conditions, i.e. a stable and an acidotic media. The results showed that MB maintains metabolic activity, ATP content and improves the survival of two LSFC cells tested.

Materials and Methods

Primary explant and cell culture

The normal human skin fibroblast cell line, WS1 (ATCC #CRL-1502) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The LSFC cell lines were obtained - after informed consent - from skin biopsies of two patients, using primary explants (10). A pure skin fibroblast cell line was obtained from each patient. The LSFC cell lines were named LSFC-F1 for the homozygous (A354V) and LSFC-F2 for the compound heterozygous (A354V and C12775STOP). The cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Mediatech Cellgro®, Herndon, USA). The culture medium was supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, USA); a solution of vitamins containing : D-calcium pantothenate (1 mg/L), choline chloride (1 mg/L), folic acid (1 mg/L), inositol (2 mg/L), Nicotinamide (1 mg/L), Pyridoxine (1 mg/L), Riboflavin (0.1 mg/L), Thiamine (1 mg/L); sodium pyruvate (10 mM); non-essential amino acids solution containing : L-alanine (8.9 mg/L), L-asparagine (15 mg/L), L-aspartic acid (13.3 mg/L), L-glutamic acid (14.7 mg/L), glycine (7.5 mg/L), L-proline (11.5 mg/L), L-serine (10.5 mg/L); penicillin (100 IU) and streptomycin (100 µg/ml) (Mediatech Cellgro®). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C in 5%

CO₂. This study was approved by the Comité d'éthique à la recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi and the Comité d'éthique à la recherche du Complexe hospitalier de la Sagamie.

Assessment of COX activity

Isolated mitochondria were prepared as described by Pitkänen et al. (11). Protein concentration of the mitochondrial fraction was determined using Bradford's method with BSA as a standard (12). The cytochrome c oxidase (COX) and citrate synthase (CS) activities were measured as described by Kramer et al. (13) at the same protein concentration. The COX activity was expressed as COX/CS ratio.

Methylene blue treatment

Methylene blue, MB (chemical grade; purity $\geq 95\%$), was obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). The cells were treated with or without 125 nM MB during 24 or 96 hours in a stable medium containing Earl's Salt medium base, 4 mM glucose, 4 mM lactate, 18 mM sodium bicarbonate at a pH adjusted to 7.3 or in an acidotic medium containing Earl's Salt medium base, 30 mM glucose, 10 mM lactate, 7 mM sodium bicarbonate at a pH adjusted to 7.0.

Metabolic activity using resazurin

Exponentially growing cells were plated at a density of 1×10^4 cells per well in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) in 100 μ l of culture medium and were allowed to adhere for 24 hours before treatment. Optimal concentration of MB was determined using a concentration-response curve ranging from 0,016 to 10 μ M (data not shown). Concentration of 0,016 μ M MB was found inactive while 5 and 10 μ M were cytotoxic. The optimal concentration of MB was 0,125 μ M (125 nM). The cells were treated with or without 125 nM MB in a stable medium or an acidotic medium. After 24 h or 96 h, 10 μ l of a solution of resazurin 4% was added to each well and the plates were incubated 60

minutes at 37°C (14). Fluorescence was measured on an automated Fluoroskan Ascent FI plate reader (Labsystems) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. The metabolic activity was reported on the relative quantity of DNA found in each well using Hoescht assay (15). Briefly, the medium was removed from the wells. The cells were washed with PBS buffer, pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and the plates were frozen at -80°C for 24 hours. The plates were then thawed to room temperature and shaken for three hours with 100 µL of SDS 0.01 % per well. The plates were again frozen for 24 hours at -80°C and thawed to room temperature. Then, we added to each well 100 µL of solution containing 60 ng/mL Hoescht 33342 in TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 4 M NaCl) adjusted to pH 7.4. The plates were shaken for 2 hours at room temperature in the dark. Fluorescence was then measured (ex.: 460 nm; em.: 530 nm). Regardless of the conditions tested (n>30), the mean of relative Hoechst fluorescence for WS1, LSFC-F1 and LSFC-F2 was 8 ± 1 , 2.0 ± 0.4 and 2.6 ± 0.5 , respectively.

Assessment of ATP content

Exponentially growing cells were plated at a density of 10^4 cells per well in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) in 100 µl of culture medium and were allowed to adhere for 24 hours before treatment. Then, the cells were treated with or without 125 nM MB in a stable medium or an acidotic medium for 24 or 96 hours. The cells were washed with PBS and 100 µl of boiling distilled demineralized water was added to the cells (16). Five microliters from each sample was added to an opaque microplate. Using an automated system, 45 µL of a reaction solution (D-luciferin 0.5 mM; DTT 1 mM; firefly luciferase 1.25 µg/mL) was injected and light emission was measured immediately over 10 seconds. ATP content of samples was determined using standard curves with known concentrations of ATP and expressed as ATP/Hoescht ratio.

Survival assay using calcein-AM

Exponentially growing cells were plated at a density of 10^4 cells per well in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) in 100 μ l of culture medium and were allowed to adhere for 24 hours before treatment. Then, the cells were treated 96 hours with or without 125 nM MB in a stable medium or an acidotic medium. The viability of cells was assessed by the presence of intracellular esterase activity using calcein-AM (Invitrogen, Burlington) (17). The probe was diluted at a final concentration of 4 μ M and added directly to the cells. The plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 2 hours and fluorescence (ex.: 485 nm; em.: 530 nm) was read using a Fluoroskan Ascent FL plate reader (Labsystems).

Statistical analysis

In all studies the values were expressed as means \pm standard deviation of six determinations. The distribution of each group was found to be normal by using the Kolmogorov-Smirnov test ($p > 0.200$). The results were analyzed by one-way ANOVA followed by a post-hoc Bonferroni test. P values of 0.05 or less were considered as statistically significant.

Results

Cytochrome oxidase activity of Leigh Syndrome French Canadian skin fibroblasts.

COX activity was evaluated on isolated mitochondria. Results presented in Figure 1 are expressed as the ratio of COX activity on citrate synthase (CS) activity made on the same quantity of proteins. The COX/CS ratio for normal skin fibroblast (WS1) and Leigh Syndrome French Canadian skin fibroblasts, LSFC-F1 and LSFC-F2, was 1.0 ± 0.2 , 0.47 ± 0.05 and 0.5 ± 0.1 respectively. The COX activity for both LSFC cells was significantly lower, i.e. about 52% in comparison with normal fibroblast WS1. No

significant difference was found between LSFC-F1 and LSFC-F2. These results agree with those reported in the literature (4).

Effect of methylene blue on metabolic activity and ATP content of Leigh Syndrome French Canadian skin fibroblasts.

The effect of MB on the metabolic activity of WS1 and LSFC cells was evaluated using resazurin in two culture media with regard to physiological blood concentration of glucose, lactate, bicarbonate and pH measured in LSFC patients before (stable medium) and during the acidotic crisis (acidotic medium). In order to assess the effect of MB on metabolic activity, the normal skin and LSFC fibroblasts were treated with or without 125 nM MB for 24 and 96 hours in a stable medium or an acidotic medium. The metabolic activity was reported on the relative quantity of DNA found in each well. Results presented in Figure 2 show that after 96 hours the metabolic activity of WS1 significantly increased to approximately 43% in a stable medium and approximately 76% in the acidotic medium in comparison to 24 hours. However, no change was observed for LSFC-F2. In contrast, a drastic decrease of metabolic activity was observed for LSFC-F1 after 96 hours in both media. The decline of the metabolic activity is completely prevented by MB in the stable medium (Figure 2A) and the acidotic medium (Figure 2B). Moreover, MB significantly increases the metabolic activity of LSFC-F2 after 96 hours in the acidotic medium in comparison with untreated cells. However, MB has no significant effect on metabolic activity of LSFC-F2 after 24 hours and on WS1 after 24 and 96 hours. On the other hand, it is interesting to note that, after 24 hours in the stable medium (Figure 2A) the metabolic activity of LSFC-F1 is significantly higher, about 130% in comparison with normal cells. Moreover, after 24 h in the acidotic medium (Figure 2B), the metabolic activity of both LSFC cell lines is higher in comparison with WS1. Altogether, these results suggest that MB could prevent the decline of metabolic activity and protect energy homeostasis in LSFC cells. Therefore, the effect of MB on ATP content was assessed on both LSFC cells and compared with WS1. ATP content was reported on the relative quantity of DNA found in each well. The results presented in Figure 3 show that, at 24 hours, the ATP content is about 40% to 60% lower in both

LSFC cell lines in comparison with WS1 in the stable (Figure 3A) and acidotic media (Figure 3B). After 96 hours, the ATP content of LSFC-F1 was significantly decreased to approximately 73% in the stable medium and to approximately 97% in the acidotic medium compared with untreated cells at 24 hours. The treatment with MB completely prevents the decline of ATP in both media. As observed in WS1, the ATP content in LSFC-F2 did not decrease in the stable medium after 96 hours (Figure 3A). In contrast, a significant decrease was observed after 96 hours for WS1 and LSFC-F2 in the acidotic medium (Figure 3B). The decline of ATP is more marked for LSFC-F2 with a decrease of 91% compared with a decrease of 53% for the WS1. Interestingly, MB completely restores the ATP content in LSFC-F2 but not in WS1. Altogether, these results show that MB can maintain ATP content in both LSFC cell lines and suggests that MB could allow the improvement of cell survival.

Effect of methylene blue on survival of Leigh Syndrome French Canadian skin fibroblasts.

To assess the effect of MB on cell survival, the LSFC-F1, LSFC-F2 and WS1 cells were treated with or without 125 nM MB for 24 and 96 hours. The percentage of survival of cells at 96 hours was calculated from calcein fluorescence at 24 hours which is considered as 100% of survival. Results presented in Figure 4 show that the percentage of survival of WS1, ranging from 54% to 69%, was not significantly different between the two culture media. Moreover, MB did not improve cell survival. Interestingly, the survival of LSFC-F2 is significantly higher than normal cells in the stable medium with 82% but not in the acidotic medium with 40% of survival. The MB treatment of LSFC-F2 increases cell survival in the stable and acidotic medium to approximately 27% and 54% respectively compared to untreated cells. Finally, LSFC-F1 cells did not survive in the two culture media after 96 hours. However, MB strongly improves the survival of LSFC-F1 in both media with 82% and 99% of survival, respectively. Altogether, these results indicate that MB strongly improves the survival of both LSFC cells.

Discussion

LSFC disease is characterized by COX deficiency which can result in acidotic crises and lead to coma and death (3,4). Some studies show that MB increases COX content and activity suggesting that MB could prevent acidotic crises in LSFC disease (9,18). MB effect was evaluated on a spatial memory retention deficit in rats induced by a COX inhibitor, sodium azide. MB was shown to increase mitochondrial respiration at low doses ranging from 0.5 to 2 μM , transferring electrons from complex IV to oxygen (6,19,20). Interestingly, administration of a low dose of methylene blue (1 mg/kg) in rat completely restored the memory retention impaired by the inhibitor of COX, thus suggesting that MB can compensate inhibited mitochondrial respiration in brain (20). Moreover, Callaway et al. (18) reported that MB improves cognitive functions in normal rats by increasing the brain cytochrome c oxidase activity. Recently, Atamna et al. (9) demonstrated that nanomolar range of MB delays cellular senescence of normal human fibroblasts and increases oxygen consumption, heme synthesis and resistance to oxidative damage. Interestingly, MB could also increase the cellular contents of cytochrome c oxidase.

The objective of this study was to evaluate *in vitro* the protective effect of MB on LSFC cells in two culture conditions as stable and acidotic media. COX activity in LSFC disease is variable according to the tissues (4). The most important decreases are observed in brain, liver and lungs with only 10 to 20 % of the normal COX activity (4). However, cultures of LSFC cells of brain, liver or lung are not available to evaluate the potential of drugs such as methylene blue. Moreover, there is no animal model. In a previous work, Merante et al. (4) reported that the COX activity of fibroblasts isolated from LSFC patients, cultivated in normal conditions, was decreased about fifty percent in comparison with normal skin fibroblasts. Given that skin fibroblasts are much easier to obtain, this model was chosen for the present study. As reported in the literature (4), COX activity in both LSFC cells was reduced about fifty percent in comparison with normal skin fibroblasts, WS1. Using these cellular models, we tested the effect of MB on

metabolic activity, ATP content and survival in two culture conditions as stable and acidotic media.

Metabolic activity was measured using resazurin which is a redox indicator dependent on cellular reduced equivalents such as NADH and NADPH. Non-fluorescent resazurin is irreversibly reduced to fluorescent resorufin by NADH-dependent oxidoreductase (21). The reduction of resazurin is shown to be dependent on both glycolytic and oxidative metabolism (22). Therefore, resazurin was used to determine general metabolic activity including mitochondrial function (23-26). Interestingly, our results show that the metabolic activity at 24 hours was found generally higher in both LSFC cell lines in comparison with normal cells. This observation could be due, in part, to the accumulation of reduced equivalents as NADH possibly caused by a decreased COX activity and sustained glycolysis (4). The NADH/NAD⁺ ratio is implicated in the regulation of glucose metabolism. Therefore, elevated NADH/NAD⁺ ratio can cause a blockage of glucose oxidation and reduce the ATP content (27,28). Moreover, the NADH accumulation can lead to the transformation of the pyruvate to lactate through lactate dehydrogenase (29). Intracellular acidification induced by lactic acid could be unfavourable to the preservation of COX activity and this effect may be exacerbated in LSFC cells. After 96 hours in both media, our results indicate that metabolic activity and ATP content were drastically reduced in LSFC-F1. Surprisingly, the compound heterozygous LSFC-F2 was found to be unaffected after 96 hours in the stable medium compared with the acidotic medium and with homozygous LSFC-F1 cells. Moreover, LSFC-F2 was found to be more resistant in the stable medium than normal cells and LSFC-F1 cell lines and more resistant in the acidotic medium compared with LSFC-F1. It is interesting to mention that the compound heterozygous patient survived about twelve acidotic crises. LSFC-F2 resistance could be explained, in part, by a COX VIc polymorphism that replaces an acidic glutamate 62 with a glycine 62 (1). Indeed, this polymorphism possibly decreases the sensitivity of LSFC-F2 cells in acidic conditions avoiding such a decline of the COX activity. This hypothesis may give a physiological clue to the crises that the patients suffer, in that a stress perhaps temporarily lowers the

pH by increasing lactate production and this then lowers the ability of COX to maintain its activity. Testing of this hypothesis is in progress.

Preliminary experiments allowed the determination of the optimal MB concentration at 125 nM (data not shown). It is important to mention that relatively high concentrations of MB ($>1 \mu\text{M}$) are cytotoxic for normal and LSFC cell lines (data not shown). These results are in agreement with the literature (9). Our results show that MB prevents decline of metabolic activity as well as maintain redox state and ATP content in both LSFC cells. Moreover, MB improves survival of LSFC cells in both media. It was reported that MB⁺ can oxidize directly NADH into NAD⁺ (19) and the MBH produced can be re-oxidized directly by molecular oxygen (29-31). Decrease of NADH/NAD⁺ ratio by MB could prevent intracellular acidification and the inhibition of the glycolysis and possibly oxidative metabolism including COX activity. Moreover, in the cells MB⁺ could also act as an acceptor of hydrogen in several enzymatic systems (32,33), thus favouring the reactions of MBH with the heme group of proteins (34,35). As proposed by Atamna et al. (9) in IMR90 lung fibroblasts, it is possible that MB⁺ and MBH could serve as electron carriers between NAD(P)H-dependent dehydrogenase of mitochondrial complex I and the heme groups of COX. The MB⁺/MBH redox-cycling in mitochondria of LSFC cells could increase COX activity, consumption of oxygen and maintain ATP content. On the other hand, MB might also increase COX components of mitochondrial complex IV in LSFC cells as shown by Atamna et al. (9) in IMR90 lung fibroblasts. However, complementary studies will be necessary to confirm these hypotheses. Finally, in a previous clinical study, the treatment of five patients with intravenous MB had a demonstrable effect on all five patients, resulting in a lowering of the lactate/pyruvate ratio, a pronounced decrease of excess lactate, and may have contributed to the survival of one patient (32).

In conclusion, the results presented in this study show that a very low concentration of MB can prevent the decline of metabolic activity in LSFC cells and the decrease of ATP content. Moreover, MB was found to strongly improve the survival of LSFC cell lines suggesting that it could prevent acidotic crises. The fundamental

decompensation in acidotic crises of LSFC patients is a frequent cause of fatality and thus any manipulation with drugs that can defray the cytotoxic events in crisis could be enormously advantageous. To the best of our knowledge, MB therapy was never tested on lactic acidosis induced by inherited metabolic disorders such as LSFC. It would be interesting to investigate the protective effect of MB at very a low dose in LSFC disease *in vivo*.

References

1. Lee N, Daly MJ, Delmonte T, Lander ES, Xu F, Hudson TJ, Mitchell GA, Morin CC, Robinson BH, Rioux JD. A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16. *Am J Hum Genet*, 2001; 68:397-409.
2. Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu F, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, Lander ES. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100:605-610.
3. Morin C, Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, De Braekeleer M. Clinical, Metabolic, and Genetic Aspects of Cytochrome C Oxidase Deficiency in Saguenay-Lac-St-Jean. *Am J Hum Genet*, 1993; 53:488-496.
4. Merante F, Petrova-Benedict R, MacKay N, Mitchell G, Lambert M, Morin C, De Braekeleer M, Laframboise R, Gagne R, Robinson BH. A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *Am J Hum Genet*, 1993; 53:481-487.
5. Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, Shoubridge EA. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 2010; 21:1315-1323.
6. Lindahl PE, Öberg KE. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res*, 1961; 23:228-237.

7. Visarius TM, Stucki JW, Lauterburg BH. Inhibition and stimulation of long-chain fatty acid oxidation by chloroacetaldehyde and methylene blue in rats. *J Pharmacol Exp*, 1961; 289:820-824.
8. Riha PD, Bruchey AK, Echevarria DJ, Gonzalez-Lima F. Memory facilitation by methylene blue: Dose-dependent effect on behaviour and brain oxygen consumption. *Eur J Pharmacol*, 2005; 511:151-158.
9. Atamna H, Nguyen A, Schultz C, Boyle K, Newberry J, Kato H, Ames BN. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J*, 2008; 22:703-712.
10. Coelho JC, Giugliani R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Genet Mol Biol*, 1999; 23:269-271.
11. Pitkanen S, Raha S, Robinson BH. Diagnosis of complex I deficiency in patients with lactic acidemia using skin fibroblast cultures. *Biochem Mol Med*, 1996; 59:134-137.
12. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985; 150:76-85.
13. Kramer KA, Oglesbee D, Hartman SJ, Huey J, Anderson B, Magera MJ, Matern D, Rinaldo P, Robinson BH, Cameron JM, Hahn SH. Automated Spectrophotometric Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Enzyme Activities in Cultured Skin Fibroblasts. *Clin Chem*, 2005; 51: 2110-2116.
14. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 2000; 267:5421-5426.
15. Larsson R, Nygren P. A rapid fluorometric method for semiautomated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture. *Anticancer Res*, 1989; 9:1111-1119.
16. Yang N, Ho W, Chen Y, Hu M. A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP. *Anal Biochem*, 2002; 306:323-327.

17. Wang XM, Terasaki PI, Rankin GW Jr, Chia D, Zhong HP, Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum Immunol*, 1993; 37:264-270.
18. Callaway NL, Riha PD, Bruchey AK, Munshi Z, Gonzalez-Lima F. Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004; 77:175-181.
19. Visarius TM, Stucki JW, Lauterburg BH. Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria. *FEBS Lett*, 1997; 412:157-160.
20. Callaway NL, Riha PD, Wrubel KM, McCollum D, Gonzalez-Lima F. Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats. *Neurosci Lett*, 2002; 332:83-86.
21. Barnes S, Spenny JG. Stoichiometry of the NADH-oxidoreductase reaction for dehydrogenase determinations. *Clin Chim Acta*, 1980; 107:149-154.
22. Abe T, Takahashi S, Fukuuchi Y. Reduction of Alamar Blue, a novel redox indicator, is dependent on both the glycolytic and oxidative metabolism of glucose in rat cultured neurons. *Neurosci Lett*, 2002; 326:179-182.
23. Springer JE, Azbill RD, Carlson SLA. Rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. *Brain Res Protoc*, 1998; 2:259-263.
24. Magnani E, Bettini E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Res Protoc*, 2000; 5:266-272.
25. Yang Y, Balcarcel RR. 96-well plate assay for sublethal metabolic activity. *Assay Drug Dev Technol*, 2004; 2:353-361.
26. Zhang HX, Du GH, Zhang JT. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 2004; 25:385-389.
27. Tilton WM, Seaman C, Carriero D, Piomelli S. Regulation of glycolysis in the erythrocyte: role of the lactate/pyruvate and NAD/NADH ratios. *J Lab Clin Med*, 1991; 118:146-152.
28. Holness MJ, Sugden MC. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 2003; 31:1143-1151.

29. Robinson BH, Taylor J, François B, Beaudet AL, Peterson DF. Lactic acidosis, neurological deterioration and compromised cellular pyruvate oxidation due to a defect in the reoxidation of cytoplasmically generated NADH. *Eur J Pediatr*, 1983; 140:98-101.
30. May JM, Qu Z, Cobb CE. Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2004; 286:C1390-C1398.
31. Harrop GA Jr, Barron G. Studies on blood cell metabolism. I. The effect of methylene blue and other dyes upon the oxygen consumption of mammalian and avian erythrocytes. *J Exp Med*, 1928; 48:207-223.
32. Tranquada RE, Bernstein S, Grant WJ. Intravenous Methylene Blue in The Therapy of Lactic Acidosis. *Arch Intern Med*, 1964; 114: 13-25.
33. Quastel JH. Use of Artificial Electron Acceptors in Study of Dehydrogenase. *Method Enzymol*, 1957; 4: 330-331.
34. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem*, 1970; 245:1374-1377.
35. Metz EN, Balcerzak SP, Sagone AL Jr. Mechanisms of methylene blue stimulation of the hexose monophosphate shunt in erythrocytes. *J Clin Invest*, 1976; 58:797-802.

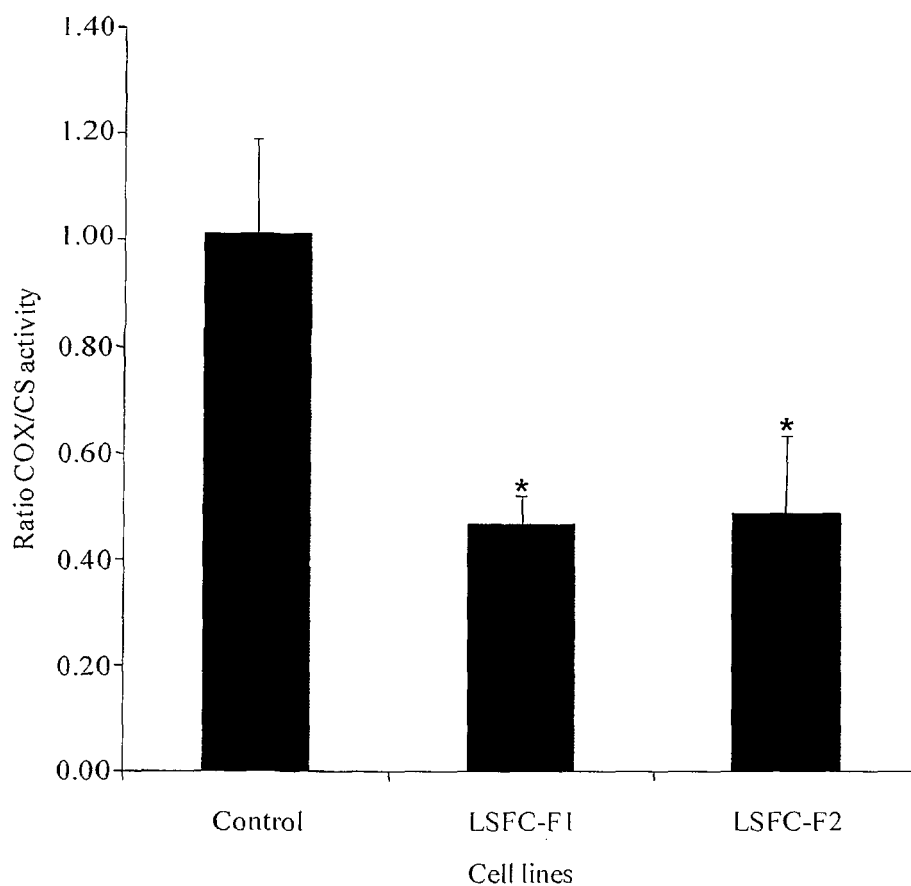
Figures

Fig. 1 Cytochrome c oxidase activity of normal (WS1) and Leigh Syndrome French Canadian (LSFC) skin fibroblasts. Data represent the means \pm standard deviation of six determinations. *Significantly different from normal skin fibroblasts WS1; $P \leq 0.05$, one-way ANOVA analysis and post-hoc Bonferroni test.

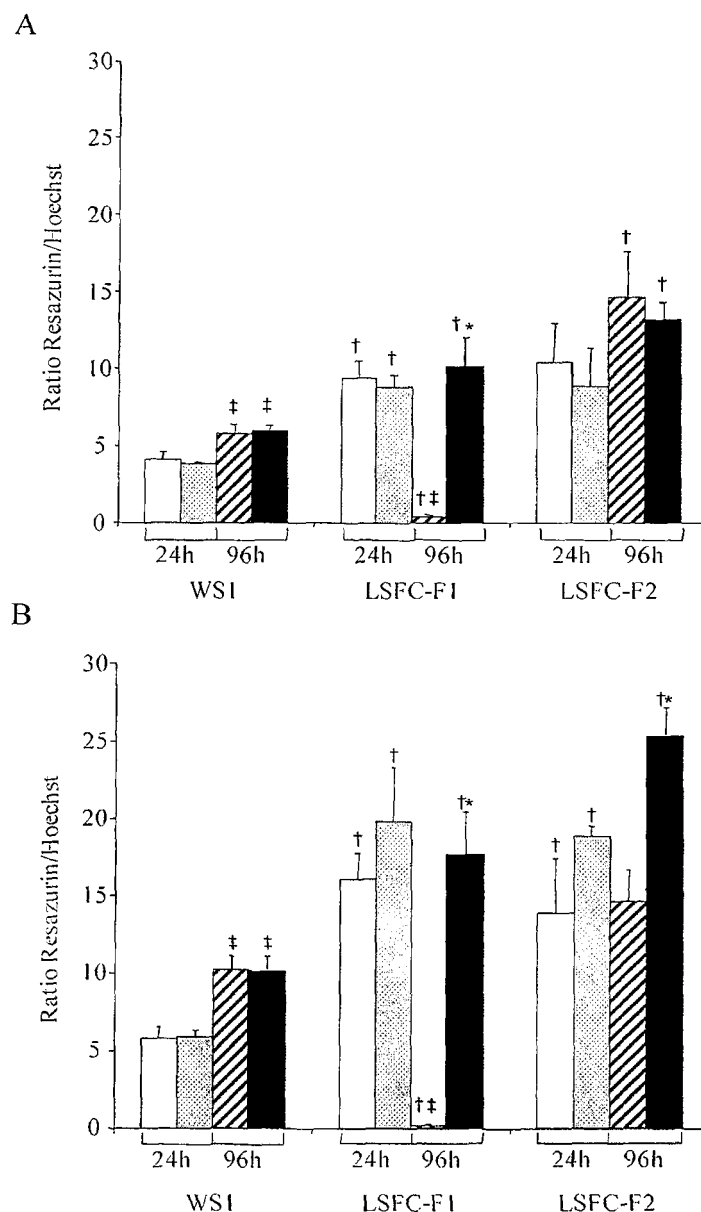


Fig. 2 Effect of methylene blue on the metabolic activity of normal (WS1) and LSFC skin fibroblasts in stable medium (A) and acidotic medium (B). The cells were incubated for 24 h (white) or 96 h (dashed) in the absence or in the presence of 125 nM methylene blue (gray & black). Data represent the means \pm standard deviation of at least six determinations. Statistical analysis was performed independently for each cell type in each medium. LSFC cells were also compared with normal skin fibroblasts according to the time and the treatment. *Significantly different from MB-untreated cells for LSFC-F1 or LSFC-F2. ‡Significantly different from cells at 24 h for WS1 or LSFC-F1. †Significantly different from normal skin fibroblasts WS1 with regard of time and treatment for LSFC-F1 or LSFC-F2. $P \leq 0.05$, one-way ANOVA analysis and post-hoc Bonferroni test.

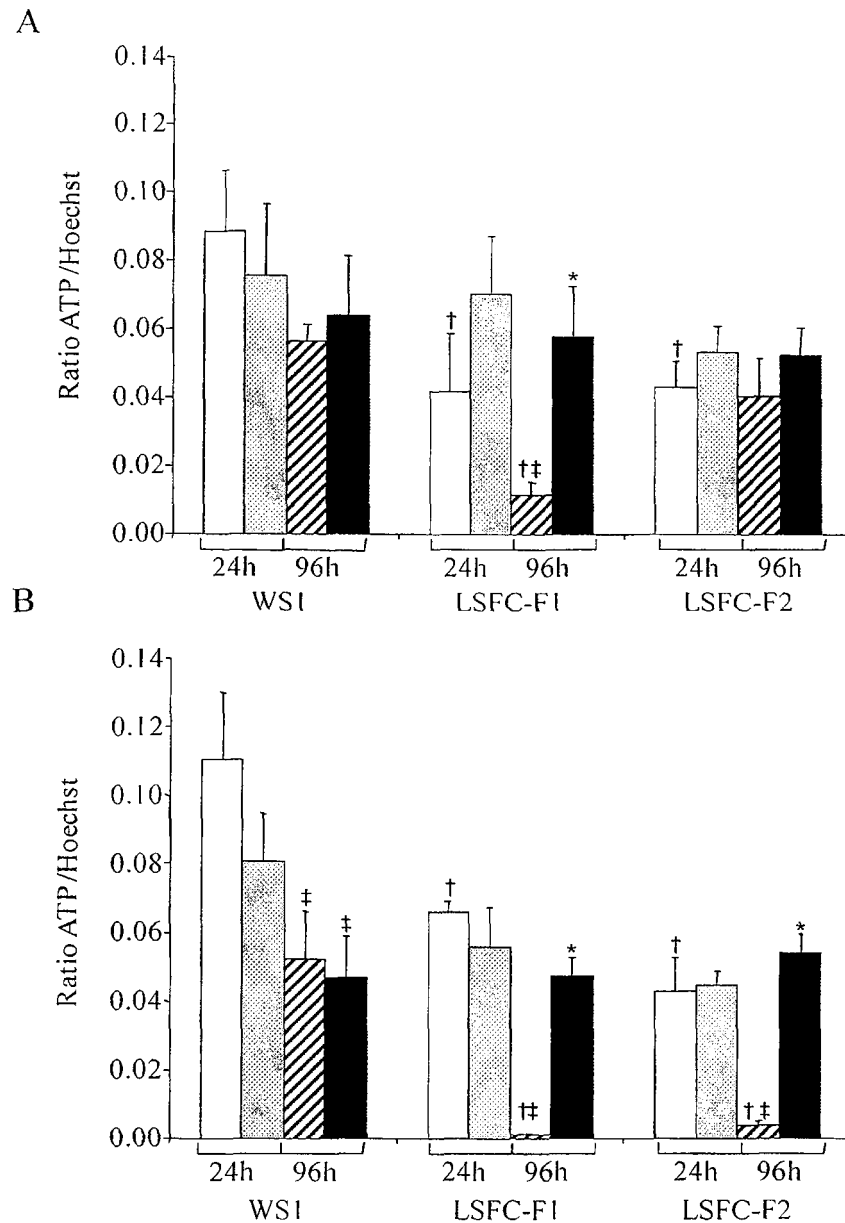


Fig. 3 Effect of methylene blue on the ATP content of normal (WS1) and LSFC skin fibroblasts in stable medium (A) and acidotic medium (B). The cells were incubated for 24 h or 96 h in the absence (white) or in the presence of 125 nM methylene blue (gray & black). Data represent the means \pm standard deviation of at least six determinations. Statistical analysis was performed independently for each cell type in each medium. LSFC cells were also compared with normal skin fibroblasts according to the time and the treatment. *Significantly different from MB-untreated cells for LSFC-F1 or LSFC-F2. ‡Significantly different from cells at 24 h for WS1 or LSFC-F1. †Significantly different from normal skin fibroblasts WS1 with regard to time and treatment for LSFC-F1 or LSFC-F2. $P \leq 0.05$, one-way ANOVA analysis and post-hoc Bonferroni test.

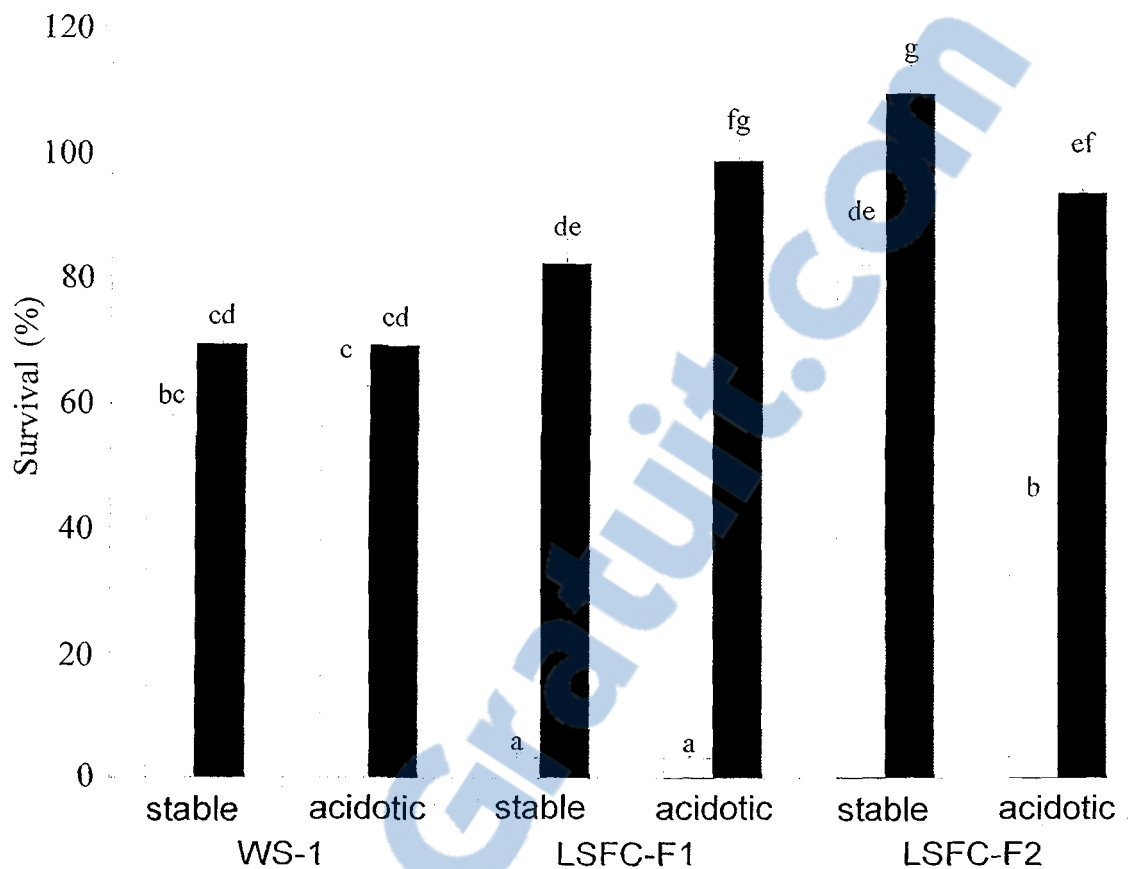


Fig. 4 Effect of methylene blue on the survival of normal and LSFC skin fibroblasts. Each cell line was incubated for 96 hours in stable medium or acidotic medium with (black) or without (white) 125 nM methylene blue. Data represent the means \pm standard deviation of at least six determinations. Means within each group with different letters (a-g) differ significantly from each others. $P \leq 0.05$, one-way ANOVA analysis and post-hoc Bonferroni test.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Tel que décrit précédemment, la LSFC est une maladie récessive caractérisée par une déficience de l'enzyme COX, provoquant des épisodes de crise acidosique entraînant généralement le coma et la mort. Cette étude a été menée dans le but d'éclaircir les conséquences biochimiques et cellulaires découlant de la défectuosité de l'enzyme COX dans des cellules de patients atteints de LSFC, afin de mieux comprendre la maladie et faciliter la recherche d'un traitement.

Ce projet a évolué par une succession de modèles d'étude *in vitro* sur culture de cellules mettant en évidence différents éléments du métabolisme des cellules LSFC. La modulation de l'activité COX de cellules saines par le KCN a permis d'explorer l'effet d'une diminution plus ou moins sévère d'activité enzymatique sur certains paramètres cellulaires, en plus de lancer les assises du modèle d'étude et d'orienter les pistes de recherche.

L'étude des cellules COX1 et COX2, mises en présence de conditions de culture extrêmes (hautes concentrations de lactate, de glucose et stress oxydatif), a permis de mettre en évidence certains éléments clés du métabolisme LSFC. Les résultats de ce modèle montrent que les cellules LSFC ont une activité métabolique (résazurine) plus élevée que les cellules saines, probablement dû à une accumulation de transporteurs NADH, qui sont métabolisés plus difficilement par la CTE. De plus, l'augmentation de la concentration de lactate dans le milieu a tendance à faire chuter cette même activité métabolique. Le glucose à hautes doses (30 mM) quant à lui engendre une surproduction de ROS, qui est associée à une chute de l'activité métabolique, chute qui ne s'observe pas chez les cellules saines. Bien que ces éléments pointent vers une sensibilité accrue des cellules LSFC à un stress oxydatif, les résultats de survie (calcéine-AM) montrent que les cellules LSFC survivent mieux à un stress induit par le TBHP que les cellules saines, dans l'éventail des conditions testées. Cette constatation a orienté les recherches subséquentes pour se tourner plutôt vers le statut redox des cellules, en particulier le déséquilibre NADH/NAD⁺, et vers le bleu de méthylène, un agent redox aux multiples usages médicaux.

La dernière partie de cette étude, relatée dans la publication soumise au *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* a permis de mettre au jour l'effet bénéfique du MB sur les cellules LSFC. Le MB prévient le déclin d'activité métabolique et la chute d'ATP dans les cellules LSFC. Il augmente de façon radicale la survie de ces cellules dans des conditions de culture simulant un état de crise acidosique. L'hypothèse derrière ces observations tient aux capacités redox du MB, qui oxyde directement le NADH avant d'être réoxydé à son tour par l'O₂, favorisant ainsi le transfert d'électrons dans la CTE, bien que cette hypothèse reste à confirmer. Le MB possède aussi plusieurs autres caractéristiques biochimiques intéressantes, dont celle d'accroître le contenu cellulaire en enzyme COX et à amplifier son activité, retarder la sénescence, accroître la consommation cellulaire d'oxygène et la synthèse du hème, entres autres choses. Il n'est pas exclu que l'une ou plusieurs de ces caractéristiques puissent agir parallèlement à divers niveaux dans le métabolisme cellulaire pour protéger les cellules.

Ces caractéristiques du MB, en plus des résultats prometteurs obtenus sur cellules, suggèrent que celui-ci pourrait agir de façon favorable en période de crise acidosique. Il est cependant impératif de garder en tête le contexte préliminaire de ces travaux, de même que les limitations des modèles d'étude, puisque les milieux de culture synthétisés et les conditions de culture contrôlées qui ont été utilisés dans cette étude ne peuvent pas représenter toute la complexité d'un organisme et les interactions qui sont implicites à celui-ci.

D'une façon ou d'une autre, le système redox cellulaire semble être au cœur des altérations impliquées dans la biochimie des cellules LSFC. Particulièrement, l'accumulation de NADH, occasionnée par le blocage de la CTE au niveau de l'enzyme COX, implique plusieurs autres systèmes métaboliques. Le ratio NADH/NAD⁺ est en étroit équilibre avec le ratio lactate/pyruvate, et constitue un mécanisme de gestion serré des cascades glycolytique et oxydative. ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

Au terme de ce projet de recherche, des éléments de réponse sont amenés, mais laissent aussi dans la foulée plusieurs questionnements et avenues de recherche à explorer.

Parmi ces avenues, la plus intéressante consiste à connaître plus en profondeur le mécanisme d'action du MB dans son effet protecteur sur l'activité métabolique, la production d'ATP et la survie des cellules LSFC. Afin de mieux cerner ce mécanisme, il serait intéressant d'inclure d'autres paramètres au modèle d'étude. Le plus pertinent serait bien évidemment de mesurer les variations de NADH intracellulaire dans différentes conditions (stable et acidosique) ainsi qu'en présence de différents types de stress et conditions de traitement. Il serait aussi intéressant de mesurer le taux d'activité de certains enzymes-clefs du métabolisme cellulaire, mais aussi la consommation d'oxygène des cellules, et les voies associées à la mortalité cellulaire (nécrose, apoptose) en conditions de stress.

Dans un autre ordre d'idée, il serait pertinent d'étendre les résultats obtenus sur fibroblastes à d'autres types de cultures, comme par exemple des cellules hépatiques ou neuronales, qui sont plus fortement atteintes que les fibroblastes dans la maladie LSFC. Bien que les résultats sur fibroblastes LSFC soient probants, ce type de cellule n'est inhibé en activité COX qu'à hauteur de 50 % de l'activité de fibroblastes normaux. Les neurones sont quant à eux un type cellulaire dont l'activité COX est inhibée d'environ 80 % chez les patients LSFC. Comme ce type de cellules consomme rapidement ses réserves d'ATP, il devient impératif de garder ce tissu dans la mire pour de futurs travaux.

Toujours dans un autre ordre d'idée, selon un article de Ichai paru en 2000, il existe des systèmes de navettes redox intra et inter-organes pour la coopération énergétique au niveau d'un organisme.⁽⁴⁸⁾ Et bien que les modèles en culture cellulaire aient leur utilité, et soient cruciaux dans les études à caractère biochimique, il conviendrait d'affirmer les résultats prometteurs du MB *in vivo*. Ces étapes sont

précurseur et essentielles à un objectif plus ultime, qui consiste à évaluer l'effet protecteur du MB chez les patients LSFC.

Dans la foulée, ces résultats préliminaires portent potentiellement des implications dans d'autres maladies à caractère mitochondrial, notamment le syndrome de Leigh, lequel s'apparente au LSFC, et pour lequel il n'existe pas non plus, à l'heure actuelle, de traitement efficace.

BIBLIOGRAPHIE

1. Baldwin E. Dynamic aspects of biochemistry. *Cambridge University Press*, 1952; 457 pages.
2. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. L'essentiel de la biologie cellulaire : Introduction à la biologie moléculaire de la cellule. *Médecine-Sciences Flammarion*, 1998; 630 pages.
3. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 2nd edition, *John Wiley & Sons, inc.*, 1995; 1631 pages.
4. Campbell NA. Biologie. *Éditions du nouveau pédagogique*, 1995; 1190 pages.
5. Garrett RH, Grisham CM. Biochimie. 2^e edition. *DeBoeck Université*, 2000; 1254 pages.
6. Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenbord J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu J, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, Lander ES. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003; 100(2): 605-10.
7. Morin C, Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, DeBraekeleer M. Clinical, metabolic and genetic aspects of cytochrome c oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *The American Journal of Human Genetics*, 1993; 53: 488-496.
8. Cooper MP, Qu L, Rohas LM, Lin J, Yang W, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Spiegelman BM. Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex. *Genes & Development*, 2006; 20(21): 2996-3009.
9. Stacpoole PW, Kerr DS, Barnes C, Bunch ST, Carney PR, Fennell EM, Felitsyn NM, Gilmore RL, Greer M, Henderson GN, Hutson AD, Neiberger RE, O'Brien RG, Perkins LA, Quisling RG, Shroads AL, Shuster JJ, Silverstein JH, Theriaque DW, Valenstein E. Controlled Clinical Trial of Dichloroacetate for Treatment of Congenital Lactic Acidosis in Children. *Pediatrics* 2006; 117: 1519-1531.
10. Merante F, Petrova-Benedict R, MacKay N, Mitchell G, Lambert M, Morin C, De Braekeleer M, Laframboise R, Gagné R, Robinson BH. A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguanay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *The American Journal of Human Genetics*, 1993; 53: 481-487.
11. Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency. *American Journal of Medical Genetics*, 2001; 106: 46-52.

12. Schon EA. Mitochondrial genetics and disease. *Trends in Biochem Sciences*, 2000; 25: 555-556.
13. Robinson BH. Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatric Research*, 2000; 48: 581-585.
14. Lee N, Daly MJ, Delmonte T, Lander ES, Xu F, Hudson TJ, Mitchell GA, Morin CC, Robinson BH, Rioux JD. A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16. *The American Journal of Human Genetics*, 2001; 68(2): 397-409.
15. Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, Robinson BH. The role of the LRPPRC (leucin-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochemical Journal*, 2004; 382(Pt 1): 331-6.
16. Hou J, Wang F, McKeehan WL. Molecular cloning and expression of the gene for a major leucin-rich protein from human hepatoblastoma cells (HepG2). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 1994; 30A: 111-114.
17. Liu L, McKeehan WL. Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytoplasmic shuttling, and chromosome activity. *Genomics*, 2002; 79: 124-136.
18. Manthey GM, McEwen JE. The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 1995; 14: 4031-4043.
19. Manthey GM, Przybyla-Zawislak BD, McEwen JE. The *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *European Journal of Biochemistry*, 1998; 255: 156-161.
20. Luft F. Lactic acidosis update for critical care clinicians. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2001; 12: S15-S19.
21. Liet JM, Pelletier V, Robinson BH, Laryea MD, Wendel U, Morneau S, Morin C, Mitchell G, Lacroix J. The effect of short-term dimethylglycine treatment on oxygen consumption in cytochrome oxidase deficiency: a double-blind randomized crossover clinical trial. *Journal of Pediatrics*, 2003; 142(1): 62-66.
22. Finsterer J. Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults. *Pediatric Neurology*, 2008; 39(4): 223-225.

23. Piao YS, Tang GC, Yang H, Lu DH. Clinico-neuropathological study of a Chinese case of familial adult Leigh syndrome. *Neuropathology*, 2006; 26: 218-221.
24. Cristofalo VJ, Volker C, Allen RG. Use of the fibroblast model in the study of cellular senescence. Tiré de *Methods in molecular medicine* Vol. 38: *Aging Methods and Protocoles*. Humana Press Inc. NJ, USA, 2000; pages 23-52.
25. Pitkanen S, Raha S, Robinson BH. Diagnosis of complex I deficiency in patients with lactic acidemia using skin fibroblast cultures. *Biochem Mol Med*, 1996; 59:134-137.
26. Kramer KA, Oglesbee D, Hartman SJ, Huey J, Anderson B, Magera MJ, Matern D, Rinaldo P, Robinson BH, Cameron JM, Hahn SH. Automated Spectrophotometric Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Enzyme Activities in Cultured Skin Fibroblasts. *Clin Chem*, 2005; 51: 2110-2116.
27. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 2000; 267:5421-5426.
28. Dufour D, Pichette A, Mshvildadze V, Bradette-Hébert ME, Lavoie S, Longtin A, Laprise C, Legault J. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 111: 22-28.
29. Wang XM, Terasaki PI, Rankin GW Jr, Chia D, Zhong HP, Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum Immunol*, 1993; 37:264-270.
30. Beasley DMG, Glass WI. Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations. *Occupational Medicine*, 1998; 48(7): 427-431.
31. Leverve XM, Fontaine E. Role of Substrates in the Regulation of Mitochondrial Function In Situ. *IUBMB Life*, 2001; 52:221-229.
32. Petrenko YA, Gorokhova NA, Tkachova EN, Petrenko AY. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria. *Ukr Biokhim Zh*, 2005; 77(5): 100-105.
33. Vasilyev KY, Kiselyova AA, Khazanov VA. Effects of Succinic and Glutamic Acid Combination on Energy Metabolism in the Liver of Mice under Conditions of Hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009; 147(3): 307-310.

34. Debray FG, Mitchell GA, Allard P, Robinson BH, Hanley JA, Lambert M. Diagnostic Accuracy of Blood Lactate-to-Pyruvate Molar Ratio in the differential Diagnosis of Congenital Lactic Acidosis. *Clinical Chemistry*, 2007; 53(5): 916-921.
35. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 2009; 417:1-13.
36. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 1997; 29(8): 363-372.
37. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*, 2001; 52(3-5): 159-164.
38. Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 2007; 7: 106-118.
39. Babich H, Liebling EJ, Burger RF, Zuckerbraun HL, Schuck AG. Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 2009; 45(5-6): 226-233.
40. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, Mitochondrial Homeostasis and Mitochondrial-Related Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002; 2(2): 133-151.
41. Martín M, Macía M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *Journal of Pineal Research*, 2000; 28:242-248.
42. Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sciences*, 2000; 68(4): 387-399.
43. Peiró C, Lafuente N, Matesanz N, Cercas E, Llergo JL, Vallejo S, Rodríguez-Mañas L, Sánchez-Ferrer C. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *British Journal of Pharmacology*, 2001; 133: 967-974.
44. Brambilla L, Sestili P, Guidarelli A, Palomba L, Cantoni O. Electron Transport-Mediated Wasteful Consumption of NADH Promotes the Lethal Response of U937 Cells to Tert-Butylhydroperoxide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998; 284:1112-1121.

45. Mackay N, Robinson BH. Measurement of the Ratio of Lactate to Pyruvate in Skin Fibroblast Cultures. *Methods in Cell Biology*, 2007; 80:173-178.
46. Cerdán S, Rodrigues TB, Sierra A, Benito M, Fonseca LL, Fonseca CP, García-Martín ML. The redox switch/redox coupling hypothesis. *Neurochemistry International*, 2006; 48: 523-530.
47. Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochemical Journal*, 1967; 108: 514-527.
48. Ichai C, Guérin JP, Leverve X, Grimaud D. Le lactate en reanimation. *Conférences d'actualisation, Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS et SFAR*, 2000: pages 503-524.