

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS	XVII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	3
PROBLÉMATIQUE EN LIEN AVEC LA MALADIE.....	3
1.1. La population du Saguenay–Lac-Saint-Jean	3
1.2. Le syndrome de Leigh	4
1.2.1. Causes génétiques du syndrome de Leigh	5
1.3. Syndrome de Leigh type Canadien-Français.....	6
1.3.1. Manifestations cliniques	6
1.3.2. Différences entre le syndrome de Leigh classique et le type Canadien-Français.....	9
1.4. La cytochrome c oxydase	9
1.5. Principe de production d'énergie	10
1.5.1. La voie aérobie	11
1.5.2. La voie anaérobie	12
1.6. Crise d'acidose métabolique	13
1.7. Traitements actuels.....	14
1.8. Le syndrome de Leigh type Canadien-Français : une maladie génétique	15
1.8.1. Identification du gène défectueux	15
1.8.2. Rôle du gène Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing (<i>LRPPRC</i>).....	16
CHAPITRE 2	19
MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	19
2.1. Étude comparative du patron d'expression de fibroblastes d'individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français et de témoins	19
2.2. <i>NDUFA4L2</i> : Un gène différemment exprimé dans les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français	19
2.3. La voie de l'hypoxie cellulaire.....	20
2.3.1. Principe général.....	20

2.3.2. Mécanisme de l'hypoxie.....	21
2.3.3. Gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie.....	22
2.3.3.1. Gènes régulant le système vasculaire et l'érythropoïèse	22
2.3.3.2. Gènes régulant le métabolisme énergétique	22
2.3.4. Pertinence d'étudier la voie de l'hypoxie dans le contexte du syndrome de Leigh type Canadien-Français.....	24
2.3.5. Induction de l'hypoxie par voie chimique.....	25
HYPOTHÈSE.....	25
OBJECTIFS.....	26
MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
3.1. Principe général de l'étude	27
3.2. Culture des lignées cellulaires	28
3.3. Simulation de la condition d'hypoxie.....	30
3.4. Quantification des protéines	30
3.4.1. Préparation des échantillons	30
3.4.1.1. Extraction des protéines.....	30
3.4.1.2. Quantification des protéines par spectrophotométrie	31
3.5. Mesure de la nécrose cellulaire.....	32
3.5.1. Principe de la mesure.....	32
3.5.2. Démarche expérimentale	33
3.6. Mesure de l'expression génique	34
3.6.1. Culture cellulaire pour les essais	34
3.6.2. Extraction de l'ARN messager.....	34
3.6.3. Transcription inverse	35
3.6.4. Réaction de PCR en temps réel	35
3.7. Analyses statistiques	38
RÉSULTATS	39
4.1. Détermination de la dose de chlorure de cobalt et de sa toxicité.....	39
4.2. Mesure de l'expression des gènes de la voie de l'hypoxie	41
4.2.1. Résultat du traitement sur l'expression du gène <i>NADH dehydrogenase</i> <i>(ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2</i>	41
4.2.2. Résultat du traitement sur l'expression du gène <i>hypoxia-inductible</i> <i>factor 1-α</i>	42

4.2.3. Résultat du traitement sur l'expression du gène <i>cytochrome c oxydase subunit IV isoform 2</i>	43
4.2.4. Résultat du traitement sur l'expression du gène <i>pyruvate déshydrogénase kinase 1</i>	44
CHAPITRE 5	47
DISCUSSION	47
5.1. Réduction de la cytotoxicité en fonction de la dose de chlorure de cobalt	47
5.2. Effet de l'hypoxie sur l'expression des gènes de la voie de l'hypoxie	48
5.2.1. Variation de l'expression de NADH déshydrogénase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2 selon les patients.....	49
5.2.2. Stabilisation de la sous-unité alpha en hypoxie	51
5.2.3. Cytochrome c oxydase isoforme 2.....	52
5.2.4. Pyruvate déshydrogénase kinase 1.....	52
5.3. Limites de cette étude.....	53
5.4. Études d'expression par puces à ADN	55
CONCLUSION	59
BIBLIOGRAPHIE	61
ANNEXE 1 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées pour faire les puces à ADN	71
ANNEXE 2 : RÉSULTATS DE L'ANALYSE DES PUCES À ADN	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques génotypiques et phénotypiques des patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français.....	7
Tableau 2 : Caractérisation des lignées cellulaires utilisées	29
Tableau 3 : Composition du tampon de lyse pour l'extraction des protéines	31
Tableau 4 : Étapes de réaction du PCR en temps réel	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Effet fondateur au Québec.....	4
Figure 2 : Chaîne de transport des électrons.....	10
Figure 3 : Étapes schématisées de la respiration cellulaire.....	12
Figure 4 : Structure du gène <i>leucine-rich pentatricopeptide repeat containing (LRPPRC)</i>	16
Figure 5 : Localisation des gènes de la voie de l'hypoxie.....	24
Figure 6 : Démarche expérimentale à suivre pour le protocole d'hypoxie.....	28
Figure 7 : Réactions chimiques du <i>Cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega)</i>	32
Figure 8 : Phases d'amplification de l'ADN par RT-PCR.....	37
Figure 9 : Résultats de la toxicité des doses de CoCl_2	40
Figure 10 : Expression relative de <i>NADH déhydrogénase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2 (NDUFA4L2)</i> suite au traitement de CoCl_2	41
Figure 11 : Expression relative de <i>hypoxia-inductible factor 1-α (HIF-1α)</i> suite au traitement de CoCl_2	42
Figure 12 : Expression relative de <i>cytochrome c oxydase subunit IV isoform 2 (COXIV-2)</i> suite au traitement de CoCl_2	43
Figure 13 : Expression relative de <i>pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1)</i> suite au traitement de CoCl_2	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial
- ADP : Adénosine diphosphate
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- Atm : Atmosphère
- ATP : Adenosine-5'-triphosphate
- BSA : *Bovine serum albumine*
- CoCl₂ : Chlorure de cobalt
- COX : *Cytochrome c oxidase*
- COX10 : *Cytochrome c oxidase assembly homolog 10 (yeast)*
- COX15 : *Cytochrome c oxidase assembly homolog 15 (yeast)*
- COXI : *Cytochrome c oxidase I*
- COXII : *Cytochrome c oxidase II*
- COXIII : *Cytochrome c oxidase III*
- COXIV-2 : *Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2 (lung)*
- DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- EBS : Épidermolyse bulleuse simplex
- FADH₂ : *Flavine adenine dinucleotide*
- FBS : *Fetal bovine serum*
- Flt-1 : *Fms-related tyrosine kinase 1*
- Glut-1 : *Glucose transporter type 1*

Glut-3 : *Glucose transporter type 3*
HIF-1 : *Hypoxia inductible factor 1*
HIF-1 α : *Hypoxia inductible factor 1 alpha*
HIF-1 β : *Hypoxia inductible factor 1 bêta*
HIF-2 α : *Hypoxia inductible factor 2 alpha*
HIF-3 α : *Hypoxia inductible factor 3 alpha*
HRE : *Hypoxia response element*
LDH : *Lactate dehydrogenase*
LON : *Lon peptidase 1*
LRPPRC : *Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing*
MEF : *Mouse embryonic fibroblast*
NADH : *Nicotinamide adenine dinucleotide*
ND4 : *NADH dehydrogenase subunit 4*
ND6 : *NADH dehydrogenase subunit 6*
NDUFA4 : *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4*
NDUFA4L2 : *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2*
PBS : *Phosphate buffer saline*
PDH : *Pyruvate dehydrogenase*
PDK1 : *Pyruvate dehydrogenase kinase 1*
PHD : *Prolyl-hydroxylase*
PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*
PCR : *Polymerase chain reaction*
ROS : *Reactive oxygen species*
RPL13A : *Ribosomal protein L13A*
SLIRP : *SRA stem-loop interacting RNA binding protein*

SLSJ : Saguenay–Lac-Saint-Jean

SURF1 : *Surfeit-1*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VHL : *Von Hippel-Lindau tumor suppressor E3 ubiquitin protein ligase*

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Catherine Laprise, ma directrice de maîtrise sans qui ce travail aurait été impossible. Tu as su prendre le temps qu'il fallait pour m'écouter et m'orienter à travers toutes les étapes de ce projet. Tu as été pour moi un modèle de persévérance et d'ambition ce qui m'a encouragée à poursuivre mes objectifs tant au niveau de cette maîtrise que dans mes choix de carrières. Je te remercie de ta confiance en moi, c'est ce qui m'a permis d'avancer. Ce fut un grand plaisir de faire partie de ton équipe pour mon stage de recherche au premier cycle et pour ce projet de maîtrise.

Merci également aux professionnelles de recherche de l'équipe de la professeure Laprise. Anne-Marie Madore, tu as toujours été là quand j'avais des interrogations que ce soit sur des techniques ou sur des résultats. Même s'il n'existait pas toujours de réponse, ton écoute et ta bonne humeur m'ont permis de passer à travers des instants moins roses et de me redonner des forces pour recommencer. Vanessa T. Vaillancourt, quelle chance j'ai eu de travailler avec une coordonnatrice comme toi. Tes précieux conseils m'ont permis d'avancer pas à pas dans ce projet. En plus d'être d'une grande aide au travail, j'ai aussi fait la découverte d'une très bonne amie. Je te remercie d'avoir été là quand j'avais besoin de parler.

Je tiens à remercier sincèrement Stéphanie Girard, mon bras droit dans ce projet. Ta présence à mes côtés m'a aidé à gérer mon stress en plus de rendre les temps d'attentes beaucoup plus agréables. Je remercie également mes précieuses amies Valérie et Camélia de m'avoir si bien soutenue et de m'avoir permis de me sentir écoutée et comprise. Vos encouragements m'ont donné de l'énergie lorsque j'en avais le plus besoin. Je remercie également toute l'équipe du laboratoire Gepromic pour avoir fait de cette expérience un moment inoubliable.

J'aimerais remercier ma famille d'avoir cru en moi et de m'avoir incitée à poursuivre mes études. Vous m'avez écoutée même si parfois vous ne compreniez pas ce que je vous racontais. L'important, c'est que vous avez été présent pour moi ce qui a été une source de réconfort.

Enfin, je dédie ce mémoire à mon conjoint Marc-André qui a toujours été là dans les moments difficiles. Tu as su à plusieurs reprises me remettre sur le droit chemin et me pousser à dépasser mes limites. Merci de m'avoir accompagnée dans cette étape importante.

INTRODUCTION

Le syndrome de Leigh type Canadien-Français est une maladie génétique ayant une prévalence élevée (1/2063) au Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ). Celle-ci est caractérisée entre autres par de l'hypotonie, un retard psychomoteur sévère ainsi qu'un taux élevé d'acidose lactique dans le sang principalement lors d'épisodes de crises. C'est dans les années 1980 que le pédiatre Jean Larochelle a remarqué une incidence élevée de patients présentant ces manifestations qui sont semblables au syndrome de Leigh classique. En 1993, suite à ces observations, le Dr Charles Morin et ses collaborateurs ont démontré que cette maladie possède des caractéristiques distinctes du syndrome de Leigh classique. Un défaut dans l'enzyme cytochrome c oxydase (COX) est alors reconnu. En 2003, le gène *leucine-rich pentatricopeptide repeat containing (LRPPRC)*, responsable de la maladie, est identifié ainsi que les deux mutations entraînant une diminution de l'enzyme COX. En 2005, par l'initiative du Dr Charles Morin, pédiatre ayant participé à la découverte de la maladie, et de Pierre Lavoie, père de famille ayant perdu deux enfants du syndrome de Leigh type Canadien-Français, un consortium de recherche est créé regroupant des chercheurs de la région de Montréal et du SLSJ. Celui-ci est d'abord soutenu par la Fondation de l'association de l'acidose lactique, puis en 2008, le groupe obtient une subvention d'équipe émergente des Instituts de recherche en santé du Canada.

Ce mémoire s'inscrit donc dans les activités de ce groupe de recherche. En 2011, une étude d'expression génomique a permis d'identifier le gène *NDUFA4L2* comme étant 2 fois plus exprimé dans les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français comparativement à ceux de témoins non atteints de la maladie. Ce gène aurait un rôle dans l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire en situation d'hypoxie. Ce mémoire a donc comme but l'étude de l'implication de la voie de l'hypoxie dans le contexte du syndrome de Leigh type Canadien-Français. Il a été émis comme hypothèse que comme *NDUFA4L2* a été retrouvé plus exprimé chez les patients atteints comparativement aux témoins, la voie de l'hypoxie pourraient être un mécanisme de compensation dans la maladie. Afin de valider cette hypothèse, les différents gènes et protéines de cette voie seront quantifiés dans des fibroblastes de personnes atteintes du syndrome de Leigh type Canadien-Français ainsi que dans ceux de témoins. Cette étude

devrait permettre d'élucider l'implication d'un mécanisme encore aujourd'hui non étudié dans le contexte de la maladie ce qui ultimement pourrait améliorer la compréhension de la pathogénèse de celle-ci.

La première partie de ce mémoire sera consacrée à la caractérisation du syndrome de Leigh type Canadien-Français dans son ensemble, soit les causes génétiques, ses manifestations cliniques mais ainsi que les caractéristiques permettant de le différencier du syndrome de Leigh classique. Les mécanismes connus associés à la maladie seront expliqués ainsi que l'état des recherches actuelles.

Dans la deuxième partie, la mise en contexte de cette étude sera décrite ce qui permettra de mieux comprendre l'implication de la voie de l'hypoxie pour les patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français. La troisième partie décrira la méthodologie des différentes techniques utilisées pour la culture cellulaire, la mise en condition hypoxique ainsi que les méthodes de quantification des protéines et des gènes. Enfin, dans la dernière partie, les résultats de cette étude et leurs retombées pour les patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français seront présentés.

CHAPITRE 1

PROBLÉMATIQUE EN LIEN AVEC LA MALADIE

1.1. La population du Saguenay–Lac-Saint-Jean

La région du SLSJ se caractérise par une prévalence élevée de certaines maladies héréditaires dont la prévalence ailleurs dans le monde est relativement faible (1). La littérature scientifique actuelle tend à appuyer que le profil génétique du SLSJ est dû à un effet fondateur qui se serait répété à trois reprises lors de la colonisation du Québec (voir figure 1)(1). L'effet fondateur est défini comme étant un phénomène démographique se produisant lorsqu'un certain nombre d'individus migrent hors d'une population mère initiale et se déplacent vers un endroit géographique distinct. Cela a pour conséquence la création d'une nouvelle population qui est moins variable sur le plan génétique que la population d'origine (2). Au Québec, le premier effet fondateur s'est déroulé lors de l'arrivée des colons Français au début du 17^{ième} siècle. Les premières familles se sont installées dans la ville de Québec puis, certaines d'entre elles ont migré vers le nord et fondèrent la région de Charlevoix. Cette seconde migration est à l'origine du second effet fondateur. Le troisième effet fondateur, quant à lui, s'est produit au 19^{ième} siècle lors d'un déplacement de certains résidents de Charlevoix vers la région du SLSJ. Ce phénomène est en grande partie responsable de la plus grande homogénéité du bagage génétique de la population du SLSJ comparativement à des populations cosmopolites. Un autre phénomène ayant contribué à augmenter l'incidence de certaines maladies, reconnu comme un effet multiplicateur, est sans doute le nombre élevé d'enfants qu'avaient les femmes à cette époque (3). Un fait intéressant à noter est que la principale raison des déplacements des familles vers des nouvelles terres non habitées était le manque d'espace et de terres cultivables (2).

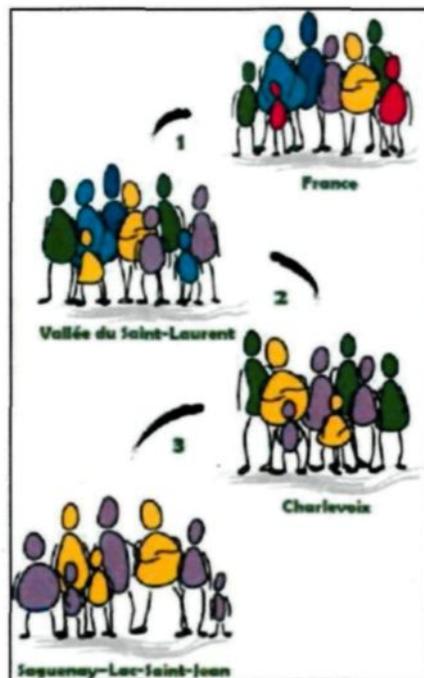


Figure 1 : Effet fondateur au Québec (modifiée de Laprise *et al.* 2005 (4)). Cette figure illustre les migrations étant responsables de la diminution de la diversité génétique du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ). Celles-ci correspondent aux trois effets fondateurs s’étant déroulés dans la région; d’abord entre la France et la vallée du Saint-Laurent (1), ensuite vers la région de Charlevoix (2) et, finalement, vers la région du SLSJ (3). Ceci explique l’homogénéité de la région sur le plan génétique.

1.2. Le syndrome de Leigh

Le syndrome de Leigh est une maladie mitochondriale causée par un déficit à plusieurs niveaux de la chaîne de transport des électrons (5). Au niveau mondial, une personne sur 40 000 est affectée par cette maladie (6). Le docteur Denis Leigh a décrit

cette maladie en 1951 (<http://omim.org/entry/220111>). Elle se caractérise par des lésions symétriques dans le cerveau, soit au niveau des noyaux gris, du thalamus et du tronc cérébral ce qui entraîne une neurodégénération progressive du système nerveux central (5, 7). Le système nerveux périphérique est également touché par des neuropathies et des myotonies. De plus, les patients peuvent présenter des cardiomyopathies, des problèmes rénaux ainsi qu'une myopathie sévère (8). Les cliniciens identifient généralement un retard psychomoteur, de la faiblesse musculaire et de l'hypotonie, une ataxie au niveau du tronc et des tremblements (7). De plus, il y a souvent une acidification des liquides corporels tels que l'urine, le sang ou le fluide céphalo-rachidien due à l'augmentation des niveaux de lactate et de pyruvate (7). Bien que tous les patients atteints du syndrome de Leigh aient des manifestations semblables, la cause de cette maladie est très variable au point de vue génétique.

1.2.1. Causes génétiques du syndrome de Leigh

La majorité des cas de syndrome de Leigh observés est causée par des défauts à différents niveaux du processus de production d'énergie dans la mitochondrie (9). En général, un défaut de la chaîne de transport des électrons est en cause. En effet, les complexes I, II, IV et V sont majoritairement responsables du syndrome de Leigh bien que la maladie a déjà été observée alors que le coenzyme Q ou le complexe pyruvate déshydrogénase avaient une activité réduite (9, 10). La cause la plus fréquente est un déficit dans l'enzyme formant le complexe IV de la chaîne de transport des électrons (11). Celle-ci se nomme la cytochrome c oxydase (COX) et sera décrite à la section 1.4. Des mutations dans le gène *surfeit 1* (*SURF1*), un gène encodé au niveau nucléaire, causent la maladie chez une grande partie des patients atteints du syndrome de Leigh (12). *SURF1* est responsable de l'assemblage du complexe IV (12). Parfois, des mutations dans les gènes *COX10* et *COX15*, des sous-unités du complexe IV, entraînent des défauts de l'assemblage de COX ce qui peut également causer la maladie (10). Bien que ces quelques gènes soient responsables de la plupart des cas observés, il ne s'agit pas d'une liste exhaustive puisqu'il y aurait près d'une trentaine de gènes pouvant causer le syndrome de Leigh (13). En plus

des manifestations au niveau du système nerveux nommées précédemment, les patients présentent une grande faiblesse et un niveau modéré d'acidose lactique (8).

1.3. Syndrome de Leigh type Canadien-Français

En 1980, des cas de syndrome de Leigh furent observés au SLSJ par le docteur Jean Larochelle (14). Les enfants atteints présentaient une hypotonie, un retard psychomoteur ainsi qu'une fréquence variable pour les crises d'acidoses métaboliques (15). En 1993, une forme de syndrome de Leigh propre à la région du SLSJ fut décrite par le docteur Charles Morin et ses collaborateurs (15). Cette maladie est appelée aujourd'hui syndrome de Leigh type Canadien-Français et plus communément acidose lactique congénitale due au principal symptôme qu'est la crise acidotique (14). Le taux de porteurs de cette maladie récessive au SLSJ est de 1 personne sur 23 alors qu'un enfant sur 2063 naît avec ce syndrome dans la région annuellement (15).

1.3.1. Manifestations cliniques

Les enfants atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français présentent une perte de tonus musculaire, un retard psychomoteur, une dysmorphie faciale, notamment due à une expression faciale réduite, ainsi que la présence d'acide lactique dans le sang (14). Malgré qu'un seul gène ait été identifié, il existe une grande variabilité phénotypique entre les patients ce qui permet de les classer selon trois degrés de sévérité différents soit léger, moyen et sévère (voir tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques génotypiques et phénotypiques des patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français

Code*	Âge (an)	Sexe	Nombre de crises	Génotype	Phénotype	Remarques§
101-0002-1	32	M	10 et plus	A/V + C1277STOP	Sévère	Retard intellectuel important, hypotonie, pas autonome
102-0002-1	32	M	0	V/V	Sévère	Retard intellectuel important, hypotonie, pas autonome
103-0001-1	30	F	1	V/V	Moyen	Retard intellectuel important, hypotonie, pas autonome
104-0002-1	13	M	1	V/V	Moyen	Retard intellectuel léger, actif, autonome
105-0001-1	24	F	0	V/V	Léger	Retard intellectuel léger, active, autonome
106-0001-1	15	F	0	V/V	Léger	Retard intellectuel léger, active, autonome
108-0001-1	11	F	1	V/V	Moyen	Retard intellectuel modéré, active, autonome
110-0001-1	24	F	3	V/V	Moyen	Retard intellectuel modéré, hypotonie, semi-autonome
114-0002-1	8	M	0	V/V	Léger	Retard intellectuel léger, actif
115-0002-1	2 mois†	M	1	V/V	Sévère	-

*Le code du patient est le même que celui donné à la lignée cellulaire et est attribué selon la méthode de Gaudet *et al.* (16). Brièvement, le premier nombre fait référence au numéro de la famille. Un nombre commençant par 1 correspond à la famille d'un individu malade alors qu'un 3 correspond à un individu témoin. Le second nombre correspond au numéro du sujet. Un chiffre pair correspond à un individu mâle et un chiffre impair à un individu

de sexe féminin. Le dernier chiffre fait référence au projet dans le cadre duquel le participant a été recruté. Ici, le chiffre 1 correspond à la Biobanque de l'acidose lactique.

‡ Ce patient est le seul parmi les participants de l'étude à être décédé à ce jour.

§ Les remarques à propos de chaque patient ont été définies selon les données cliniques disponibles à la Biobanque de l'acidose lactique ainsi qu'en collaboration avec le Dr Charles Morin, principal médecin traitant des patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français au SLSJ. L'autonomie est définie selon la capacité du patient à faire des tâches par lui-même (ex. travailler). L'approbation quant à l'accès au dossier clinique a été obtenue par les comités d'éthique du CSSS de Chicoutimi et de l'Université du Québec à Chicoutimi.

Comme il est possible de le remarquer dans le tableau 1, pour la majorité des patients, le génotype est V/V, soit une valine à l'état homozygote en position 354. Seul le patient 101-0002-1 est un hétérozygote composé pour la même mutation ainsi que pour une délétion de 8 nucléotides tel qu'il sera discuté dans la section 1.8. Malgré que les patients possèdent la même mutation, ils n'ont pas tous le même niveau d'atteinte clinique de la maladie ou la même sévérité. Certains patients n'ont jamais fait de crises (les patients codifiés 102, 105, 106 et 114) alors que d'autres en ont fait plusieurs (les patients 101 et

110). De plus, certains patients arrivent à faire une activité physique modérée alors que d'autres ont de la difficulté à marcher et doivent se déplacer en fauteuil roulant.

Bien qu'un défaut au niveau de la COX soit aussi observé dans le syndrome de Leigh type Canadien-Français, les mécanismes biochimiques responsables de cette maladie sont différents de la forme classique déjà documentée permettant sa classification comme un type précis (15).

1.3.2. Différences entre le syndrome de Leigh classique et le type Canadien-Français

Comme il a été mentionné ci-haut, le syndrome de Leigh « classique » peut être causé par un défaut dans l'assemblage de l'enzyme COX (11). Ce défaut est observé dans tous les organes avec une activité de l'enzyme de 25% (8). Comparativement à la version classique du syndrome de Leigh, le type Canadien-Français résulte de la mutation d'un gène spécifique, le « leucin-rich pentatricopeptide repeat containing protein » (*LRPPRC*) (voir section 1.8). De plus, il semble que le déficit au niveau de l'enzyme COX n'affecte pas tous les organes avec la même intensité comme il sera vu à la section suivante. Bien que ces deux formes de la maladie présentent des différences au niveau de leurs mécanismes biochimiques, les manifestations observées sont causées par un défaut de l'une des activités essentielles de la cellule, la production d'énergie.

1.4. La cytochrome c oxydase

Treize sous-unités (COXI, II, III, IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc et VIII) composent l'enzyme COX (17) (voir figure 2). Les sous-unités COX I, COX II et COX III sont encodées dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) les autres étant codées par l'ADN nucléaire (18). Le syndrome de Leigh type Canadien-Français est causé par un défaut de l'assemblage des sous-unités de COX. Le cerveau et le foie sont les organes principalement atteints puisqu'une baisse d'activité de l'enzyme COX de 90% y est observée (19). Le muscle squelettique et la peau ainsi sont moins touchés (activité de COX de 50%) (19). Récemment, le groupe de recherche du Dr Éric Shoubridge de l'Université McGill a observé que, malgré que la mutation de *LRPPRC* soit présente dans les cellules du cœur, l'atteinte de COX y est beaucoup moins marquée. Bien que cette observation reste à

confirmer, il pourrait y avoir un mécanisme de compensation qui fait en sorte que le cœur puisse maintenir les niveaux de COX et donc une production d'énergie efficace. Comme il sera discuté à la section suivante, la production d'énergie est une activité cellulaire importante et donc la diminution de l'activité d'un des complexes de la chaîne de transport n'est pas sans conséquence.

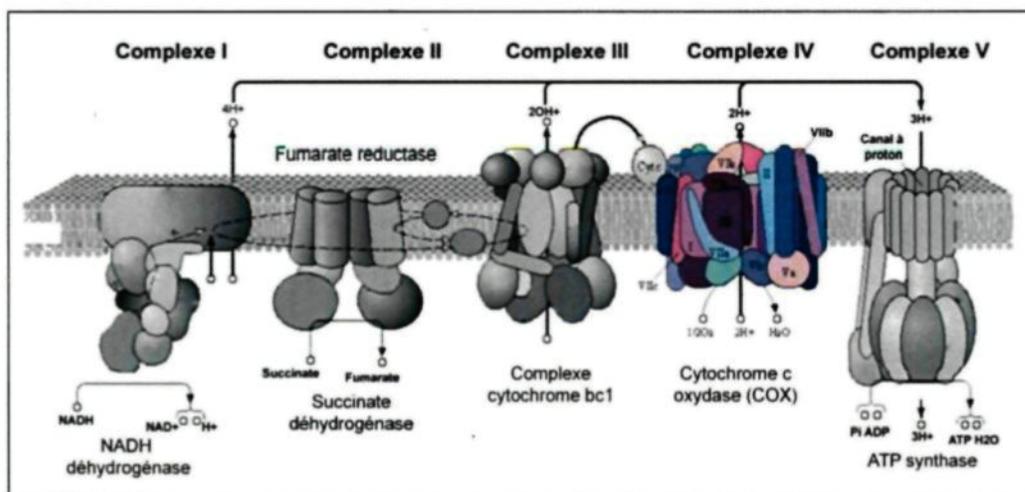


Figure 2 : Chaîne de transport des électrons (modifiée de l'originale (20)). L'enzyme COX forme le complexe IV de la chaîne et est composé de 13 sous-unités. L'activité de COX est diminuée chez les individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français.

1.5. Principe de production d'énergie

L'adénosine-5'-triphosphate (ATP) est la molécule fournissant l'énergie aux cellules pour réaliser toutes les activités essentielles (21). Il existe deux principales voies par lesquelles la production d'ATP est possible : la voie aérobie et la voie anaérobie. Celles-ci seront décrites dans les deux prochaines sections.

1.5.1. La voie aérobie

La voie aérobie se produit en présence d'oxygène lors de la respiration cellulaire (22). Ce processus est caractérisé par la transformation des nutriments provenant de l'alimentation, principalement les glucides et les acides gras libres, en une molécule énergétique qu'est l'ATP, produit final formé à la suite de quatre principales étapes (figure 3) (21). L'organite responsable de la respiration cellulaire est la mitochondrie. Premièrement, la glycolyse est réalisée dans le cytosol de la cellule et permet de transformer une molécule de glucose à 6 carbones en deux molécules de pyruvate à 3 carbones (21). Cette étape ne nécessite pas d'oxygène et est commune aux voies aérobie et anaérobie (21). Deuxièmement, le pyruvate est converti en acétyl CoA par l'enzyme *pyruvate déshydrogénase* au niveau des membranes mitochondriales (23). Troisièmement, l'acétyl CoA est oxydé au cours du cycle de Krebs se déroulant dans la matrice mitochondriale, ce qui produit deux substrats donneurs d'électrons pour la prochaine étape, le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et le flavine adénine dinucléotide (FADH₂) (21, 23). Finalement, la phosphorylation oxydative se déroule au niveau de la membrane des mitochondries où se situe la chaîne de transport des électrons. Un gradient de protons est généré de chaque côté de la membrane mitochondriale ce qui agit en tant que force motrice pour la conversion d'ADP (adénosine diphosphate) en ATP par l'enzyme ATP synthase (24). La transformation d'une molécule de glucose résulte en la formation de 36 molécules d'ATP par la voie aérobie, voie ayant le plus haut rendement énergétique (24). L'oxydation d'un acide gras libre à 6 carbones génère une quantité semblable d'ATP (24). L'oxygène agit comme accepteur final d'électrons dans la voie aérobie et permet le fonctionnement optimal de la chaîne de transport (21). C'est le complexe IV de la chaîne de transport des électrons formé par l'enzyme COX (Figure 2) qui est responsable de la réduction de l'oxygène moléculaire en H₂O. Cette réaction est essentielle pour éliminer les ions hydrogènes en surplus (21). Il arrive parfois que la concentration en oxygène soit faible; la cellule doit ainsi produire de l'énergie par une voie alternative qu'est la voie anaérobie.

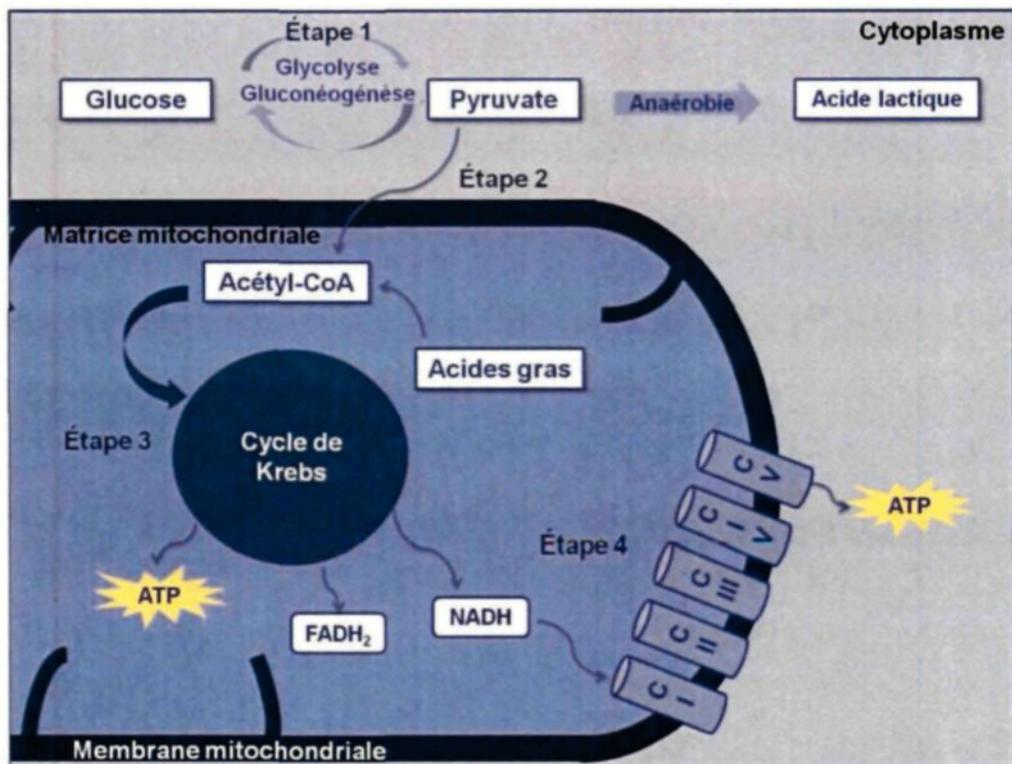


Figure 3: Étapes schématisées de la respiration cellulaire (basé sur le principe de respiration cellulaire décrit précédemment (25)). Étape 1 : Glycolyse (transformation du glucose en pyruvate). Étape 2 : Transformation du pyruvate en acétyl CoA. Étape 3 : Cycle de Krebs (oxydation de l'acétyl CoA et production de NADH et FADH₂). Étape 4 : Phosphorylation oxydative (formation de l'ATP dans la chaîne de transport des électrons).

1.5.2. La voie anaérobie

Comme il a été mentionné dans la section précédente, la glycolyse est une étape commune aux deux voies de production d'énergie et a comme produit final le pyruvate. Dans la voie anaérobie, l'enzyme lactate déshydrogénase réalise la conversion du pyruvate en lactate en utilisant les électrons du NADH et ce dans le cytoplasme de la cellule (24). Seulement deux molécules d'ATP seront produites à la suite de cette réaction (26). Cette voie est principalement utile lorsque la concentration en oxygène est momentanément réduite, par exemple dans les muscles lors d'un exercice intense. Le

lactate produit dans les muscles est transporté par le sang jusqu'au foie où il est transformé en pyruvate et par la suite converti en glucose par la gluconéogénèse (27). Le glucose est ensuite retourné dans le sang et peut être utilisé de nouveau (27). Cette chaîne de réaction porte le nom de cycle de Cori.

Dans le cas du syndrome de Leigh type Canadien-Français, étant donné que l'activité de l'enzyme effectuant la dernière étape de la phosphorylation oxydative (COX) est diminuée en concentration, cela entraîne donc une surcharge de nutriments au niveau de la chaîne de transport des électrons. De ce fait, la cellule produit davantage d'ATP par la voie anaérobique. Comme il y a une accumulation d'acide lactique dans le sang, les risques de crise d'acidose métabolique sont augmentés.

1.6. Crise d'acidose métabolique

Comme il a été mentionné précédemment, les patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français ont une capacité de production d'ATP insuffisante due à la réduction de la quantité de COX présent. Certaines situations nécessitant de grandes quantités d'énergie peuvent mener à la crise acidotique notamment en période de stress, pour la digestion d'un repas copieux ou lorsque l'organisme doit combattre une infection (14). Comme l'activité de l'enzyme COX est diminuée, la dernière étape de la chaîne est inefficace, favorisant ainsi l'accumulation de pyruvate (en amont de la chaîne) qui est converti en acide lactique par la voie anaérobique (28). En situation normale, les niveaux de lactate sanguin se situent entre 0,8-2,2 mM (29). Les enfants atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français en crise ont un taux de lactate sanguin entre 12 et 26 mM (15). L'accumulation d'acide lactique dans le sang entraîne une diminution des ions bicarbonate responsables du tamponnage du pH (14) (19). Le pH sanguin normal de 7,4 passe donc à 6,8 (30). Afin d'éliminer l'excès d'acide produit et de rétablir le pH, les enfants souffrant de crise d'acidose métabolique se retrouvent à hyperventiler ce qui peut mener à la formation d'un œdème pulmonaire (14). Parfois, la situation d'acidose métabolique peut entraîner la survenue du coma chez les enfants atteints ce qui cause généralement le décès. Les crises surviennent habituellement avant l'âge de cinq ans exacerbant ainsi les risques

de mortalité (15). La prévention des crises d'acidose métabolique s'avère donc d'une importance capitale.

1.7. Traitements actuels

À ce jour, les mécanismes déclencheurs de la crise d'acidose métabolique sont encore mal compris. De plus, il n'existe actuellement aucun médicament permettant de prévenir la survenue de cette crise. Cependant, une étude menée par le consortium de recherche sur le syndrome de Leigh type Canadien-Français a démontré l'implication du bleu de méthylène dans la survie des fibroblastes de patients atteints du syndrome (31). Cet agent redox permettrait le transfert d'électrons dans la mitochondrie tout en augmentant le contenu en COX (31), ce qui n'a toutefois pas été validé dans les fibroblastes des patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français. Ce produit n'a pas encore été expérimenté dans le contexte de maladies métaboliques et plusieurs étapes avant la mise en marché d'un médicament destiné aux gens atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français sont nécessaires (31). Toutefois, il donne un peu d'espoir aux familles.

Pour le moment, la seule prise en charge qui existe pour les patients et leurs parents est un suivi régulier avec le médecin traitant. De plus, il est fortement conseillé aux parents de répartir les repas en plusieurs petites collations dans la journée ainsi que d'éviter les repas riches en gras afin de faciliter la digestion et minimiser les grands besoins énergétiques, réduisant ainsi les risques de déclencher une crise (Dr Charles Morin, communication personnelle). Une trousse d'information sur le syndrome de Leigh type Canadien-Français a été développée par Gail Ouellette, conseillère en génétique, en collaboration avec le Dr Charles Morin ainsi qu'avec l'étroite collaboration des parents d'enfants atteints utilisant les observations de ces derniers quant aux facteurs pouvant déclencher une crise mais aussi à ceux pouvant atténuer les risques. Celle-ci a pour but d'informer les parents qui ont un enfant nouvellement diagnostiqué et pour les aider à se familiariser avec les symptômes de la maladie. Elle contient également des conseils pratiques et des ressources utiles aux parents mais également au personnel soignant ayant à traiter un patient se présentant en crise (32).

1.8. Le syndrome de Leigh type Canadien-Français : une maladie génétique

1.8.1. Identification du gène défectueux

En 2001, des recherches ont été menées afin de localiser le gène responsable du syndrome de Leigh type Canadien-Français. L'étude du déséquilibre de liaison à l'ensemble du génome entre les parents hétérozygotes et leur enfant atteint de la maladie a permis de localiser un marqueur à la position 2p16.21 (6). Deux ans plus tard, le gène « *Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing* » (*LRPPRC*) a été identifié comme étant responsable de la maladie (18) (Figure 4). Ce gène possède 38 exons et code pour un transcrit d'environ 6000 paires de bases. La protéine résultante a un poids moléculaire de 130 kilo-dalton (kDa) (18).

Le séquençage de ce gène a permis d'identifier deux mutations (Figure 4). La première a été retrouvée chez la majorité des patients atteints. Il s'agit d'une substitution d'une alanine par une valine en position 354 dans l'exon 5 du gène (A354V). La seconde est une délétion de huit paires de bases à partir du nucléotide C en position 1277 sur l'exon 35 du gène (C1277STOP). Cette mutation a été identifiée chez un seul patient connu à ce jour qui est hétérozygote, c'est-à-dire qu'il possède les deux mutations (hétérozygote composé) (18). Précisément, cela signifie qu'il possède la mutation A354V sur l'un de ces allèles et la mutation C1277STOP sur son second allèle. Ce patient présente le même phénotype que les autres patients, mais il a survécu à plusieurs crises d'acidose pour des raisons encore inconnues (Charles Morin, communication personnelle) (voir tableau 1). Ces mutations dans le gène *LRPPRC* cause un défaut de l'assemblage de l'enzyme COX et donc une activité réduite de ce complexe est observée dans certains tissus, tel qu'il a été mentionné à la section 1.4.

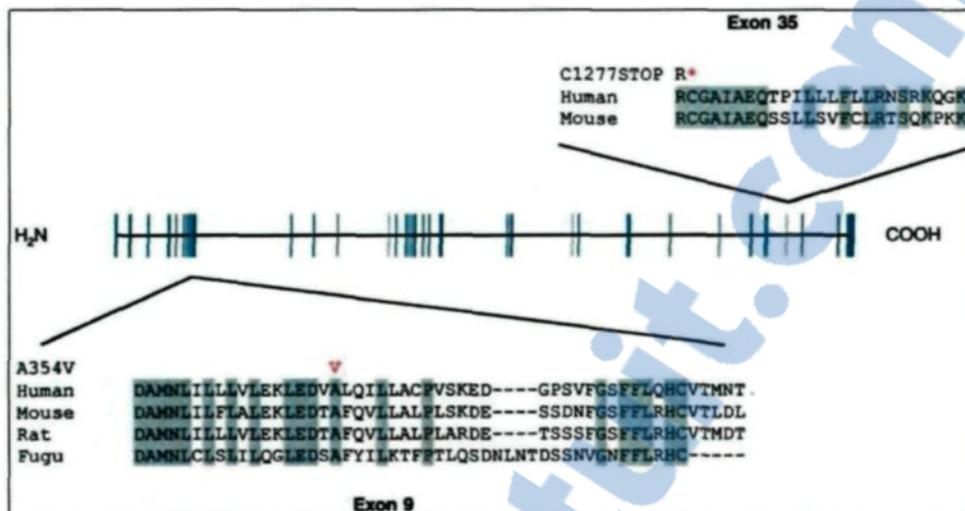


Figure 4: Structure du gène *leucine-rich pentatricopeptide repeat containing (LRPPRC)* (18). Le gène *LRPPRC* possède 38 exons, représentés par les lignes bleues. Les mutations causant le syndrome de Leigh type Canadien-Français sont identifiées (A354V et C1277STOP).

1.8.2. Rôle du gène *Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing (LRPPRC)*

Le gène *LRPPRC*, qui a un rôle important à jouer au niveau mitochondrial, est encodé au niveau nucléaire. Chez les personnes atteintes du syndrome de Leigh type Canadien-Français, il y a une nette diminution de la protéine LRPPRC dans les mitochondries ce qui est associé à une quantité moindre des ARN messagers de COX I, COXII et COXIII, des sous-unités du complexe IV ainsi qu'avec tous les ARN messagers encodés au niveau de l'ADN mitochondrial (33, 34). Cette protéine est nécessaire au bon fonctionnement de la transcription des ADNmt (22). Il serait responsable de la stabilité des ARN messagers (ARNm) mitochondriaux. De plus, il serait impliqué dans le processus de modification post-transcriptionnelle en permettant la polyadénylation de l'ARNm (33-37). Plus précisément, il formerait un complexe ribonucléoprotéique avec la protéine « *SRA stem-loop interacting RNA binding protein* » (SLIRP) (35). Son activité est donc

essentielle pour la maturation du complexe IV de la chaîne de transport des électrons (38). L'instabilité des ARNm mitochondriaux n'est pas observée dans un contexte autre que celui du syndrome de Leigh type Canadien-Français, ce qui pourrait être spécifique à la mutation A354V (39). De plus, malgré que l'activité du complexe IV soit affectée par ces mutations, la production d'ATP cellulaire ne serait pas diminuée grâce à l'hyperfusion des mitochondries, soit la formation d'une grande mitochondrie (40).

La protéine LRPPRC est également impliquée dans la production de certains ARN de transfert, sans toutefois être impliqué dans la synthèse d'ARN ribosomal (34, 35, 39). Cette protéine semble aussi exercer des fonctions au niveau nucléaire. En effet, notons que LRPPRC forme un complexe avec PGC-1 α afin de réguler l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogénèse et la respiration cellulaire (7).

Plus récemment, certaines études ont démontré son implication dans la mort cellulaire. En fait, LRPPRC serait impliqué au niveau de la résistance aux médicaments observée dans certains cancers par son action sur la transcription de certains gènes induits dans l'apoptose. Cette réponse serait donc empêchée permettant ainsi aux cellules de survivre (41). Également, une élévation du niveau de l'expression a été démontrée dans plusieurs lignées tumorales renforçant son rôle anti-apoptotique (42). Il fait aussi partie de la voie de l'ARN polymérase I dans le contrôle de l'apoptose dans la sclérose en plaque (43). Ce dernier aurait également un rôle dans l'initiation de l'autophagie. En effet, un niveau d'expression faible du gène *LRPPRC* serait associé à l'activation de l'autophagie dans les cellules en plus de contrôler la présence de mitochondries défectueuses (44).

Son implication dans les fonctions mitochondriales lui confère également de l'importance dans d'autres maladies causées par des dysfonctions de cet organite, tel la maladie de Parkinson (45).

Malgré toutes les études qui ont été faites jusqu'à présent, le rôle de *LRPPRC* et son lien avec la symptomatologie du syndrome de Leigh type Canadien-Français reste toujours à documenter (34).

CHAPITRE 2

MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE

2.1. Étude comparative du patron d'expression de fibroblastes d'individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français et de témoins

En 2011, une étude visant la détermination du profil d'expression d'individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français a été menée au laboratoire de génétique de l'Université du Québec à Chicoutimi. À partir de l'ARN extrait de fibroblastes d'individus atteints (n=12) et de témoins (n=12) de même âge et de même sexe (voir annexe 1), celui-ci a été hybridé sur des puces à ADN HGU133plus2.0 d'Affymetrix contenant 54,675 sondes couvrant l'ensemble des transcrits du génome. Cela a permis d'identifier 69 gènes différemment exprimés entre les individus atteints de la maladie et les témoins répartis en 8 catégories biologiques fonctionnelles telles que : Cycle cellulaire et apoptose (n=10), Production d'énergie et chaîne de transport (n=6), Métabolisme du glucose et des lipides (n=6), Composants structuraux (n=3), Réponse immunitaire (n=11), Transcription (n=10), Transduction (n=11) et autres (n=12). Dans la catégorie de la production d'énergie et de la chaîne de transport des électrons, les gènes *COXI* et *COXIII* sont ressortis comme étant moins exprimés chez les patients par rapport aux témoins ce qui est cohérent avec des résultats déjà obtenus (33). De plus, les gènes *ND4* et *ND6*, qui codent tous les deux pour des sous-unités du complexe I, sont également ressortis ce qui confirme également les données antérieures (35) (voir annexe 2).

2.2. *NDUFA4L2* : Un gène différemment exprimé dans les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français

Le gène NADH déhydrogénase (ubiquinone) 1 alpha subcomplexe, 4-like 2 (*NDUFA4L2*) est le seul parmi les différents gènes identifiés grâce à la puce, qui a été validé par PCR en temps réel. Ce gène est situé sur le bras long du chromosome 12 en

position 13.3 (46). Peu d'information portant sur son rôle a été documentée jusqu'à présent. La séquence de nucléotides de ce gène est hautement similaire à celle de *NDUFA4*, gène codant pour une sous-unité du complexe I ayant une activité NADH déhydrogénase et oxydoréductase (46). Certaines expérimentations ont identifié *NDUFA4L2* dans le contexte de maladies comme biomarqueur, c'est-à-dire que la présence de celui-ci pourrait aider à poser le diagnostic d'une maladie donnée. C'est le cas pour l'arthrite rhumatoïde, dans laquelle il a été identifié comme étant un marqueur potentiel pour la détermination de l'intégrité et la régénération du cartilage (47). Il a aussi identifié comme étant un biomarqueur dans le cas du paragangliome thyroïdien, une maladie rare étant difficile à différencier du cancer médullaire de la thyroïde (48). Il a également été démontré récemment que la protéine *NDUFA4L2* est impliquée dans l'inhibition du complexe I de la chaîne de transport des électrons en situation d'hypoxie ce qui a pour effet de réduire la consommation en oxygène par la mitochondrie, réduisant ainsi la production des substances réactives à l'oxygène (ROS), ayant un effet néfaste sur la cellule (49). C'est ce rôle d'inhibiteur du complexe I qui est le plus pertinent dans le contexte du syndrome de Leigh type Canadien-Français puisqu'il agit au niveau de la mitochondrie et donc de la respiration cellulaire. C'est d'ailleurs sur la base de ces résultats que s'est construit le présent projet de recherche.

2.3. La voie de l'hypoxie cellulaire

2.3.1. Principe général

En médecine, l'hypoxie fait référence à une diminution de l'apport en oxygène aux tissus (50). L'état de faible teneur en oxygène dans le milieu cellulaire est appelé hypoxie cellulaire. Comme il a été mentionné précédemment, la respiration cellulaire par la voie aérobie se fait en présence d'oxygène. En situation physiologique, la cellule consomme l'oxygène cellulaire abondamment, pouvant ainsi produire de l'ATP d'une manière continue. Cependant, il existe un seuil de tension en oxygène en dessous duquel la cellule doit limiter son utilisation d'oxygène. Lorsque la valeur de la tension en oxygène extracellulaire atteint 3 à 6 torr, la mitochondrie réduit la phosphorylation oxydative, diminuant ainsi la respiration cellulaire (51). La voie de l'hypoxie cellulaire, en partie gérée

par le facteur induit par l'hypoxie (*HIF-1*) (52), permet à la cellule d'adapter son métabolisme (49).

2.3.2. Mécanisme de l'hypoxie

HIF-1 est un facteur de transcription qui, lorsque activé, permet la transcription de nombreux gènes dans la voie de l'hypoxie. Cette protéine est présente en faible proportion dans tous les organes (53). L'activation d'HIF-1 requiert l'assemblage des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β la composant. En situation de concentration physiologique en oxygène, la stabilité de la sous-unité α est régie par une famille de prolyl hydroxylases (PHD) (54). Leur rôle consiste à ajouter des groupements hydroxyles (-OH), avec l'oxygène comme substrat, sur les acides aminés proline de la sous-unité α . Les résidus hydroxylés permettront la reconnaissance de la sous-unité HIF-1 α par la protéine von Hippel-Lindau (VHL), ce qui engendrera l'ubiquitination des résidus, les menant ainsi à la dégradation protéasomale (55). La sous-unité α étant ainsi dégradée, elle ne peut s'assembler avec la sous-unité HIF-1 β ce qui, en temps normal, est réalisé par la partie amino-terminale allant des acides aminés 1 à 390 (56).

La faible teneur en oxygène permet donc d'empêcher la dégradation de la sous-unité HIF-1 α ce qui permet l'hétérodimérisation avec la sous-unité HIF-1 β , activant ainsi le facteur HIF-1 (57). Le complexe HIF-1, une fois assemblé, se fixe au niveau du promoteur de plusieurs gènes étant sous son contrôle. Ceux-ci possèdent une séquence spécifique nommée élément de réponse à l'hypoxie (HRE) (58). La formation d'un complexe avec la protéine p300 permet l'augmentation de la transcription des gènes (58).

Il existe deux autres formes homologues à HIF-1 α . HIF-2 α est une protéine identique à HIF-1 α et possède la même capacité d'hétérodimérisation avec la sous-unité HIF-1 β lors de l'hypoxie. Celle-ci, contrairement à HIF-1 α , est exprimée en grande quantité dans le foie, les poumons, le cerveau et le cœur (53). HIF-3 α a également la

capacité de s'assembler avec la sous-unité β mais régule négativement HIF puisque l'hétérodimère formé n'a pas d'activité transcriptionnelle (53).

2.3.3. Gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie

La réponse à l'hypoxie comprend tous les gènes qui sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie en oxygène ainsi que ceux permettant l'adaptation de la concentration en oxygène du milieu (59). En effet, les mécanismes qui seront abordés ont comme but commun l'augmentation de la disponibilité en oxygène. Au niveau de l'organisme, le système a besoin de moyens efficaces pour acheminer l'oxygène rapidement aux tissus. Au niveau cellulaire, la cellule active une voie métabolique ne nécessitant pas d'oxygène, la voie anaérobie, pour conserver un niveau physiologique d'activité (59).

2.3.3.1. Gènes régulant le système vasculaire et l'érythropoïèse

Lors d'une baisse des niveaux d'oxygène au niveau tissulaire, une adaptation de l'organisme consiste à augmenter l'apport en oxygène en allant modifier le réseau responsable de la distribution de l'oxygène. HIF-1 a un effet sur trois principaux groupes de gènes important pour l'adaptation de la réponse cellulaire. Le premier groupe de gènes permet la production de protéines impliquées dans la production de vaisseaux sanguins, qui est appelée aussi l'angiogénèse. Les gènes impliqués sont « *vascular endothelial growth facteur* » (VEGF) et son récepteur « *fms-related kinase 1* » (Flt-1). Certains facteurs sont également responsables de la modification du diamètre des vaisseaux sanguins. Le second groupe de gènes a un effet au niveau de la maturation des globules rouges, qui sont chargés de la distribution de l'oxygène aux tissus. Cette maturation est appelée érythropoïèse (60). HIF-1 a un effet sur les gènes impliqués dans l'apport en fer aux globules rouges (59).

2.3.3.2. Gènes régulant le métabolisme énergétique

Le troisième groupe de gènes impliqués dans la régulation de l'oxygène exerce une action au niveau de la réponse cellulaire à l'hypoxie. Lorsque la cellule est dans une condition de faible teneur en oxygène, la mitochondrie diminue la respiration par la voie

aérobique afin de favoriser la production d'ATP par la voie anaérobique (61). HIF-1 active donc la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse, ce qui a pour effet d'augmenter le substrat disponible pour la fermentation (61). En effet, il y a production de transporteurs de glucose tels que *glucose transporter 1* (Glut-1) et *glucose transporter 3* (Glut-3) et également d'enzymes glycolytiques comme la *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), qui est responsable de la sixième étape de la glycolyse (conversion du NAD⁺ en NADH) (23, 56, 62). L'augmentation de la glycolyse accroît le niveau disponible de pyruvate. Afin d'augmenter la conversion en lactate dans la voie anaérobique, la transcription de deux autres gènes est à la hausse. D'une part, l'activation de la *lactate dehydrogenase* (LDH) permet un renouvellement de NAD⁺ disponible pour la glycolyse tout en favorisant la production d'ATP pour que la cellule continue de fonctionner (56). D'autre part, afin d'empêcher que le pyruvate entre dans le cycle de Krebs, il y a activation de la *pyruvate dehydrogenase kinase 1* (PDK1). Celle-ci a pour effet d'inhiber la conversion du pyruvate en acétyl CoA par l'enzyme pyruvate déshydrogénase (56). De cette manière, le pyruvate est entièrement dirigé vers la voie anaérobique évitant ainsi une surcharge de substrat dans la chaîne de transport. Cette dernière est ralentie en condition hypoxique, évitant ainsi la production de ROS (63).

HIF-1 agit également au niveau de la COX. En effet, il existe un isoforme de la sous-unité 4 appelée COXIV-2 qui est activé seulement lorsque la tension en oxygène est basse et qui a comme but d'augmenter l'efficacité de la respiration cellulaire. En fait, HIF-1 favoriserait la transcription de la protéase LON responsable de la dégradation de l'isoforme COXIV-1 pour promouvoir l'activité de COXIV-2 à la place. Ainsi, l'activité de COX serait changée, et par le fait même la production d'ATP par la phosphorylation oxydative. De plus, la consommation d'oxygène serait diminuée puisque COX est le principal accepteur d'électrons. Comme la chaîne de transport arrêterait de fonctionner, cela réduirait la production des ROS (64). La figure 5 résume la localisation des gènes qui seront étudiés dans la voie de HIF dans le contexte du syndrome de Leigh type Canadien-Français.

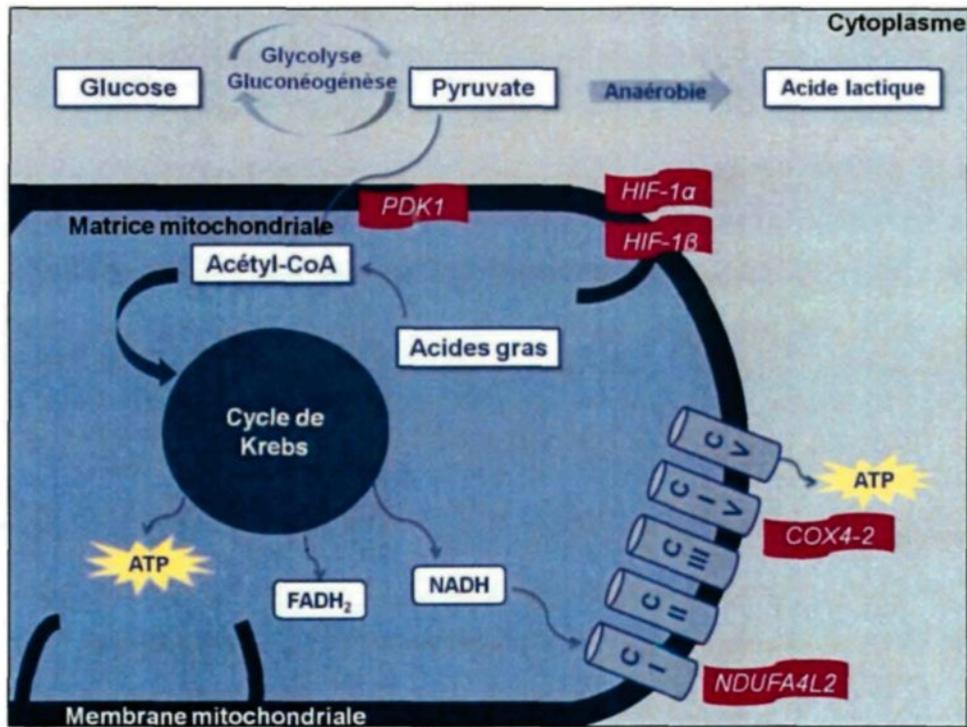


Figure 5 : Localisation des gènes de la voie de l'hypoxie. HIF-1 est formé des sous-unités α et β qui s'assemblent lors d'une condition hypoxique, la sous-unité α étant dégradée en situation physiologique. PDK1 empêche la conversion du pyruvate en acétyl CoA. NDUFA4L2 est responsable de l'inhibition du complexe I en situation d'hypoxie. COXIV-2 est un isoforme de la sous-unité COXIV-1 qui est davantage produite lors d'une condition d'hypoxie permettant ainsi une respiration cellulaire plus efficace.

2.3.4. Pertinence d'étudier la voie de l'hypoxie dans le contexte du syndrome de Leigh type Canadien-Français

Le syndrome de Leigh type Canadien-Français est une maladie affectant le complexe IV de la chaîne de transport des électrons. La production d'énergie y est donc affectée ce qui entraîne les manifestations mentionnées plus haut soit un retard psychomoteur, une hypotonie ainsi qu'un risque élevé pour des crises d'acidose métabolique. Comme le gène *NDUFA4L2* est responsable de l'inhibition du complexe I en situation d'hypoxie et que son expression est augmentée chez les patients comparativement aux témoins, il pourrait y avoir

un mécanisme de compensation permettant la survie cellulaire. En effet, comme l'activité de la chaîne de transport des électrons est affectée, la voie d'HIF-1 pourrait contribuer à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique afin de réduire l'apport en nutriments dirigé vers la chaîne. Cela aurait pour effet d'éviter une surcharge pour permettre aux cellules d'ajuster leur activité mitochondriale en fonction de l'activité réduite de COX.

2.3.5. Induction de l'hypoxie par voie chimique

Bien que l'hypoxie soit un phénomène caractérisé par une diminution de l'oxygène ambiant, il est également possible d'induire le mécanisme de réponse par voie chimique. L'utilisation du chlorure de cobalt (CoCl₂) est bien documentée comme étant un inducteur d'hypoxie (65, 66). En fait, le CoCl₂ aurait la capacité d'inactiver les prolyl-hydroxylases (PDHs) responsables de l'ajout de groupement hydroxyles sur la sous-unité HIF-1 α de la protéine HIF-1. L'inactivation serait faite par la fixation du CoCl₂ sur des sites de liaisons au fer situés sur les PDHs (67). Comme les prolines ne sont plus hydroxylées, la protéine VHL ne peut plus reconnaître la sous-unité α , ce qui empêche la dégradation protéasomale de se produire. Ainsi, la sous-unité alpha est stabilisée et peut s'assembler avec la sous-unité β (68).

Hypothèse

Étant donné que l'analyse des puces à ADN a démontré une plus grande expression de *NDUFA4L2* chez les individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français et que ce gène code pour une protéine responsable de l'inhibition du complexe I de la chaîne de transport lors d'une faible teneur en oxygène, l'hypoxie pourrait être un mécanisme impliqué dans la pathogénèse du syndrome. Ainsi, l'expression des gènes impliqués dans cette voie, soit *PDK1*, *COXIV-2* et *NDUFA4L2*, devrait être augmentée chez les patients comparativement aux témoins.

Objectifs

L'objectif principal de cette étude est de valider l'implication de la voie d'HIF-1 dans les fibroblastes de personnes atteintes du syndrome de Leigh type Canadien-Français. Pour ce faire, les objectifs secondaires sont : 1) faire l'étude comparative des gènes de la voie de l'hypoxie entre les personnes atteintes de la maladie et les témoins suite à une condition d'hypoxie chimique et, 2) mesurer la quantité de protéines produite pour chacun des gènes étudiés en condition hypoxique entre les deux groupes d'individus.

Rapport-Gratuit.com

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Principe général de l'étude

L'étude consistait d'abord à évaluer si la voie biologique d'HIF-1 stimulée par l'hypoxie répondait de la même manière dans les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français que ce qui était décrit dans la littérature par Deng *et al* en 2012 (69). Ces derniers avaient démontré qu'il était possible d'induire chimiquement l'hypoxie dans une lignée d'adénocarcinome (A549) en incubant les cellules dans du milieu de culture en présence de CoCl_2 pendant 24h. La même expérience a ainsi été réalisée en utilisant des lignées primaires de fibroblastes. La première étape visait à déterminer la dose optimale pour l'induction de l'hypoxie. La sous-unité α de la protéine HIF-1 est stabilisée par l'hypoxie alors qu'elle n'est pas visible en condition où des concentrations physiologiques d'oxygène sont présentes. Ceci est quantifiable par immunobuvardage. Ensuite, l'évaluation de la toxicité de la dose choisie a été réalisée par la mesure de la relâche de la lactate déshydrogénase (LDH). Finalement, l'expression des différents gènes de la voie de l'hypoxie avant et après le traitement au CoCl_2 par PCR en temps réel a été évaluée. La démarche expérimentale suivie pour l'étape d'hypoxie est illustrée à la figure 6. Les précisions concernant les étapes du protocole sont disponibles aux sections : 3.2. Culture des lignées cellulaires, 3.3. Simulation de la condition d'hypoxie, 3.4. Quantification des protéines, 3.5. Mesure de la nécrose cellulaire, 3.6. Mesure de l'expression génique et 3.7. Analyses statistiques.

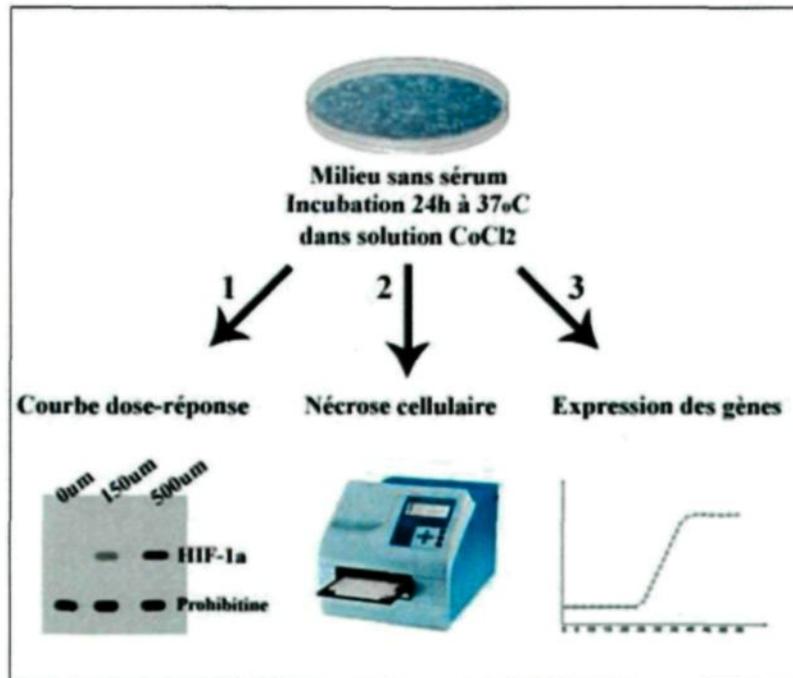


Figure 6 : Démarche expérimentale à suivre pour le protocole d'hypoxie. Pour chaque étape, les cellules sontensemencées pour une confluence entre 90 et 100% au moment du traitement, puis elles sont incubées avec une solution de CoCl₂. Les étapes subséquentes sont ensuite réalisées soit la courbe dose-réponse par mesure de la sous-unité α en immunobuvardage (1), la mesure de la nécrose cellulaire par quantification de la relâche du LDH par spectrophotométrie (2) et la mesure d'expression des gènes par RT-PCR (3).

3.2. Culture des lignées cellulaires

Dans cette étude, les lignées cellulaires de fibroblastes primaires isolés de biopsies de peau de neuf individus ont été utilisées. Six d'entre elles proviennent d'individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français (voir tableau 1). Les trois dernières proviennent de témoins (de sexe masculin et féminin) ne présentant pas de syndrome métabolique pour éviter la variabilité. Toutes les lignées proviennent de la Biobanque de l'acidose lactique située à l'UQAC. Les cellules ont été cultivées dans du milieu « *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* » (DMEM) composé de glucose (4500 mg/L), de L-glutamine (584 mg/L)

et de pyruvate de sodium (110 mg/L) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et de 5% d'une solution de pénicilline et de streptomycine. Puisque la L-glutamine se dégrade rapidement, il fallait en ajouter au milieu au deux semaines.

Tableau 2: Caractérisation des lignées cellulaires utilisées

Code	Nom de la lignée*	Sexe	Âge au prélèvement (an)	Génotype	Phénotype
P1	101-0002-1	M	25	V/A C1277STOP	Sévère
P2	104-0002-1	M	6	V/V	Moyen
P3	106-0001-1	F	8	V/V	Léger
P4	108-0001-1	F	4	V/V	Moyen
P5	114-0002-1	M	5	V/V	Léger
P6	115-0002-1	M	2 mois	V/V	Sévère
T1	332-0004-1	M	8	A/-	Témoin
T2	331-0004-1	M	5	A/-	Témoin
T3	304-0005-2	F	5	A/-	Témoin

*Se référer à la note de bas de page du tableau 1 pour l'explication sur la codification des lignées. Ici, le dernier chiffre fait référence au projet dans le cadre duquel la personne a été recrutée. Le chiffre 1 correspond à la Biobanque de l'acidose lactique alors que l'individu 304-0005-2 a été recruté comme témoin dans le cadre du projet sur l'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) également réalisé à l'UQAC par la professeure Laprise (les témoins avaient également accepté que leurs cellules puissent être utilisées pour d'autres projets de recherche).

3.3. Simulation de la condition d'hypoxie

Pour la simulation de l'hypoxie cellulaire, une solution de CoCl_2 1M (RICCA Chemical Company, Arlington, Texas) a été utilisée. Lorsque les cellules avaient atteint la confluence (90-100%), elles étaient lavées deux fois avec du DMEM sans sérum, puis incubées à 37°C dans un environnement contenant 5% de CO_2 dans une solution de CoCl_2 pendant une période de 24h (temps déterminé par l'équipe de Deng *et al* (69) comme étant suffisant pour stabiliser HIF-1 α). Pour chacune des étapes nécessitant l'induction de l'hypoxie, soit la courbe dose-réponse, la nécrose ainsi que le PCR en temps réel, ces mêmes conditions ont été répétées.

3.4. Quantification des protéines

Afin de mesurer quelle dose induisait le mieux l'hypoxie, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage. Celle-ci est une technique biochimique permettant d'identifier avec précision la présence ou non d'une protéine dans un échantillon. Elle se base sur le principe des interactions anticorps-antigènes qui se reconnaissent de manière spécifique (70). D'une manière générale, l'immunobuvardage consiste à faire migrer un échantillon contenant les protéines extraites dans un gel d'acrylamide, à le transférer sur une membrane de nitrocellulose puis à l'incuber en présence d'anticorps. Dans un premier temps, c'est un anticorps primaire qui est spécifique à la protéine étudiée qui est fixé. Puis, l'anticorps secondaire couplé à une enzyme est dirigé sur le premier anticorps. Finalement, avec l'ajout d'un substrat qui réagit avec l'enzyme couplé à l'anticorps secondaire, il y a une réaction photochimique qui permet de visualiser la protéine d'intérêt (chemiluminescence). Les anticorps ont été achetés chez Abcam (Toronto, Canada).

3.4.1. Préparation des échantillons

3.4.1.1. Extraction des protéines

Le protocole d'extraction a été établi par le laboratoire du Dr Eric Shoubridge de l'Université McGill, chercheur du consortium de l'acidose lactique. Plus précisément, le

tampon utilisé pour l'extraction des protéines est détaillé dans le tableau 3. Celui-ci était préparé le jour de l'extraction et était placé sur glace avant d'être utilisé. Lorsque le temps d'incubation était terminé, le milieu contenant le CoCl_2 était retiré et le tapis cellulaire était lavé deux fois avec du tampon PBS 1X froid. Par la suite, le tampon de lyse froid était ajouté sur le tapis cellulaire afin de décoller les cellules. L'échantillon était incubé sur glace pendant 40 minutes, puis était centrifugé afin de recueillir que le surnageant. Celui-ci était finalement quantifié.

Tableau 3 : Composition du tampon de lyse pour l'extraction des protéines

Produit	Concentration finale
Tris HCl	25mM
NaCl	150mM
SDS	0,1%
DDM	1,5%
Inhibiteur de protéase	1X
PMSF	1mM
NaF	20mM

*La solution de lyse est complétée dans du PBS 1X.

3.4.1.2. Quantification des protéines par spectrophotométrie

La quantification des protéines de l'échantillon se fait à partir de l'essai Bradford (71). Celui-ci utilise le bleu de Coomassie G-250, un colorant possédant des propriétés chimiques lui permettant de changer de conformation lorsqu'il se lie aux protéines (72). Ce composé existe en trois formes chargées possédant toutes des teintes différentes (73). Dans sa forme non liée, ce composé arbore une couleur rouge-brunâtre et a une absorbance maximale à 470 nm (72, 73). Le changement de conformation, qui correspond à la forme bleue du colorant, se fixe aux protéines et absorbe à 590 nm (72, 73). La quantité de protéines sera donc proportionnelle à la quantité de colorant bleu absorbant à 595 nm (73). Dans un premier temps, une courbe standard est réalisée à partir de concentrations connues de la protéine *bovine serum albumin* (BSA) (72). Par la suite, il est possible de déterminer

la concentration de notre échantillon en trouvant à quel point de la courbe standard cela correspond.

3.5. Mesure de la nécrose cellulaire

3.5.1. Principe de la mesure

Une fois que la dose de CoCl_2 a été déterminée, la toxicité de cette dernière a été établie en utilisant le *Cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay* de Promega (Madison, États-Unis). Cette mesure est effectuée grâce à la relâche de la LDH. En effet, lorsque la cellule meurt, la membrane cytoplasmique est rompue ce qui permet la libération de cette enzyme présente dans le cytosol de la cellule. La réaction enzymatique qui se produit est illustrée à la figure 7. La LDH a la propriété de produire du NADH qui est le substrat à la réaction de la diaphorase, une enzyme catalysant la réaction décrite ici-bas. Celui-ci est utilisé pour convertir le sel de tétrazolium en un produit rouge qu'est le formazan. L'intensité de la couleur peut être déterminée par densité optique à l'aide d'un lecteur de plaque *multiskan go* (Thermo Scientific). La quantité de LDH dans le milieu sera proportionnelle à la formation de formazan et à la production d'un composé rouge. Autrement dit, plus la toxicité sera élevée, plus l'absorbance sera grande.

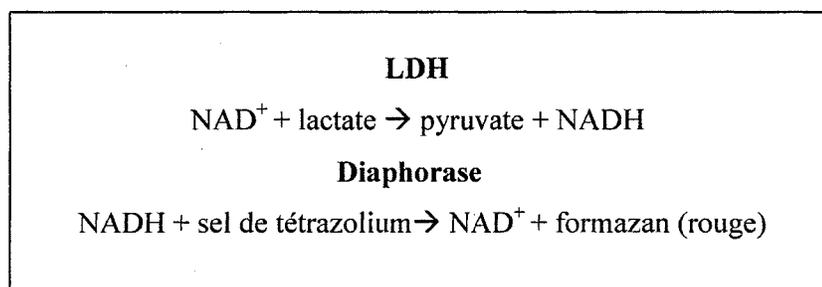


Figure 7 : Réactions chimiques du *Cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay* (Promega). LDH : lactate déshydrogénase, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide.

La toxicité peut être calculée en effectuant le ratio entre la quantité de LDH présente dans le surnageant (due à la toxicité de la dose) et la quantité totale de LDH (des cellules nécrotiques et des cellules vivantes) (voir formule ci-dessous).

$$\text{Toxicité} = \frac{\text{Absorbance surnageant (cellules nécrotiques)}}{\text{Absorbance culot + surnageant (cellules totales)}} \%$$

3.5.2. Démarche expérimentale

Une plaque 96 puits a étéensemencée avec 10 000 cellules par puits pour chaque lignée de l'étude. Trois concentrations différentes ont été mesurées soit 0, 150 et 500 μM de CoCl_2 pour chaque lignée et ce en triplicata. Cette même expérience a été répétée trois fois. Les cellules étaient placées dans les puits pendant 24h dans du DMEM sans sérum avant d'être traitées au CoCl_2 pour leur laisser le temps d'adhérer. Le sérum animal peut également contenir de la LDH. Il est donc important de le retirer du milieu pour effectuer l'expérience sans quoi il pourrait y avoir du bruit de fond associé. Un puits contenant du milieu de culture a été ajouté puisque celui-ci contient un colorant rouge de phénol pouvant également contribuer au bruit de fond. Cette valeur a été soustraite de toutes les autres. Un contrôle positif, fourni par la compagnie, a été utilisé afin de vérifier si l'essai enzymatique fonctionnait correctement.

Les cellules ont été incubées pendant 24h à 37°C dans la concentration de CoCl_2 déterminée par l'expérience précédente. Le surnageant ainsi que le culot cellulaire ont été récoltés, puis incubés dans une solution de lyse pendant 1h à 37°C . La solution enzymatique contenant le sel de tétrazolium et la diaphorase a ensuite été ajoutée puis incubée 30 minutes supplémentaires à température de la pièce et à l'obscurité. Une solution d'arrêt a finalement été ajoutée pour figer la réaction avant d'être mesurée à 490 nm dans le *multiskan go*.

3.6. Mesure de l'expression génique

La quantification de l'expression génique s'effectue en plusieurs étapes qui seront abordées dans les prochaines sections. D'abord, l'ARNm doit être extrait des cellules. Puis, celui-ci doit être transcrit en ADN complémentaire par la transcription inverse. Ce n'est que par la suite que l'on peut procéder à la réaction de polymérase en chaîne en temps réel (RT-PCR).

3.6.1. Culture cellulaire pour les essais

Afin d'obtenir une bonne quantité de produit génique, il était nécessaire de cultiver une quantité assez grande de cellules. Dans le protocole de QIAGEN®, le nombre maximal de cellules est spécifié pour chaque type de colonne utilisé afin d'éviter que celle-ci ne soit bouchée par une quantité excessive d'ARN ce qui modifierait sa pureté. Dans le cas présent, nous ne devons pas dépasser 1 milliard de cellules. Nous avons utilisé un flacon T75 à confluence entre 90 et 100% ce qui équivalait à environ 3 millions de cellules. Une fois la confluence atteinte, les cellules étaient lavées avec du DMEM sans sérum puis incubées pendant 24h avec la concentration de CoCl_2 requise. Une fois le traitement terminé, les cellules étaient lavées avec du PBS 1X et étaient décollées avec de la trypsine, puis centrifugées avant de passer aux étapes subséquentes.

3.6.2. Extraction de l'ARN messenger

Afin de mesurer l'expression des gènes, il est nécessaire d'extraire l'ARNm. Pour ce faire, nous avons utilisé le *RNeasy plus mini kit* de QIAGEN® (Toronto, Canada (74)). La technologie de QIAGEN est basée sur l'utilisation de colonnes possédant une membrane de silice ayant une grande sélectivité pour l'ARN ainsi que sur des systèmes de tampons à forte teneur en sel augmentant la capacité de liaison de l'ARN à la membrane (74). Une fois fixé, l'ARNm est lavé de toutes impuretés puis est élué dans de l'eau libre de RNases, des enzymes ayant la propriété de dégrader l'ARN (75). L'ARN est une molécule simple brin qui est beaucoup plus sensible à la dégradation que l'est l'ADN (75). Pour cette raison, il est

nécessaire de le convertir en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse avant de réaliser le PCR en temps réel.

3.6.3. Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée à l'aide du *qScript™ cDNA SuperMix* de Quanta biosciences (Gaithersburg, États-Unis)(76). La solution nécessaire à la réaction contient une enzyme *reverse transcriptase* ainsi que des nucléotides essentiels à la synthèse du brin d'ADNc. Pour une réaction de transcription inverse de 20 µl finaux, nous avons ajouté 4 µl de réactif, 150 ng d'ARN et puis complété le tout avec de l'eau sans RNase. Le cycle de réaction est le suivant :

5 minutes à 25°C

30 minutes à 42°C

5 minutes à 85°C

Pause à 4°C

Ces températures permettent à la *transcriptase inverse* d'effectuer la liaison des nucléotides (76).

3.6.4. Réaction de PCR en temps réel

La réaction de polymérase en chaîne est une méthode utilisée pour l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN, soit un gène en particulier ou une région, ce qui permet de la quantifier spécifiquement (77). Pour ce faire, des amorces complémentaires au brin d'ADN à amplifier sont fixées en amont et en aval de la région d'intérêt (78). Cela permet donc à l'ADN polymérase, enzyme responsable de la réplication de l'ADN, de savoir où commencer à synthétiser le nouveau brin d'ADN (78). Cette réaction est réalisée dans un cycle de différentes températures dans un appareil appelé thermocycleur (65). Celui-ci effectue des cycles de chaleur et de refroidissement subséquents. La chaleur permet au double brin d'ADN d'être séparé (dénaturation) ce qui permet aux amorces de se fixer sur l'ADN simple brin (hybridation). L'enzyme Taq polymérase effectue la réplication à une température de 60°C (élongation) (77). Le cycle de réaction est présenté dans le tableau 4.

Tableau 4 : Étapes de réaction du PCR en temps réel

Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	15 secs	X55
Hybridation et Élongation	60°C	60 secs	

Le tableau 4 montre le temps passé à une température donnée pour les différentes étapes du PCR en temps réel. Ce même cycle est répété 55 fois.

Ce qui distingue le PCR en temps réel du PCR standard est la capacité de détecter l'amplification de l'ADN en temps réel puisqu'il y a émission de fluorescence émise lors de la synthèse de nouveau brin d'ADN. L'amplification est exponentielle puisqu'à chaque cycle, la quantité d'ADN nouvellement synthétisé double (77, 79). Les amorces Taqman sont utilisées pour cette technique. En fait, elles sont composées d'un fluorophore qui émet de la fluorescence et d'un suppresseur qui, lorsque situé près du fluorophore, inhibe la fluorescence de ce dernier. Lorsque l'enzyme polymérase amplifie le gène voulu, il en résulte une libération du fluorophore et du suppresseur ce qui va engendrer de la lumière qui est détectable par le thermocycleur (79). La fluorescence sera détectée seulement lorsqu'elle dépassera la ligne seuil sous laquelle la fluorescence émise est considérée comme du bruit de fond, lors de la phase d'initiation (Voir figure 8). Le point où la fluorescence dépasse le seuil est un point de référence pour le calcul de la concentration (cycle Ct) (80). Plus un gène sera présent dans l'échantillon au départ et moins de cycles seront nécessaires pour entrer dans la phase exponentielle (80). Lorsqu'il y a épuisement des réactifs dans la réaction, on voit apparaître une phase plateau (81).

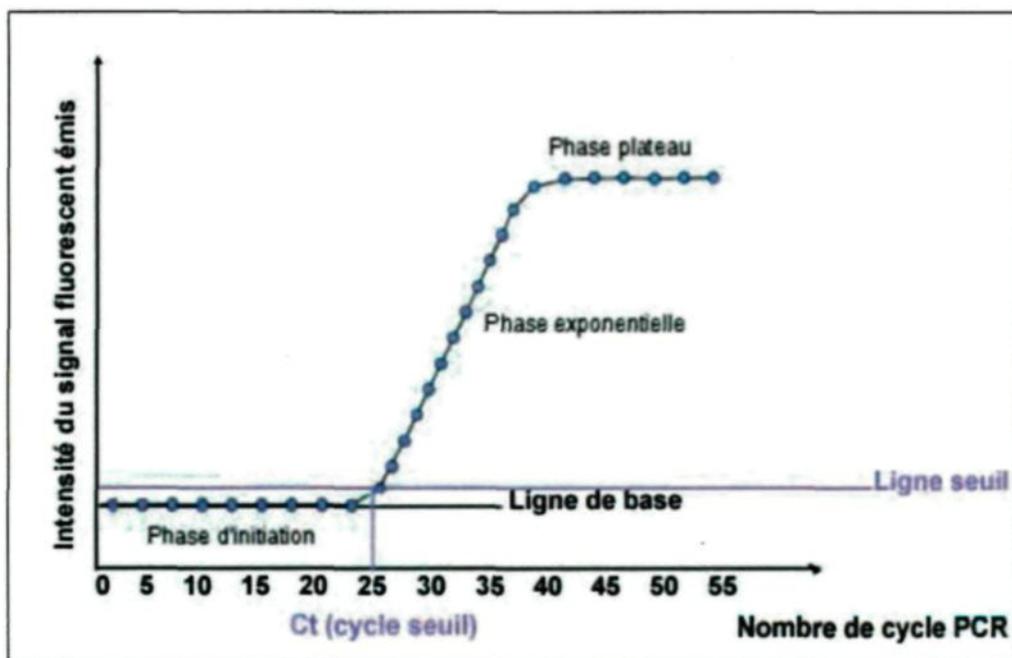


Figure 8 : Phases d'amplification de l'ADN par RT-PCR (image modifiée de John Libbey Eurotext (82)). L'amplification est composée de trois phases : la phase d'initiation, la phase exponentielle et la phase plateau.

La mesure de l'expression se fait de manière comparative avec un gène contrôle qui est connu pour être essentiel à l'activité cellulaire et donc qui est exprimé en proportion égale dans toutes les cellules du corps (77). Dans notre cas, le gène *ribosomal protein L13a* (*RPL13A*) a été choisi comme contrôle puisqu'il est connu pour avoir une expression stable dans les fibroblastes (83). Ce gène code une protéine ribosomale formant la sous-unité 60S du ribosome (46).

Avant de pouvoir quantifier un gène, une courbe standard est réalisée pour chaque gène à étudier. Elle est générée à partir de trois dilutions connues de l'ADN d'un sujet de référence qui sera incorporé dans tous les essais. Nous obtenons donc une courbe à trois points qui représentent la fluorescence obtenue au cycle Ct pour chaque dilution (84).

Celle-ci doit se conformer à certaines exigences. Ainsi, la pente de régression doit être entre 0,98 et 1,00 pour être valide puisqu'elle correspond à l'exactitude des dilutions. De plus, la valeur de l'efficacité doit se situer entre 0,95 et 1,00 puisqu'elle fait référence à la ressemblance des triplicatas pour un même échantillon donc à la qualité de la manipulation. Les échantillons de concentration inconnue seront donc placés sur cette courbe ce qui permettra d'en déterminer la concentration.

3.7. Analyses statistiques

Les résultats du RT-PCR sont analysés à l'aide du logiciel du Rotor-gene 6000 (74), de Excel et de SPSS version 20. Afin de comparer les moyennes des données d'expression entre les différentes conditions (cellules traitées vs cellules non traitées) ainsi qu'entre les patients et les témoins, un test de Student a été utilisé respectant une valeur de signification inférieure à 5%.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

4.1. Détermination de la dose de chlorure de cobalt et de sa toxicité

La détermination de la dose de CoCl_2 nécessaire afin d'induire une condition d'hypoxie a été réalisée sur toutes les lignées. Comme toutes les doses utilisées ont démontré une stabilisation nette d'HIF-1 α comparativement à l'état basal, où la présence de la protéine était imperceptible, nous avons sélectionné deux doses extrêmes pour vérifier si elles étaient toxiques pour les cellules soit 150 μm et 500 μm (limite établie par Deng *et al.* 2012 comme étant toxique). La figure 9 montre le pourcentage de toxicité observé pour les différentes lignées par rapport à l'état basal et ce pour les deux doses utilisées. Aucune des doses n'étaient toxiques, une réduction de la nécrose cellulaire a même été observée. La dose la plus élevée induisant la stabilisation de HIF-1 α a donc été sélectionnée pour les essais suivants, soit 500 μm de CoCl_2 .

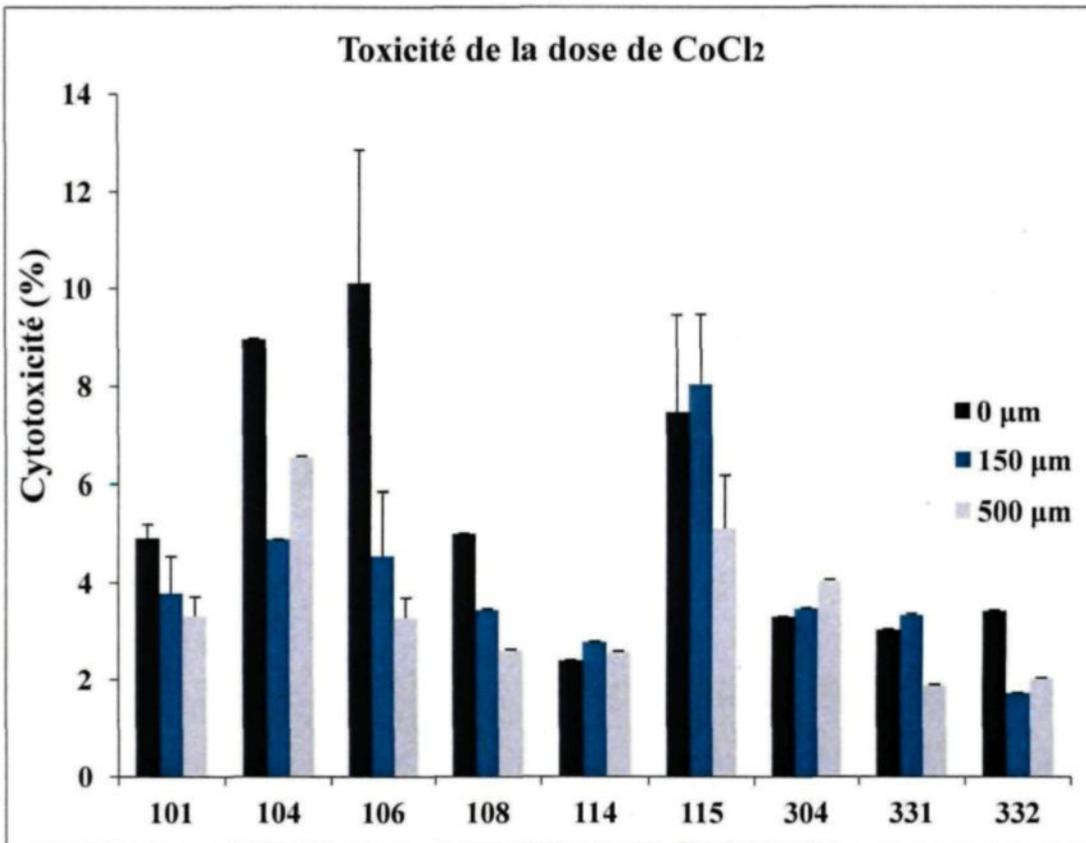


Figure 9 : Résultats de la toxicité des doses de CoCl₂. La cytotoxicité de chacune des doses (150 μM et 500 μM) pour chacune des lignées utilisées est représentée dans cette figure. La toxicité est calculée en divisant l'absorbance obtenue pour le surnageant sur la toxicité totale soit le culot cellulaire additionné du surnageant. Cette mesure a été effectuée à trois reprises en triplicatas.

Il est possible d'observer que la toxicité diminue pour les lignées 101, 106, 108, 115, 331 et 332 avec une dose de 500 μM de CoCl₂. Le pourcentage de cytotoxicité au niveau basal n'est pas élevé dans l'ensemble.

4.2. Mesure de l'expression des gènes de la voie de l'hypoxie

Afin de mesurer l'expression des gènes de la voie de l'hypoxie, nous avons incubé chacune des lignées cellulaires avec 500 μm de CoCl_2 pendant 24h et nous avons ensuite extrait l'ARN des cellules. Les figures 10 à 13 montrent les résultats d'expression obtenus par qRT-PCR. L'expression relative de chacun des gènes est démontrée par rapport au gène contrôle *RPL13A*. La significativité a été déterminée à l'aide d'un test de Student. Les résultats sont représentatifs de trois essais différents.

4.2.1. Résultat du traitement sur l'expression du gène *NADH déhydrogénase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2*

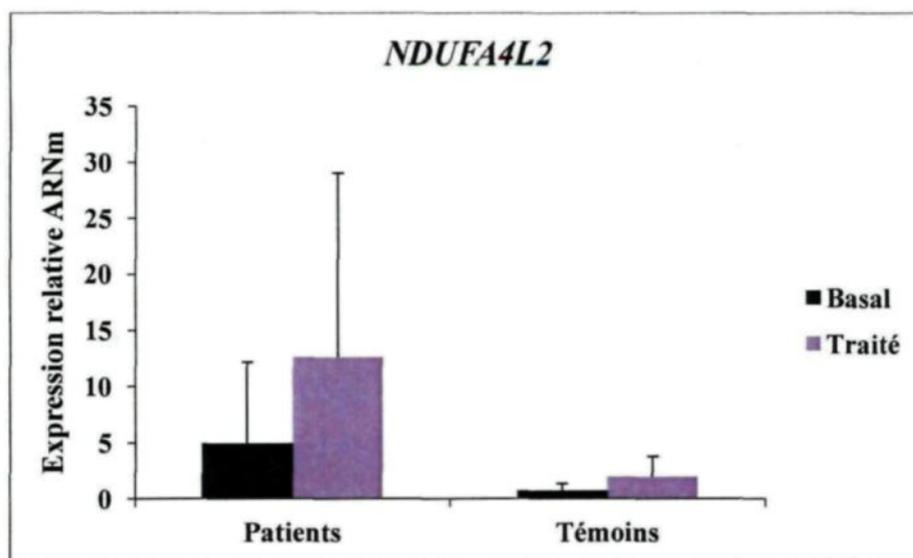


Figure 10 : Expression relative de *NADH déhydrogénase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2* (*NDUF4L2*) suite au traitement de CoCl_2 . La valeur d'expression a été combinée pour les patients et les témoins. Ce résultat est représentatif des trois essais qui ont été réalisés.

Bien que le gène soit plus exprimé chez les patients comparativement aux témoins, une grande variabilité est observé entre les personnes atteintes du syndrome de Leigh type Canadien-Français ce qui explique qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes ($p=0,35$). Le traitement induit une augmentation de l'ordre de 2,5 fois de l'ARNm chez les deux groupes d'individus mais n'est pas significative ($p=0,32$ chez les patients et 0,35 chez les témoins).

4.2.2. Résultat du traitement sur l'expression du gène *hypoxia-inductible factor 1- α*

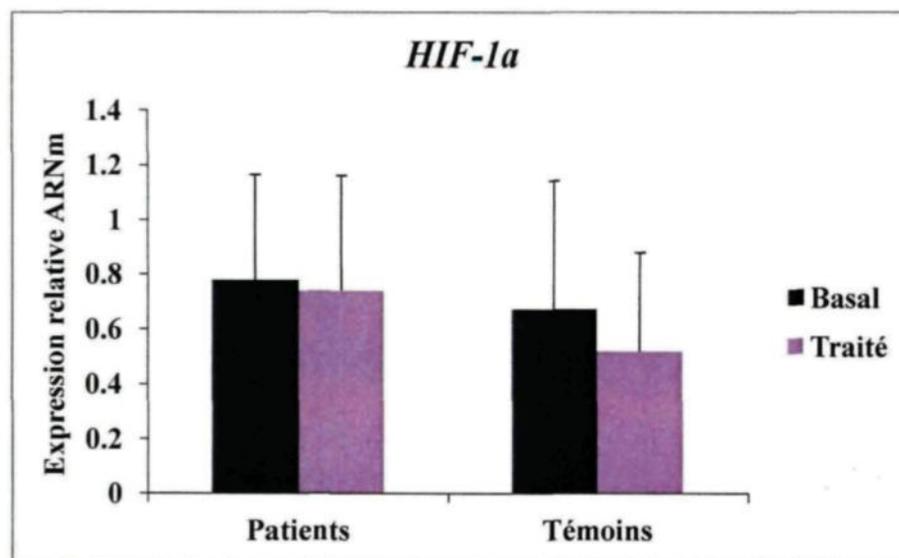


Figure 11 : Expression relative de *hypoxia-inductible factor 1- α* (*HIF-1 α*) suite au traitement de CoCl_2 .

La condition d'hypoxie n'induit pas de différence dans l'expression d'*HIF-1 α* ($p=0,91$ chez les patients et 0,68 chez les témoins). Il n'y a pas de différence d'expression de ce gène entre les patients et les témoins au niveau basal ($p=0,78$).

4.2.3. Résultat du traitement sur l'expression du gène *cytochrome c oxydase subunit IV isoform 2*

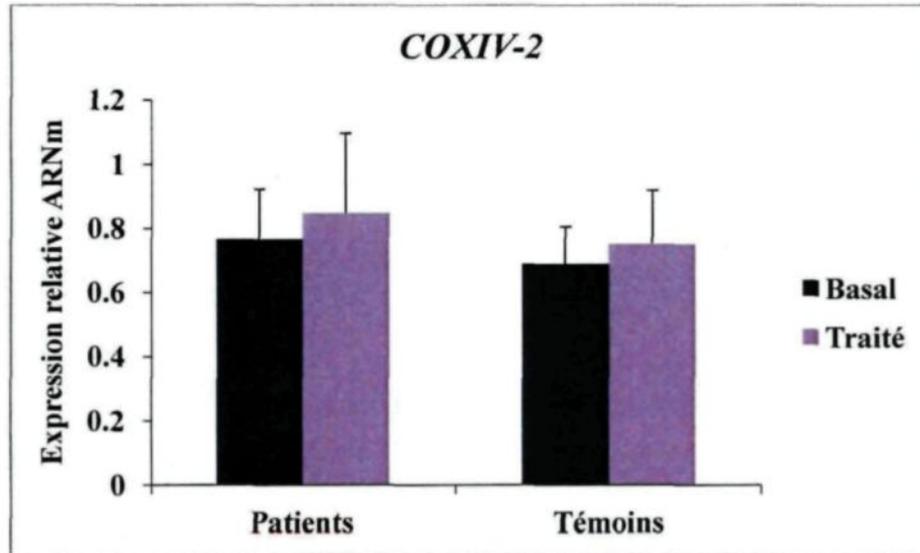


Figure 12 : Expression relative de *cytochrome c oxydase subunit IV isoform 2* (*COXIV-2*) suite au traitement de CoCl_2 .

L'expression de *COXIV-2* en situation d'hypoxie n'augmente pas que ce soit chez les patients ou les témoins ($p=0,51$ et $0,61$ respectivement). Ce gène est exprimé autant chez les deux groupes d'individus au niveau basal ($p=0,48$).

4.2.4. Résultat du traitement sur l'expression du gène *pyruvate déshydrogénase kinase 1*

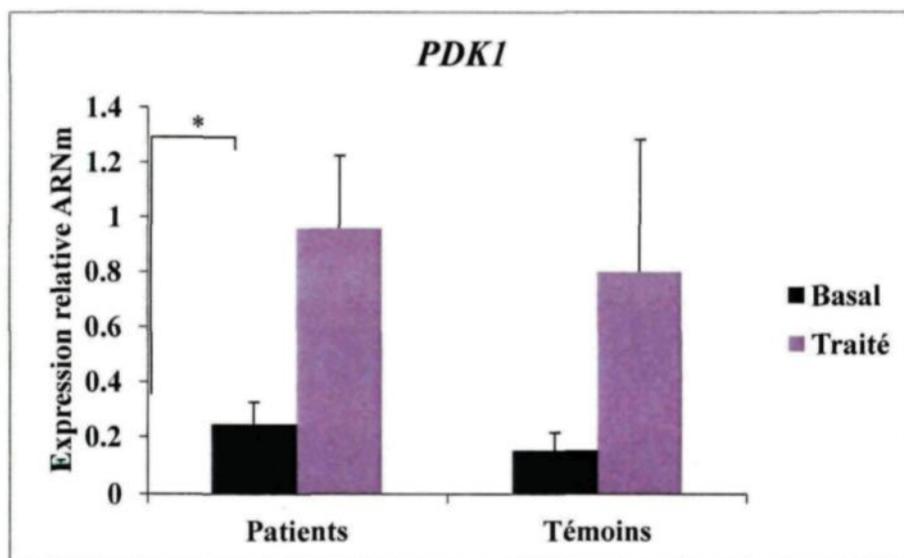


Figure 13 : Expression relative de pyruvate *déshydrogénase kinase 1* (*PDK1*) suite au traitement de CoCl_2 .

L'induction de l'hypoxie a un effet significatif sur l'expression de *PDK1*. En effet, celui-ci induit une augmentation de l'expression du gène d'environ 4 fois chez les patients alors que cette augmentation est de près de 5 chez les témoins. Cette augmentation est significative dans le cas des patients avec une valeur de $p < 0,0001$ alors qu'une forte tendance est observée chez les témoins $p = 0,08$. L'expression est cependant semblable au niveau basal pour les deux groupes ($p = 0,12$).

4.3. Mesure de la quantité de protéines de la voie de l'hypoxie (résultats préliminaires)

Afin de valider si les augmentations observées dans l'ARNm suite au traitement de CoCl_2 se manifestaient également au niveau de la protéine, nous avons procédé à l'extraction des protéines et à l'immunobuvardage de celles-ci sur un gel d'acrylamide. Étant donné le nombre restreint de cellules et la difficulté de travailler en hypoxie due au temps de manipulation qui devait être rapide, les essais ont été réalisés sur trois lignées de patients et trois lignées de témoins. Celles-ci sont définies comme étant patient 1 (P1),

patient 2 (P2), témoin 1 (T1) etc. La protéine de contrôle de chargement utilisée est la prohibitine, protéine impliquée dans le processus de vieillissement de la cellule et qui est donc également exprimée dans toutes les cellules (46). Les résultats obtenus n'ont pas permis de tirer des conclusions et ne sont donc pas présentés dans le présent mémoire. Les conditions pour l'immunoburvardage devront donc être optimisées et ceux-ci devront donc être refaits. Cependant, il a été possible d'observer quelques faits intéressants au sujet de la protéine NDUFA4L2.

4.3.1. Résultat du traitement sur la protéine NDUFA4L2

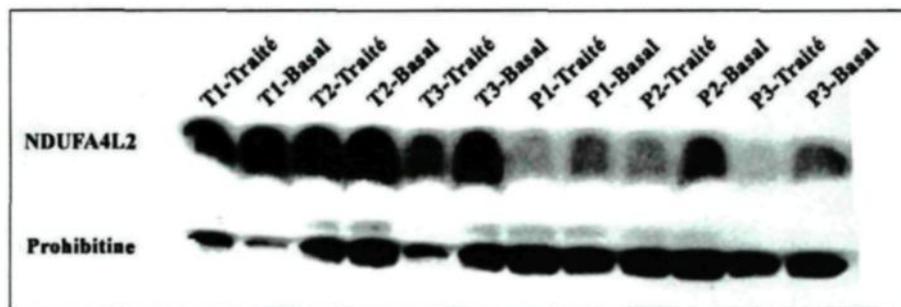


Figure 14 : Effet du traitement de CoCl_2 sur la protéine NDUFA4L2

La prohibitine, protéine contrôle, varie entre les puits. Le traitement diminue l'expression de la protéine chez le témoin 3 (T3-traité) ce qui n'est pas visible chez les deux autres témoins. Le traitement diminue le niveau de protéine chez tous les patients étudiés. Au niveau basal, la protéine est plus exprimée chez les témoins par rapport aux patients. Il est aussi possible de noter que le patient 2 a une quantité plus grande de protéine que les deux autres patients.

Rapport-Gratuit.com

CHAPITRE 5

DISCUSSION

5.1. Réduction de la cytotoxicité en fonction de la dose de chlorure de cobalt

La LDH est une enzyme présente dans la cellule qui est responsable de la dernière étape de la glycolyse anaérobie, soit la conversion du L-lactate et du NAD en pyruvate et en NADH (46). La LDH est donc une enzyme essentielle pour l'activité « normale » de la cellule. Comme elle est située dans le cytoplasme de cette dernière, elle peut être utilisée comme indicateur de cytotoxicité dans le cas où la membrane cellulaire éclate, soit lors de la mort cellulaire. Le contenu en LDH d'une cellule est affecté par différents facteurs tels le pH, la pression en O₂, la disponibilité et la nature du carbone présent dans le milieu de culture (85). Il varie également d'un type cellulaire à l'autre (85). Le CoCl₂ provoque une diminution de la toxicité cellulaire dans la majorité des lignées comparativement au niveau de base qui est relativement bas (inférieur à 10%). Peu d'articles ont relaté cet effet dans la littérature puisqu'ils n'ont pas étudié l'impact isolé du chlorure de cobalt sur la toxicité cellulaire, mais bien en mesurant l'effet d'une utilisation conjointe avec une molécule (ex. le tert-butyl hydroperoxide) ou l'effet sur l'induction de l'apoptose. Dans l'ensemble, une diminution de l'effet toxique de la molécule ou de l'apoptose causée par celle-ci était observée lorsque le CoCl₂ était utilisé (86-88). Pour la plupart cependant, le CoCl₂ était utilisé pour mimer l'hypoxie ou comme inducteur de mort cellulaire (89-91). Le mécanisme expliquant cette baisse de toxicité est, la plupart du temps, la réduction par le CoCl₂ du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), lequel est dommageable pour les cellules lorsque présent dans le milieu de culture (92).

Par ailleurs, la carence en sérum est un phénomène pouvant entraîner de la cytotoxicité (93-95). Le sérum contient une grande quantité de LDH pouvant contribuer à augmenter le bruit de fond lors des essais de cytotoxicité. Il est donc recommandé de

diminuer la concentration de celle-ci avant de réaliser les essais cellulaires (96) . Dans cette étude, les indications de Deng *et al.* ont été suivies pour ce qui est du traitement au CoCl_2 , soit d'incuber les cellules dans du milieu sans sérum lors du traitement. Or, il est possible que ce soit cette baisse dans la concentration du sérum qui expliquerait que la toxicité cellulaire diminue lors d'un traitement avec une plus grande dose de CoCl_2 . En fait, la baisse dans la concentration de sérum pourrait entraîner une augmentation de la production de substances réactives à l'oxygène ainsi qu'une perte du potentiel de membrane mitochondrial tel qu'il a été observé par Wu *et al.* en 2012. Les auteurs suggèrent qu'une concentration croissante de CoCl_2 pourrait induire la production de la protéine *Heat-shock-protein-90* (Hsp90) qui est une chaperonne (46). La production de cette protéine serait un moyen de défense de la cellule pour permettre d'éliminer les dérangements observés suite à une baisse du sérum du milieu soit par ses pouvoirs antioxydants et pour le maintien des activités mitochondriales (93). La réalisation d'immunobuvardage contre la protéine Hsp90 dans diverses conditions de CoCl_2 , soit différentes concentration et différents temps d'incubation, serait une étape utile afin de valider l'implication de ce mécanisme dans la baisse de la cytotoxicité observée.

Étant donné que les valeurs de toxicité cellulaire sont relativement faibles (inférieures à 10%) et encore plus lorsque traité, il semble donc que le CoCl_2 n'a pas d'effet néfaste noté sur la viabilité cellulaire et il était donc justifié de continuer l'expérimentation avec ces conditions.

5.2. Effet de l'hypoxie sur l'expression des gènes de la voie de l'hypoxie

L'hypoxie a un effet sur la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α qui s'assemble avec la sous-unité HIF-1 β pour former le facteur de transcription HIF-1(54). Ce dernier augmente la transcription des différents gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (61). Les résultats de RT-PCR seront discutés et le résultat de l'immunobuvardage pour NDUFA4L2 sera discuter dans la même section que le gène.

5.2.1. Variation de l'expression de NADH déhydrogénase (ubiquinone) 1 alpha subcomplexe, 4-like 2 selon les patients

Le gène *NDUFA4L2* code pour une protéine impliquée dans l'inhibition du complexe I en situation d'hypoxie (49). Comme il a été vu ci-haut, l'expression de ce gène est modifiée suite à l'ajout de CoCl_2 dans le milieu cellulaire. Il a été observé que cette augmentation de l'ordre de deux fois et demi n'était pas significativement différente entre les deux groupes. En fait, cela est dû à la grande variabilité qui est observée entre les sujets d'un même groupe pour l'expression de ce gène. Certains sujets atteints (104, 108 et 115) avaient une expression relative au niveau basal de *NDUFA4L2* supérieure à 2 allant même jusqu'à 14 tandis que d'autre (110, 106 et 114) avait une expression relative ne dépassant pas 0,35. Il est intéressant de constater la grande variabilité de l'expression entre les individus affectés d'une même maladie autosomale récessive. De façon intéressante, les cliniciens observent également une grande variabilité au niveau phénotypique entre les patients (section 1.3.1, Charles Morin, communication personnelle). Malgré que les niveaux d'expression au niveau basal varient entre les patients, il semble que l'augmentation soit proportionnelle pour tous suite au traitement à l'exception de l'hétérozygote composé. Ce dernier est le seul patient pour qui l'augmentation de l'expression est de l'ordre de 30 fois. Or, ce patient possède des caractéristiques particulières qui le distinguent des autres patients aux niveaux génotypique et phénotypique. D'abord, c'est le seul patient qui a été observé avec deux mutations différentes sur chacun de ses allèles soit la A354V et la délétion C1277STOP (18). Malgré cette particularité, il semble posséder les mêmes manifestations cliniques que les autres soit un retard psychomoteur marqué, un tonus musculaire réduit ainsi qu'une prévalence augmentée pour les crises d'acidose métabolique (15). C'est à ce niveau que l'hétérozygote composé est le plus différent : ce patient a survécu à plus d'une dizaine de crises dans sa vie et il n'est pas autant affecté par celles-ci que le sont les autres patients (Charles Morin, communication personnelle). En effet, certaines crises ont été répertoriées alors qu'il se présentait aux urgences pour une autre cause. Ce patient semble donc posséder un mécanisme qui est propre à son statut d'hétérozygote composé et qui lui serait bénéfique.

Dans cette étude, l'expression beaucoup plus importante du gène *NDUFA4L2* (inhibant le complexe I) comparativement aux autres patients est soulevée. Bien que l'expression de ce gène ne semble pas être différente entre les personnes atteintes de la maladie et les témoins, elle pourrait s'avérer différente parmi les individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français; ceci pourrait potentiellement conduire à l'identification d'un mécanisme d'intérêt menant à une meilleure compréhension de la maladie. De plus amples investigations sont requises en ce sens.

En ce qui concerne l'expression protéique, l'effet de l'hypoxie semble être le même que ce soit pour les individus affectés ou les témoins. En effet, l'expression protéique diminue suite au traitement, ce qui est observé pour les deux groupes. Les essais préliminaires réalisés démontrent des discordances avec les résultats obtenus dans la présente étude par PCR en temps réel ainsi que ceux obtenus par Tello *et al* (2011). Ce dernier avait démontré qu'une diminution de l'oxygène ambiant menait à l'augmentation de l'expression protéique de *NDUFA4L2*, et ce, dans différents modèles cellulaires soit des lignées HeLa (cellules carcinome utérin), RCC4 (cellules de carcinome rénal), PC-12 (cellules de médulla adrénale de rat provenant d'un pheochromocytome), HL-1 (cellules de muscle cardiaque), MEF (mouse embryonic fibroblasts) et HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Ces cellules sont toutes des lignées commerciales immortalisées. Dans le cas présent, des fibroblastes primaires de lignées malades et témoins ont été utilisées. Or, il est possible que des différences existent au niveau de la réponse à l'hypoxie. En effet, la plupart des lignées utilisées dans l'étude précédente avait une origine tumorale. La réponse à l'hypoxie pourrait être différente dans une lignée de cellule primaire non cancéreuse ce qui expliquerait que les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français ont une moins grande expression protéique de *NDUFA4L2* en présence de CoCl_2 . Bien que des fibroblastes d'embryons de souris aient été utilisés dans l'expérience de Tello *et al.*, ceux-ci provenaient de souris dont l'expression de HIF-1 α était contrôlée par le Tamoxifène, agent ayant un effet sur les sites de recombinaison CRE (49). Il est donc difficile d'obtenir une comparaison valable. De plus, dans l'article de Tello *et al.* 2011, ils ont démontré que l'hypoxie induisait la diminution de l'expression protéique

de NDUFA4, qui est une protéine semblable à NDUFA4L2. Étant donné que l'anticorps utilisé n'a pas été employé dans d'autres études et que celui-ci est polyclonal, il n'est pas impossible que ce dernier soit non spécifique à NDUFA4L2 mais plutôt à NDUFA4. Davantage de recherches seraient nécessaires en ce sens pour valider ces observations. En effet, en utilisant un anticorps contre NDUFA4, il serait possible de voir si la protéine isolée est bien NDUFA4L2 et dans le cas contraire, cela expliquerait pourquoi on observe une diminution de l'expression protéique en condition hypoxique.

Il a également été observé que la protéine contrôle variait entre les puits ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Il serait donc essentiel d'utiliser plusieurs protéines contrôles lors des prochaines manipulations afin d'avoir une idée plus juste de la quantité de protéine mise dans les puits. Malgré cette différence, NDUFA4L2 était plus traduite chez les témoins par rapport aux individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français. De plus, une différence au niveau de l'expression de celle-ci entre les différents patients a été observée. Un intérêt particulier devrait être apporté à cette protéine afin de comprendre pourquoi elle est différemment exprimée entre les patients et si sa plus faible quantité par rapport aux individus non atteints est attribuable à la mutation de *LRPPRC* comme le sont de nombreuses protéines des complexes IV et I.

Étant donné que peu d'informations sont disponibles sur NDUFA4L2, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur cette protéine pour identifier ses partenaires d'interactions. Cela pourrait aider à définir des nouveaux rôles que pourraient avoir NDUFA4L2 et ainsi aider à comprendre comment elle agit dans le cas du syndrome de Leigh type Canadien-Français.

5.2.2. Stabilisation de la sous-unité alpha en hypoxie

Le gène *HIF-1* est impliqué lors de la réponse à l'hypoxie en allant moduler l'expression d'autres gènes de cette voie biologique. Le gène *HIF-1 α* , pour sa part, code pour la sous-unité α qui est stabilisée par l'hypoxie (voir introduction pour de plus amples explications). Il est donc justifié que le traitement de CoCl_2 n'affecte pas l'expression du gène puisque l'effet se manifeste au niveau de la protéine. L'expression de ce gène a été

mesurée afin de voir s'il existait une différence entre les deux groupes d'individus au niveau basal ce qui aurait pu mettre de l'emphase sur l'hypoxie comme étant un mécanisme clé dans la mécanique de la maladie. Or, ce n'est pas ce qui a été démontré ici. Il semble donc que *HIF-1* ne soit pas impliqué dans la pathogénèse du syndrome de Leigh type Canadien-Français.

5.2.3. Cytochrome c oxydase isoforme 2

La COX est l'enzyme réalisant la dernière étape de la production d'énergie. Elle est composée de 13 sous-unités dont une, la COXIV, possède un isoforme qui est sous le contrôle du facteur de transcription HIF-1. COXIV-2 est donc davantage produite lors d'une situation d'hypoxie cellulaire, ce qui constitue un moyen d'améliorer l'efficacité de la respiration cellulaire (64). Dans cette étude, la quantification de l'expression du gène COXIV-2 par PCR en temps réel demeure inchangée suite au traitement avec CoCl_2 . Il est possible que le type cellulaire utilisé ne soit pas un bon modèle en raison de son faible contenu en COXIV-2. En effet, l'étude de Hüttemann *et al.* (2001) a évalué la présence de l'isoforme dans différents tissus chez l'humain et a démontré que bien que l'expression de COXIV-1 était ubiquitaire, celle de son isoforme n'était pas uniforme dans tout le corps de l'animal (97). De plus, Fukuda *et al.* (2007) a observé une différence dans l'augmentation de l'expression de l'ARNm de COXIV-2 suite à une condition d'hypoxie selon les tissus observés, ce qui soulève l'hypothèse dont la réponse à l'hypoxie pourrait être tissu-spécifique (64). Il n'y a donc pas d'effet de l'hypoxie sur l'expression du gène *COXIV-2* dans les fibroblastes mais cette piste devrait être approfondie dans d'autres types cellulaires avant d'être écartée complètement.

5.2.4. Pyruvate déshydrogénase kinase 1

La *pyruvate déshydrogénase kinase 1* est responsable de la phosphorylation de la *pyruvate déshydrogénase*, enzyme impliquée dans la conversion du pyruvate en acétyl CoA. Cette étape est importante pour la respiration cellulaire puisqu'elle permet de contrôler directement le fonctionnement de la chaîne de transport. En effet, lorsque

l'expression de *PDK1* est élevée, cela entraîne donc une diminution de la respiration mitochondriale et limite la production de substances réactives à l'oxygène pouvant être dommageable pour la cellule (98). Dans le cas présent, il a été observé qu'une simulation de l'hypoxie par le CoCl_2 contribuait à l'augmentation de l'expression de *PDK1* et ce, autant dans les deux groupes étudiés. Les personnes atteintes du syndrome de Leigh type Canadien-Français et les témoins ont un niveau d'expression de gène *PDK1* égal au niveau basal ce qui a également été observé au niveau protéique. De plus, ce gène subit une augmentation de 4 à 5 fois lors d'une condition d'hypoxie pour les deux groupes. Étant donné que ce gène a une expression semblable chez les patients et les témoins, il serait difficile de croire à une implication de *PDK1* dans le syndrome de Leigh type Canadien-Français. Celle-ci est donc rejetée.

5.3. Limites de cette étude

Évidemment, un certain nombre de limites est soulevé dans cette étude. D'abord, le choix de la protéine contrôle peut être critiqué étant donné que celle-ci varie d'un puits à l'autre. Au départ, la protéine contrôle devant être utilisée était la porine (VDAC1). Celle-ci forme un canal à anion se retrouvant au niveau de la matrice mitochondriale (46). Après plusieurs mises au point, la protéine n'était pas visualisable dans les conditions définies. Suite aux recommandations de chercheurs du Consortium de l'acidose lactique possédant une expertise en immunobuvardage, la prohibitine a été utilisée. Cependant, dans la majorité des immunobuvardages qui ont été réalisés, une différence du niveau de protéine a été observée entre les puits. Il aurait été essentiel dans le cadre de ces essais d'utiliser une autre protéine contrôle ce qui aurait permis d'identifier plus justement si la quantité de protéine varie dans les puits en raison d'une mauvaise quantification ou si la protéine contrôle n'est pas exprimée également pour toutes les lignées. Cependant, étant donné le temps limité pour les manipulations, il n'a pas été possible de faire une telle comparaison. Pour cette raison principalement, les résultats d'immunobuvardage ne peuvent être utilisés pour conclure à un rejet de la voie de l'hypoxie au niveau protéique. Dans un contexte d'études doctorales, il est certain que ces immunobuvardages devraient être refaits afin de

pouvoir en tirer des conclusions. De plus, il aurait été intéressant d'étudier la réponse à l'hypoxie sur différents types cellulaires. Cependant, étant donné que le syndrome de Leigh type Canadien-Français est une maladie assez sévère, il va de soit qu'il est difficile d'obtenir d'autres échantillons que la peau vu la nature invasive que constituerait le prélèvement d'autres organes. Les autres types cellulaires disponibles à la Biobanque de l'acidose lactique sont des cellules musculaires (obtenues de biopsies) et des cellules du cerveau (obtenues à la suite d'interruptions de grossesses). Néanmoins, il y a très peu d'échantillons de disponibles (moins de 5 donneurs) donc il était préférable de faire les essais sur un type cellulaire plus accessible au préalable. Cependant, les fibroblastes ne seraient probablement pas le meilleur modèle puisque suivant les travaux réalisés dans le laboratoire du Dr Shoubridge, le niveau de LRPPRC serait davantage réduit dans le tissu hépatique. Ainsi, ces cellules ne constituent pas le type cellulaire le plus affecté par la maladie et il est donc possible que l'effet de l'hypoxie soit davantage perceptible dans d'autres modèles cellulaires. L'utilisation de cellules musculaires pourrait permettre de répondre à cette question. Également, le choix des lignées pour les expérimentations sur l'hypoxie est discutable. En fait, nous avons utilisé les lignées de l'hétérozygote, du patient 106 et du patient 104. Comme il est possible de le remarquer dans le tableau 1, les deux dernières lignées n'appartiennent pas aux patients ayant le phénotype le plus sévère. Nous avons choisi ces lignées afin d'avoir un point de comparaison avec les résultats obtenus par les chercheurs du groupe de recherche du Consortium de l'acidose lactique qui utilisaient également ces lignées, particulièrement la 106. L'inclusion de l'hétérozygote visait à identifier si ce dernier se comportait différemment puisqu'il s'agit du seul patient ayant deux allèles distincts et présentant un phénotype particulier (i.e. ayant survécu à de nombreuses crises). De plus, nous devons restreindre le nombre de lignées étant donné l'importance des manipulations liées à la culture et la dégradation rapide de la sous-unité HIF-1 α . Il est certain qu'il aurait été intéressant d'observer l'hypoxie sur une lignée plus sévère telle la 102 ou la 115. Cependant, malgré que les deux lignées utilisées soient de phénotypes semblables, il est possible d'observer des différences entre les niveaux basaux de protéines. Basé sur la littérature scientifique et sur nos résultats, il est envisageable que ces différences soient potentiellement augmentées dans les lignées de patients plus sévèrement touchés par la maladie. Une autre des limites de cette étude qui sera discutée

plus en détail dans la prochaine section est le résultat des puces à ADN. Bien entendu, comme le présent projet repose sur l'identification du gène *NDUFA4L2* dans les puces, il est nécessaire de se questionner sur cet élément de la démarche scientifique utilisée.

5.4. Études d'expression par puces à ADN

Comme il a été mentionné précédemment, le gène *NDUFA4L2* a été le seul à ressortir significatif pour ce qui est de l'étude d'expression. Quatre autres gènes ont également été mesurés par PCR en temps réel sans toutefois démontrer de différence significative entre les deux groupes d'individus. Le gène *ND6* code pour une sous-unité du complexe I. Celui-ci est encodé au niveau mitochondrial et a déjà été décrit dans les recherches de Sasarman *et al.* (2010) comme n'étant pas affecté par le défaut de *LRPPRC*, contrairement aux autres ARNm mitochondriaux (35). Or, deux résultats discordants ont été observés dans l'étude des puces à ADN. D'abord, les puces ont démontré une plus grande expression chez les patients par rapport aux témoins. Cependant, les résultats du PCR ont démontré une différence significative en faveur des témoins. Ces résultats soulèvent plusieurs questionnements. Néanmoins, certaines hypothèses pourraient expliquer ceux-ci. En premier lieu, il est important de souligner que les puces n'ont pas toutes été réalisées au même moment ni par le même manipulateur. Ces deux variables peuvent donc entraîner le phénomène de « *batch effects* » (99). Plusieurs programmes existent pour normaliser les résultats et corriger pour ces variations afin de ne pas contrer l'effet biologique observé. Dans le cas présent, le logiciel ComBat a été utilisé (100). Malgré le fait que l'analyse utilisée soit robuste, il est possible que les variations observées soient dues à la technique.

Également, l'ARN qui a été utilisé pour faire les RT-PCR provenait des mêmes échantillons qui ont été envoyés pour faire les puces. Étant donné qu'une partie des extractions ait été effectuée 5 ans auparavant, il est possible que l'ARN pour ces échantillons ait été en partie dégradé et que cette dégradation soit variable d'un échantillon à l'autre, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre les deux méthodes.

L'ARN a été conservé à -80°C pendant cette période ce qui est indiqué pour une période de un an, et donc il se pourrait que la période de 5 ans ait été trop longue (101).

L'utilisation d'un seul gène contrôle peut également être questionnée. En fait, il est de plus en plus conseillé d'en utiliser plusieurs dans les études d'expression (102). Il a été noté que certains gènes dit « *housekeeping* », donc essentiels pour le bon fonctionnement cellulaire, pouvaient varier dépendamment de la condition à laquelle ils étaient soumis (103). Étant donné que le thermocycleur utilisé ne pouvait contenir plus de 100 réactions à la fois, l'utilisation d'un second gène contrôle aurait été difficile puisque déjà les deux autres gènes étaient en multiplex.

Une grande variabilité a été observé entre les différents patients et ce, même si les puces ont été réalisées au même moment. Cela concorde avec la grande variabilité phénotypique identifiée chez les patients. De plus, la taille d'un échantillon nécessaire pour faire une étude de puces à ADN est déterminée selon l'amplitude de la variation présente dans la population en plus des autres facteurs permettant d'identifier une différence d'expression entre deux groupes d'individus d'une condition donnée (valeur de p, seuil signification et taux de faux positifs) (104). Dans la présente étude, une grande variabilité interindividuelle a été observée entre les patients pour l'expression des gènes. Un plus grand nombre d'individus aurait sans doute permis de minimiser cette variabilité afin d'améliorer la détection de différences significatives dues à la biologie de la maladie. Cependant, le nombre restreint d'individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français était un facteur limitant et les puces ont donc été réalisées à partir de l'ensemble des individus répertoriés à la Biobanque de l'acidose lactique, c'est-à-dire 12 personnes. Ces différences interindividuelles ont été également démontrées lors des essais sur l'hypoxie, conditions dans lesquelles toutes les extractions ont été réalisées par la même personne dans un court laps de temps.

Bien que la technologie des puces à ADN est ici critiquable, cette approche à tout de même permis de mettre en évidence des différences déjà documentées dans la maladie (à titre d'exemple les gènes *COX1*, *COX3*, et *ND4* sont ressortis comme étant différemment exprimés chez les patients atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français par rapport aux témoins ce qui a été démontré par l'équipe du Dr Shoubridge) et de cibler *NDUFA4L2* comme nouveau candidat pour l'étude des mécanismes en cause dans la maladie. Son importance a pu être démontrée par sa différence d'expression protéique entre les patients et les témoins. Son rôle mérite donc d'être davantage connu dans le contexte du syndrome de Leigh type Canadien-Français.

CONCLUSION

La voie de l'hypoxie régulée par HIF-1 est un mécanisme de compensation permettant aux cellules de s'adapter à un changement dans le niveau d'oxygène ambiant pour maintenir une respiration cellulaire efficace. Dans cette étude, il a été proposé que les gènes induits dans l'hypoxie puissent être en cause dans le syndrome de Leigh type Canadien-Français, maladie génétique rare dont la fréquence est élevée au Saguenay-Lac-Saint-Jean. L'hypothèse selon laquelle ces gènes seraient davantage exprimés chez les patients par rapport aux témoins n'a pas été confirmée au niveau génétique. Comme la réponse à l'hypoxie était semblable chez les sujets affectés par la maladie et chez les témoins, l'implication de cette voie dans le contexte du syndrome de Leigh type Canadien-Français a été rejetée dans les fibroblastes de patients. Les résultats obtenus au niveau protéique n'ont pas permis de se prononcer sur l'implication de cette voie dans le contexte de la maladie. Ils devront donc être refaits en utilisant une protéine contrôle étant invariable d'un patient à l'autre. Malgré cela, il a été noté que la protéine NDUFA4L2 était moins exprimée chez les patients par rapport aux témoins comme le sont les autres protéines composant le complexe IV de la chaîne de transport soulignant son importance dans la maladie. De plus, il a été observé que l'expression de certaines protéines variait d'un patient à l'autre, particulièrement chez l'hétérozygote composé qui a un phénotype très résistant par rapport aux autres malades.

Dans le cadre des recherches sur le syndrome de Leigh type Canadien-Français, il serait judicieux de chercher à comprendre pourquoi les sujets malades présentent des variabilités au niveau du phénotype clinique observé et comment se manifeste ces différences. L'étude de voies biologiques sur un nombre restreint de lignées cellulaires réduit l'ampleur de la tâche et augmente la précision des manipulations. Cependant, il devient clair que ces découvertes ne pourront être généralisées pour tous les individus atteints en raison des différences qui demeurent parmi ces derniers. Essayer de comprendre qu'est-ce qui biologiquement expliquerait que le patient hétérozygote, qui a survécu à plus de dix crises dans sa vie comparativement à des enfants qui sont décédés des

suites de leur première crise, ait un phénotype résistant et de survivant serait judicieux et représente une piste de recherche essentielle.

NDUFA4L2, dont les fonctions connues à ce jour comme son rôle dans l'inhibition du complexe I en situation d'hypoxie, demeure à préciser dans le syndrome de Leigh type Canadien-Français. L'étude de ses partenaires d'interactions pourrait permettre de comprendre comment agit cette protéine dans cette pathologie. De même, il serait intéressant de mesurer l'effet d'une perte ou d'une augmentation de cette protéine pour les cellules d'individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français afin de voir si sa présence est bénéfique ou bien si, au contraire, elle est responsable du déficit observé au niveau de l'activité de la chaîne mitochondriale.

Cette étude a donc permis d'identifier NDUFA4L2 qui, suivant ces premiers résultats, semble un gène impliqué dans le syndrome de Leigh type Canadien-Français. Son rôle exact reste toutefois à préciser.

BIBLIOGRAPHIE

1. Heyer E. One founder/one gene hypothesis in a new expanding population: Saguenay (Quebec, Canada). *Human biology*. 1999;71(1):99-109. Epub 1999/02/11.
2. Scriver CR. Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001;2:69-101. Epub 2001/11/10.
3. Charbonneau H, Desjardins B, Légaré J, Denis H. The population of the St.Lawrence Valley, 1608-1760 2000. Cambridge University Press ed.
4. Laprise C, Vigneault A, Tremblay J, Gaudet D. L'ABC de l'ADN 2005. 42 p.
5. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1951;14(3):216-21. Epub 1951/08/01.
6. Lee N, Daly MJ, Delmonte T, Lander ES, Xu F, Hudson TJ, et al. A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16. *American journal of human genetics*. 2001;68(2):397-409. Epub 2001/01/13.
7. Cooper MP, Qu L, Rohas LM, Lin J, Yang W, Erdjument-Bromage H, et al. Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex. *Genes & development*. 2006;20(21):2996-3009. Epub 2006/10/20.
8. Robinson BH. Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatr Res*. 2000;48(5):581-5. Epub 2000/10/25.
9. Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol*. 2008;39(4):223-35. Epub 2008/09/23.
10. Rahman S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, et al. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals of neurology*. 1996;39(3):343-51. Epub 1996/03/01.
11. Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency. *American journal of medical genetics*. 2001;106(1):46-52.
12. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, et al. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet*. 1998;20(4):337-43. Epub 1998/12/08.
13. National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference. [updated octobre 2011; cited 2013 26 octobre]; Available from : <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/leigh-syndrome>.

14. Association de l'acidose lactique du Saguenay-Lac-Saint-Jean. Historique. 2008 [cited 2012 28 mars]; Available from : <http://aal.qc.ca/index>.
15. Morin C, Mitchell G, Laroche J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, et al. Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *American journal of human genetics*. 1993;53(2):488-96. Epub 1993/08/01.
16. Gaudet D, Arsenault S, Belanger C, Hudson T, Perron P, Bernard M, et al. Procedure to protect confidentiality of familial data in community genetics and genomic research. *Clinical genetics*. 1999;55(4):259-64. Epub 1999/06/11.
17. Kadenbach B, Merle P. On the function of multiple subunits of cytochrome c oxidase from higher eukaryotes. *FEBS letters*. 1981;135(1):1-11. Epub 1981/11/30.
18. Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(2):605-10. Epub 2003/01/17.
19. Merante F, Petrova-Benedict R, MacKay N, Mitchell G, Lambert M, Morin C, et al. A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *American journal of human genetics*. 1993;53(2):481-7. Epub 1993/08/01.
20. Kanehisa Laboratories. [cited 2013 30 mars]; Available from : <http://www.kanehisa.jp/>.
21. Toole G., Toole S. *Essential A2 Biology for OCR 2004*. 176 p.
22. Harley JP, Prescott LM, Klein DA, Sherwood LM, Willey JM, Woolverton CJ. *Microbiologie 2010*. De Boeck Supérieur ed. 1216 p.
23. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Damell J. *Biologie moléculaire de la cellule 2005*. De Boeck Supérieur ed. 1096 p.
24. Johnson G.B., Losos J.B., Raven P.H., S.S. S. *Biologie 2011*. De Boeck Supérieur ed. 1406 p.
25. Martin C, Riou B, Vallet B. *Physiologie humaine appliquée 2006*. 1098 p.
26. E.D.P. DR, E.M.F. DR. *Biologie cellulaire et moléculaire 1983*. Presses Université Laval ed. 758 p.
27. Woodbury CP. *Biochemistry for the pharmaceutical sciences 2011*: Jones & Bartlett Publishers. 500 p.

28. Eckert R, Randall D. Physiologie animale: mécanismes et adaptations 1999. De Boeck supérieur ed. 840 p.
29. Robinson BH. Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab.* 2006;89(1-2):3-13. Epub 2006/07/21.
30. Costill DL, Wilmore JH. Physiologie du sport et de l'exercice, Adaptation physiologique à l'exercice physique 2006. De Boeck Supérieur ed. 625 p.
31. Legault J, Larouche PL, Cote I, Bouchard L, Pichette A, Robinson BH, et al. Low-concentration methylene blue maintains energy production and strongly improves survival of Leigh syndrome French Canadian skin fibroblasts. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques.* 2011;14(3):438-49. Epub 2011/12/29.
32. Ouellette G, Morin C, Vézina H. Trousse d'information sur l'acidose lactique. 2008. p. 48.
33. Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, Robinson BH. The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *The Biochemical journal.* 2004;382(Pt 1):331-6. Epub 2004/05/14.
34. Gohil VM, Nilsson R, Belcher-Timme CA, Luo B, Root DE, Mootha VK. Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(18):13742-7. Epub 2010/03/12.
35. 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(8):1315-23. Epub 2010/03/05.
36. Ruzzenente B, Metodiev MD, Wredenberg A, Bratic A, Park CB, Camara Y, et al. LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *The EMBO journal.* 2012;31(2):443-56. Epub 2011/11/03.
37. Chujo T, Ohira T, Sakaguchi Y, Goshima N, Nomura N, Nagao A, et al. LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. *Nucleic acids research.* 2012;40(16):8033-47. Epub 2012/06/05.
38. Xu F, Addis JB, Cameron JM, Robinson BH. LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model. *The Biochemical journal.* 2012;441(1):275-83. Epub 2011/09/02.

39. Sondheimer N, Fang JK, Polyak E, Falk MJ, Avadhani NG. Leucine-rich pentatricopeptide-repeat containing protein regulates mitochondrial transcription. *Biochemistry*. 2010;49(35):7467-73. Epub 2010/08/04.
40. Rolland SG, Motori E, Memar N, Hench J, Frank S, Winklhofer KF, et al. Impaired complex IV activity in response to loss of LRPPRC function can be compensated by mitochondrial hyperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(32):E2967-76. Epub 2013/07/24.
41. Michaud M, Barakat S, Magnard S, Rigal D, Baggetto LG. Leucine-rich protein 130 contributes to apoptosis resistance of human hepatocarcinoma cells. *Int J Oncol*. 2011;38:169-78.
42. Tian T, Ikeda J, Wang Y, Mamat S, Luo W, Aozasa K, et al. Role of leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein (LRPPRC) for anti-apoptosis and tumorigenesis in cancers. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2462-73. Epub 2012/02/14.
43. Achiron A, Mashiach R, Zilkha-Falb R, Meijler MM, Gurevich M. Polymerase I pathway inhibitor ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2013. Epub 2013/09/04.
44. Zou J, Yue F, Jiang X, Li W, Yi J, Liu L. Mitochondrion-associated protein LRPPRC suppresses the initiation of basal levels of autophagy via enhancing Bcl-2 stability. *The Biochemical journal*. 2013;454(3):447-57. Epub 2013/07/05.
45. Gaweda-Walerych K, Zekanowski C. Integrated pathways of parkin control over mitochondrial maintenance - relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2013;73(2):199-224. Epub 2013/07/05.
46. National Center for Biotechnology Information. 2013 [cited 2013 10 septembre]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5245>.
47. Andreas K, Haupl T, Lubke C, Ringe J, Morawietz L, Wachtel A, et al. Antirheumatic drug response signatures in human chondrocytes: potential molecular targets to stimulate cartilage regeneration. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(1):R15. Epub 2009/02/05.
48. Castelblanco E, Gallel P, Ros S, Gatus S, Valls J, De-Cubas AA, et al. Thyroid paraganglioma. Report of 3 cases and description of an immunohistochemical profile useful in the differential diagnosis with medullary thyroid carcinoma, based on complementary DNA array results. *Human pathology*. 2012;43(7):1103-12. Epub 2012/01/03.
49. Tello D, Balsa E, Acosta-Iborra B, Fuertes-Yebra E, Elorza A, Ordonez A, et al. Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1alpha decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity. *Cell metabolism*. 2011;14(6):768-79. Epub 2011/11/22.

50. Brunner LS, Smeltzer SC, Suddarth DS, Bare B. Soins infirmiers en médecine et en chirurgie: fonctions respiratoire, cardiovasculaire et hématologique 2006. De Boeck Supérieur ed. 680 p.
51. Chandel NS, Budinger GR, Choe SH, Schumacker PT. Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(30):18808-16. Epub 1997/07/25.
52. Aragonés J, Fraisl P, Baes M, Carmeliet P. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell metabolism*. 2009;9(1):11-22. Epub 2009/01/02.
53. Zepeda AB, Pessoa A, Jr., Castillo RL, Figueroa CA, Pulgar VM, Farias JG. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell biochemistry and function*. 2013;31(6):451-9. Epub 2013/06/14.
54. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4):393-402. Epub 2008/05/24.
55. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-5. Epub 1999/06/03.
56. Nagy MA. HIF-1 is the commander of gateways to cancer. *Cancer science and therapy*. 2011;035-040 (2011) - 035:35-40.
57. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5):343-54. Epub 2004/05/04.
58. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(23):12969-73. Epub 1996/11/12.
59. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta biochimica Polonica*. 2004;51(3):563-85. Epub 2004/09/28.
60. Nguyen SH, Bourouina R. Manuel d'anatomie et de physiologie 2008. Wolters Kluwer France ed. 4221 p.
61. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1797(6-7):1171-7. Epub 2010/02/16.
62. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & development*. 2000;14(16):1983-91. Epub 2000/08/19.

63. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*. 2006;3(3):177-85. Epub 2006/03/07.
64. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007;129(1):111-22. Epub 2007/04/10.
65. Wang G, Hazra TK, Mitra S, Lee HM, Englander EW. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic acids research*. 2000;28(10):2135-40. Epub 2000/04/25.
66. Karovic O, Tonazzini I, Rebola N, Edstrom E, Lovdahl C, Fredholm BB, et al. Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1alpha. *Biochemical pharmacology*. 2007;73(5):694-708. Epub 2006/12/16.
67. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107(1):43-54. Epub 2001/10/12.
68. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(18):15911-6. Epub 2003/02/28.
69. Deng S, Yang Y, Han Y, Li X, Wang X, Zhang Z, et al. UCP2 inhibits ROS-mediated apoptosis in A549 under hypoxic conditions. *PloS one*. 2012;7(1):e30714. Epub 2012/02/01.
70. BeMiller JN, Bradley J, Carpenter CR, Chang SK, Daubert CR, Dogan H, et al. *Food analysis 2010*. Springer ed. 601 p.
71. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54. Epub 1976/05/07.
72. Handel TM, Hamel DJ. *Methods in enzymology-Chemokines part B 2009*. Academic Press ed. 350 p.
73. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Molecular Biology*. 1994;32:9-15. Epub 1994/01/01.
74. Qiagen. 2013 [cited 2013 26 mars]; Available from : <http://www1.qiagen.com/>.
75. Tuffaha M. *Phenotypic and Genotypic Diagnosis of Malignancies 2008*. John Wiley and sons ed. 298 p.

76. Biosciences Q. 2013 [cited 2013 28 mars]; Available from : <http://www.quantabio.com>.
77. Erber WN. Diagnostic techniques in hematological malignancies 2010. Cambridge University Press ed. 336 p.
78. Pelt-Verkuil E, Belkum A, Hays JP. Principles and Technical Aspects of Polymerase Chain Reaction Amplification 2008. Springer ed. 325 p.
79. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology. 2002;2:11.
80. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. J Mol Endocrinol. 2005;34(3):597-601. Epub 2005/06/16.
81. Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, et al. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4531-6. Epub 2003/10/09.
82. John Libbey Eurotext. 2007 [cited 2013 4 avril]; Available from: <http://www.jle.com/fr/revues/bio>.
83. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology. 2002;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002/08/20.
84. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques. 2005;39(1):75-85. Epub 2005/08/03.
85. Cartwright T. Animal Cells as Bioreactors 1994. Cambridge University Press ed. 184 p.
86. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. Annals of the New York Academy of Sciences. 2002;973:443-7. Epub 2002/12/18.
87. Kim EH, Won JH, Hwang I, Yu JW. Cobalt Chloride-induced Hypoxia Ameliorates NLRP3-Mediated Caspase-1 Activation in Mixed Glial Cultures. Immune network. 2013;13(4):141-7. Epub 2013/09/07.
88. Lan A, Xu W, Zhang H, Hua X, Zheng D, Guo R, et al. Inhibition of ROS-activated p38MAPK pathway is involved in the protective effect of H₂S against chemical hypoxia-induced inflammation in PC12 cells. Neurochemical research. 2013;38(7):1454-66. Epub 2013/04/30.

89. Ji Q, Yang L, Zhou J, Lin R, Zhang J, Lin Q, et al. Protective effects of paeoniflorin against cobalt chloride-induced apoptosis of endothelial cells via HIF-1 α pathway. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2012;26(3):455-61. Epub 2012/01/25.
90. Rovetta F, Stacchiotti A, Faggi F, Catalani S, Apostoli P, Fanzani A, et al. Cobalt triggers necrotic cell death and atrophy in skeletal C2C12 myotubes. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;271(2):196-205. Epub 2013/05/21.
91. Wang LX, Zeng JP, Wei XB, Wang FW, Liu ZP, Zhang XM. Effects of scutellarin on apoptosis induced by cobalt chloride in PC12 cells. *The Chinese journal of physiology*. 2007;50(6):301-7. Epub 2008/04/30.
92. Babich H, Gold T, Gold R. Mediation of the in vitro cytotoxicity of green and black tea polyphenols by cobalt chloride. *Toxicology letters*. 2005;155(1):195-205. Epub 2004/12/09.
93. Wu K, Xu W, You Q, Guo R, Feng J, Zhang C, et al. Increased expression of heat shock protein 90 under chemical hypoxic conditions protects cardiomyocytes against injury induced by serum and glucose deprivation. *International journal of molecular medicine*. 2012;30(5):1138-44. Epub 2012/08/28.
94. Voccoli V, Mazzoni F, Garcia-Gil M, Colombaioni L. Serum-withdrawal-dependent apoptosis of hippocampal neuroblasts involves Ca⁺⁺ release by endoplasmic reticulum and caspase-12 activation. *Brain research*. 2007;1147:1-11. Epub 2007/04/03.
95. Dennis MD, McGhee NK, Jefferson LS, Kimball SR. Regulated in DNA Damage and Development 1 (REDD1) promotes cell survival during serum deprivation by sustaining repression of signaling through the mechanistic target of rapamycin in complex 1 (mTORC1). *Cellular signalling*. 2013. Epub 2013/09/11.
96. Corporation P. CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity Assay. USA: 2012.
97. Huttemann M, Kadenbach B, Grossman LI. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene*. 2001;267(1):111-23. Epub 2001/04/20.
98. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*. 2006;3(3):177-85. Epub 2006/03/07.
99. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet*. 2010;11(10):733-9. Epub 2010/09/15.
100. Chen C, Grennan K, Badner J, Zhang D, Gershon E, Jin L, et al. Removing batch effects in analysis of expression microarray data: an evaluation of six batch adjustment methods. *PloS one*. 2011;6(2):e17238. Epub 2011/03/10.

101. Corporation LT. Technical Buletin #159: Working with RNA. 2013 [cited 2013 28 septembre]; Available from: <http://www.lifetechnologies.com>.

102. Singh J. The use of Multiple Housekeeping Genes for Normalization of Quantitative RT-PCR Data.

103. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and biophysical research communications. 2004;313(4):856-62. Epub 2004/01/07.

104. Wei C, Li J, Bumgarner RE. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. BMC genomics. 2004;5:87. Epub 2004/11/10.

**ANNEXE 1: CARACTÉRISTIQUES DES LIGNÉES CELLULAIRES
UTILISÉES POUR FAIRE LES PUCES À ADN**

Patients	Sexe	Âge	Âge	Sexe	Témoins
101-0002-1	M	25	M	24	321-0004-2
102-0002-1	M	25	M	27	323-0004-2
103-0001-1	F	23	F	28	303-0003-2
104-0002-1	M	6	M	8	332-0004-1
105-0001-1	F	17	F	17	330-0003-1
106-0001-1	F	8	F	9	304-0003-2
108-0001-1	F	4	F	5	304-0005-2
114-0002-1	M	5	M	5	331-0004-1
110-0001-1	F	21	F	23	328-0003-1
116-0001-1	F	19 SA	F	22SA	329-0003-1
115-0002-1	M	2 mois	M	1	335-0002-1
112-0002-1	M	12 SA	M	14 SA	305-0004-1

Chaque patient a été apparié avec un témoin de même âge et de même sexe. Un écart de ± 3 ans a été respecté chez les enfants et de ± 5 ans chez les adultes pour réduire la variabilité due à cette variable.

ANNEXE 2: RÉSULTATS DE L'ANALYSE DES PUCES À ADN

Symbole du gène*	Localisation*	#Sonde	Fic†	P	Fonctions	Références
Chaîne de transport des électrons et production d'énergie						
<i>COX1</i>	M	1553538_s_at	-2.27	7.57E-07	Sous-unité du complexe IV	Kadenbach et al. 1983
<i>COX3</i>	M	238199_x_at	-3.00	7.8E-11	Sous-unité du complexe IV	Kadenbach et al. 1983
<i>DCAF6</i> <i>ND4</i>	1q24.2	224372_at	-1.61	3.19E-07	Sous-unité du complexe I	Ragan, 1987
<i>ND6</i>	M	1553575_at	1.73	3.34E-05	Sous-unité du complexe I	Ragan, 1987
<i>NDUFA4L2</i>	12q13.3	218484_at	1.86	0.035	Réduit l'activité du complexe I	Tello et al. 2011
<i>UCP2</i>	11q13	208998_at	1.68	0.042	Effet sur potentiel de membrane mitochondriale	Fleury et al. 1997
Cycle cellulaire et apoptose						
<i>AMIGO2</i>	12q13.11	222108_at	1.62	0.042	Inhibe l'apoptose	Ono et al. 2003
<i>BIRC5</i>	17q25	202094_at	-1.81	0.036	Inhibe l'apoptose	Ambrosini et al. 1997
<i>CSRNP1</i>	3p22	225557_at	1.60	0.006	Induit l'apoptose	Ishiguro et al. 2001
<i>FOS</i>	14q24.3	209189_at	2.47	0.023	Régulation de l'apoptose	Wang et al. 2013
<i>FOSB</i>	19q13.32	202768_at	2.79	0.016	Régulation de la survie et différenciation des kératinocytes	Eckert et al. 2013
<i>GPC4</i>	Xq26.1	204984_at	1.58	0.021	Contrôle la division cellulaire et la croissance	Veugelers et al. 1998
		204983_s_at	1.54	0.022		
<i>IER3</i>	6p21.3	201631_s_at	1.82	0.008	Protège cellules de l'apoptose	Wu et al. 1998
<i>JUNB</i>	19p13.2	201473_at	1.83	4.38E-04	Différenciation cellulaire	Jacobs-Helber et al. 2002
<i>NUAK1</i>	12q23.3	204589_at	1.56	0.034	Prolifération cellulaire	Hou et al. 2011
<i>TIMP3</i>	22q12.3	201147_s_at	-1.60	0.029	Induit l'apoptose	Koers-Wunrau et al. 2013
		201149_s_at	-1.51	0.033		

Composants structuraux						
<i>COL11A1</i>	1p21	204320_at	4.06	0.012	Forme la matrice extracellulaire de cartilage	Li et al. 1995
		37892_at	4.41	0.013		
		229271_x_at	3.94	0.017		
<i>LAMA4</i>	6q21	202202_s_at	-1.52	0.013	Constituant de la membrane basale	Richards et al. 1994
<i>LIMCH1</i>	4p13	212327_at	2.19	0.031	Sites d'adhésion cellulaire	Oochio et al. 2004
		212328_at	2.21	0.032		
Métabolisme du glucose et des lipides						
<i>ATF3</i>	1q32.3	202672_s_at	2.06	0.035	Inhibe la gluconéogénèse	Allen-Jennings et al. 2002
<i>GUSBPI</i>	5p14.3	255888_at	1.54	0.002	Dégradation glycosamino-glycan (pseudogène)	Shiple et al. 1993
<i>HES1</i>	3q28-q29	203394_s_at	2.17	0.026	Répresseur de α -glucosidase	Yan et al. 2002
<i>PFKFB4</i>	3p22-p21	228499_at	1.61	0.024	Impliquée dans glycolyse	Li et al. 2012
<i>PLA2G16</i>	11q12.3	209581_at	1.82	0.014	Métabolisme des phospholipides	Uyama et al. 2009
<i>PPP1R3B</i>	8p23.1	222662_at	1.52	0.046	Régule synthèse glycogène	Doherty et al. 1995
Réponse immunitaire						
<i>CD9</i>	12p13.3	201005_at	-1.74	0.032	Protéine surface /antigène	Boucheix et al. 1991
<i>CTSC</i>	11q14.2	225647_s_at	-3.11	0.004	Réponse inflammatoire	Kono et al. 2012
		201487_at	-2.55	0.004		
		231234_at	-2.11	0.010		
		225646_at	-2.45	0.013		
<i>EGRI</i>	5q31.2	201693_s_at	2.37	0.002	Réponse inflammatoire	Cho et al. 2006
		227404_s_at	1.98	0.003		
		201694_s_at	1.67	0.003		

<i>FCRLB</i>	1q23.3	238452_at	1.52	0.029	Récepteur immunoglobuline	Chikaev et al. 2005
<i>GAL</i>	11q13.3	214240_at	-1.53	0.032	Messenger cellulaire	Bauer et al. 2008
<i>HS2ST1/LOC339524</i>	1p22.3	215039_at	1.54	0.049	Réponse inflammatoire	Axelsson et al. 2012
<i>LIF</i>	22q12.2	205266_at	1.59	0.016	Cytokine	Nakashima et al. 1999
<i>NAMPT</i>	7q22.3	243296_at	1.56	0.039	Inflammation	Romacho et al. 2009
<i>NFKBIZ</i>	3p12-q12	223217_s_at	1.59	0.030	Interleukine	Haruta et al. 2001
<i>SAMD9</i>	7q21.2	228531_at	-1.60	0.026	Inflammation cutanée	Hershkovitz et al. 2011
<i>SOCS3</i>	17q25.3	227697_at	1.58	0.019	Régulation négative des cytokines	Hill et al. 2010
Transcription						
<i>BHLHE40</i>	3p26	201170_s_at	1.78	0.006	Répresseur de transcription	Seuter et al. 2013
<i>DLX1</i>	2q31.1	242138_at	-1.88	0.016	Production d'interneurones de l'embryon	Cobos et al. 2005
<i>EBF1</i>	5q34	229487_at	-1.56	0.045	Développement du glomérule	Fretz et al. 2013
<i>EID3</i>	12q23.3	231292_at	-1.57	0.043	Répresseur de transcription	Bavner et al. 2005
<i>EN1</i>	2q14.2	220559_at	1.66	0.023	Rôle dans développement de l'embryon	Logan et al. 1989
<i>FOXF2</i>	6p25.3	206377_at	-1.59	0.021	Activation de la transcription	Hellqvist et al. 1998
<i>RARB</i>	3p24.2	205080_at	1.91	0.050	Récepteur de l'acide rétinoïque	Brand et al. 1988
<i>SOX9</i>	17q24.3	202935_s_at	2.63	0.036	Développement du squelette et testicules	Cox et al. 2011
<i>SOX11</i>	2p25.2	204914_s_at	1.93	0.048	Développement système nerveux	Jay et al. 1995
<i>ZIC1</i>	3q24	206373_at	3.11	0.019	Développement	Aruga et al. 1994
Transduction						
<i>ADRBK2</i>	22q12.1	228771_at	1.60	0.044	Récepteur b-adrénergique	Calabrese et al. 1994

<i>ARHGAP29</i>	1p22.1	1558280_s_at	-1.70	0.014	Régulation de RHO	Myagmar et al. 2005
<i>CPE</i>	4q32.3	201116_s_at	2.31	0.030	Biosynthèse d'hormones	Chen et al. 2001
<i>DUSP1</i>	5q34	201044_x_at	1.53	0.035	Régule la signalisation	Patterson et al. 2009
<i>HTR2A</i>	17q14-21	207135_at	1.78	0.048	Récepteur sérotonine	Peroutka 1988
<i>NEDD9</i>	6p25-p24	202149_at	2.78	0.007	Signalisation dans le cytosquelette	Manie et al. 1997
		202150_s_at	1.61	0.013		
<i>MC4R</i>	18q22	221467_at	-1.80	0.004	Récepteur de mélanocortine	Gantz et al. 1993
<i>RGS5</i>	1q23.1	209071_s_at	1.72	0.037	Régulation de la signalisation des protéines G	Holobotovskyy et al. 2013
<i>RGS20</i>	8q11.23	210138_at	-1.62	0.042	Régulation de la signalisation des protéines G	NCBI
<i>SGK223</i>	8p23.1	235085_at	1.65	0.038	Active signalisation RhoA	Tanaka et al. 2006
<i>SIK1</i>	21q22.3	208078_s_at	1.85	0.045	Kinase impliquée dans transduction	Lo et al. 2001
Autres						
<i>AIM1</i>	6q21	212543_at	-1.62	0.018	Absent dans mélanome	Trent et al. 1990
<i>C11orf87</i>	11q22.3	236532_at	-2.22	0.017	-	-
<i>CNTN1</i>	12q11-q12	227202_at	1.54	0.027	Maturation des oligodendrocytes	Hu et al. 2003
<i>EFNA5</i>	5q21	233814_at	-1.54	0.016	Communication cellulaire	Konstantinova et al. 2007
<i>FAM26F</i>	6q22.1	229390_at	1.65	0.047	Développement oviducte	Song et al. 2011
<i>IER2</i>	19p13.2	202081_at	1.55	0.004	Motilité cellule tumorale	Neeb et al. 2012
<i>KIAA1462</i>	10p11.23	213316_at	1.52	0.029	Jonctions intercellulaires	Akashi et al. 2011
<i>PDZRN4</i>	12q12	220595_at	1.51	0.002	Ubiquitination	Katoh et Katoh 2004
<i>PLEKHA2</i>	8p11.22	238013_at	1.57	0.023	Migration des cellules B malignes	Li et al. 2013

<i>PLOD2</i>	3q24	202619_s_at	1.56	0.046	Hydroxylation des lysyls dans collagène	Valtavaara et al. 1997
<i>PLXDC2</i>	10p12.31	227276_at	2.19	0.048	Développement système nerveux	Miller-Delaney et al. 2011
<i>RPL31</i>	2q11.2	200962_at	1.89	0.010	Composant sous-unité 60S	NCBI

*Les symboles et les localisations chromosomiques sont issus du site National Center for Biotechnology Information (NCBI) version GRCh37.

‡ : différence d'expression. Une différence d'expression négative signifie que le gène est moins exprimé chez les individus atteints du syndrome de Leigh type Canadien-Français comparativement aux témoins et inversement pour une donnée positive.