



HAL
open science

La fonction mitochondriale dans un modèle murin de Porphyrie Aiguë Intermittente (PAI)

Chadi Homedan

► **To cite this version:**

Chadi Homedan. La fonction mitochondriale dans un modèle murin de Porphyrie Aiguë Intermittente (PAI). Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT: 2015ANGE0077 . tel-02280794

HAL Id: tel-02280794

<https://theses.hal.science/tel-02280794>

Submitted on 6 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Mr. Chadi HOMEDAN

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

Grade de Docteur de l'Université d'Angers

Ecole doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biochimie

Soutenue le : 02/07/2015 à Angers

La fonction mitochondriale dans un modèle murin de Porphyrie Aiguë Intermittente (PAI)

Jury

Rapporteurs : Mr. Hubert de Verneuil, Professeur. Université Victor Segalen Bordeaux II

Mr. François Feillet, Professeur. Université de Lorraine

Examineurs : Mr. Jean Charles Deybach, Professeur. Université Paris VII

Directeur de Thèse : Mr. Yves Malthièry, Professeur. Université Angers

Co-directeur de Thèse : Mr. Pascal Reynier, Professeur. Université Angers

Remerciements :

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, monsieur Yves Malthiery, pour toute son aide. En 2003, vous m'avez ouvert les portes de votre service pour m'apprendre la Biochimie dans son versant médical et en recherche fondamentale; je vous en suis très reconnaissant.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à monsieur Pascal Reynier. Grâce à ton soutien permanent depuis de nombreuses années, j'ai traversé beaucoup d'obstacles et j'ai pu enfin valoriser mon travail de thèse.

Je tenais à remercier messieurs les professeurs Hubert de Verneuil et François Feillet qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie monsieur le professeur Jean-Charles Deybach pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, pour sa collaboration scientifique ainsi que pour le temps qu'il a consacré à m'aider à la réalisation de ce travail.

Je remercie également monsieur le professeur Hervé Puy et la docteure Caroline Schmitt du Centre Français des Porphyries (CFP). Je vous remercie pour tout le temps que vous avez consacré à produire les souris et à m'aider à valoriser ce travail.

Je tiens à remercier la docteure Naïg Gueguen; merci de m'avoir encadré pendant les années de master 2 et de thèse, et de m'avoir appris à comprendre la mitochondrie et à la manipuler. Merci pour tout le temps que tu as passé avec moi à l'animalerie, à la paillasse et également à la compréhension et l'interprétation des résultats.

Je remercie chaleureusement Céline Wetterwald pour son aide technique.

Je remercie également Elvina Royer et Maria Daniel pour leur aide dans la correction et la mise en page du manuscrit.

Je remercie infiniment ma famille, surtout mes parents qui ont toujours cru en moi; merci pour votre générosité, votre amour et votre soutien sans limite.

Je remercie mon fils Sami; "Samsoumi chéri" tu es la joie de ma vie et une source de motivation inépuisable.

Enfin, tous mes remerciements vont à Jihane. Merci à toi ma chère "Jiji"; tu as tout fait pour m'aider, tu m'as soutenu dans tout ce que j'ai entrepris; merci de m'avoir supporté pendant toutes ces longues années de construction.

J'en oublie certainement et je m'en excuse auprès d'eux.

Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable

Je souhaite dédier ce travail à ma chère Syrie

سوريا

Liste des abréviations

α KGDH : α KétoGlutarate DésHydrogénase

ΔP : Adénosine 5'-DiPhosphate

$\Delta\psi$: Potentiel de membrane

Acyl CoA : acétyl coenzyme A

ADH : Anti Diuretic Hormone

ADN : Acide DésoxyriboNucléique Nucléaire

ADN mt : Acide DésoxyriboNucléique Mitochondrial

ADP : Adénosine 5'-DiPhosphate

AMP : Adénosine monophosphate

ANT : Adenine Nucleotide Translocase

ALA : Acide delta aminolévulinique

ALAD : Acide delta aminolévulinique Déshydratase

ALAS : Acide delta aminolévulinique synthase

ATP : Adénosine 5'-TriPhosphate

ARNm : Acide RiboNucléique Messenger

ASLX : Anémie Sidéroblastique Liée à l'X

Bax : Bcl-2-Associated X protein

Bcl2 : B-cell leukemia/lymphoma 2

Ca : Calcium

CAT: Catalase

CH : CoproPorphyrie Héritaire

CS : Citrate Synthase

Cyt C : Cytochrome *c*

CFP : Centre Français des Porphyries

COX : Cytochrome *c* Oxydase
CPOX : Protoporphyrinogène Oxydase
CRM : Chaîne Respiratoire Mitochondriale
CoA : Coenzyme A
DCPIP : Dichlorophenolindophenol
DOVA : 4-5 Dioxovaleric Acid
DTNB : 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
e- : Electron
ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène
FAA : FumarylAcétoAcétate
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée
FAH : FumarylAcétoacétate Hydrolase
FCCP: carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone
FECH : Ferrochelatase
Fe-S : Fer-Souffre
GMPc : Guanosine MonoPhosphate Cyclique
GPX : Glutathion Peroxidase
GTP : Guanosine TriPhosphate
HMB : HydroxyMéthylBilane
HBBS : HydroxyMéthylBilane Synthase
HMOX : Hème Oxygénase
H₂O₂ : Eau Oxygénée
INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
KD : kilo Dalton

Km : Constante de Michaelis

KO: Knock Out

LONP1: Lon Peptidase1

MnSOD : Manganèse SuperOxyde

NAD : Nicotinamide-Adénine Dinucléotide,

NADH : Nicotinamide-Adénine Dinucléotide, Hydrogéné

NADP : Nicotinamide-Adénine Dinucléotide Phosphate

NDUF: NADH déhydrogénase (Ubiquinone) 1 subcomplex

NO : Azote

NRF: Nuclear Respiratory Factor

NTBC : 2-(2-Nitro-4-TrifluorométhylBenzoyl)-1,3-Cyclohexanedione

OXPHOS : Oxidative Phosphorylation

O₂: dioxygène

O₂⁻ : Anion superOxyde

OH[·]: radical hydroxyle

PAI : Porphyrie Aiguë Intermittente

PDH : Pyruvat Déhydrogénase

PBG : PorphoBilinoGène

PBGD : PorphoBilinoGène Désaminase

PBG S: PorphoBilinoGène Synthase

PCT : Porphyrie Cutanée Tardive

PCT f : Porphyrie Cutanée Tardive Familiale

PCT S : Porphyrie Cutanée Tardive Sporadique

PDP1 : Pyruvate Déhydrogénase Phosphatase1

PEC : Porphyrie Erythropoïétique Congénitale

PGC-1α : Peroxisome Proliferator Activated Coactivator 1 alpha

PKA : Proteine Kinase A

PP : Protoporphyrine IX

PPE : Protoporphyrine Erythropoïétique

PPOX : Protoporphyrinogène Oxydase

PV : Porphyrie Variégata

ROS : Reactive Oxygen Species

RT: Reverse Transcription

RT, q-PCR: Real Time, quantitative - Polymerase Chain Reaction

SA : Succinyl Acétone

SAA : SuccinylAcétoAcétate

SDHA: Succinate DésHydrogénase A

SDHB : Succinate DésHydrogénase B

SDHC : Succinate DésHydrogénase C

SDHD : Succinate DésHydrogénase D

SOD : SuperOxyde Dismutase

SOD1 : Cuivre Zinc SuperOxyde Dismutase

SOD2 : Manganèse SuperOxyde Dismutase

TAT : Tyrosine AminoTransférase

TCA : TriCarboxylic Acid

TH : Tyrosinémie Héritaire

TIM : Translocase of Inner Membrane

TMPD: N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine

TNB: Trinitrobenzène

TOM : Translocase of Outer Membrane

TFAM : Transcription Factor A mitochondrial

UCP : uncoupling protein

Uro'gen : Uroporphyrinogen

URO D : Uroporphyrinogen Décarboxylase

UROIII S : Uroporphyrinogène III Synthase

VLCAD : Very long chain acyl coA déhydrogénase

VDAC : Voltage-Dependant Anion Channel

Liste de figures

Figure 1 : L'hème de l'hémoglobine fixe et transporte le dioxygène dans le sang.

Figure 2a : Voie de synthèse de la molécule d'hème

Figure 2b : Biosynthèse de hème.

Figure 3 : Lien entre PGC-1 α et l'expression de l'ALAS1 dans la cellule hépatique

Figure 4 : L'hème est dégradé sous forme de bilirubine

Figure 5 : Structure de l'hème *b* (à gauche), de l'hème *a* (au centre) de l'hème *c* (à droite)

Figure 6 : La répartition des molécules de l'hème au sein des complexes de la CRM

Figure 7 : Effets de l'acide delta amino-levulinique (ALA) sur l'organisme

Figure 8 : Les anomalies des différentes enzymes de la voie de synthèse de l'hème

Figure 9 : Physiopathologie des porphyries hépatiques

Figure 10 : Physiopathologie de la crise aiguë de PAI

Figure 11 : Voie de catabolisme de la tyrosine

Figure 12 : Mécanisme d'action du plomb sur la voie de synthèse de l'hème.

Figure 13 : Complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Figure 14 : Le cycle de Krebs est un des principaux producteurs de coenzymes réduits

Figure 15 : La β -oxydation est un autre fournisseur énergétique alimentant l'OXPPOS mitochondriale.

Figure 16 : La chaîne respiratoire mitochondriale et l'OXPPOS convertissent l'énergie apportée par les coenzymes réduits en molécules d'ATP.

Figure 17 : Mécanisme d'action de l'ATP synthase

Figure 18 : Production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale

Figure 19 : Mécanismes de l'atteinte neurologique dans la PAI

Figure 20 : Interconnexions entre la biosynthèse de l'hème et le cycle du Krebs et OXPPOS

Sommaire

LISTES DES ABREVEATIONS	4
LISTES DES FIGURES	9
AVANT PROPOS	13

A- INTRODUCTION

I- L'hème, son métabolisme et ses précurseurs	17
I.1: Définition et variétés de molécules d'hème	
I.2 : Synthèse de l'hème	17
I.3 : Régulation de la synthèse hépatique de l'hème	21
I.3.1 : Régulation transcriptionnelle	21
I.3.2 : Régulation post transcriptionnelle	22
I.3.3 : Régulation post traductionnelle	22
I.4 : Catabolisme de l'hème	23
I.5 : L' hème dans la chaîne respiratoire mitochondriale	24
I.6 : L'acide 5-amino-lévulinique (ALA)	26
II- Anomalies du métabolisme de l'hème et pathologies, les porphyries	27
II.1. : Porphyries héréditaires	27
II.1.1 : Les porphyries hépatiques aiguës	28
II.1.1.a : Caractéristiques de la crise	29
II.1.1.b : Le diagnostic de la porphyrie	31
II.1.1.c : Physiopathologie des porphyries aiguës	32
II.1.1.d : Traitement de la crise aiguë	34
II.1.2 : Porphyries aiguës non hépatiques	36
II.1.2.a : La porphyrie cutanée tardive (familiale, sporadique) f PCT/s PCT	36
II.1.3 : Les porphyries érythropoïétiques	36
• La porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC)	36
• La protoporphyrie érythropoïétique (PPE)	36
• L'anémie sidéroblastique liée à l'X (ASLX)	37

II.2 : Les porphyries acquises	38
II.2.1. : La Tyrosinémie héréditaire de type I	38
II.2. 2: L'intoxication au plomb	39
III- La mitochondrie	41
III.1 : Structure	41
III.1.1 : La membrane externe	41
III.1.2 : La membrane interne	41
III.1.3 : L'espace inter membranaire	42
III.1.4 : La matrice	42
III.1.5 : La composition de la chaîne respiratoire et de la fonction OXPHOS	42
III.1.5.1 : NADH Ubiquinone OxydoRéduction (complexe I)	42
III.1.5.2 : Succinate Ubiquinone Oxydoréductase (complexe II)	43
III.1.5.3 : Ubiquinol cytochrome C réductase (Complexe III)	43
III.1.5.4 : Cytochrome C oxydase (Complexe IV)	44
III.1.5.5 : La F0-F1 ATP synthase (complexe V)	44
III.2 : Le métabolisme énergétique mitochondrial	45
III.2.1 : La production des coenzymes réduites	45
III.2.1.a : Le cycle de Krebs	45
III.2.1.b La β -oxydation des acides gras	47
III.2.2 : L'oxydation phosphorylante OXPHOS	49
III.2.2.a : La chaîne respiratoire	49
III.2.2.b : Synthèse de l'ATP	50
III.2.3 : Régulation de l'oxydation phosphorylante	51
III.2.3.a : Régulation de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante	51
• la fuite des protons	51
• Les mécanismes intrinsèques	52
III.2.3.b : Régulation allostérique	52
• Rôle du calcium	52
• Régulation par le rapport énergétique (ATP/AMP)	52
• La régulation par le rapport NAD^+/NADH	53
III.2.3.c : La régulation post-traductionnelle	53
• Mécanisme de phosphorylation	53
• Mécanisme d'acétylation	53
III.2.3.d : La régulation transcriptionnelle : la biogenèse mitochondriale	53
III.3 : La production mitochondriale des ROS	56
III.3.1 : La détoxification mitochondriale des ROS	57
<u>B- RESULTATS</u>	59

1) Article I: Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in a mouse model	
2) Article II : Mitochondrial energetic defects in muscle and brain of mouse model of acute intermittent porphyria	
Résultats supplémentaires articles 1 et 2	66
3) Article III : Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial Dysfunction of HepG2 cells	69
<u>C- DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</u>	72
Bibliographie	79

AVANT-PROPOS

Mon travail de thèse a débuté dans l'unité Inserm 694. Mes travaux de recherche ont été dirigés par le Pr. Yves Malthiery (directeur de thèse) et le Pr. Pascal Reynier (codirecteur). Ils sont, pour partie, une collaboration avec l'unité Inserm 1149 (Université Paris Diderot) et le Centre Français des Porphyrines (CFP).

L'axe de recherche principal de notre laboratoire est la compréhension des mécanismes biochimiques et cellulaires impliqués dans les maladies mitochondriales.

La mitochondrie est un organite intracellulaire multi-fonctionnel. Sa fonction principale est la conversion énergétique, la matrice mitochondriale hébergeant plusieurs voies métaboliques comme le cycle du Krebs et la β -oxydation des acides gras. La mitochondrie héberge d'autres métabolismes, telle que la synthèse de l'hème.

La synthèse de l'hème et la mitochondrie présentent plusieurs points communs :

La synthèse de l'hème, qui s'effectue au sein de la matrice mitochondriale, débute par une molécule de succinyl-coA, un intermédiaire du cycle du Krebs. Ce cycle fournit les coenzymes réduits, substrats de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le succinyl-coA est également le précurseur du succinate, le substrat du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Par ailleurs, la synthèse de l'hème prend partiellement place dans la mitochondrie; quatre étapes de cette voie de synthèse se passent au sein de la matrice mitochondriale, les autres dans le cytosol.

La synthèse de l'hème est ubiquitaire. Quelque soit l'organe, l'hème, aboutissement de cette voie de synthèse, participe à la structure de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale; les complexes enzymatiques de cette chaîne contiennent sept hémoprotéines.

Un autre élément commun est le facteur PGC-1 α , facteur de transcription précoce qui contrôle à la fois l'expression d'une enzyme limitante dans la voie de synthèse de l'hème (l'ALA Synthase) et la biogenèse mitochondriale.

La voie de synthèse de l'hème peut être perturbée par des déficits enzymatiques, héréditaires ou non, qui peuvent concerner les différentes étapes enzymatiques de cette voie. Ces déficits sont soit primaires comme dans les porphyries héréditaires, soit secondaires à d'autres déficits ou intoxication comme dans la tyrosinémie de type I et le saturnisme. Un point commun relie toutes ces pathologies, à savoir le blocage enzymatique de cette voie de synthèse, avec deux conséquences, d'une part le déficit en hème et d'autre part, l'accumulation des porphyrines ou de leurs précurseurs comme l'acide delta amino levulinique (ALA).

La porphyrie aiguë intermittente (PAI) se manifeste par des crises abdominales douloureuses aiguës, spontanées ou provoquées par la prise de certains médicaments. Si la composante neurologique ne semble pas faire de doute, nous ne savons pas précisément quel trouble métabolique est à l'origine de ces crises, le déficit en hème ou l'excès de précurseurs tel l'ALA. Ces deux hypothèses seront analysées au cours de notre travail.

L'hypothèse d'un dysfonctionnement mitochondrial a déjà été évoquée à plusieurs reprises sans qu'elle soit définitivement vérifiée. D'une part la synthèse des molécules d'hèmes sollicite la mitochondrie, d'autre part plusieurs complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale intègrent des molécules d'hèmes nécessaires à leur bon fonctionnement.

Par ailleurs, la molécule d'ALA, qui présente en elle-même une action oxydante, stimule la production de molécules oxygénées réactives (ROS). Ces Espèces Oxygénées Réactives, produites par la mitochondrie, présentent une agressivité moléculaire vis-à-vis des structures mitochondriales et peuvent perturber le bon fonctionnement mitochondrial. Par ailleurs, elles présentent également un effet régulateur de cette physiologie mitochondriale en se comportant comme des régulateurs transcriptionnels de gènes impliqués dans la régulation mitochondriale.

Au cours des porphyries aiguës, les patients peuvent présenter des signes musculaires cliniques comparables à ceux décrits dans certaines maladies mitochondriales. Le muscle squelettique, grand consommateur d'énergie, sollicite fortement la fonction mitochondriale; il est d'ailleurs très riche en mitochondries. Dans les crises aiguës de

porphyries le glucose, substrat énergétique mitochondrial par excellence, peut être administré, avec bénéfice, à des fins thérapeutiques.

Le but de ce travail est d'évaluer la participation de la fonction mitochondriale dans les troubles de synthèse de l'hème, et de spéculer sur un rôle éventuel de la mitochondrie au cours du développement d'une porphyrie aiguë intermittente, et tout particulièrement des crises aiguës.

Dans un premier temps nous avons mené une étude *in vivo* dans le but d'explorer le métabolisme énergétique mitochondrial dans un modèle murin transgénique de la porphyrie aiguë intermittente. Ce modèle, présentant une double mutation hétérozygote du gène de la troisième étape (mitochondriale) de la voie de synthèse de l'hème, suite à l'induction par phénobarbital la souris mime biochimiquement les crises de la porphyrie aiguë intermittente, notamment la baisse de l'activité de l'enzyme déficitaire (*PBGD* ou *HMBS*), une augmentation de l'activité de l'enzyme ALA Synthase et une excrétion urinaire accrue de l'acide delta amino-lévulinique.

Dans un deuxième temps nous avons réalisé une étude *in vitro* permettant d'évaluer, sur le fonctionnement mitochondrial, l'effet d'un excès d'un des précurseurs de la synthèse de l'hème, l'acide delta amino lévulinique. Cette étude a été menée sur une lignée cellulaire hépatique, le foie étant le site principal de la synthèse hémique.

INTRODUCTION

I- L'hème, son métabolisme et ses précurseurs :

I.1: Définition et variétés de molécules d'hème

Hémoglobine et chlorophylle sont les "pigments de la vie" qui font que le sang est rouge et les plantes sont vertes selon (Battersby 1987).

Dans l'antiquité déjà les Grecs extrayaient un colorant rouge des coquillages de la famille des murex et l'utilisaient comme pigment de la couleur pourpre. Cette pourpre, teinture rouge violacé profond, est un des éléments culturels majeurs de l'Antiquité méditerranéenne, poursuivi jusqu'à nos jours dans des vêtements religieux. D'un point de vue chimique, la molécule principale est un dibromoindigo, molécule à noyau phénolique.

Aujourd'hui le terme grec *porphureos*, qui signifie pourpre, a donné son nom à une classe de pigments la plus abondante dans la nature, les porphyrines. Les composants de cette famille de molécules en forme d'anneau se trouvent chez tous les vivants qu'ils soient animaux, végétaux, voire certaines bactéries.

La chlorophylle du monde végétal est une porphyrine liant un atome de magnésium; elle est indispensable à la photosynthèse.

Dans le monde animal, la molécule de porphyrine lie un atome de fer pour former l'hème, une molécule indispensable pour le fonctionnement de nombreuses protéines dites métalloprotéines. L'hème de l'hémoglobine des globules rouges assure le transport de l'oxygène et peut fixer l'oxyde de carbone (Fig1). Le dioxyde de carbone, lui, se fixe à la partie globine de cette hémoglobine. Les molécules d'hème entrent également dans la composition de protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Insérant le nickel, les porphyrines forment le coenzyme F430 qui joue un rôle majeur chez les bactéries notamment dans le métabolisme du méthane. Liant un atome de cobalt, la molécule de porphyrine constitue la vitamine B12, molécule essentielle chez l'homme.

Toutes ces molécules dites hémoprotéines ont la particularité d'absorber la lumière visible, ce qui donne une couleur spécifique aux cellules qui en contiennent, caractéristique de l'ion métallique contenu (Dayan 2013).

Dans la matrice mitochondriale, l'hème est produit par l'insertion d'un atome de fer à l'état ferreux dans une molécule de porphyrine.

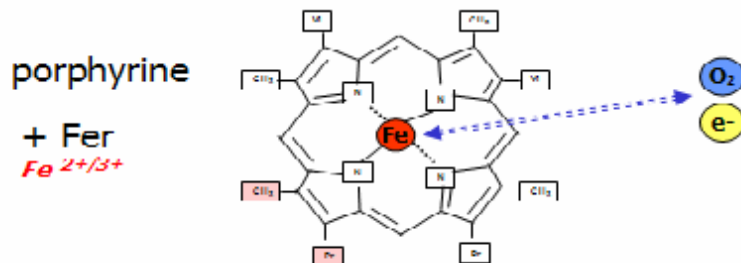


Fig 1 : L'hème de l'hémoglobine fixe et transporte le dioxygène dans le sang.

Chez l'homme, l'hème est un co-facteur important dans plusieurs types de réactions biologiques comme le transport de l'oxygène, les réactions d'oxygénase, la régulation des activités enzymatiques (Bonkovsky 2013). Il est également le groupement prosthétique de protéines comme la guanylate cyclase, les NO synthases, les hydroxylases ou les cyclo-oxygénases qui synthétisent des molécules de signalisation comme le GMPc, le monoxyde d'azote (NO), les hormones stéroïdes, les prostaglandines. L'hème contrôle également, outre sa propre synthèse et sa dégradation, l'expression de nombreuses protéines comme la globine et il régule la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires (Ponka 1999).

Les hémoprotéines de la chaîne respiratoire mitochondriale participent au transfert des électrons. Cette dernière fonction est indispensable à la conversion énergétique dans les cellules eucaryotes à travers le processus d'oxydation phosphorylante (OXPHOS).

I.2 : Synthèse de l'hème

La biosynthèse de l'hème est ubiquitaire mais les deux sites majeurs de production sont la moelle osseuse (80 % de l'hème synthétisé dans l'organisme) et le foie (environ 15 %) (Lyouni 2011).

La voie de synthèse, partagée entre la matrice mitochondriale et le cytosol, est constituée de huit étapes enzymatiques (Fig2). La première étape consiste en formation d'une molécule d'acide delta amino-levulinique (ALA) par condensation d'un acide aminé, la glycine et d'un intermédiaire du cycle de Krebs, le succinyl-Coenzyme A. Cette réaction,

qui se produit au sein de la matrice mitochondriale, est catalysée par une enzyme, l'ALA synthase (ALAS). Cette étape est considérée comme limitante, l'activité de l'ALAS étant régulatrice de l'ensemble de la voie de synthèse de l'hème. L'ALA quitte la mitochondrie, traverse la membrane mitochondriale probablement par un canal transporteur à ce jour non identifié. Dans le cytosol, deux molécules d'ALA se condensent pour former le deuxième précurseur le porphobilinogène (PBG) sous l'action de l'enzyme ALA deshydratase (ALAD). Ensuite, 4 molécules de PBG sont polymérisées par l'enzyme PBG désaminase pour former un premier tétrapyrrole linéaire, l'hydroxymethylbilane (HMB). Cette molécule d'HMB est ensuite cyclisée pour former l'uroporphyrinogène (Uro'gen I) par l'action de l'enzyme URO 3 Synthase. Puis cette molécule subit une étape de décarboxylation par l'enzyme uroporphyrinogène décarboxylase (URO D) pour former la coproporphyrinogène, réaction se produisant dans la matrice mitochondriale grâce à l'action de la coproporphyrinogène oxydase (CPOX). Cette molécule CPOX est ensuite convertie en protoporphyrinogène. La suite du processus de synthèse se produit dans la mitochondrie par l'action d'une enzyme nommée protoporphyrinogène oxydase (PPOX) permettant la formation de la protoporphyrine IX (PP). L'étape finale est catalysée par l'enzyme Ferrochelatase (FECH) connue aussi sous le nom d'hème synthase qui introduit un atome de fer à l'état ferreux dans la PP pour former l'hème.

La synthèse de l'hème commence donc dans la mitochondrie par un intermédiaire du métabolisme énergétique (le succinyl CoA), et après plusieurs étapes partagées entre cytosol et mitochondrie se terminera dans la mitochondrie, par constitution du produit final, la molécule d'hème (Siddesh 2014).

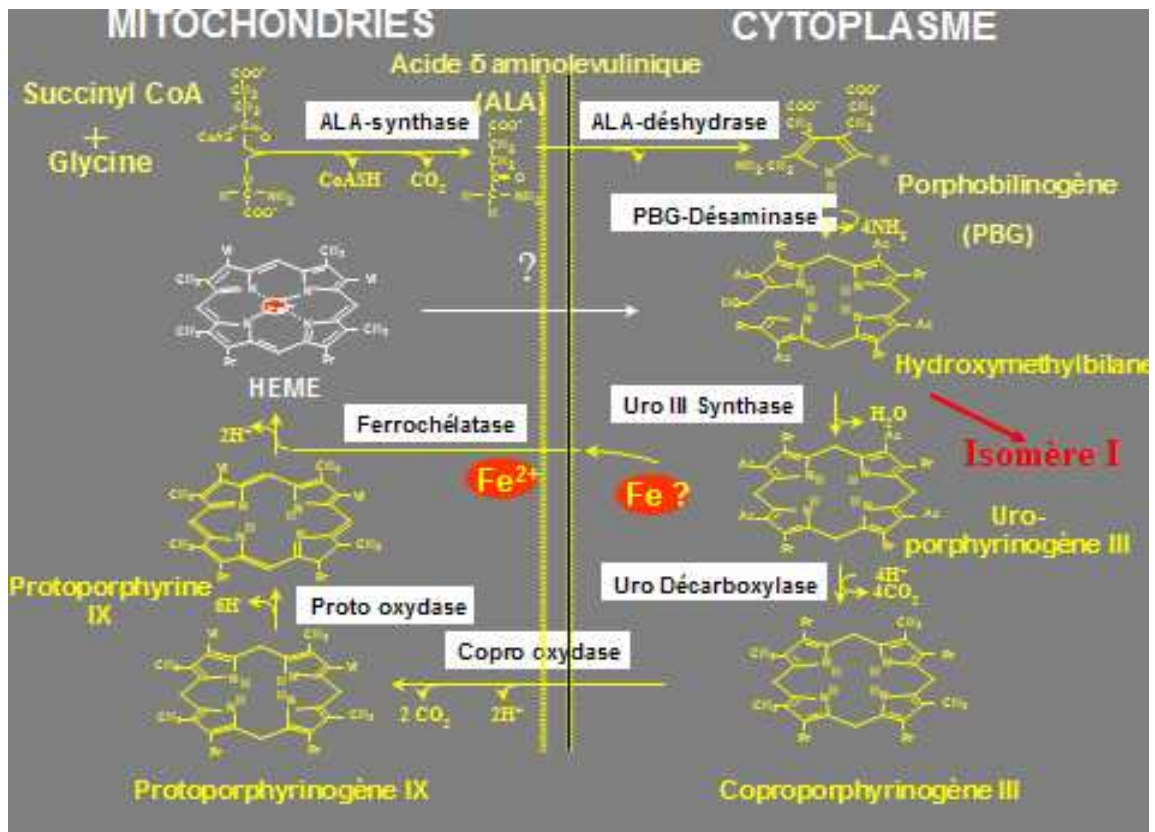


Fig 2a : Voie de synthèse de la molécule d'hème

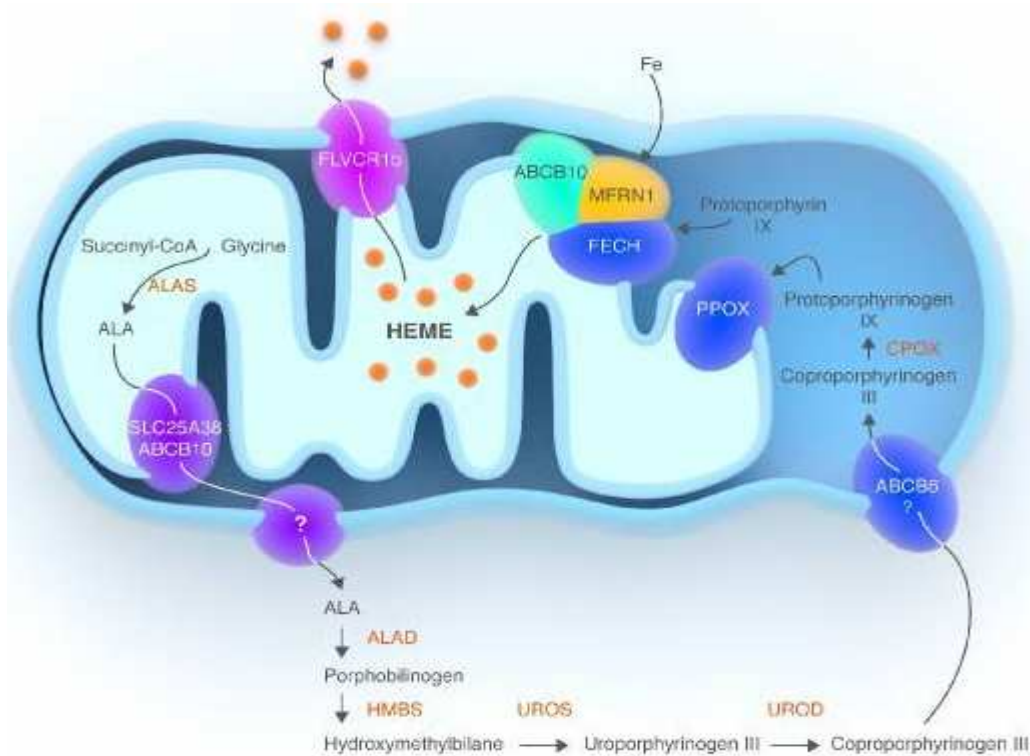


Fig 2b : Biosynthèse de hème. (Hematologica 2014)

I.3 : Régulation de la synthèse hépatique de l'hème

La voie de synthèse de l'hème est régulée principalement par la première enzyme de processus de synthèse, l'ALAS. Cette enzyme à deux isoformes, l'une virtuellement ubiquitaire mais essentiellement hépatique (ALAS1) et l'autre érythroïde (ALAS2).

La régulation de l'ALAS est tissu spécifique, et l'on parle d'une régulation hépatique et d'une régulation érythroïde.

I.3.1 : Régulation transcriptionnelle

En dehors du tissu érythroïde et notamment dans la cellule hépatique, l'hème exerce un rôle inhibiteur sur la transcription du gène codant pour l'ALAS1 (rétro-contrôle négatif).

Le glucose et d'autres intermédiaires du métabolisme glucidique inhibent aussi la transcription du gène de l'ALAS1, notamment par l'intermédiaire du peroxisome proliferator activated coactivator 1 alpha (PGC-1 α) (Hanschin 2005)

Le PGC-1 α est un co-activateur de plusieurs récepteurs nucléaires et facteurs de transcription. Il contrôle ainsi la biogenèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif (OXPHOS) dans plusieurs tissus tels que le tissu adipeux, les muscles squelettiques, le cœur et le foie.

Dans le tissu hépatique, le PGC-1 α est induit et activé pendant les périodes de jeûne lorsque le foie passe du métabolisme glucidique au métabolisme des acides gras. Il a, par ailleurs, été montré que l'expression du gène codant pour PGC-1 α , induit une augmentation de l'expression du gène de l'ALAS1. (Fig3). (Scassa 2004) et qu'il aurait donc un rôle déterminant dans la sévérité de la crise de porphyrie induite chez un modèle murin de porphyrie aiguë. (Hanschin 2005)

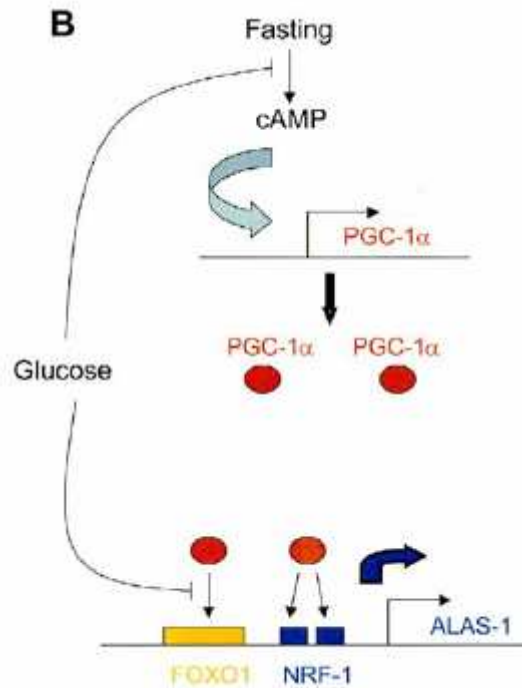


Fig 3 : Lien entre PGC-1 α et l'expression de l'ALAS1 dans la cellule hépatique
(Hansch C. 2005)

I.3.2 : Régulation post transcriptionnelle

Dans la cellule hépatique, grâce à un épissage alternatif, deux formes d'ARNm d'ALAS sont produites, une forme majeure et une forme mineure qui se différencient par leur extrémité 5' non traduite. L'hème régule négativement la stabilité de la forme majeure en la décomposant au stade post-transcriptionnel, tandis que la forme mineure est plus résistante aux effets de l'hème (Roberts 2001).

I.3.3 : Régulation post traductionnelle

L'hème peut réguler l'ALAS1 dans la phase post traductionnelle, en diminuant le transport vers la mitochondrie de la pré-ALAS1 (Daily 2005).

Il a été montré, récemment, que l'hème accentue la dégradation mitochondriale de l'ALAS1 grâce à une protéase ATP dépendante, LONP1, qui contrôle le turnover sélectif des protéines mitochondriales matricielles (Tian 2011)

I.4 : Catabolisme de l'hème

L'hème est principalement dégradé dans la rate et le foie. La première étape consiste en la cassure du noyau tétrapyrrole, produisant de la biliverdine et libérant un atome de fer et du monoxyde de carbone. La biliverdine est ensuite transformée en bilirubine sous l'action de la biliverdine oxydase. Cette bilirubine sera excrétée par le foie vers les canaux biliaires (Fig4).

Cette procédure de dégradation est contrôlée par l'hème oxygénase (HMOX), première enzyme de la voie de dégradation de l'hème qui développe donc une action limitante et régulatrice sur l'ensemble de cette voie. Il existe deux isoformes de cette enzyme, HMOX1 et HMOX2.

Le gène de l'HMOX1 est exprimé à de faibles niveaux. Sa transcription est induite par des facteurs de stress chimique ou physique (ROS, choc thermique...), son propre substrat, l'hème et certaines métalloporphyrines (Fig4).

Contrairement à l'HMOX1 le gène de l'HMOX2 n'est pas inductible. Cette isoforme est abondante dans le cerveau et les testicules. Sa fonction principale est la production du monoxyde du carbone, qui est un vasodilatateur et une molécule de signalisation (Siddesh 2014)

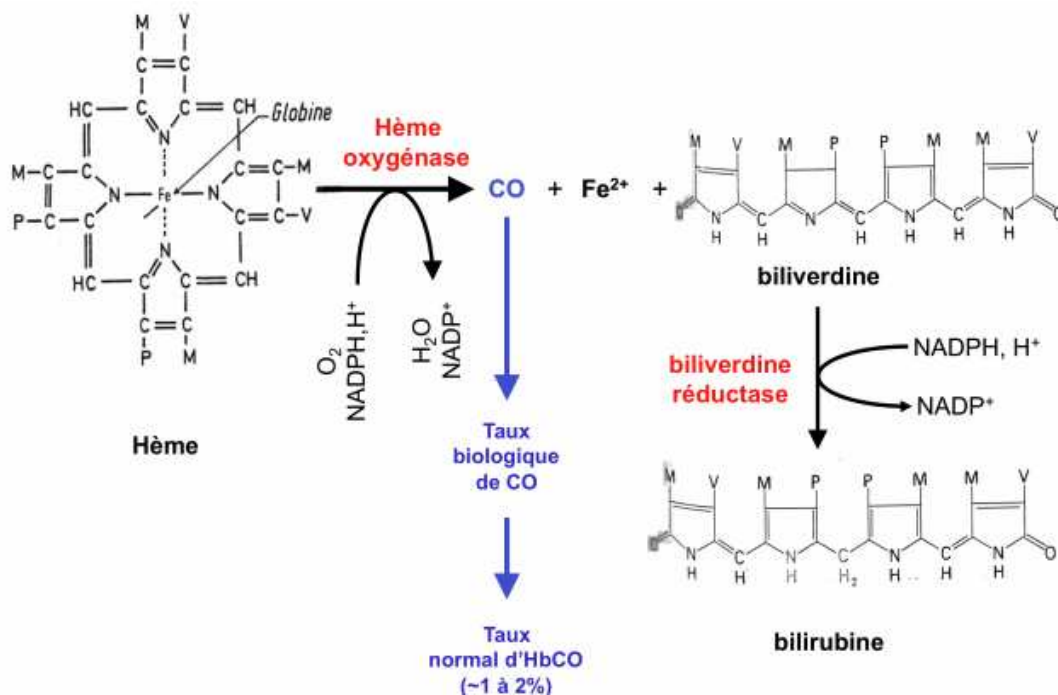


Figure 4 : L'hème est dégradé sous forme de bilirubine

I.5 : L'hème dans la chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale assure le flux séquentiel des électrons, à partir d'un substrat à faible potentiel de réduction jusqu'à l'O₂. Ce transfert multi-électrons se passe au niveau de la membrane interne de la mitochondrie via les quatre complexes de la chaîne respiratoire. Ces derniers contiennent des hémoprotéines, des flavines et des protéines fer-soufre.

Les cytochromes sont des protéines de transfert d'électrons. Elles renferment un atome de fer octaédrique coordonné par quatre liaisons coplanaires à quatre atomes d'azote de la molécule de porphyrine, constituant la molécule d'hème. Trois types d'hèmes sont rencontrés dans les cytochromes, l'hème *a*, l'hème *b* et l'hème *c*. L'hème *a* se retrouve dans les cytochromes *a* et *a*₃ (cytochrome oxydase), l'hème *b* dans les cytochromes *b*₅₆₂ et *b*₅₆₅ (cytochrome réductase), l'hème *c* dans les cytochromes *c* et *c*₁. On distingue trois classes de cytochromes caractérisés par le type d'hème qu'ils renferment et leur spectre d'absorption.

Chaque type de cytochrome, sous sa forme réduite (Fe⁺²), présente trois bandes d'absorption dans la région visible. La bande de longueur d'onde la plus élevée est proche de 600nm pour le cytochrome *a*, de 560 nm pour le cytochrome *b* et 550 pour le cytochrome *c*.

Les groupements héminiques des cytochromes *a* et *b* sont reliés de façon non covalente à leur protéine associée, l'hème du cytochrome de type *c* est attaché de façon covalente par l'intermédiaire d'un résidu de cystéine. Le potentiel standard de réduction de l'atome de fer, dans l'hème, dépend étroitement de son interaction avec les chaînes latérales de la protéine et donc est différent pour chaque cytochrome.

Les cytochromes de type *a* et *b* et certains de type *c* sont des protéines intégrales de la membrane. Une exception remarquable est le cytochrome *c* des mitochondries qui constitue une protéine soluble qui s'associe, par des liaisons électrostatiques, à la surface externe de la membrane interne des mitochondries.

Dans la mitochondrie, les cytochromes sont présents au niveau de la membrane interne. Sept molécules d'hème font partie des cytochromes embarqués dans les complexes de la chaîne de transfert des électrons (Kim 2012).

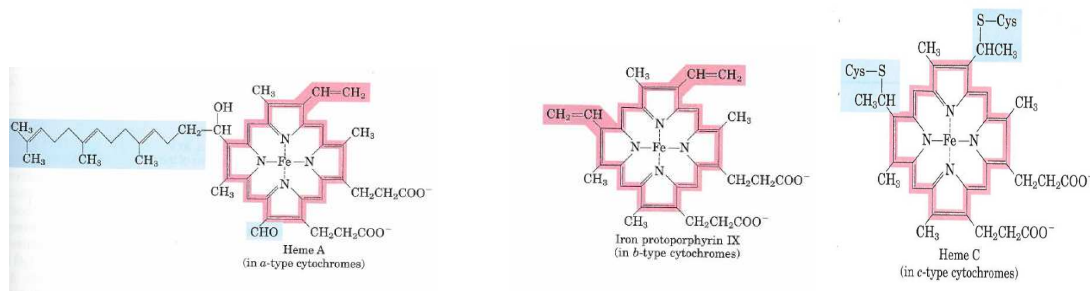


Fig. 5 : Structures des trois types d'hème, l'hème *a* (à gauche), l'hème *b* (au centre) et l'hème *c* (à droite). L'hème *a* possède une longue queue isoprénoïde. L'hème *c* est lié de façon covalente à la protéine du cytochrome *c*, par l'intermédiaire de deux liaisons thioester sur deux résidus de Cys.

Les trois variétés d'hème (*a*, *b*, *c*) rentrent dans la composition des complexes II, III, IX et le cytochrome *c* mobile de la CRM (Hildenbutel 2014). L'hème *b* constitue un groupe prosthétique dans le complexe II (succinate deshydrogénase), et le complexe III.

Le rôle exact de l'hème *b* dans le fonctionnement du complexe II reste à élucider. Il pourrait, soit participer à la stabilisation des sous-unités transmembranaires, soit participer aux mécanismes de prévention contre les effets des ROS (Yanakovoskaya 2003), soit les deux. Dans le complexe III, deux molécules d'hème *b* participent au transfert des électrons entre l'ubiquinol oxydé et l'hème *c* du cytochrome *c* (Hunte 2003). Dans le complexe IV, l'hème *a*₃ fait partie du site catalytique qui réduit l'oxygène, le récepteur final des électrons de cette chaîne transporteuse d'électrons (Fig. 6).

Par ailleurs, il a été montré récemment un rôle critique de l'hème dans l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. En cas de déficit en hème, l'assemblage du complexe II pourrait être défectueux (Kim 2012).

Dans les cellules eucaryotes, la biosynthèse de l'hème est partagée entre le compartiment cytosolique et le compartiment mitochondrial. Si les étapes de cette synthèse sont bien

connues aujourd'hui, les mécanismes régulant le trafic de l'hème à travers les membranes mitochondriales restent obscures (Travaglini 2013).

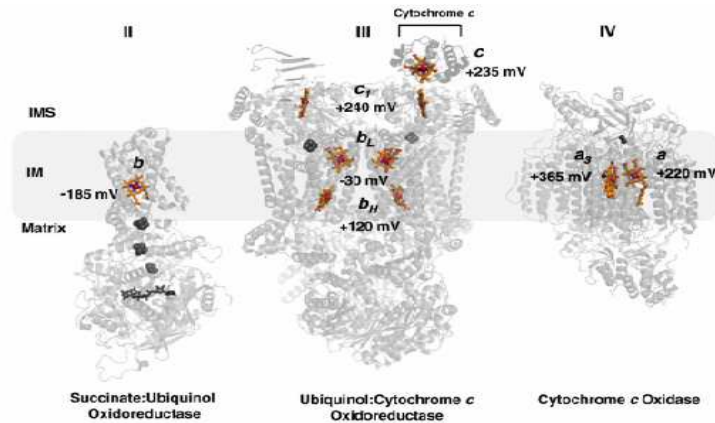


Fig. 6: La distribution des molécules d'hème (*b*, *c*, *a*) au sein des complexes II, III et IV de la CRM.

Les points du potentiel médian sont notés. On constate une tendance de l'augmentation de celui-ci entre l'hème *b* du complexe II et l'hème *a3* du complexe IV qui constitue l'accepteur terminal des électrons et le site de la réduction de l'oxygène (Kim 2012).

I.6 : L'acide delta amino-lévulinique (ALA) :

L'acide delta amino-levulinique (ALA) est un aminoacétone qui constitue le premier métabolite de la voie de synthèse de l'hème. Il est produit par la condensation d'une glycine et d'un succinyl-CoA par action d'une l'ALA synthase. Cette molécule s'accumule dans le sang et dans les tissus (essentiellement le foie et le cerveau) chez les patients atteints d'une porphyrie héréditaire (porphyrie aiguë) ou acquise (saturnisme).

L'oxydation de l'ALA *in vitro* génère des molécules comme le 4-5 dioxovaleric acid (DOVA), l'ion NH_4^+ et des ROS (Bechara 2007), le DOVA est doté d'une activité génotoxique importante causée par une réaction avec les résidus d'alanine et de guanine de l'ADN (Douki 1998).

Il a été montré que, chez les patients porteurs de porphyrie aiguë intermittente et de tyrosinémie, le risque de survenue d'un cancer de la cellule hépatique est plus élevé que dans la population générale. Ce risque est évalué à 35 fois la normale chez les patients atteints de PAI. (Lang 2015) et il est plus important lorsque les taux plasmatiques d'ALA sont supérieurs de 100 fois la normale ($\approx 0.26 \mu\text{M}$) (Douki 1998).

L'ALA subit une étape d'énolisation suivie d'une oxydation par un superoxyde produisant, au final, de l'eau oxygénée H_2O_2 qui se transformera en radical hydroxyl HO^\bullet par une réaction de Fenton (Monterio 1989, Bechara 1996).

Il a été montré *in vitro* que le DOVA produit à la suite d'une administration d'ALA chez les rats, peut causer des dommages au niveau d'organes comme le cerveau, le foie et le muscle. L'administration d'ALA chez les rats est accompagnée du déclenchement des mécanismes enzymatiques anti-oxydant telle que l'augmentation de l'activité de superoxyde dismutase (SOD) et de glutathion peroxydase (GPX), (Rocha et al. 2003).

Le dosage de l'activité de la SOD et la GPX chez les patients atteints de PAI symptomatique a montré des taux de deux fois la normale, tandis que l'augmentation de la SOD chez les patients non symptomatique ne dépasse pas les 30% de la normale (Medeiros 1982). De même, l'activité de la SOD augmente en cas d'intoxication au plomb, de manière exponentielle à partir des taux de plomb de $30\mu g/dl$.

Ces nombreux travaux cités dans la littérature montrent l'effet pro-oxydant de l'accumulation de l'ALA dans l'organisme (Fig7).

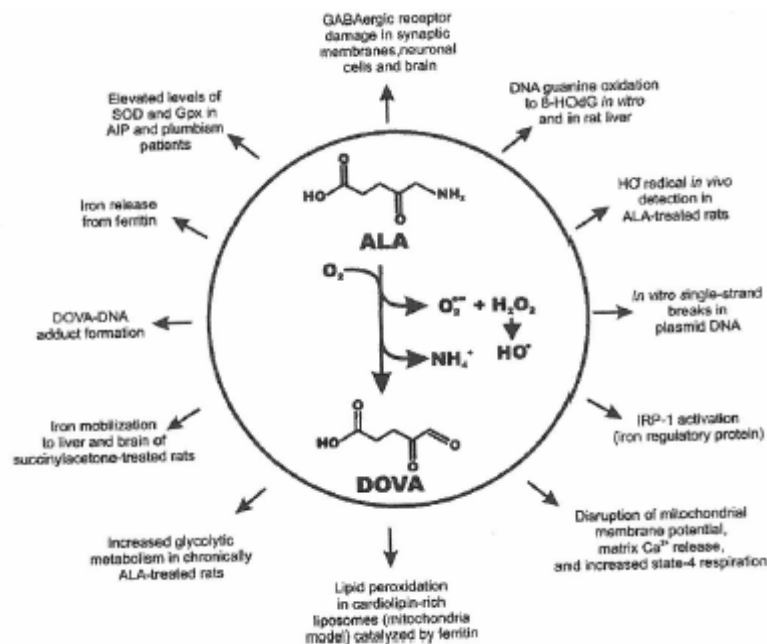


Fig 7 : Effets néfastes de l'acide delta amino levulinique (ALA) dans l'organisme.

II - Anomalies du métabolisme de l'hème et pathologies (les porphyries)

Ce sont des maladies liées à un déficit partiel des enzymes de la biosynthèse de l'hème. Elles sont réparties en deux formes différentes, héréditaires ou acquises.

II.1. : Porphyries héréditaires

On dénombre huit porphyries différentes, toutes sont des pathologies métaboliques héréditaires, de transmission autosomique dominante ou récessive. Sept de celles-ci sont dues à un déficit enzymatique spécifique de la voie de synthèse de l'hème la huitième est le résultat d'un gain de fonction de l'enzyme ALAS2 (Puy 2010).

Le blocage enzymatique aboutit à une accumulation en amont des précurseurs comme l'acide delta amino-levulinique, du porphobilinogène ou encore des porphyrines (Fig8). Ces produits s'accumulent, selon le lieu du blocage, dans le foie ou la moelle osseuse. En conséquence, ils sont sécrétés dans les différents milieux biologiques de l'organisme : le sang, les urines ou les selles (Balwani 2012).

La production anormalement élevée des précurseurs ou des porphyrines s'associe à l'apparition de signes cliniques caractéristiques des porphyries que sont les signes cutanés ou les crises aiguës intermittentes de type neuroviscéral ou les deux.

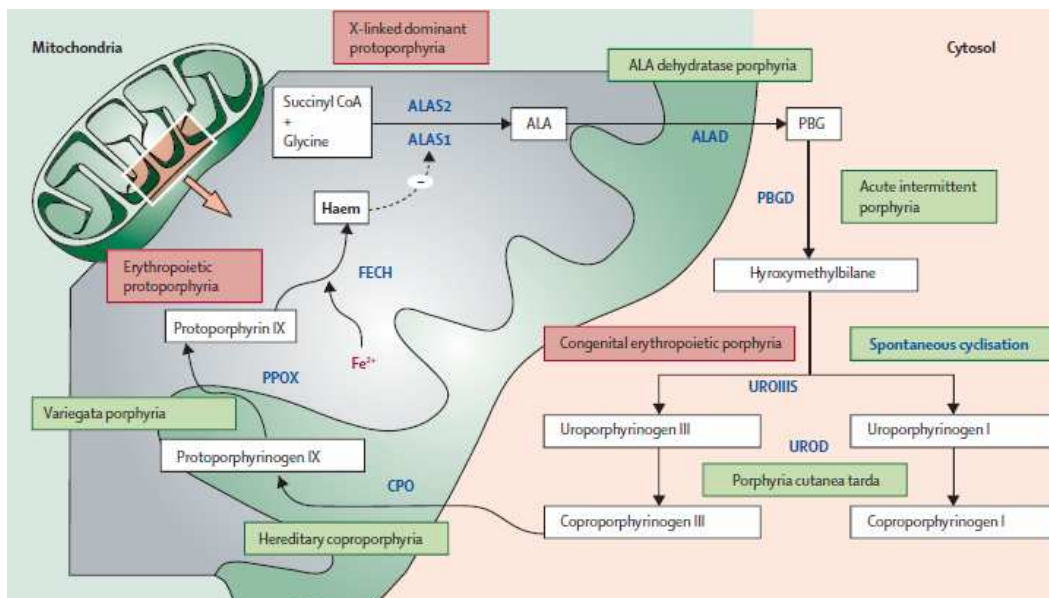


Figure 8 : Les anomalies des différentes enzymes de la voie de synthèse de l'hème produisent différents types de porphyries.

Les porphyries sont caractérisées par un taux de pénétrance faible (Elder 2012) avec une expression clinique extrêmement variable. Chez la plupart des patients peuvent être identifiées des facteurs déclenchants exogènes ou endogènes. (Anderson 2005)

Les porphyries sont classées selon le lieu du blocage enzymatique en porphyrie hépatique ou érythropoïétique (Balwani 2012)

A. Les porphyries hépatiques sont en nombre de cinq :

- Déficit héréditaire en ALAD
- Porphyrie aiguë intermittente (PAI)
- Coproporphyrine héréditaire (CH)
- Porphyrie variégata (PV)
- Porphyrie cutanée tardive (familiale, sporadique)

Les quatre premières sont également appelées « porphyries aiguës »

B. Les porphyries érythropoïétiques sont au nombre de 3 :

- La porphyrie érythropoïétique congénitale PEC
- XLDPP gain de fonction ALAS2
- Protoporphyrine érythropoïétique PPE

II.1.1 : Les porphyries hépatiques aiguës :

Les patients atteints d'une porphyrie aiguë manifestent des crises aiguës de sévérité variable, allant d'une simple douleur abdominale jusqu'à la paralysie respiratoire mettant en jeu le pronostic vital. Les crises récurrentes sont communes à toutes les porphyries aiguës tandis que les signes cutanés sont exclus de la PAI.

La PAI est la porphyrie aiguë la plus fréquente et la plus redoutable (Anderson 2001). Elle est liée à des mutations du gène PBGD (Namba 1991), elle a un taux de prévalence estimé à 1/75000 en Europe, à l'exception du nord de la Suède où elle est plus fréquente 1/1000 (Schneider 2002), (Floderus 2002) à cause d'un effet fondateur.

Les porphyries aiguës sont plus fréquentes chez les femmes avec un ratio homme/femme égale à 1/4 (Bylesjo 2009). L'apparition des symptômes coïncide le plus souvent avec l'âge de la procréation chez les femmes (15-45 ans), elle est exceptionnelle avant la puberté ou après la ménopause.

Le rythme de la survenue des crises est très variable. La plupart des patients développent une ou plusieurs crises à moment donné, suivies d'une rémission complète. Moins de 10% des patients expriment des crises récurrentes.

II.1.1.a : *Caractéristiques de la crise:*

Les crises de porphyrie aiguë sont habituellement précédées d'une phase prodromique associant diversement asthénie, anorexie, insomnie. La symptomatologie clinique de la crise de porphyrie aiguë associe douleurs abdominales, troubles neurologiques et/ou psychiques. Chacun de ces symptômes peut exister isolément, précéder ou suivre les deux autres. Les signes abdominaux apparaissent généralement les premiers et associent fréquemment :

- des douleurs intenses, continues ou paroxystiques, sans localisation prédominante mais peuvent être ressenties dans le bas du dos avec une irradiation vers les membres inférieurs,
- des nausées puis des vomissements pouvant entraîner des troubles hydroélectriques importants,
- une constipation tenace alternant parfois avec des épisodes de diarrhée.

Les patients peuvent présenter des troubles cardiovasculaires comme une tachycardie et une hypertension artérielle témoignant d'une hyperactivité sympathique.

L'examen radiologique ne montre aucune modification. Durant les crises aiguës certains patients présentent une déshydratation probablement due à une sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique (ADH) qui pourrait expliquer l'hyponatrémie constatée à l'examen biologique. Ce déséquilibre ionique peut aboutir à des troubles graves; important, il est décrit dans des cas d'épilepsie secondaire.

Dans ce contexte, la constatation d'une coloration franchement anormale des urines en rouge, brun rouge "porto" doit faire évoquer le diagnostic. Mais cet élément majeur peut manquer car la coloration anormale apparaît généralement 30 à 60 minutes après émission. A ce stade, si aucune erreur thérapeutique n'est commise, l'évolution spontanée de la crise est le plus souvent favorable, à *fortiori* si un traitement adapté est appliqué et les éventuelles causes déclenchantes supprimées.

Cependant, certaines crises aiguës peuvent mettre en jeu le pronostic vital, probablement à cause des complications neurologiques sévères de type neuropathie. Cette complication est

le plus souvent secondaire à l'administration d'un médicament porphyrinogénique. Cette neuropathie menaçante, de type moteur, peut débuter par des douleurs musculaires, notamment dans les membres, suivies par une faiblesse musculaire. La faiblesse musculaire peut évoluer vers une tétraplégie avec une paralysie respiratoire aboutissant au décès (Siddesh 2014).

La récupération des complications neurologiques est très longue et incomplète. Parfois, des séquelles plus au moins sévères peuvent persister.

Les manifestations cliniques sont peu spécifiques et un bilan biologique est indispensable pour faire le diagnostic d'une crise aiguë de porphyrie.

Une étude américaine faite sur une cohorte de 108 patients présentant une porphyrie aiguë (90 PAI, 9 CH, et 9 porphyries variégata) a montré une prédominance féminine (81% des patients sont de sexe féminin), avec un début des signes cliniques dans la deuxième décennie de la vie; les douleurs abdominales étaient le signe clinique le plus fréquent (73 % des cas), la fatigue musculaire était fréquente (63% des cas), l'anxiété et la dépression étaient présentes également (18 % des cas) et il a été noté une augmentation de la survenue d'hypertension artérielle et les complications rénales (Bonkovsky 2013).

II.1.1.b : *Le diagnostic de la crise aiguë de porphyrie*

Le diagnostic d'une crise aiguë de porphyrie est très souvent évoqué dans le contexte clinique décrit, associé à la constatation d'urines foncées ou rouges. Cependant, le diagnostic de crise aiguë de porphyrie hépatique doit reposer sur le dosage des précurseurs de l'hème dans les urines (séparation en chromatographie d'échange d'ions suivie d'un dosage spectrophotométrique). Une augmentation franche des taux urinaires de porphobilinogène (PBG) constitue l'élément principal du diagnostic (Kauppinen 2002) Le dosage de l'ALA n'est pas indispensable pour établir le diagnostic d'une crise aiguë par contre il peut être utile pour différencier les autres causes de douleurs abdominales, notamment dans le saturnisme et la rare porphyrie liée au déficit en delta aminolevulinique acide déshydrogénase (Aarsand 2006).

L'augmentation d'excrétion urinaire de PBG et d'ALA est commune aux trois porphyries aiguës. Néanmoins cette augmentation est plus importante et plus persistante dans la PAI.

Si le taux de PBG est 10 fois plus élevé que la normale, le traitement de la crise aiguë peut débuter sans attendre le reste des investigations biologiques (Hift 2004). Les examens, réalisés *a posteriori*, auront pour but, d'une part, de typer la porphyrie en étudiant le spectre des porphyrines dans les différents milieux biologiques (sang, selles et urines) et d'autre part, de confirmer le diagnostic. Un déficit d'activité enzymatique de 50 % confirmera ce diagnostic, sachant que chaque enzyme impliquée dans la voie de synthèse de l'hème est responsable d'un type spécifique de porphyrie.

L'identification d'une mutation génique sera menée si possible. La découverte de celle-ci est un pré requis nécessaire pour enclencher une enquête familiale.

La porphyrie reste longtemps méconnue, le diagnostic étant souvent établi plus d'une décennie après l'apparition des premiers signes cliniques (Bonkovsky 2014).

II.1.1.c : *Physiopathologie des porphyries aiguës*

La crise aiguë est, dans plus de 50 % des cas, induite par des facteurs déclenchants, les plus fréquents étant l'administration de médicaments (barbituriques, sulfamides, oestro-progestatifs). Ces médicaments, pour être métabolisés, induisent une induction hépatique de certains cytochromes P450 qui sont des hémoprotéines. En conséquence, le turnover de l'hème s'accroît dans la cellule hépatique avec, comme conséquence, une diminution de l'hème intracellulaire. Ce pool d'hème a un rôle régulateur sur la voie de synthèse de l'hème car il exerce un rétro-contrôle négatif sur l'activité de la première enzyme de cette voie, l'ALAS. L'activité de cette enzyme augmente d'une manière spectaculaire (emballement) avec comme conséquence l'accumulation des précurseurs (ALA et PBG) en amont du bloc enzymatique. (Fig9)

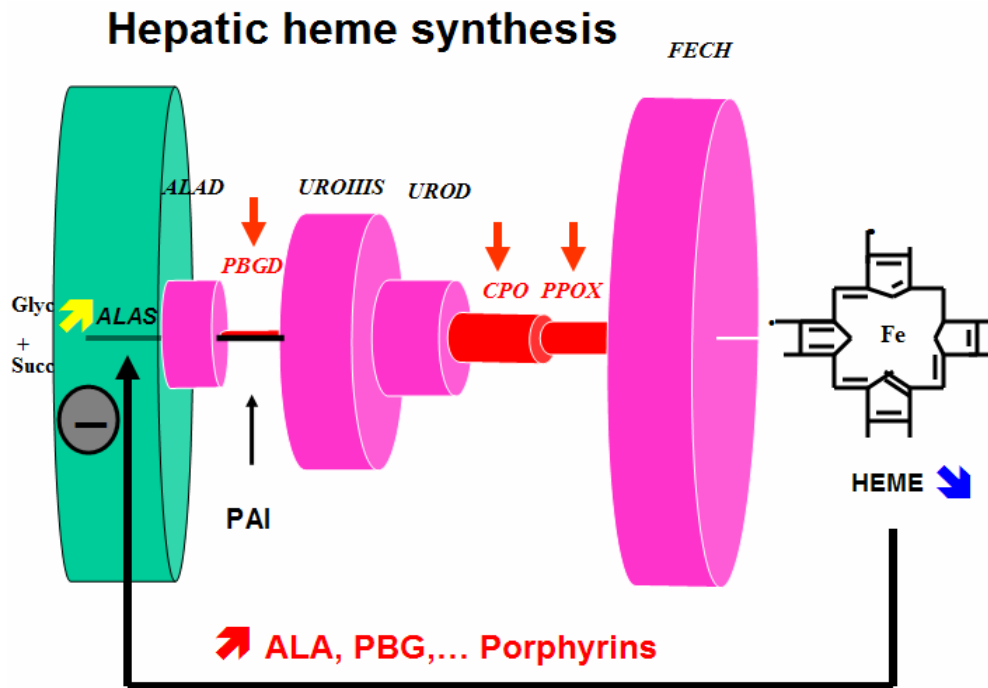


Fig 9 : Physiopathologie des porphyries hépatiques

Les facteurs nutritionnels, tels que les régimes hypocaloriques, peuvent déclencher des crises chez les malades atteints de porphyries. La carence en substrats énergétiques dans la cellule hépatique induit des facteurs transcriptionnels tel que le coactivateur PGC1 α , qui régule l'expression de l'ALAS1. L'activité enzymatique de ALAS1 sera donc augmentée en cas de carence énergétique (Hndshim 2005).

Les épisodes infectieux, toutes les situations de stress et l'inflammation induisent l'expression hépatique de l'enzyme hème oxygénase, cette enzyme catabolise l'hème en augmentant le besoin en hème, tout cela génère une surproduction des précurseurs de l'hème (ALA, PBG)

Si le mécanisme du déclenchement de la crise aiguë de porphyrie est assez bien connu, il reste à expliquer le lien entre l'accumulation des précurseurs d'hème et le déficit en hème et la physiopathologie de la crise (Fig10).

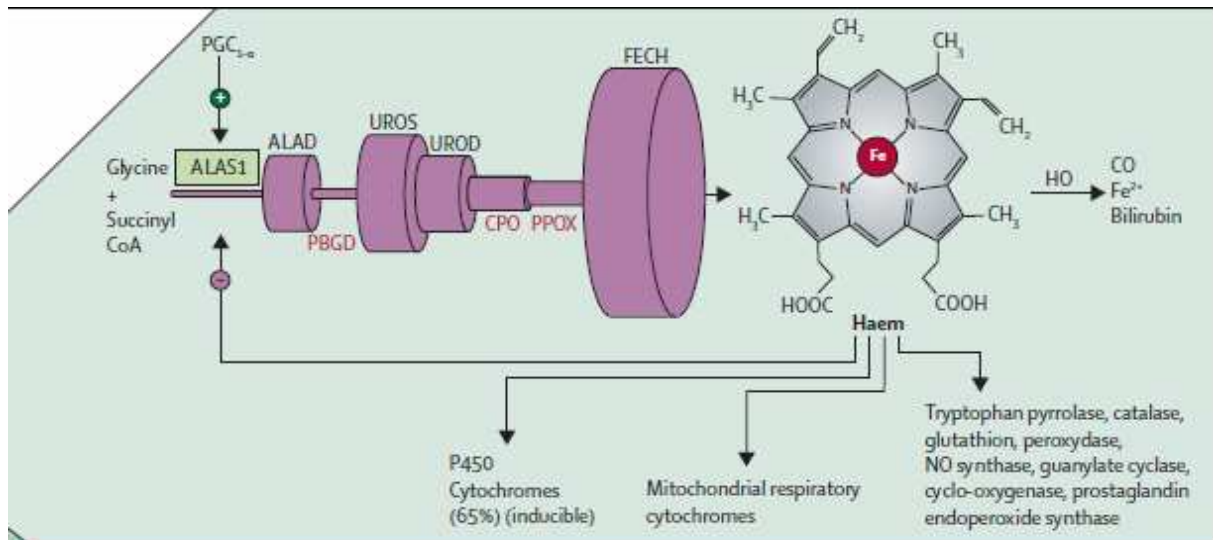


Fig10: Physiopathologie de la crise aiguë de PAI (Puy H. et al. 2010)

L'hypothèse principale est la neurotoxicité des précurseurs de l'hème accumulés dans le foie lors des crises aiguës (Meyer 1998). La normalisation des taux des précurseurs de l'hème et l'amélioration clinique nette chez des patients atteints de la PAI ayant subi une transplantation hépatique plaide en faveur de cette hypothèse. (Soonawalla 2004), (Ashwani 2014).

Une autre hypothèse a été avancée pour expliquer la neuropathie axonale observée chez les patients, à savoir celle d'une carence en hème (Lindberg 1999). L'hème, composant essentiel de la CRM, est indispensable au métabolisme aérobie et à la synthèse d'ATP. Par ailleurs, le tissu nerveux est un grand consommateur d'énergie et la diminution de synthèse d'ATP peut perturber le transport axonal de celui-ci. En outre, l'accumulation des précurseurs de l'hème pourrait perturber le fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ axonale, provoquer une altération du potentiel membranaire et induire le déclenchement d'un processus d'apoptose (Albert 2004)

II.1.1.d : Traitement de la crise aiguë :

La première étape est d'éliminer tout facteur déclenchant ou aggravant de la crise, ainsi que tous les médicaments connus pour être porphyrinogéniques. L'apport d'aliments riches en carbohydrates visant à corriger une carence calorique semble avoir un effet positif sur l'évolution de la crise.

La deuxième étape est de soulager les douleurs en administrant des analgésiques. Le recours aux morphiniques s'avère souvent nécessaire. Les anxiolytiques peuvent aider à restreindre les doses de morphine.

En règle générale, une crise non compliquée se résout en quelques jours. Le monitoring des taux urinaires de PBG n'est pas nécessaire, l'évolution clinique étant le meilleur paramètre pour évaluer l'évolution de la crise. Les crises compliquées par une neuropathie motrice ou encéphalopathie peuvent mettre le pronostic vital en jeu. Elles nécessitent une prise en charge en réanimation.

La troisième étape est le traitement spécifique par l'hème. L'administration d'hème est le traitement de choix de la crise aiguë. Celui-ci agit en réprimant l'expression de l'ALAS et en réduisant les quantités des précurseurs de l'hème (ALA et PBG) accumulés en amont du bloc enzymatique. Plusieurs préparations d'hème, administrées par voie intraveineuse, sont disponibles; mais l'utilisation d'une solution d'hémine humaine stabilisée par l'arginine (Normosang[®]) est de loin la plus utilisée (Mustajoki 1993). Le but du traitement par Normosang[®] est d'éviter les complications neurologiques. Pour être efficace le traitement par Normosang[®] doit débiter avant l'apparition des complications neurologiques.

Moins de 10 % des patients manifestent des crises récurrentes sans qu'il soit identifié un facteur déclenchant. Le plus souvent une administration régulière de Normosang[®] à hauteur d'une prise par semaine s'avère nécessaire.

L'hème exogène a prouvé son efficacité lors du traitement des crises aiguës de PAI. Pourtant, l'administration de ce médicament n'est pas anodine, plusieurs effets secondaires à ce traitement ayant été rapportés, notamment des cas de phlébites ou de thromboses, ou bien encore des cas de surcharge en fer. Afin de réduire ces effets, de nouvelles pistes thérapeutiques sont à l'essai, tout particulièrement des tentatives de thérapie génique. Dans un travail récent Yasouda et al. décrit l'effet bénéfique du siRNA ALAS1 introduit par voie veineuse, et cela dans le même modèle animal que celui de notre étude. L'administration prophylactique de siRNA ALAS1 a permis à la souris d'échapper à l'accumulation d'ALA plasmatique et urinaire induite par phénobarbital. Cet effet protecteur a été obtenu grâce à l'inhibition de la transcription de l'ARNm de l'ALAS1. En outre, cet effet protecteur est dose-dépendant et il est durable dans le temps car une dose IV assure une protection durant 2 semaines. Des protocoles cliniques de traitement de la PAI humaine sont évoqués par certaines équipes.

Aujourd'hui, la greffe hépatique est considérée comme un traitement ultime de la porphyrie aiguë. A ce jour, un nombre limité de patients en ont bénéficié. Celle-ci permet un retour à

la normale des taux urinaires d'ALA et PBG et une disparition des crises (Balwani M and Desnick 2012).

II.1.2 : **Porphyries aiguës non hépatiques :**

II.1.2.a : La porphyrie cutanée tardive (familiale, sporadique) f PCT/s PCT

La PCT est la forme la plus fréquente des porphyries hépatiques chroniques. Elle est caractérisée par une photodermatose bulleuse. Sa prévalence en Europe de l'ouest est d'environ 1/25 000. Les hommes sont davantage affectés que les femmes. La maladie se manifeste chez l'adulte. La PCT est acquise (75 % des cas) ou familiale (25 % des cas). La PCT est due à un déficit en uroporphyrinogène décarboxylase (UROD). Ce déficit, dans la forme familiale de la maladie, est lié à des mutations hétérozygotes du gène UROD entraînant une accumulation de porphyrines (uro et 7-carboxyle porphyrines) dans le foie. La transmission est autosomique, dominante et de faible pénétrance. La PCT ne présente pas de risque vital et son pronostic est favorable. Elle est cependant un facteur reconnu de risque pour le développement du carcinome hépatocellulaire. Des études récentes ont montré l'implication des cytochromes de la famille des cytochromes P450 (CYP1A2) dans la physiopathologie de la maladie (Phillips 2011, (Tchernitchko 2012).

II.1.3 : **Les porphyries érythropoïétiques**

- La porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC)

Connue aussi sous le nom de "maladie de Günther", est une forme rare et complexe de porphyrie. De transmission autosomique récessive, elle est due à un déficit en uroporphyrinogène III synthase (UROIIS) lié à des mutations du gène codant cette enzyme. Il en résulte l'hyperexcrétion et l'accumulation d'uroporphyrinogène I et de coproporphyrinogène I. La PEC se manifeste généralement dès la naissance. La gravité de cette maladie est liée d'une part à l'intensité des lésions cutanées entraînant souvent des déformations et des mutilations sévères (oreilles, doigts, paupières) et d'autre part à des poussées hémolytiques graves nécessitant des transfusions. La sévérité de la PEC est inversement proportionnelle à l'activité de l'UROIIS (Kappas 1995).

- La protoporphyrie érythropoïétique (PPE)

La PPE est associée à un déficit partiel de l'activité de la ferrochélatase lié à des mutations du gène *Fech*. La transmission est de forme autosomique dominante. Ce défaut conduit à une accumulation de protoporphyrine IX dans les érythrocytes, le plasma et les selles. A cause de sa faible solubilité, la protoporphyrine IX n'est pas excrétée par l'urine.

Une étude récente a montré que les complications (maladie hépatique chronique pouvant évoluer vers l'insuffisance hépatique aiguë) seraient la conséquence de l'accumulation de protoporphyrine IX (PpIX) (Lyoumi 2011).

- L'anémie sidéroblastique liée à l'X (ASLX):

L'anémie sidéroblastique héréditaire, maladie récessive liée à l'X est liée à des mutations des gènes *ALAS2* (Cox 2004) ou *ABS7* (transporteur de la membrane interne mitochondriale). L'apparition de la maladie est précoce (dès la naissance) ou plus tardive (20-30 ans). L'ASLX est caractérisée par une production inadéquate de l'hème et une accumulation excessive de fer dans les mitochondries des érythroblastes (Bottomley 2004).

Des données récentes montrent que la perturbation de la région C-terminale de l'*ALAS2* conduit à la production de la PPIX en excès mais en quantités suffisantes pour provoquer une photosensibilité et des dommages hépatiques, en dépit d'une activité *FECH* normale (Whatley 2008). L'ASLX est classiquement sensible au traitement par la pyridoxine.

II.2 : Les porphyries acquises

Les porphyries acquises regroupent un certain nombre d'affections ayant pour conséquence une accumulation des porphyrines ou des précurseurs, consécutive à une inhibition toxique de certaines enzymes de la biosynthèse de l'hème (Nordmann 1994) :

II.2.1: La Tyrosinémie héréditaire de type I

La tyrosinémie héréditaire de type I est la tyrosinémie la plus sévère. C'est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive, causée par un déficit de l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase (FAH), entraînant une accumulation caractéristique de succinylacétoacétate (SAA) et de succinylacétone (SA). La SA est un puissant inhibiteur d'une enzyme clé de la voie de synthèse de l'hème, l'aminolevulinate deshydratase (ALAD) dans le foie et les hématies. Cette inhibition secondaire de la voie de synthèse de l'hème aboutie à une accumulation de l'ALA dans le sang et les urines et une baisse de synthèse de l'hème (Sniderman 2014).

La prévalence est de l'ordre d'un cas sur deux millions. Dans la forme infantile aiguë précoce, l'affection débute entre 15 jours et 3 mois par un syndrome de nécrose hépatocellulaire avec vomissements, diarrhée, ictère, hypoglycémie, oedème, ascite et syndrome hémorragique. Une complication septicémique est fréquente. S'y associe une tubulopathie rénale avec un rachitisme hypophosphatémique. La maladie peut débuter plus tardivement par un rachitisme vitamino-résistant lié à la tubulopathie. Non traitée, la maladie aiguë peut se compliquer par des crises tyrosinémiques avec des accès de polynévrite porphyrique et une dystonie. L'apparition d'hépatomes malins est fréquente.

Le diagnostic est confirmé par la mise en évidence d'ALA et de succinyl acétone dans les urines. Le dosage enzymatique sur fibroblastes est également possible. Le diagnostic anténatal est possible par dosage des métabolites, l'étude enzymatique ou la recherche de la mutation génique. Le traitement repose sur le NTBC (2-(2-Nitro-4-TrifluorométhylBenzoyl)-1,3-Cyclohexanedione) en association avec un régime pauvre en protéines. Malgré le traitement, un hépatocarcinome peut se développer, caractérisé par l'élévation de l'alpha foetoprotéine, et requiert une transplantation hépatique (Fig11).

(Garnier 2005), (Bouchard 2006). La protoporphyrine en excès prend la place de l'hème dans l'hémoglobine et fixe du zinc sur le site occupé habituellement par le fer. L'auto oxydation de l'ALA serait à l'origine de la formation de radicaux libres. Le plomb se substitue par ailleurs au calcium ionisé dans son rôle de second messenger cellulaire, ce qui expliquerait les anomalies de la transmission (Fig12).

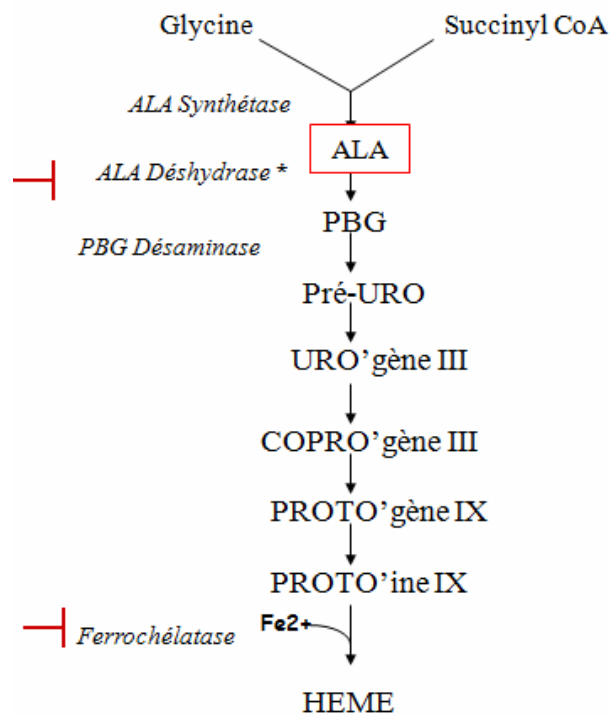


Fig12 : Mécanisme d'action du plomb sur la voie de synthèse de l'hème.

On distingue deux cas d'intoxication, une intoxication aiguë et une intoxication chronique. Au cours de l'intoxication aiguë, les douleurs abdominales dites "coliques de plomb", évoquent les douleurs abdominales de la crise de porphyrie aiguë, sans que l'on puisse prouver un même mécanisme physiopathologique.

La plombémie et la mise en évidence d'une protoporphyrine zinc sont suffisamment parlantes pour différencier cette atteinte d'une porphyrie.

III. La mitochondrie

Les cellules eucaryotes possèdent des organites spécialisés dans la production énergétique cellulaire, les mitochondries. Elles sont en nombre variable, dans les cellules, selon les types cellulaires et leur besoin énergétique.

III.1 : Structure :

La mitochondrie est constituée de deux membranes lipidiques dans lesquelles nous trouvons de nombreuses composantes protéiques, d'un espace inter-membranaire et d'une matrice interne.

III.1.1 : La membrane externe :

C'est une bicouche lipidique intégrant environ 40 protéines (Walther 2009) spécialisées dans le transport transmembranaire. Le passage des molécules à travers la membrane externe est, soit passif à travers le transporteur VDACz pour les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 5 KDa (Maldonado 2012), soit actif pour les molécules d'un poids moléculaire supérieur à cette taille.

Cette membrane assure les interactions avec les structures intracellulaires telles que le cytosquelette et donc la mobilité des mitochondries dans la cellule. Elle comporte également des protéines directement impliquées dans le processus d'apoptose, comme la protéine pro-apoptotique Bax et d'autres protéines de type Bcl2 (antiapoptotiques).

III.1.2 : La membrane interne :

Cette membrane est constituée de lipides voisins de ceux présents dans les membranes bactériennes, et d'un lipide particulier qui assure son imperméabilité aux ions, les cardiolipines (diphosphatidyl glycerol) représentant un cinquième des lipides totaux. Le cholestérol en est absent.

Cette membrane est particulièrement riche en protéines impliquées dans la respiration cellulaire (chaîne respiratoire mitochondriale), la production d'ATP (fonction OXPHOS) et le transport de protéines et de divers métabolites (transporteurs).

Cette membrane forme des structures particulières en forme de replis appelées crêtes mitochondriales, augmentant la surface de cette membrane interne et dans lesquels se

trouvent les composants de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant la synthèse d'ATP.

III.1.3 : L'espace inter membranaire :

Cet espace, délimité par les deux membranes externe et interne, présente une composition proche du cytosol. Il renferme plus de 100 protéines différentes, la plus abondante étant le cytochrome C qui assure le transfert des électrons du complexe III au complexe IV de la chaîne respiratoire (Herrmann 2010).

Parmi ces protéines, certaines sont directement impliquées dans la régulation du processus d'apoptose induit par l'activation de certaines protéines au niveau de la membrane externe. Ce sont soit des facteurs pro-apoptotiques, soit des facteurs anti-apoptotiques.

III.1.4 : La matrice :

C'est le compartiment interne de la mitochondrie, dans lequel plusieurs voies métaboliques prennent place. Cet espace renferme les enzymes du cycle de Krebs, de la β -oxydation des acides gras ou de dégradation de certains acides aminés, ainsi que des enzymes de la voie de synthèse de l'hème.

La matrice mitochondriale contient également les molécules d'ADN mitochondrial. Ce génome mitochondrial est constitué d'une molécule d'ADN circulaire, double brin de 16569 paires de base chez l'homme et dépourvu d'introns (Schatz 1995). Il ne code que pour 13 de la centaine de protéines de la fonction OXPHOS mitochondriale.

III.1.5 : La composition de la chaîne respiratoire et de la fonction OXPHOS :

III.1.5.1 : NADH Ubiquinone OxydoReductase (complexe I) :

C'est un énorme complexe contenant 47 protéines. Il possède un site liant le $\text{NADH} + \text{H}^+$ orienté vers la matrice. C'est à son niveau qu'entrent dans la chaîne respiratoire les électrons portés par le $\text{NADH} + \text{H}^+$ (ce transporteur universel d'électrons est soluble et peut se déplacer d'une enzyme à une autre). Le complexe est alimenté par les $\text{NADH} + \text{H}^+$ provenant de l'oxydation des substrats aussi bien mitochondriaux que cytosoliques.

Ce complexe comporte un groupement FMN (intégré dans une flavoprotéine) et des noyaux fer-soufre. Le complexe I va récupérer les électrons provenant du $\text{NADH} + \text{H}^+$, puis ses électrons vont transiter à travers le groupement FMN et les centres fer-soufre. Enfin ces

électrons seront cédés à l'ubiquinone oxydée qui se trouvera ainsi réduite (ubiquinol). La roténone est un inhibiteur spécifique de ce complexe. Ce complexe est fixe dans la membrane. L'ubiquinol diffuse librement dans la membrane interne à cause de sa solubilité dans les membranes lipidiques (molécule hydrophobe). Il va donc diffuser jusqu'au complexe III où il sera réoxydé en cédant ses électrons (Sharma 2009).

Le complexe I constitue un site privilégié de production d'espèce oxygénées réactives (ROS) (Turrens 1997), molécules pouvant endommager les structures mitochondriales, tant l'ADNmt, les lipides membranaires que les protéines membranaires ou matricielles (Balaban 2005)

III.1.5.2 : Succinate Ubiquinone Oxydoreductase (complexe II) :

Ce complexe fait partie à la fois de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Il est composé de 4 sous-unités protéiques (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD), toutes codées par le génome nucléaire. Les sous-unités A et B situées dans la matrice mitochondriale forment le bras hydrophile de l'enzyme à activité catalytique, tandis que les deux autres sous-unités C et D enchâssées dans la membrane interne constituent le bras hydrophobe (fonction d'ancrage). La sous-unité A est une flavoprotéine et contient les sites de fixation du substrat (succinate) et du cofacteur flavonoïque, le FADH₂. La sous-unité B contient 3 centres fer-soufre.

Ce complexe II catalyse l'oxydation du succinate en fumarate tout en transférant deux électrons vers le pool des quinones. Contrairement aux autres complexes, le transport des électrons via le complexe II n'est pas couplé directement au transfert de protons vers l'espace inter-membranaire.

III.1.5.3 : Ubiquinol cytochrome c reductase (Complexe III) :

Ce complexe III, composée de 11 sous-unités protéiques, se situe au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Il assure le transfert de deux électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome c, transfert couplé avec le passage de quatre protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Le complexe III contient quatre groupe redox actifs : 2 cytochromes b, un cytochrome c1 et un centre fer-soufre.

III.1.5.4 : Cytochrome c oxydase (Complexe IV) :

Ce complexe est composé de 13 sous-unités ; 3 d'entre elles, dotées d'une activité catalytique, sont codées par le génome mitochondrial (COX1, COX2 et COX 3), les 10 autres sous unités sont codées par le génome nucléaire.

Les électrons venant du complexe III sont acceptés par un centre métallique CuA au sein de la sous-unité COX 2. Ce dernier réduit l'hème *a* de la sous-unité catalytique COX1; puis ces électrons sont transférés vers un autre hème (hème *a3*-CuB) dans la sous-unité COX1. A ce stade, les ligands gazeux (O₂) se lient et sont réduits en molécules d'eau. L'énergie libérée par ce transfert d'électrons permet à quatre protons d'être transloqués de la matrice vers l'espace inter-membranaire (Silva 2013).

III.1.5.5 : La F0-F1 ATP synthase (complexe V) :

Ce complexe est composé de 15 sous-unités protéiques, dont deux codées par le génome mitochondrial. Son activité enzymatique est une ATP hydrolase/synthase couplée au transport de protons (Fig13).

Ce complexe est constitué de deux domaines, le domaine mobile F0 (rotor), enchâssé dans la membrane mitochondriale interne qui permet le retour des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice. Le domaine fixe F1 (stator) est un domaine matriciel, il est au contact de la membrane interne, ce domaine est composé de 3 protéines α , 3 protéines β et d'une protéine γ , δ et ϵ . Ce domaine F1 permet l'hydrolyse ou la synthèse d'ATP par un mécanisme de rotation dirigé par le gradient de protons. Les protons passent au travers de la sous unité *a* puis au travers du rotor formé des sous-unités *c*, entraînant la rotation de celui-ci autour de la sous unité α , la rotation de la sous unité γ au sein du domaine F1 génère l'énergie nécessaire pour la phosphorylation de l'ADP. L'activité enzymatique de cette enzyme est décrite comme "rotary catalysis" (Devenish 2008).

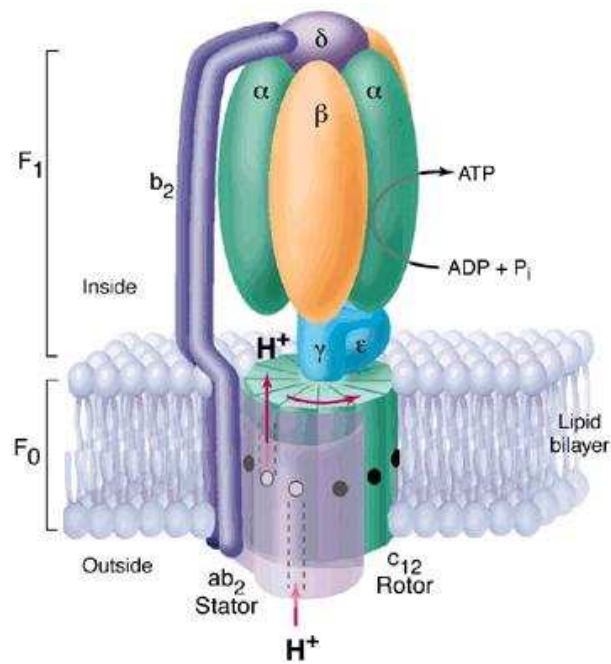


Fig13 : Complexe V

III.2 : Le métabolisme énergétique mitochondrial :

La mitochondrie constitue le fournisseur principal d'énergie à la cellule. Les différentes voies cataboliques matricielles produisent des coenzymes réduits, $\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2 qui seront les substrats de la chaîne respiratoire mitochondriale, permettant de synthétiser les molécules d'adénosine triphosphates (ATP), molécules à haut potentiel énergétique d'hydrolyse apportant l'énergie nécessaire aux différentes fonctions biologiques de la cellule.

III.2.1 : La production des coenzymes réduits :

A l'issue du catabolisme des substrats énergétiques comme les glucides et les acides gras, des molécules d'acétyl-coA sont synthétisées, elles seront ensuite métabolisées par les enzymes du cycle de Krebs pour fabriquer des coenzymes réduits (NADH et de FADH_2).

III.2.1.a : Le cycle de Krebs :

Le cycle de Krebs est une voie indispensable pour la fabrication des coenzymes réduits. Toutes les réactions métaboliques se passent dans la matrice mitochondriale. Le point de départ est la condensation de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate par la citrate synthase aboutissant à la formation de citrate, lequel sera déshydraté par l'aconitase en cis-aconitate. Ce dernier est réhydraté en isocitrate par la même aconitase. L'isocitrate est ensuite oxydé en α -cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase en présence de NAD, puis sera ensuite converti en succinyl-CoA par décarboxylation oxydative dans une réaction nécessitant le

cofacteur NAD et le CoA-SH. Cette réaction enzymatique est réalisée par un ensemble de trois enzymes constituant le "complexe α -cétoglutarate déshydrogénase". Le succinyl-CoA sera transformé en succinate par la succinyl-CoA synthétase, un CoA et une molécule de GTP. Dans l'étape suivante, la succinate déshydrogénase, enzyme à la fois du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire, converti le succinate en fumarate en réduisant une molécule de FAD en FADH₂ (Nelson 2000).

Le fumarate sera transformé en L-malate sous l'action de la fumarase, dans une dernière étape ce L-malate est transformé en oxaloacétate par l'action de malate déshydrogénase.

Le bilan de ce cycle de 10 réactions est la consommation d'une molécule d'acétyl-coA, la synthèse d'une molécule de GTP et la réduction de trois molécules de NADH en NADH+H⁺ et d'une molécule de FAD en FADH₂. Ces cofacteurs réduits seront réoxydés par la chaîne respiratoire, au niveau des complexes I et II.

Certaines étapes du cycle de Krebs sont fortement régulées, ces étapes sont : la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase.

- La citrate synthase est activée par l'acétyl-CoA, l'oxaloacétate et l'ADP mais inhibée par le NADH, l'ATP, le citrate et le succinyl-CoA.
- L'isocitrate déshydrogénase est activée par le calcium et l'ADP, et inhibée par le NADH et l'ATP.
- L' α -cétoglutarate déshydrogénase est activée par le calcium et inhibée par le NADH, l'ATP et son produit le succinyl-CoA.

Il y a donc une régulation selon la disponibilité du substrat, le pouvoir réducteur, la concentration en produit et la charge énergétique (Fig14).

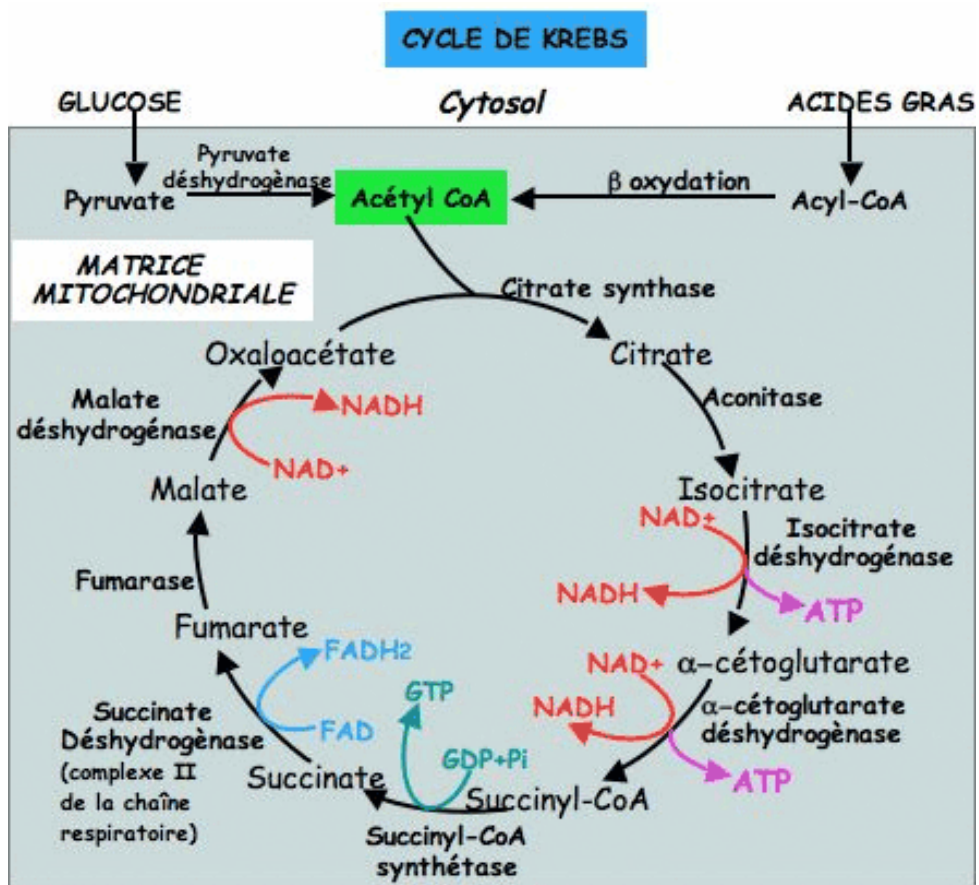


Fig14 : Le cycle de Krebs est un des principaux producteurs de coenzymes réduits alimentant la chaîne respiratoire mitochondriale en électrons au cours de processus d'oxydo-réduction.

III.2.1.b : La β-oxydation des acides gras :

La β-oxydation est la voie principale de dégradation des molécules d'acides gras dans la matrice mitochondriale. Elle produit de l'acétyl-CoA qui intégrera le cycle de Krebs pour y être oxydé, ainsi que des coenzymes réduits, NADH et FADH₂, qui alimenteront la chaîne respiratoire en électrons à haut potentiel énergétique.

Les acides gras sont activés, en aérobiose, dans la matrice mitochondriale par une acyl-CoA synthase qui produira des acyl-CoA. La dégradation complète de la molécule d'acide gras se produit par des découpages successifs de la molécule d'acide gras de maillons dicarbonés et se poursuit jusqu'à ce que la molécule soit complètement dégradée en molécules d'acétyl-CoA. Ce processus de dégradation est appelé "hélice de Lynen" et

chacune de ces étapes successives « tour d'hélice » libère une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de NADH, ainsi qu'une molécule de FADH₂ (Nelson 2000).

Dans le cas d'une molécule d'acide gras à nombre pair de carbone, le dernier tour d'hélice mène à la formation de deux molécules d'acétyl-CoA, une molécule de NADH et une molécule de FADH₂. Dans le cas d'une molécule à nombre impair de carbone, le dernier tour d'hélice mène à la formation d'une molécule de propionyl-CoA, une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de NADH et une molécule de FADH₂.

Chaque tour d'hélice de Lynen libère donc une molécule d'acétyl-CoA qui rentre dans le cycle de Krebs, ainsi qu'une molécule de NADH et une molécule de FADH₂. Au total, la dégradation des molécules d'acide gras libère une énergie totale permettant la synthèse d'un nombre de molécules d'ATP supérieur à la dégradation des molécules de glucides (Fig15).

Par exemple, une molécule d'acide gras de 16 atomes de carbone, l'acide palmitique, permet la synthèse de 106 molécules d'ATP. Une molécule d'acide gras à 6 atomes de carbone, l'acide caproïque, permet la synthèse de 44 molécules d'ATP. A titre de comparaison, la dégradation d'un ose à 6 carbones, le glucose, dégage une énergie permettant la synthèse de 32 molécules d'ATP, soit 27% d'énergie en moins que la molécule d'acide gras renfermant le même nombre d'atomes de carbone.

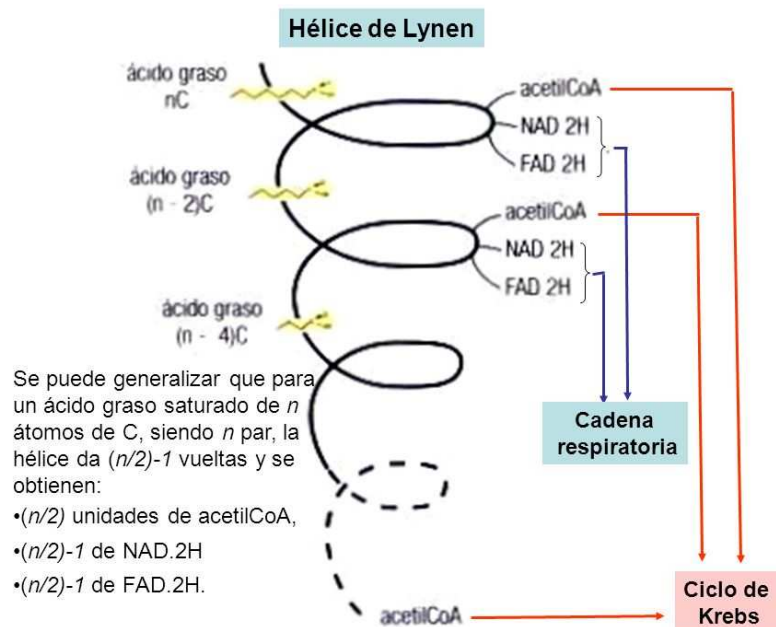


Fig15 : La β -oxydation est un autre fournisseur énergétique pour alimenter l'OXPPOS mitochondriale.

III.2.2: l'oxydation phosphorylante OXPHOS :

Cette fonction intègre la chaîne respiratoire mitochondriale ou chaîne transporteuse d'électrons et la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase.

III.2.2.a : La chaîne respiratoire :

Elle est composée de quatre complexes enzymatiques enfichés dans la membrane interne de la mitochondrie dont le rôle essentiel est de convertir l'énergie des électrons fournis par les équivalents réduits (NADH et FADH₂) issus des catabolismes glucidiques et lipidiques en un gradient électrochimique établi entre les deux faces de la membrane interne mitochondriale (Fig16).

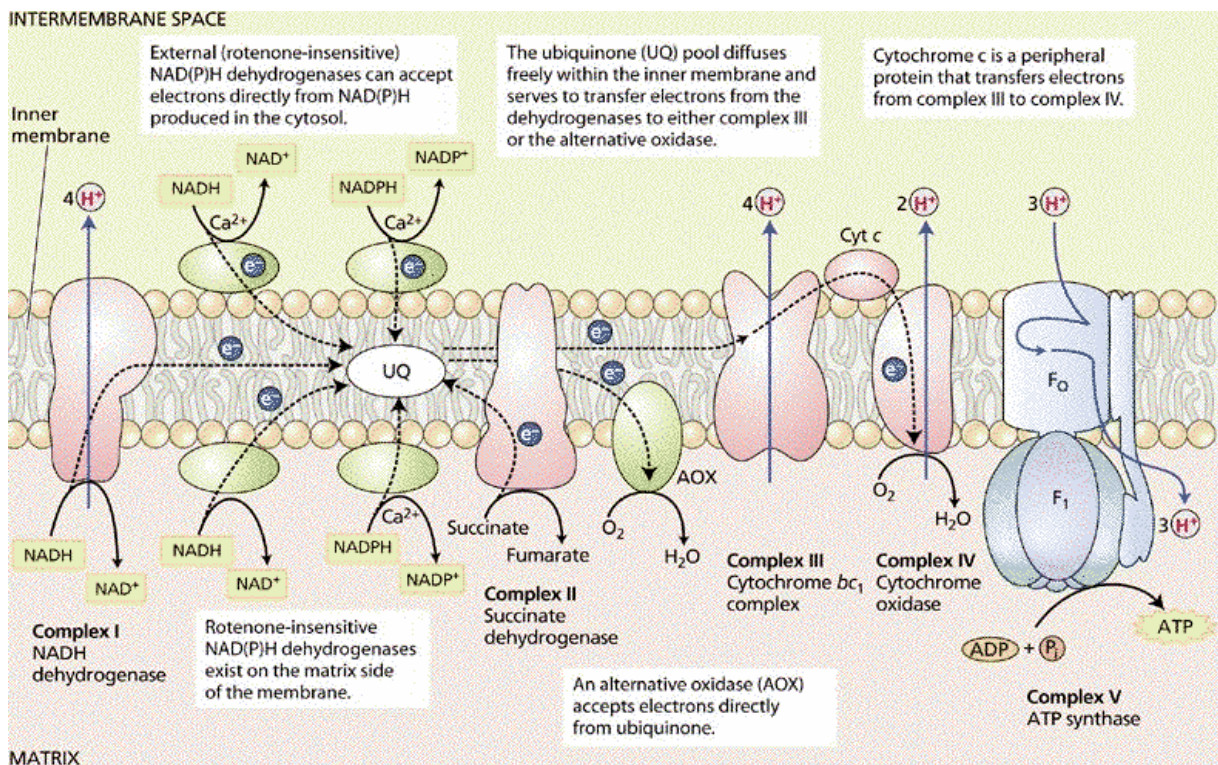


Fig16 : La chaîne respiratoire mitochondriale et l'OXPHOS convertissent l'énergie apportée par les coenzymes réduits en molécules d'ATP.

Les coenzymes réduits (NADH+H⁺ et FADH₂) issus du cycle de Krebs (catabolisme des glucides) et de la β-oxydation (catabolisme des acides gras) sont oxydés au niveau du complexe I (NADH+H⁺) et du complexe II (FADH₂) de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les électrons fournis au cours de cette oxydation, sont transférés au complexe III par un transporteur mobile, le Coenzyme Q ou ubiquinol qui sera oxydé en ubiquinone, libérant des électrons vers le complexe III de la chaîne. Ces électrons seront

cédés par le complexe III à un autre accepteur mobile, le cytochrome c (une hémoprotéine soluble) qui sera oxydé à son tour en transférant ces électrons à l'accepteur final, le dioxygène, au niveau du complexe IV.

L'énergie progressivement libérée au cours de ces transferts d'électrons permet une translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, au niveau des complexes I, III et IV. La membrane interne sera donc chargée positivement sur sa face externe et négativement sur sa face interne, ce qui crée un gradient électrochimique autour de cette membrane interne appelé force protomotrice (ΔP). La théorie chimio-osmotique décrite par Mitchell en 1966, présente une explication de cette conversion d'une énergie chimique en une énergie électrochimique. Ce gradient constitue donc une "réserve dynamique" de l'énergie issue des dégradations des nutriments.

III.2.2.b : Synthèse de l'ATP :

Les protons du gradient de la membrane interne mitochondriale sont redirigés vers la matrice mitochondriale, passant à travers le complexe V de l'OXPPOS. Ce complexe a une activité ATP synthase, permettant donc la synthèse de molécules d'ATP dans la matrice mitochondriale. Cette ATP sera exportée vers le cytosol grâce à une translocase des nucléotides (ANT), transporteur enfiché dans la membrane mitochondriale interne. En fait, il existe plusieurs isoformes d'ANT diversement représentées selon les organes, nommées ANT1 à ANT5 (Fig17).

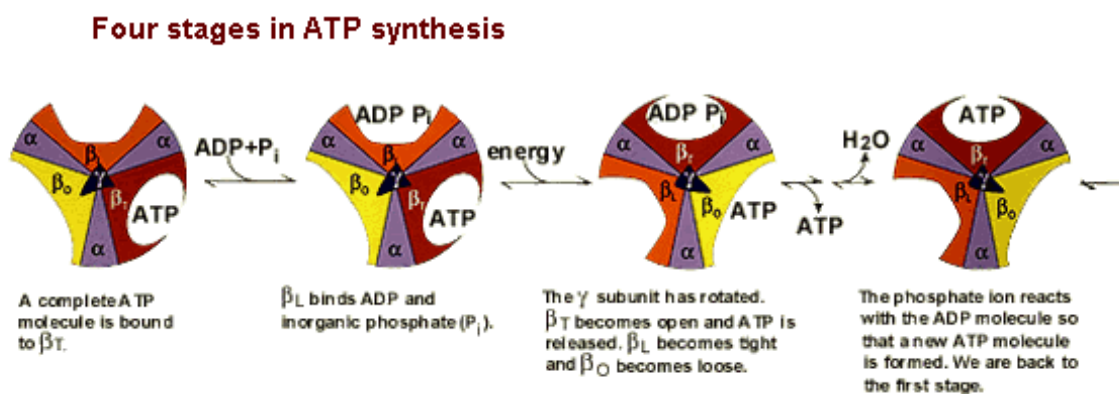


Fig17 : L'ATP synthase permet la synthèse des molécules d'ATP dans la matrice mitochondriale, en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane interne mitochondriale.

III.2. 3 : Régulation de l'oxydation phosphorylante :

La fonction principale de la mitochondrie est la production d'énergie, 90 % de l'ATP synthétisée dans la cellule étant fournie par cet organelle. Chaque type cellulaire de l'organisme doit réguler finement la production énergétique afin de s'adapter à ses propres besoins énergétiques.

Cette régulation passe par plusieurs niveaux, faisant appel à des équilibres entre les molécules produites ou utilisées par la chaîne respiratoire mitochondriale, comme le calcium, le rapport AMP/ATP et le rapport NADH/NAD⁺.

III.2.3.a: Régulation de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante :

L'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale est exprimée par le ratio ATP/O qui reflète l'équilibre entre la quantité d'ATP synthétisée et le nombre de molécules d'oxygène consommées. Ce paramètre peut varier soit par modification de la force motrice et on parle alors d'un découplage extrinsèque, soit par modification de l'efficacité de pompage des protons et on parle alors de découplage intrinsèque.

- *la fuite des protons :*

L'activité de l'ATP synthase dépend du gradient de protons généré par l'activité des complexes de la chaîne respiratoire.

Une partie de ces protons retournent vers la matrice par une simple diffusion. Cette fuite, dite basale, représente environ 20% de la respiration mitochondriale. Elle est directement en rapport avec la quantité des cardiolipines présentes dans la membrane interne (Hubert 2002). Des protéines membranaires, comme l'adénine nucléotide translocase (ANT), peuvent également être impliquées dans cette fuite basale (Brand 2005).

Outre cette fuite basale, il existe un autre type de fuite, inductible, liée à des protéines de la membrane mitochondriale interne qui permettent la translocation des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice. Parmi ces protéines, nous trouvons les protéines découplantes (UCP, uncoupling protein). UCP1, surtout présente dans les adipocytes bruns, activée par des hormones comme la noradrénaline qui régule la température corporelle. UCP2, abondante dans d'autres types cellulaires comme les cellules bêta du pancréas et les macrophages est activée par l'augmentation de ROS et aboutit à une baisse de la synthèse d'ATP (Liu 2013). UCP3, principalement exprimée

dans le muscle, est activée par la surproduction des ROS. Elle permet d'induire un découplage modéré et donc de diminuer le potentiel de membrane (Brand 2004).

- *Les mécanismes intrinsèques :*

Le découplage intrinsèque correspond à l'équilibre entre les protons pompés et les électrons transférés par la chaîne respiratoire mitochondriale. Il module le rapport ATP/O.

Ce phénomène concerne le complexe IV et l'ATP synthase. Il est soumis à des variations métaboliques qui peuvent modifier l'efficacité du pompage des protons (Capitanio 1996).

III.2.3.b: Régulation allostérique :

- *Rôle du calcium :*

La mitochondrie joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire du calcium. L'augmentation du calcium cytosolique implique rapidement une augmentation de celui-ci dans la matrice mitochondriale. Le calcium module l'activité des navettes malate /aspartate. L'élévation du calcium libre mitochondrial $[Ca^{++}]$ stimule de nombreuses déshydrogénases mitochondriales calcium-sensibles, ce qui induit notamment une augmentation du NADPH.

La concentration mitochondriale en calcium stimule l'isoforme 1 de la pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDP1) et régule l'activité de la pyruvate déshydrogénase mitochondriale (Turkan 2004). Dans le cycle de Krebs deux enzymes sont régulées par le calcium, l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase. En plus le calcium pourrait réguler directement la synthèse d'ATP, en se fixant sur la sous-unité F1- β de l'ATP synthase. L'action coordonnée du calcium sur les déshydrogénases et l'ATP synthase occasionne une forte augmentation de la respiration mitochondriale avec une altération minimale du rapport $NAD(P)H / NAD(P)^+ P^+$ (De Marchi 2014).

- *Régulation par le rapport énergétique (ATP/AMP) :*

Le rapport énergétique ATP/AMP joue un rôle important dans la régulation de plusieurs systèmes mitochondriaux. Une augmentation cytosolique du rapport ATP/ADP sera suivie par une augmentation mitochondriale similaire, augmentation qui va activer la

respiration mitochondriale par effet de substrat (stimulation de FOF1-ATP synthase). Cette stimulation nécessite une activation des voies d'apport du substrat et de leur oxydation. Par exemple, le complexe PDH est activé par l'ADP et inhibé par l'ATP (Spriet 2002). Dans le cycle de Krebs, 3 enzymes sont sensibles au ratio ATP/ADP, la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Une augmentation de la concentration de l'ATP peut inhiber l'activité de ces trois enzymes et à l'inverse, une baisse de la concentration cellulaire d'ATP induit augmente l'activité de ces trois enzymes et donc l'apport de coenzymes réduits à la chaîne respiratoire (Strumilo 2005).

D'autre part, le ratio ATP/ADP peut moduler l'activité de la cytochrome c oxydase. Cette enzyme possède des sites de liaison spécifiques de haute affinité à l'ADP et à l'ATP. L'ADP diminue le K_m de l'enzyme pour le cytochrome c, tandis que l'ATP l'augmente (Napiwotzki 1998).

- *La régulation par le rapport $NAD^+/NADH$:*

Le rapport $NAD^+/NADH$ libre joue également un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Le NAD^+ est un co-substrat régulant l'activité de trois enzymes du cycle du Krebs, la malate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase, et l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Le NADH produit par les deux dernières inhibe leur activité. Le complexe PDH est également régulé par le ratio $NAD^+/NADH$; une augmentation de ce rapport liée à une augmentation intramitochondriale du NAD^+ active ce complexe enzymatique (Stein 2012)

III.2.3.c : La régulation post-traductionnelle :

Deux mécanismes principaux de régulation post-traductionnelle conditionnent la production des coenzymes réduits ($NADH^+$ et $FADH_2$) et les complexes de la chaîne respiratoire, la phosphorylation et l'acétylation.

- *Mécanisme de phosphorylation :*

Un tiers des 60 phospho-protéines mitochondriales, caractérisées à ce jour, est impliqué dans les enzymes de la CRM et notamment dans les complexes I et IV (Pagliarini 2006). Cette phosphorylation peut influencer l'activité de ces protéines enzymatiques. Par

exemple, la phosphorylation de la sous-unité NDUFS4 du complexe I par la protéine PKA induit une augmentation de la respiration liée à ce complexe. A l'inverse, une mutation dans cette sous-unité qui induit une diminution de la phosphorylation entraînant une baisse de la respiration liée au complexe I (Papa 2004).

Certaines sous-unités du complexe IV (COX I, COX IV et COX Vb) disposent de sites de phosphorylations et l'activité du complexe IV est régulée par des réactions de phosphorylation/déphosphorylation de ces sous-unités.

Le cytochrome c, ainsi que l'enzyme de détoxification des ROS (la superoxyde dismutase MnSOD), sont aussi phosphorylables. La phosphorylation de la MnSOD aurait un rôle inhibiteur (Bykova 2003), le calcium par contre induit une déphosphorylation de cette enzyme aboutissant à une augmentation de son activité (Hopper 2006)

- *Mécanisme d'acétylation :*

20 % des protéines mitochondriales possèdent des sites putatifs d'acétylation. Parmi ces protéines figurent plusieurs enzymes du cycle de Krebs (fumarate déshydrogénase, malate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase, et succinate déshydrogénase), des enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras et des sous-unités des complexes I et V de la CRM. (Kim 2006).

Les réactions d'acétylation/déacétylation influencent l'activité de ces protéines. Par exemple, l'hyperacétylation de la sous-unité NDUF9 du complexe I est corrélée avec une baisse d'activité de ce complexe et une quantité plus faible d'ATP synthétisée. (Ahne 2008).

III.2.3.d : La régulation transcriptionnelle : la biogenèse mitochondriale :

La biogenèse mitochondriale est définie comme étant l'ensemble des mécanismes nécessaires au développement et à la division des mitochondries préexistantes dans le but d'augmenter la masse mitochondriale, pour s'adapter aux modifications de l'environnement (Jornayvaz 2010).

Du fait de la double origine du protéome mitochondrial, sa biogenèse requiert la participation et la coordination de l'expression du génome mitochondrial et du génome nucléaire. Plusieurs protéines sont responsables de cette coordination, notamment le facteur de transcription précoce PGC-1 α , co-activateur transcriptionnel. Ce facteur induit la synthèse d'autres facteurs comme NRF1 et NRF2 (Nuclear Respiratory Factor) induisant la synthèse des protéines codées par le génome nucléaire. En parallèle, la transcription du génome mitochondrial est activée par le facteur TFAM (Transcription Factor A, mitochondrial), lui-même synthétisé à partir du génome nucléaire.

L'ensemble de ces facteurs nécessite une régulation fine permettant d'assurer l'expression coordonnée des deux génomes, tant pour assurer une biogenèse mitochondriale convenable que pour adapter l'oxydation phosphorylante aux besoins physiologiques. L'adaptation à ces besoins pourrait constituer un signal en retour pour freiner l'activation de la biogenèse mitochondriale à travers ce qu'il est convenu d'appeler "le dialogue nucléo-mitochondrial".

III.3 : La production mitochondriale des ROS :

La mitochondrie est un producteur important des espèces réactives de l'oxygène. Ces ERO (ou ROS) regroupent l'anion superoxide (O_2^-), l'oxygène singulet (O_2^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH^{\bullet}).

Dans des conditions physiologiques, 2 % environ de l'oxygène consommé par la chaîne respiratoire mitochondriale est transformé en anion superoxide (Gnaiger 2000).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est transformé en radical hydroxyl en présence de fer par la réaction de Fenton (Imlay 1988) :



Au sein de la mitochondrie le complexe I est décrit comme le fournisseur majeur de ROS.

Le complexe III produit également des ROS. La production basale est peu importante, mais peut augmenter en cas d'inhibition du complexe III (Murphy 2009).

Il a été décrit un rôle du cycle de Krebs dans la production de ROS, et tout particulièrement l' α -cétoglutarate déshydrogénase par sa sous-unité E3. Cette production est réalisée lors de l'accumulation de CoA-SH et en absence de NAD^+ (Tretter and Adam-Vizi 2004).

Une partie importante des ROS cellulaires sont produits par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces molécules, à faible durée de vie, peuvent altérer les structures cellulaires et moléculaires de voisinage, comme les transporteurs transmembranaires mitochondriaux (complexes TOM et TIM), les protéines enzymatiques de la matrice (l'aconitase du cycle de Krebs), les molécules d'ADNmt peuvent être altérées en cas d'excès de ROS produits et non neutralisées par les systèmes détoxifiants. Ces altérations moléculaires peuvent, éventuellement, permettre l'initiation d'un processus d'apoptose (Fig18).

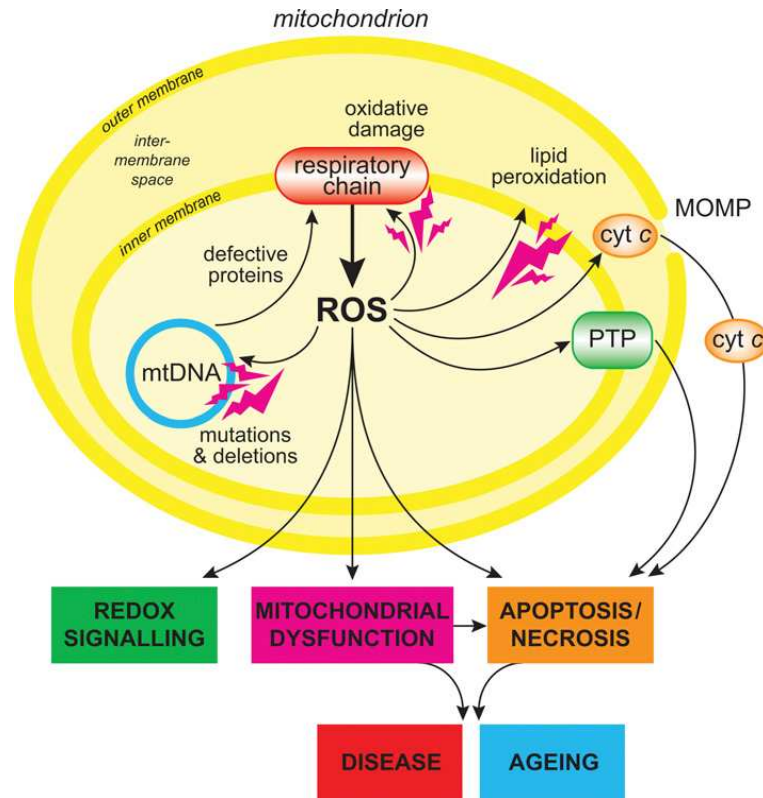


Fig18 : La production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale. (Michael 2009)

La production mitochondriale des ROS peut endommager l'oxydation phosphorylante, les ROS peuvent altérer également les protéines, les membranes et l'ADN mitochondriales. Toutes les voies métaboliques intra mitochondriale sont concernées par les effets des ROS tels que le cycle de Krebs, la bêta oxydation des acides gras, et la synthèse de l'hème. La production de ROS est responsable de la libération mitochondriale des molécules de cytochrome c vers le cytosol en activant la voie de l'apoptose.

MOMP : Outer membrane permeabilization, PTP : permeability transition pore, cyt c : Cytochrome c

La production de ROS par la mitochondrie est en lien avec l'état métabolique de la cellule, notamment avec le couplage entre l'oxydation et phosphorylation ; la production de ROS augmente quand le découplage est important.

III.3.1 : La détoxification mitochondriale des ROS :

La cellule est dotée de plusieurs mécanismes pour détoxifier les ROS. Le système de superoxydes dismutases SOD (CuZnSOD ou SOD1 dans le cytosol et l'espace intermembranaire, MnSOD ou SOD2 dans la matrice mitochondriale) catalyse la transformation de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Le peroxyde d'hydrogène peut induire des effets délétères au sein de la cellule (dommage de l'ADN, peroxydation des lipides). Cette espèce moléculaire est détoxifiée ensuite par

l'activité d'autres enzymes comme la catalase et la glutathion peroxydase (Holley, Bakthavatchalu 2011).

RESULTATS

Introduction articles 1 et 2

La porphyrie aiguë intermittente (PAI, MIM # 176000), est la forme la plus sévère des porphyries hépatiques aiguës, elle est due à des mutations touchant la troisième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème l'hydroxyméthylbilane synthase (HMBS).

La PAI est une maladie de transmission autosomique dominante qui est responsable de crises récurrentes pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients. Elle se manifeste par des crises de type neurovisceral incluant des douleurs abdominales sévères, des nausées, des vomissements, une constipation ou une diarrhée, ainsi qu'une neuropathie périphérique (Thadani 2000). Biologiquement la crise aiguë est caractérisée par une accumulation et une excrétion urinaire massive des précurseurs de l'hème, l'acide delta amino-lévulinique (ALA) et le porphobilinogène (PBG) (Puy 2010). La survenue des crises de PAI est déclenchée le plus souvent par un facteur d'origine endocrinienne ou environnementale, tels que les infections, le jeûne, ou le plus souvent l'utilisation d'un médicament porphorynogène comme par exemple le phénobarbital ou les sulfamides.

La biosynthèse hépatique de l'hème est régulée grâce à un rétrocontrôle négatif exercé par l'hème sur l'activité de la première enzyme mitochondriale de la voie de synthèse de l'hème ALA synthase (ALAS). Cette enzyme catalyse la formation d'ALA mitochondrial par la condensation de glycine et de succinyl-CoA produit par le cycle de Krebs (Ferreira 2011). Dans le foie, l'hème régule l'expression mitochondriale de l'ALAS1 (May 1995). Chez les patients et lors d'une crise de PAI l'activité résiduelle (50%) de l'HMBS peut se révéler insuffisante face à l'afflux massif de précurseurs de l'hème, cela aboutit en conséquence à une carence héminique et une accumulation de précurseurs (Puy 2010). Le traitement avec l'hème arginate (Normosang[®]) réprime probablement la transcription et la traduction de l'ALAS1 (Thunell, 2006). L'hème arginate peut également diminuer la quantité de ALAS1 mitochondriale par un mécanisme de protéolyse (Tian et al., 2011). Le rôle du foie dans la physiopathologie de la PAI est majeur comme le montre l'amélioration clinique spectaculaire suite à la transplantation hépatique chez les patients atteints de PAI (Soonawalla 2004; Dowman 2012).

L'hème est partiellement synthétisé dans les mitochondries (Nelson 2000). L'hème est un cofacteur essentiel de l'oxydation phosphorylée (OXPHOS), des composants tels que le complexe I, le complexe III, le complexe IV et le cytochrome c. L'activité de l'ALAS1 dépend du cycle de Krebs pour son substrat, le succinyl-CoA. En outre, la chaîne respiratoire

mitochondriale (CRM) et l'ALA sont les contributeurs principaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui jouent un rôle central dans la physiopathologie de la PAI (Huang 2011). L'effet bénéfique de la perfusion intraveineuse de glucose en traitement de la crise de PAI est liée à une régulation directe par le glucose sur l'expression de l'ALAS1 (Oliveri 2012). Cela plaide en faveur d'un rôle de carence énergétique dans le déclenchement de la crise (Handschin 2005). De plus, il a été montré que l'expression clinique de la maladie est associée à un état de sous-nutrition en raison de l'accumulation soutenue de l'ALA (Delaby 2009). Dans un modèle de souris, il a été montré que l'expression hépatique du gène ALAS1 est activée par le facteur PGC-1 α , l'un des principaux régulateurs du métabolisme énergétique (Handschin 2005; St-Pierre 2006; Puigserver, 2005). Delaby 2009 a montré une diminution de l'insuline-like growth factor 1 (IGF-1) dans le sérum des patients PAI, l'ensemble de ces éléments renforce l'hypothèse selon laquelle le statut nutritionnel et métabolique du foie peut jouer un rôle majeur dans l'expression clinique PAI.

Le système nerveux central est également impliqué dans la PAI, les crises aiguës sont souvent précédées par une phase prodromique caractérisée par des changements comportementaux tels que l'anxiété, l'agitation et l'insomnie (Crimlisk, 1997). Chez 20-30% des patients, des signes de troubles mentaux telles que la dépression, la désorientation, les hallucinations, la paranoïa, l'agitation ou de la confusion ont été rapportés (Puy 2010). De plus, chez certains patients des lésions corticales ont été détectées par IRM cérébrale (Utz 2001).

Les signes musculaires font aussi parties du tableau clinique de la crise de PAI, les patients présentent des myalgies et une faiblesse musculaire qui commence par les bras et les jambes. Cette faiblesse musculaire peut se compliquer dans les formes graves par des paralysies touchant les muscles respiratoires (Puy 2010; Thadani 2000). Cette complication survient le plus souvent suite à une erreur du diagnostic et/ou une prise en charge inadaptée, et elle peut être responsable d'une mortalité augmentée (10%) (Siegesmund 2010). Cette complication est probablement une conséquence d'une neuropathie périphérique (Albers 2004; Lin 2011). Des électromyographies et des biopsies musculaires pratiquées chez les patients de PAI ont montré la présence des caractéristiques dénervations avec atrophies musculaires (Albers 1978; Yamada 1984). D'autres études ont révélé une dégénérescence nerveuse périphérique et des atteintes des cellules de la corne antérieure (Yamada 1984). A long terme des complications neurologiques comme les neuropathies ont été décrites chez certains patients (Pischick, 2009).

Les causes de ces signes neuromusculaires sont loin d'être comprises. La diffusion de l'ALA du foie vers le reste du corps est considérée comme le principal facteur responsable de l'expression neurologique de la PAI (Moore 1990; Meyer 1998; Solis 2004). Le mécanisme de la neurotoxicité d'ALA peut être lié à ses propriétés pro-oxydantes ou à son homologie structurale avec le GABA (Pereira, 1992; Demasi 1996; Onuki 2004; Meyer 1998). Cependant, cette neurotoxicité liée à l'accumulation de l'ALA n'est probablement pas la cause unique du tableau neuromusculaire de la crise de PAI (Lin 2011). Tout d'abord, aucune corrélation n'a été prouvée entre les niveaux d'ALA lors d'une crise de PAI et la sévérité des signes cliniques (Gorcheinet 1987). Deuxièmement, l'administration d'ALA à des individus sains n'a pas fait apparaître les symptômes de porphyrie (Dowdle 1968; Mustajoki 1992). En troisième lieu, il a été montré dans le même modèle animal (HBMS^{-/-}) en l'absence d'induction par phénobarbital, un dysfonctionnement moteur et une neuropathie due à une dégénérescence axonale et ceci sans augmentation significative de l'ALA (Lindberg 1996; 1999). La cause de cette neurotoxicité en l'absence d'accumulation de l'ALA est inconnue, mais l'absence de l'hème en soi, pourrait contribuer à la pathogénicité de la maladie (Meyer 1998).

Dans ces deux articles nous avons travaillé sur un modèle murin déficient en activité de l'HMBS créé par Lindberg en 1996. Il s'agit d'une souris de fond génétique C57BL/6, hétérozygote composite du gène HMBS. Elle contient deux allèles modifiés du gène HMBS dont un allèle avec une activité nulle et un autre allèle contenant une mutation moins sévère. Cette souris exprime biochimiquement les caractéristiques de la PAI. Elles présentent une activité résiduelle de 30% de HMBS dans le foie et une excrétion urinaire massive de l'ALA et PBG après l'administration intrapéritonéale du phénobarbital.

Afin d'explorer la fonction énergétique mitochondriale dans des conditions physiopathologiques similaires à la crise de PAI, nous avons donc étudié le métabolisme énergétique mitochondrial dans le foie, le cerveau et dans le muscle squelettique de ces souris HMBS^{-/-}.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in a mouse model



Chadi Homedan^{a,b,1}, Jihane Laafi^{a,1}, Caroline Schmitt^{c,d,e,1}, Naïg Gueguen^{b,f}, Thibaud Lefebvre^{c,d,e}, Zoubida Karim^{c,d,e}, Valérie Desquiret-Dumas^{b,f}, Céline Wetterwald^b, Jean-Charles Deybach^{c,d,e}, Laurent Gouya^{c,d,e}, Hervé Puy^{c,d,e}, Pascal Reynier^{b,f,*}, Yves Malthiery^{a,b}

^a UMR INSERM 1063, Angers, France^b Centre Hospitalier Universitaire, Département de Biochimie et Génétique, Angers, France^c Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre Français des Porphyries, Hôpital Louis Mourier, Université Paris Diderot, Colombes, France^d INSERM U1149, Center for Research on Inflammation (CRI), Université Paris Diderot, Paris, France^e Laboratory of Excellence, GR-Ex, Paris, France^f UMR CNRS 6214–INSERM 1083, Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2014

Received in revised form 29 March 2014

Accepted 31 March 2014

Available online 13 April 2014

Acute intermittent porphyria
Mitochondria
Oxidative phosphorylation
Hydroxymethylbilane synthase
Tricarboxylic acid cycle

ABSTRACT

Acute intermittent porphyria (AIP), an inherited hepatic disorder, is due to a defect of hydroxymethylbilane synthase (HMBS), an enzyme involved in heme biosynthesis. AIP is characterized by recurrent, life-threatening attacks at least partly due to the increased hepatic production of 5-aminolaevulinic acid (ALA). Both the mitochondrial enzyme, ALA synthase (ALAS) 1, involved in the first step of heme biosynthesis, which is closely linked to mitochondrial bioenergetic pathways, and the promise of an ALAS1 siRNA hepatic therapy in humans, led us to investigate hepatic energetic metabolism in *Hmbs* KO mice treated with phenobarbital. The mitochondrial respiratory chain (RC) and the tricarboxylic acid (TCA) cycle were explored in the *Hmbs*^{-/-} mouse model. RC and TCA cycle were significantly affected in comparison to controls in mice treated with phenobarbital with decreased activities of RC complexes I (–52%, ** $p < 0.01$), II (–50%, ** $p < 0.01$) and III (–55%, * $p < 0.05$), and decreased activity of α -ketoglutarate dehydrogenase (–64%, * $p < 0.05$), citrate synthase (–48%, ** $p < 0.01$) and succinate dehydrogenase (–53%, * $p < 0.05$). Complex II-driven succinate respiration was also significantly affected. Most of these metabolic alterations were at least partially restored after the phenobarbital arrest and heme arginate administration. These results suggest a cataplerosis of the TCA cycle induced by phenobarbital, caused by the massive withdrawal of succinyl-CoA by ALAS induction, such that the TCA cycle is unable to supply the reduced cofactors to the RC. This profound and reversible impact of AIP on mitochondrial energetic metabolism offers new insights into the beneficial effect of heme, glucose and ALAS1 siRNA treatments by limiting the cataplerosis of TCA cycle.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: α KGDH, alpha-ketoglutarate dehydrogenase; AIP, acute intermittent porphyria; ALA, 5-aminolaevulinic acid; ADP, adenosine diphosphate; ALAS, ALA synthase; ATP, Adenosine triphosphate; CoASH, coenzyme A; COX, cytochrome oxidase; CS, citrate synthase; CuZnSOD, CuZn, superoxide dismutase; DCPIP, 2,6-Dichlorophenol indophenol; DNTB, dinitrothiocyanobenzene; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; ICDH, isocitrate dehydrogenase; IGF-1, insulin-like growth factor 1; KCl, potassium chloride; KCN, potassium cyanide; KGDH, α ketoglutarate dehydrogenase; MnSOD, Mn superoxide dismutase; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; ND, NADH dehydrogenase; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PBG, porphobilinogen; HMBS, hydroxymethylbilane synthase; PB, phenobarbital; PGC1- α , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1; RC, respiratory chain; RCR, respiratory control ratio; RNAi, RNA interfering; ROS, reactive oxygen species; SDH, succinate dehydrogenase; siRNA, small interfering RNA, TCA cycle, tricarboxylic acid cycle; WT, wild type.

* Corresponding author at: CHU d'Angers, Département de Biochimie et Génétique, 4 rue Larrey, F-49933 Angers, France. Tel.: +33 2 41355542; fax: +33 2 41354017.

E-mail address: pareynier@chu-angers.fr (P. Reynier).¹ Contributed equally to this work.<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.032>

1357-2725/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Acute intermittent porphyria (AIP, MIM #176000), the most common form of acute hepatic porphyrias, is due to mutations of hydroxymethylbilane synthase (HMBS, EC 2.5.1.61), the third enzyme in the heme biosynthetic pathway. AIP leads to the accumulation and increased urinary excretion of heme precursors such as 5-aminolaevulinic acid (ALA) and porphobilinogen (PBG) (Puy et al., 2010). This autosomal dominant disorder is responsible for life-threatening, neurovisceral symptoms including severe abdominal pain, nausea, vomiting, constipation or diarrhoea, as well as peripheral neuropathy, tachycardia, high blood pressure, confusion, and seizure (Thadani et al., 2000).

The occurrence of AIP attacks frequently involves endocrine or environmental factors, such as infections, starvation, or the use of drugs, e.g. phenobarbital and sulfonamides. Hepatocytes require a variety of hemoproteins, including mitochondrial respiratory cytochromes and the cytochrome P450 enzymes (CYPs) that are involved in xenobiotic detoxification (Balwani and Desnick, 2012). Heme biosynthesis is regulated through negative feedback control by the heme itself on the first rate-limiting mitochondrial enzyme in the pathway, i.e. ALA synthase (ALAS). This enzyme catalyses the mitochondrial formation of ALA from the condensation of glycine and succinyl-CoA produced by the TCA cycle (Hunter and Ferreira, 2011). In the liver, heme regulates the synthesis and mitochondrial translocation of the ALAS1 housekeeping isoform (May et al., 1995). The ~50% residual activity of HMBS in AIP patients may be insufficient to handle the increased flux through the biosynthetic pathway, due to drug-induced AIP attacks, leading to the relative reduction of heme synthesis and accumulation of ALA/PBG (Puy et al., 2010). The subsequent sharp increase of ALAS1 activity may further enhance ALA accumulation. Treatment with heme arginate (Normosang®) probably represses ALAS1 induction through negative retro-control of heme itself at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational levels (Thunell, 2006). Heme arginate may also decrease mitochondrial ALAS-1 protein through proteolysis (Tian et al., 2011). The pre-eminence of the liver in the pathophysiology of AIP and in ALA production has been highlighted by the spectacular benefit of liver transplantation in patients with severe AIP (Soonawalla et al., 2004; Dowman et al., 2012). In vitro, HepG2 cells in the presence of ALA are particularly sensitive to oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA (Onuki et al., 2004). In the rat, ALA, accumulates in the liver and diffuses to the body, acting as a neurotoxic agent and an endogenous pro-oxidant, leading to oxidative damage of tissues (Demasi et al., 1996; Sima et al., 1981).

Heme, the lack of which could in itself cause neurovisceral symptoms (Meyer et al., 1998), is partially synthesized in mitochondria (Nelson and Cox, 2000). Heme is a crucial cofactor of key oxidative phosphorylation (OXPHOS) components, such as ubiquinol-cytochrome *c* oxydoreductase (complex III, heme *bL* and *bH*), cytochrome oxidase (complex IV, heme *a* and *a3*) and cytochrome *c*, which transport electrons from complex III to complex IV. ALAS depends on the TCA cycle for its substrate, the succinyl-CoA and the erythroid ALAS2 has been shown to interact directly through a C-terminal specific binding domain with the β subunit of succinyl-CoA synthetase 2 (Bishop et al., 2012). In addition, the respiratory chain (RC) and ALA are major contributors of reactive oxygen species (ROS) that play a central role in the pathophysiology of AIP (Huang et al., 2011). The beneficial effect of intravenous glucose infusion in AIP crisis is mainly thought to be related to a direct down-regulation of the levels of ALAS1 messenger and protein (Oliveri et al., 2012). Moreover, this argues in favor of an energetic deficiency (Handschin et al., 2005) and it has been shown that the clinical expression of the disease is associated with a state of under-nutrition due to the sustained accumulation

of ALA (Delaby et al., 2009). In a mouse model, the expression of the hepatic *ALAS1* gene has been shown to be turned on by the fasting-induced transcriptional coactivator proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α), one of the main regulators of energetic metabolism (Handschin et al., 2005; St-Pierre et al., 2006; Puigserver, 2005). The recent demonstration of the decrease in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and transthyretin (prealbumin) in the serum of AIP patients (Delaby et al., 2009), together with the findings reported in a mouse model concerning the role of fasting in precipitating crises of acute porphyria (Handschin et al., 2005), reinforce the hypothesis that the nutritional and metabolic status of the liver may play a major role in the AIP clinical expression.

Despite the considerable links between heme biosynthesis and mitochondrial energetic metabolism, very few studies have addressed the possible involvement of a defect of mitochondrial energetic metabolism in AIP. The perspective of a subcutaneous RNAi therapeutic targeting of hepatic *ALAS1* (<http://www.alnylam.com/Programs-and-Pipeline/Alnylam-5x15/Porphyria.php>) highlights the necessity of a better characterization of the *ALAS1*-TCA-RC relationship in hepatocytes. The aim of the present study was to examine the mitochondrial energetic profile in the liver of the *Hmbs*^{-/-} deficient mouse model (Lindberg et al., 1996, 1999) during phenobarbital exposure and after heme arginate treatment.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The murine *Hmbs*^{-/-} model of AIP used in this study was generated by Lindberg et al. (1996, 1999). These mice are compound heterozygotes of two different disruptions (one null allele and a functional allele with a milder mutation) of *Hmbs* gene from the T1 strain C57BL/6-*hmbs*^{tm1(neo)Uam} and the T2 strain C57BL/6-*hmbs*^{tm2(neo)Uam}. These mice were shown to display a residual *Hmbs* activity of 30.9% in the liver.

Thirty-four female mice (8–10 weeks old) with the same genetic background, i.e. C57BL/6, were divided into four groups. The first group (16 mice), noted WT, consisted of wild type *Hmbs*^{+/+} mice used as controls. The second group (6 mice), noted BS, consisted of *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state. The third group (6 mice), noted PB, consisted of *Hmbs*^{-/-} mice submitted to intraperitoneal injection of phenobarbital (Gardenal®) at 100 mg kg⁻¹ for 3 consecutive days as previously described (Johansson et al., 2003); these mice were sacrificed by cerebral dislocation 15 h after the last injection. The fourth group (6 mice) noted PB-HA, consisted of *Hmbs*^{-/-} mice in a state of phenobarbital-induced AIP treated by an intraperitoneal injection of heme arginate (Normosang®) at 8 mg kg⁻¹ for 2 consecutive days; these mice were sacrificed by cerebral dislocation 2 h after the last injection. In humans, the recommended daily dose of heme arginate is 3 mg kg⁻¹ d⁻¹ and is infused intravenously. Schuurmans et al. (2001) have shown that heme arginate at 3 mg kg⁻¹ (IP) did not significantly reduce plasma ALA concentrations in *Hmbs*^{-/-} mice induced by phenobarbital injection (100 mg kg⁻¹, IP) and that the most effective dose was at least 6 mg kg⁻¹ (IP). Mice had access to food and water ad libitum. The metabolic profiles of urinary ALA and PBG, analyzed in the four groups of mice (Supplementary Fig. 1), confirmed the specific and reversible accumulation of ALA and PBG during exposure to phenobarbital. Urinary porphyrin precursor levels were determined on fresh urine collected before treatment and on each day of treatment (WT, BS and PB-HA groups of mice were sacrificed on the fifth day whereas the PB group of mice was sacrificed on the third day). ALA and PBG levels in pooled urine were analyzed by sequential ion-exchange chromatography using the ALA/PBG by Column Test Kit (Bio-Rad, CA, USA). All animal experiments were conducted

in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth edition, 2011, National Research Council, National Academies Press, Washington, DC, USA.

2.2. Isolation of mitochondria from the liver

Mitochondria were isolated from the liver in the cold room (+4 °C) where all the reagents were kept on ice. Liver mitochondria were isolated using a modification of the differential centrifugation procedure described by Krähenbühl et al. (1994). The liver was cut into small pieces less than a millimeter cube in a buffer for isolation: 1 ml/100 mg liver composed of 100 mM saccharose, 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, and 5 mM EGTA at pH 7.4. Then, it was homogenized with 7 up-and-down strokes in a 50 ml Potter at 1000 rpm. The homogenate was centrifuged at 600 × g for 10 min at +4 °C and the supernatant collected was filtered through a layer of gauze and centrifuged at 7000 × g for 10 min at +4 °C. The mitochondrial pellet was washed with the isolation buffer and centrifuged at 3500 × g for 10 min at +4 °C before being resuspended in a minute volume of isolation buffer and conserved on ice. The protein concentration was determined using the colorimetric bicinchoninic acid procedure (BC Assay Kit[®], Montluçon, France) with BSA as standard.

2.3. Mitochondrial respiratory rates

Oxygen consumption was measured using Clark electrodes sensitive to oxygen. Isolated liver mitochondria were resuspended in the respiratory buffer containing in 120 mM KCl, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, and 0.3% bovine serum albumin at pH 7.4. Respiratory rates were recorded at 37 °C in 1 ml glass chambers using a two-channel, high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria). Respirations (state II) were initiated in the presence of either complex I substrates (5 mM malate and 2.5 mM pyruvate), complex II substrates (10 mM succinate supplemented with 10 μM rotenone) or complex IV substrates (5 mM *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine reduced with 50 mM ascorbate). The active state of respiration (state III, coupled-respiration) was initiated by the addition of saturating ADP concentration (0.5 mM). Cyt *c* was added (8 μM) to check the outer mitochondrial membranes integrity. The ATP synthase inhibitor oligomycin was then added to obtain the state IV respiration rate. The maximal capacity of the electron transport system was recorded by uncoupling respiratory chain using 1 μM carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP). The respiratory control ratio (RCR) was defined as the State III/State IV using complex I substrates.

2.4. Mitochondrial enzyme activities

The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes (I–IV) and of the TCA cycle enzymes in liver mitochondria were measured at 37 °C on a Beckman DU 640B spectrophotometer (Beckman Coulter, CA, USA) as described previously (Guillet et al., 2011).

2.5. Preparation of liver homogenates

All steps were performed in the cold room. Biopsies were weighed and rinsed quickly with an extraction buffer containing 220 mM mannitol, 75 mM saccharose, 10 mM Tris, 1 mM EGTA, pH 7.2. Samples were homogenized with 3 up-and-down strokes in a 2–3 ml Potter at 1000 rpm and centrifuged at 650 × g for 20 min. at 4 °C. The supernatant was conserved and the pellet was homogenized and centrifuged again. The two supernatants obtained were mixed and conserved at 4 °C.

2.6. Complex I (NADH ubiquinone reductase)

Complex I activity was measured in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 3.75 mg ml⁻¹ fatty acid-free BSA, 0.1 mM decylubiquinone and 10 μg ml⁻¹ of mitochondrial proteins with, or without, 10 μM rotenone. After 2 min of incubation at 37 °C, the reaction was initiated by adding 0.1 mM NADH (final concentration). The enzyme activity was measured at 340 nm by monitoring the oxidation of NADH.

2.7. Complex II (succinate ubiquinone reductase)

Complex II activity was measured in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 2.5 mg ml⁻¹ fatty acid-free BSA, 1 mM KCN, 5 μM rotenone, 5 μg ml⁻¹ antimycin, 30 mM succinate, 0.1 mM DCPIP and 5 μg ml⁻¹ of mitochondrial proteins. After 2 min of incubation at 37 °C, the reaction was initiated by adding 0.05 mM decylubiquinone. The enzyme activity was measured at 600 nm by monitoring the reduction of DCPIP.

2.8. Complex III (ubiquinone-cytochrome *c* reductase)

Complex III activity was determined by monitoring the reduction of cytochrome *c* at 550 nm. Five microgram of mitochondrial proteins were incubated for 30 s in 1 ml reaction medium consisting of 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.5), 1 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 1 mM KCN, 100 μM oxidized cytochrome *c* and 50 μM EDTA, pH 7.5. The reaction was initiated by adding 100 μM decylubiquinol, and the optical density was measured for 1 min. The non-enzymatic reduction of cytochrome *c* was measured under the same conditions after addition of 10 μg ml⁻¹ antimycin A. The specific activity of complex III was calculated by subtracting the activity of the non-enzymatic reaction from that of the total activity.

2.9. Complex IV (cytochrome-*c* oxydase)

Complex IV activity was determined by monitoring the oxidation of cytochrome *c* at 550 nm. A 80 μM solution of reduced cytochrome *c* (92–97% reduced using dithionite) in 50 mM KH₂PO₄ (pH 7), was pre-incubated for 2 min at 37 °C. The reaction was initiated by adding 2 μg ml⁻¹ mitochondrial protein and the change in optical density at 550 nm was recorded for 1.5 min.

2.10. Citrate synthase

Citrate synthase activity was measured in a reaction medium containing 0.15 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) regenerated with 1 M Tris buffer at pH 8.1, 0.5 mM oxaloacetate, 0.3 mM acetyl-CoA and 1% Triton X-100. After 2 min of incubation at 37 °C, the reaction was triggered by adding 50 μg ml⁻¹ of mitochondrial proteins, and the reduction of DNTB by CoASH was followed at 412 nm.

2.11. Fumarase

Fumarase activity was measured by monitoring the formation of fumarate from malate at 250 nm. The mix composed of 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 10 mM malate and 0.2% Triton was incubated for 5 min at 37 °C. The reaction was started by adding 50 μg ml⁻¹ (final volume) of mitochondrial proteins and the change in optical density at 250 nm was recorded for 4 min.

2.12. Succinate dehydrogenase (SDH)

Succinate dehydrogenase activity was measured after the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) in the presence of 1 mM phenazine methosulfate (PMS) at 600 nm. Mitochondrial

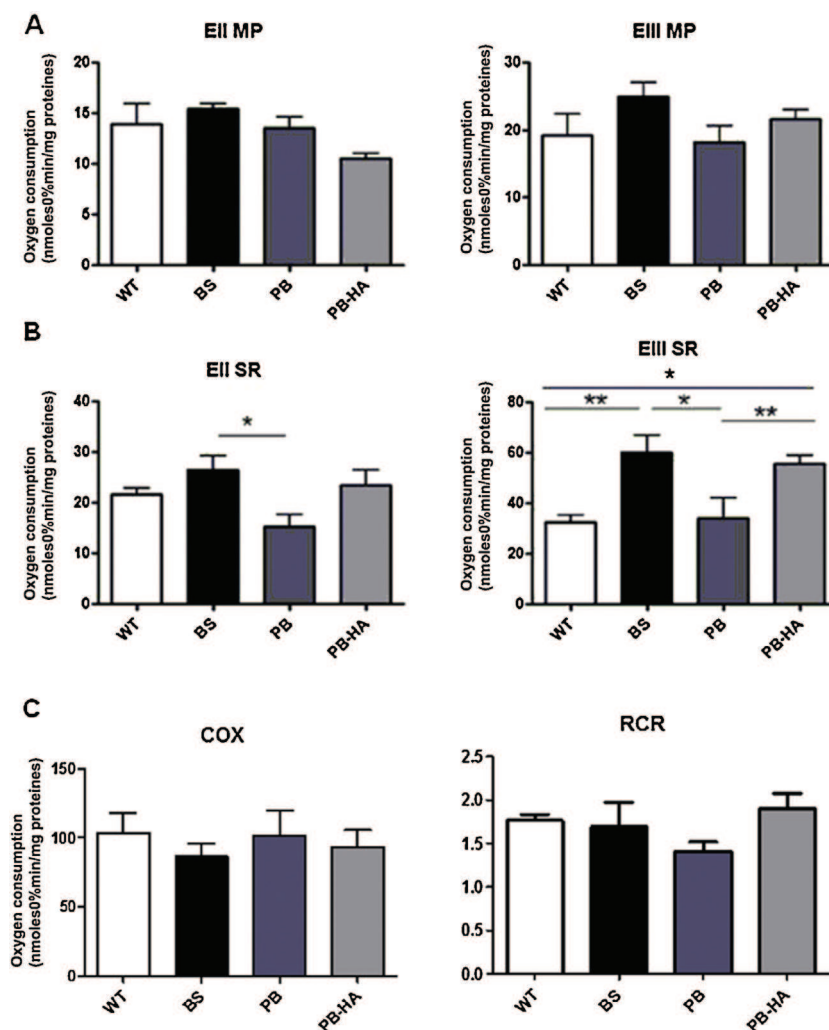


Fig. 1. Oxygen consumption on isolated liver mitochondria. Rates of oxygen consumption in respiratory states II (EII) and III (EIII): (A) in the presence of complex I-dependent substrates (MP); and (B) in the presence of complex II-dependent substrate (SR). (C) COX respiratory rates and calculated respiratory control ratios: EIII/EII (RCR). The oxygen consumption was measured in nanomoles of oxygen per minute per milligram of mitochondrial protein and the results are expressed as mean values \pm standard deviation. WT: *Hmbs*^{+/+} control mice. BS: *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state. PB: *Hmbs*^{-/-} mice after intraperitoneal phenobarbital injection. PB-HA: *Hmbs*^{-/-} mice after phenobarbital exposure followed by intraperitoneal injection of heme arginate. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

proteins (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were incubated in a mix containing 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.5), 16 mM succinate, and 1.5 mM KCN for 5 min at 37°C. The reaction was started by adding 100 μM DCPIP, and the optical density was recorded for 1.5 min.

2.13. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH), aconitase and isocitrate dehydrogenase synthase (ICDH)

The activities of three enzymes were measured during the same reaction using two different reaction mediums. First, to assay α -ketoglutarate dehydrogenase we used a mix containing 10 mM KH_2PO_4 (pH 7.2), 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.1% Triton, 2 mM DTT, 2 mM α -ketoglutarate, 0.8 mM NAD^+ , 0.1 mM thiamine pyrophosphate (TPP) and 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of mitochondrial protein. After 3 min of incubation at 37°C, the reaction was triggered by adding 0.2 mM CoASH, and the reading was recorded for 2 min at 340 nm. Then, in the same cuvettes of the spectrophotometer, we added the second mix containing 10 mM citrate, 10 mM MgCl_2 and 0.8 mM NAD^+ to assay aconitase for 4 min at 340 nm. Finally, we added 10 mM of isocitrate to assay isocitrate dehydrogenase, recording the reading for 3 min at 340 nm.

2.14. Statistical analysis

Statistical comparisons were made with the Mann-Whitney U test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Mitochondrial respiration in the liver of phenobarbital treated *Hmbs*^{-/-} mice is altered

A spontaneous increase in state III respiration (the maximal phosphorylating respiration stimulated by ADP) driven by complex II was found in liver mitochondria from *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state (BS) compared to wild type (WT) mice (+83%, ** $p < 0.01$) (Fig. 1B, right panel). There was no significant difference in the mitochondrial respiration driven by complex I substrates, malate and pyruvate, among the four groups of *Hmbs*^{-/-} mice studied, i.e. BS, WT, PB (mice with phenobarbital-induced AIP), and PB-HA (PB mice treated with heme arginate), in state II respiration, which is non-phosphorylating without ADP, and in state III respiration

(Fig. 1A). In contrast, the endogenous state II respiration (EII) driven by complex II, with succinate and rotenone as substrates, was significantly reduced in mitochondria from PB mice compared to BS mice (-59% , $^* p < 0.05$) (Fig. 1B). The endogenous ADP-stimulated state III respiration (EIII) driven by complex II was also significantly reduced in liver mitochondria from PB mice compared to BS mice (-58% , $^{**} p < 0.01$), and in PB-HA mice the treatment significantly compensated the reduced respiration in PB mice ($+58\%$, $^* p < 0.05$) (Fig. 1B). There were no significant differences among the four groups of mice with regard to complex IV (cytochrome oxidase)-driven mitochondrial respiration (Fig. 1C), nor were there any significant differences in the respiratory control ratios (RCRs).

Three control experiments showed that the mitochondrial respiratory inhibition was not due to the phenobarbital itself or to its derived products. Firstly, the phenobarbital directly administered in the Oxygraph to isolated liver mitochondria from WT *Hmbs*^{+/+} mice did not affect the respiratory rate (data not shown). Secondly, WT mice injected with phenobarbital (WT-PB) showed no significant impairment of the mitochondrial respiration driven by complexes I and II or by the isolated complex IV in comparison to non-injected controls (WT) (Supplementary Fig. 2). Lastly, enzymatic activities of respiratory chain complexes, in liver of WT mice treated with phenobarbital, were not significantly affected (Supplementary Fig. 2).

3.2. The enzymatic activities of the first three mitochondrial respiratory chain complexes are altered in the liver of *Hmbs*^{-/-} mice exposed to phenobarbital

Mitochondrial respiratory complex I activity was significantly reduced (Fig. 2) in the liver of PB mice compared to BS mice (-52% , $^{**} p < 0.01$) with a partial restoration of activity in the PB-HA mice ($+39\%$, $^* p < 0.05$). Complex II activity was significantly reduced in the liver of PB mice compared to BS mice (-50% , $^{**} p < 0.01$)

but without restoration of activity in the PB-HA mice. Complex III activity was significantly reduced in the liver of PB mice compared to BS mice (-55% , $^* p < 0.05$) with an almost complete restoration of activity in the treated PB-HA mice ($+80\%$, $^* p < 0.05$). Complex IV hemic activity was not significantly different in the liver mitochondria of the four groups of mice studied.

The analysis of protein levels of the subunits of complexes I–V in liver homogenates, using an OXPHOS antibody cocktail, showed no significant differences in the mitochondria from PB mice compared to BS mice (Supplementary Fig. 3). Similarly, the expression levels of mitochondrial (MnSOD) and cytosolic (CuZnSOD) superoxide dismutases, which are usually stimulated in response to oxidative stress, showed no significant differences between PB mice and BS mice. These two results suggest that the reduced activity of RC complexes observed in AIP mice exposed to phenobarbital is due neither to reduced OXPHOS protein expression nor to increased ROS production (Supplementary Fig. 4).

3.3. The mitochondrial enzymatic activities of three TCA cycle enzymes are altered in the liver of *Hmbs*^{-/-} mice exposed to phenobarbital

The mitochondrial enzymatic activities of five TCA cycle enzymes were investigated (Fig. 3): succinate dehydrogenase (SDH), fumarase, α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH), citrate synthase (CS) and isocitrate dehydrogenase (ICDH). After phenobarbital injection, the activities of α -KGDH, CS and SDH, were reduced by 64% ($^* p < 0.05$), 48% ($^{**} p < 0.01$) and 53% ($^* p < 0.05$), respectively, in mitochondria from PB mice compared to BS mice, whereas the activities of fumarase and ICDH were not affected. The remission in the treated PB-HA mice completely compensated the α -KGDH defect ($+244\%$, $^* p < 0.05$) and partially compensated the SDH defect ($+30\%$, $^* p < 0.05$) but failed to compensate the CS defect. As in the case of most RC complex activities, the SDH and CS activities were spontaneously greater, ($+55\%$, $^* p < 0.05$) and ($+70\%$,

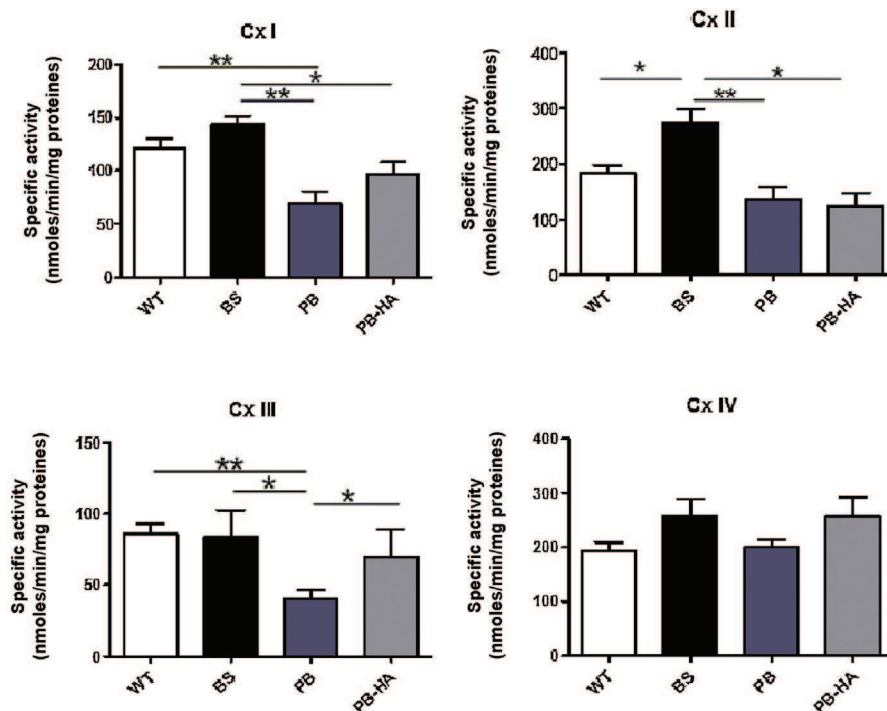


Fig. 2. Mitochondrial OXPHOS complex enzymatic activities in liver homogenate fractions. Activities of RC complexes were measured on isolated liver mitochondria from the four groups of mice. Results are expressed in nmoles min⁻¹ mg⁻¹ of mitochondrial protein as mean values \pm standard deviation. WT: *Hmbs*^{+/+} control mice. BS: *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state. PB: *Hmbs*^{-/-} mice after intraperitoneal phenobarbital injection. PB-HA: *Hmbs*^{-/-} mice after phenobarbital exposure followed by intraperitoneal injection of heme arginate. Statistical significance: $^* p < 0.05$ and $^{**} p < 0.01$.

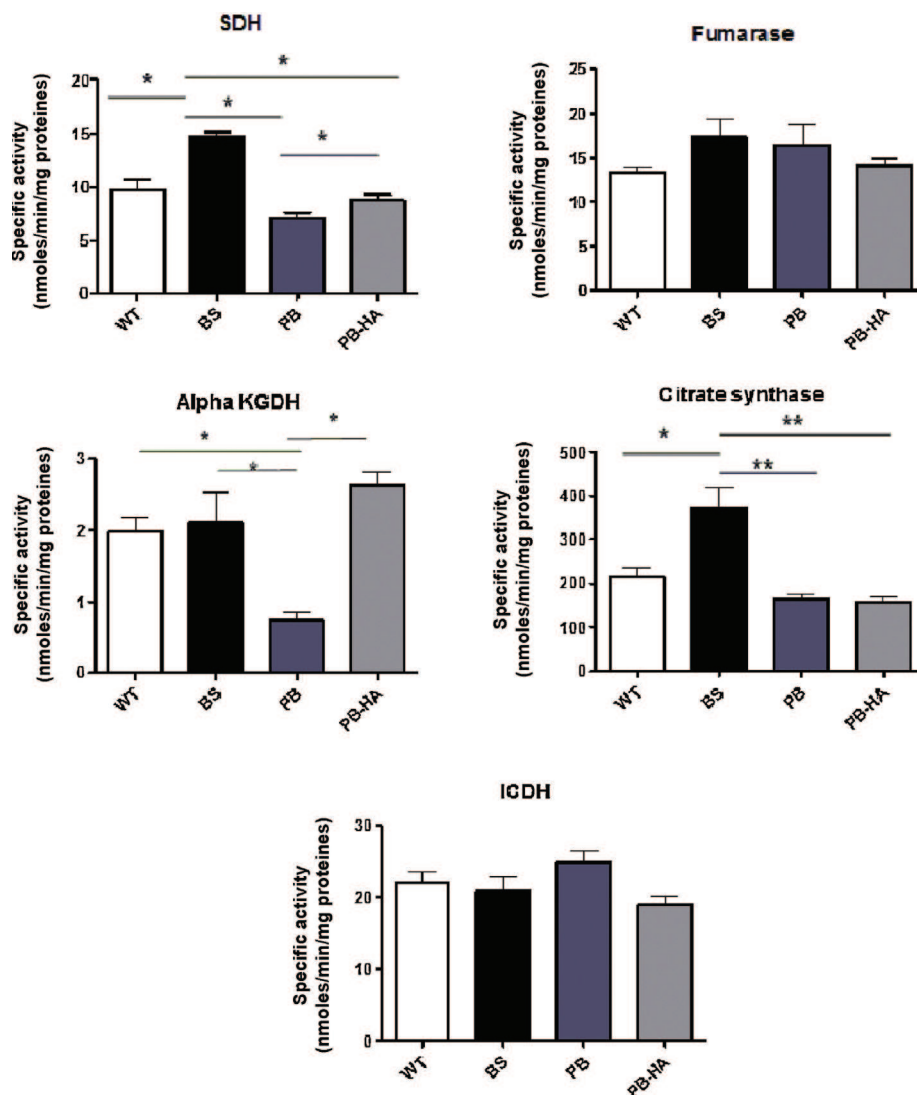


Fig. 3. Enzymatic activities of the TCA cycle in liver homogenate fractions. Succinate dehydrogenase (SDH), fumarase, isocitrate dehydrogenase (ICDH), alpha-ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH) and citrate synthase activities were measured in nmoles per minute per milligram of mitochondrial protein; the results are expressed as mean values \pm standard deviation. WT: *Hmbs*^{+/+} control mice. BS: *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state. PB: *Hmbs*^{-/-} mice after intraperitoneal phenobarbital injection. PB-HA: *Hmbs*^{-/-} mice after phenobarbital exposure followed by intraperitoneal injection of heme arginate. Statistical significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

* $p < 0.05$), respectively, in liver mitochondria from BS mice compared to WT mice.

4. Discussion

Few studies have addressed the question of the possible involvement of mitochondrial energetic defects in the pathophysiology of AIP. Pereira et al. (1992) showed that the chronic treatment of rats with ALA decreased citrate synthase activity in the liver and skeletal muscles, producing fatigue in the animals significantly earlier than in controls. Ogura et al. (2011) reported that ALA oral administration in mice led to a 1.5-fold increase of cytochrome *c* oxydase activity in the liver, accompanied by increased ATP production, suggesting that ALA may affect energy metabolism. Our study on an AIP mouse model reveals a failure of mitochondrial energetic metabolism in the liver after phenobarbital injection.

During the phenobarbital exposure, the RC and the TCA cycle of the liver mitochondria of the mice were both profoundly affected, and the treatment was accompanied by partial or complete recovery. Contrary to expectation, we found no defect

specifically affecting the three RC components containing heme as the prosthetic group, i.e. complex III, complex IV and cytochrome *c*, which transmits electrons from complex III to complex IV. Indeed, although complex III was affected, complex IV was not since the normal respiration driven by complex I substrates ensured full cytochrome *c* functionality. In contrast, the activities of mitochondrial complexes I–III were greatly affected in the liver during the phenobarbital exposure, but the decreased activities were not due to reduced enzyme content. Complexes I and II are indeed highly regulated by post-translational modifications, particularly by phosphorylation, acetylation, succinylation and by allosteric regulation. Complex I and II are directly impacted by the available supplies from the Krebs cycle intermediates. For example, the Krebs cycle metabolic intermediate succinyl-CoA activates complex II (Kearney et al., 1972) and the acetylation state of complexes I and II is tightly regulated by sirtuin 3, the activity of which relies on the NAD⁺ level and the NADH/NAD⁺ ratio (Peek et al., 2013), this later ratio being greatly dependent on the Krebs cycle activity. The respiratory measurements revealed that complex II-driven respiration, which is usually privileged in hepatocytes,

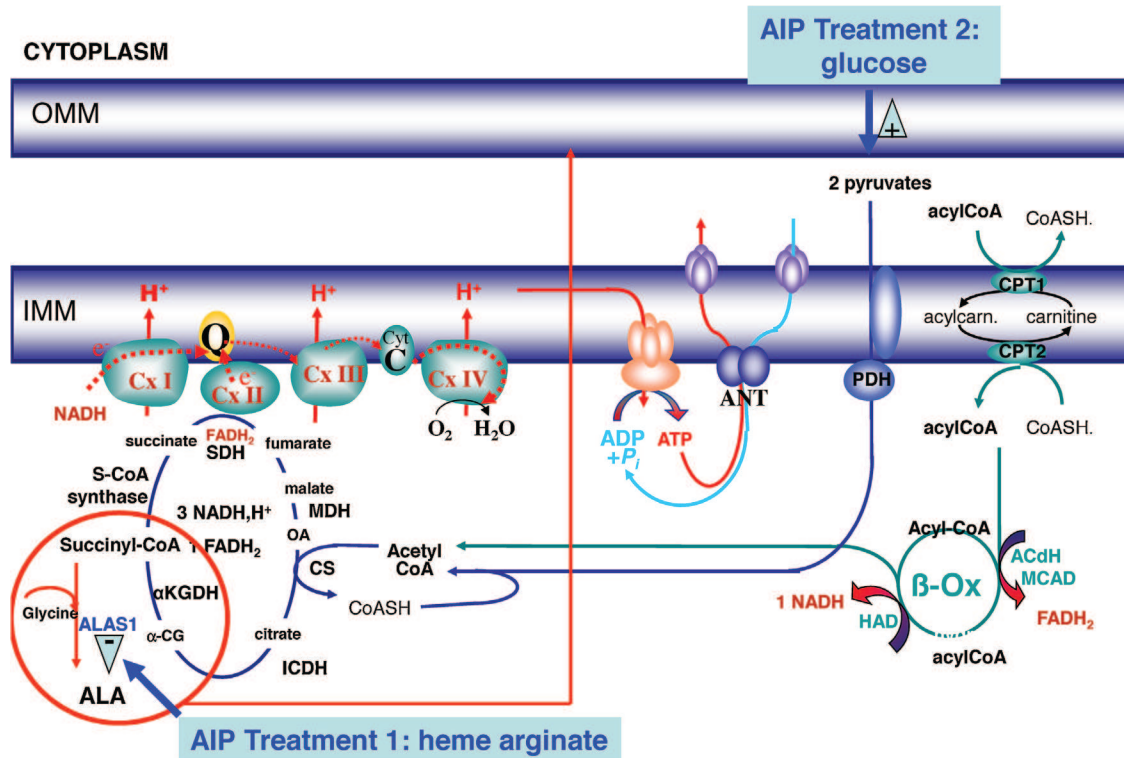


Fig. 4. Interconnections between heme synthesis, the RC and the TCA cycle during the phenobarbital exposure and the treatment with heme arginate and glucose. The transport of acyl-CoA in mitochondria through the two carnitine palmitoyl transferases, CPT1 and CPT2 is followed by β -oxidation, providing acetyl-CoA to the TCA cycle. Acetyl-CoA is also supplied to the TCA cycle by pyruvate dehydrogenase (PDH), which oxidizes the pyruvate produced by cytoplasmic glycolysis. The TCA provides NADH and FADH₂ for OXPHOS, which couples the electron flux involved in the ATP synthesis. ALAS1 uses succinyl-CoA from TCA to the heme biosynthesis. AIP crises induce the massive withdrawal of succinyl-CoA, impairing the TCA and RC fluxes. The treatment with heme arginate reduces the withdrawal of succinyl-CoA, whereas the treatment with glucose increases its supply. OMM: outer mitochondrial membrane; IMM: inner mitochondrial membrane.

was altered by the injection of phenobarbital and restored after heme treatment.

Complexes I–III all contain iron-sulfur clusters that could be the target of oxidative stress generated by the overproduction of ALA in AIP. Iron-sulfur clusters are small inorganic cofactors formed by the tetrahedral coordination of iron atoms with the sulfur groups of amino acids residues. Such iron-sulfur clusters containing enzymes are known to represent critical targets for oxygen free radicals (Rötig et al., 2002) that contribute to the pathophysiology of AIP (Hermes-Lima et al., 1992). However, in our model, none of the ROS cytosolic (CuZnSOD) and mitochondrial (MnSOD) detoxifying enzymes, known to be sensitive markers of response to oxidative stress, were affected.

The second feature distinguishing the first three RC complexes from the others is that they all constitute points of entry for electrons in the RC. Thus, we hypothesized that a general lack of substrate supply (NADH for complex I and FADH₂ for complex II) to the RC might explain the OXPHOS defect. We therefore explored the TCA cycle since complex II-driven respiration was found to be functionally affected and complex II activity (SDH) is shared by both the RC and the TCA cycle. Moreover, the heme biosynthesis pathway is closely linked to the TCA cycle that provides succinyl-CoA as a carbon source for the initial ALAS step of heme biosynthesis. We found that the TCA cycle was greatly affected at least at three levels, i.e. those of citrate synthase, the regulatory enzyme that orients the first step of the TCA flux and, interestingly, the two enzymes involved in the synthesis or utilization of succinyl-CoA, i.e. α -KGDH (one of the three regulatory enzymes of the TCA cycle) and SDH. The sharp increase of ALAS1 activity during the AIP crises probably consumes most of the succinyl-CoA available in the mitochondria. The acute subtraction of this intermediate metabolite could alter

the metabolite flux through the TCA cycle, a phenomenon known as cataplerosis, which is usually compensated by anaplerotic reactions that counter the lack of the metabolite (Nelson and Cox, 2000). ALAS induction could also occur in *Hmbs*^{+/+} WT mice treated with phenobarbital since a complex series of nuclear receptors and xenosensors control ALAS1 up-regulation upon exogenous invasion (Podvinec et al., 2004). However, Jover et al. (2000) showed that ALAS activity and mRNA were not significantly elevated in the liver by repeated phenobarbital administration in control mice whereas it was substantially induced in *Hmbs*^{-/-} mice. Therefore, this absence of ALAS1 induction strongly supports the lack of cataplerosis and OXPHOS defect we found in the *Hmbs*^{+/+} WT mice.

Our results, offering the first demonstration of a transitory implication of the mitochondrial RC and TCA cycle enzymes in the hepatic pathophysiology of AIP, are schematized in Fig. 4. The transfer of succinyl-CoA from the TCA cycle to ALA synthesis leads to cataplerosis such that the TCA cycle is unable to provide reduced substrates to the RC. The decreased supply of NADH and FADH₂ to the RC reduces the activities of complexes I–III together with the complex II-driven respiration that is usually privileged in hepatocytes, thus leading to an energetic failure. These findings suggest a putative energetic beneficial role of siRNA directed against hepatic ALAS1 and are supported by the results of the two treatments that have proved efficacious in the management of AIP, i.e. heme arginate and carbohydrates. On one hand, heme arginate inhibits ALAS1, thus increasing the availability of succinyl-CoA for the TCA cycle and the NADH, FADH₂ supply for the RC; on the other hand, the administration of carbohydrates increases the availability of acetyl-CoA for the TCA cycle by upregulating citrate synthase activity and thereby the metabolic flux across the TCA cycle. However, in

addition to this hypothesis of cataplerosis and in regard to the tight interconnection of the metabolic pathways involved in this pathophysiological model of AIP, we cannot exclude the participation of other mechanisms either in the impairment of the RC or in mitochondrial metabolic disturbances. Nor can we exclude the direct or indirect impact of heme deficiency and ALA overproduction on respiration.

Our study also showed that the enzymatic activities of the RC and TCA cycle were spontaneously increased on the transgenic *Hmbs*^{-/-} mice outside of the period phenobarbital exposure, suggesting the operation of a compensatory mechanism already present in the basal state but without any clinical manifestation. The mechanism restoring metabolic re-equilibrium in the transgenic mice might be compromised by phenobarbital. Indeed, an elevated blood lactate concentration, a classical hallmark of OXPHOS dysfunction, has been reported in 6 patients compared to controls outside the period of crises (Herrick et al., 1990), showing that AIP patients may be chronically affected by a subtle, sub-clinical OXPHOS defect.

Although the excess production of heme precursors in AIP is mainly of hepatic origin, the liver function is frequently preserved in patients and only a minority of them shows a mild transaminase increase. Thus, the OXPHOS impairment demonstrated in the present article may not have reached a threshold high enough to cause a severe liver failure.

The investigation of the impaired energetic metabolism of liver mitochondria in the AIP mouse model is prerequisite to the introduction of any new hepatic ALAS1 biotherapy for patients with the disease. Determining whether a similar mitochondrial dysfunction affects tissues and organs other than the liver and during the chronic phases of the disease should help to define a novel therapeutic strategy for the disorder.

Conflict of interest statement

No conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Dr. Urs Meyer and Dr. Anne-Kathrin Peyer (Basel, Switzerland) for providing the AIP mouse model, to Stéphanie Chupin for technical assistance and to Kanaya Malkani for critical reading and comments on the manuscript. This work was supported by INSERM, the French National Institute of Health and Medical Research and the Laboratory of Excellence, GR-Ex, Paris, France. The labex GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051 is funded by the program "Investissements d'avenir" of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochel.2014.03.032>.

References

- Balwani M, Desnick RJ. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood* 2012;120:4496–504.
- Bishop DF, Tchaikovskii V, Hoffbrand AV, Fraser ME, Margolis S. X-linked sideroblastic anemia due to carboxyl-terminal ALAS2 mutations that cause loss of binding to the β -subunit of succinyl-CoA synthetase (SUCLA2). *J Biol Chem* 2012;287:28943–55.
- Delaby C, To-Figueras J, Deybach JC, Casamitjana R, Puy H, Herrero C. Role of two nutritional hepatic markers (insulin-like growth factor 1 and transthyretin) in the clinical assessment and follow-up of acute intermittent porphyria patients. *J Intern Med* 2009;266:277–85.
- Demasi M, Penatti CA, DeLucia R, Bechara EJ. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implication in neuropsychiatric manifestations in porphyries. *Free Radic Biol Med* 1996;20:291–9.
- Dowman JK, Gunson BK, Mirza DF, Bramhall SR, Badminton MN, Newsome PN. UK Liver Selection and Allocation Working Party. Liver transplantation for acute intermittent porphyria is complicated by a high rate of hepatic artery thrombosis. *Liver Transpl* 2012;18:195–200.
- Guillet V, Gueguen N, Cartoni R, Chevrollier A, Desquiret V, Angebault C, et al. Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation. *FASEB J* 2011;25:1618–27.
- Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, et al. Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . *Cell* 2005;122:505–15.
- Hermes-Lima M, Castilho RF, Valle VG, Bechara EJ, Vercesi AE. Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* 1992;1180:201–6.
- Herrick AL, Fisher BM, Moore MR, Cathcart S, McColl KE, Goldberg A. Elevation of blood lactate and pyruvate levels in acute intermittent porphyria: a reflection of heme deficiency. *Clin Chim Acta* 1990;190:157–62.
- Huang ML, Lane DJ, Richardson DR. Mitochondrial mayhem: the mitochondrion as a modulator of iron metabolism and its role in disease. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:3003–19.
- Hunter GA, Ferreira GC. Molecular enzymology of 5-aminolevulinic synthase, the gatekeeper of heme biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1814:1467–73.
- Johansson A, Möller C, Fogh J, Harper P. Biochemical characterization of porphobilinogen deaminase-deficient mice during phenobarbital induction of heme synthesis and the effect of enzyme replacement. *Mol Med* 2003;9:193–9.
- Jover R, Hoffmann F, Scheffler-Koch V, Lindberg RL. Limited heme synthesis in porphobilinogen deaminase-deficient mice impairs transcriptional activation of specific cytochrome P450 genes by phenobarbital. *Eur J Biochem* 2000;267:7128–37.
- Kearney EB, Mayr M, Singer TP. Regulatory properties of succinate dehydrogenase: activation by succinyl CoA, pH, and anions. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;46:531–7.
- Krähenbühl S, Talos C, Wiesmann U, Hoppel CL. Development and evaluation of a spectrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rats and humans. *Clin Chim Acta* 1994;230:177–87.
- Lindberg RL, Porcher C, Grandchamp B, Ledermann B, Bürki K, Brandner S, et al. Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat Genet* 1996;12:195–9.
- Lindberg RL, Martini R, Baumgartner M, Erne B, Borg J, Zielasek J, et al. Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. *J Clin Invest* 1999;103:1127–34.
- May BK, Dogra SC, Sadlon TJ, Bhasker CR, Cox TC, Bottomley SS. Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995;51:1–51.
- Meyer UA, Schuurmans MM, Lindberg RL. Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations. *Semin Liver Dis* 1998;18:43–52.
- Nelson DL, Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3d edition, 2000:567–597.
- Ogura S, Maruyama K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Tsuchiya K, Takahashi K, et al. The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver. *BMC Res Notes* 2011;4:66.
- Oliveri LM, Davio C, Battle AM, Gerez EN. ALAS1 gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1 by vanadate in diabetic mice. *Biochem J* 2012;442:303–10.
- Onuki J, Chen Y, Teixeira PC, Schumacher RI, Medeiros MH, Van Houten B, et al. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys* 2004;432:178–87.
- Peek CB, Affinati AH, Ramsey KM, Kuo HY, Yu W, Sena LA, et al. Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science* 2013;342:1243417.
- Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226–30.
- Podvıneć M, Handschin C, Looser R, Meyer UA. Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinic synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9127–32.
- Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- α . *Int J Obes (Lond)* 2005;29(Suppl 1):S5–9.
- Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. *Lancet* 2010;375:924–37.
- Rötig A, Sidi D, Munnich A, Rustin P. Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends Mol Med* 2002;8:221–4.
- Schuurmans MM, Hoffmann F, Lindberg RL, Meyer UA. Zinc mesoporphyrin represses induced hepatic 5-aminolevulinic acid synthase and reduces heme oxygenase activity in a mouse model of acute hepatic porphyria. *Hepatology* 2001;33:1217–22.
- Sima AA, Kennedy JC, Blakeslee D, Robertson DM. Experimental porphyric neuropathy: a preliminary report. *Can J Neurol Sci* 1981;8:105–13.
- Soonawalla ZF, Orug T, Badminton MN, Elder GH, Rhodes JM, Bramhall SR, et al. Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria. *Lancet* 2004;363:705–6.

- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. [Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators.](#) *Cell* 2006;127:397–408.
- Thadani H, Deacon A, Peters T. [Diagnosis and management of porphyria.](#) *BMJ* 2000;320:1647–51.
- Thunell S. (Far) [Outside the box: genomic approach to acute porphyria.](#) *Physiol Res* 2006;55(Suppl 2):S43–66.
- Tian Q, Li T, Hou W, Zheng J, Schrum LW, Bonkovsky HL. [Lon peptidase 1 \(LONP1\)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase protein by heme in human liver cells.](#) *J Biol Chem* 2011;286:26424–30.

**MITOCHONDRIAL ENERGETIC DEFECTS IN
MUSCLE AND BRAIN OF A *HMBS*^{-/-} MOUSE MODEL
OF ACUTE INTERMITTENT PORPHYRIA**

ACCEPTÉ DANS LE JOURNAL *Human Molecular Genetics*

Chadi Homedan^{1,2,†}, Caroline Schmitt^{3,4,5,†}, Jihane Laafi^{1,†}, Naïg Gueguen^{2,6}, Valérie Desquiret-Dumas^{2,6}, Hugo Lenglet^{4,5}, Zoubida Karim^{4,5}, Laurent Gouya^{3,4,5}, Jean-Charles Deybach^{3,4,5}, Gilles Simard^{1,2}, Hervé Puy^{3,4,5}, Yves Malthiery^{1,2}, Pascal Reynier^{2,6,*}

¹UMR INSERM 1063, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France

²Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France

³Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre Français des Porphyries, Hôpital Louis Mourier AP-HP, 178 rue des Renouillers, 92701, Colombes, France

⁴INSERM U1149, CNRS ERL 8252, Center for Research on Inflammation (CRI), Université Paris Diderot, site Bichat, Sorbonne Paris Cité, 16 rue Henri Huchard, 75018, Paris, France

⁵Laboratory of Excellence, GR-Ex, Sorbonne Paris Cité, 16 rue Henri Huchard, 75018, Paris, France

⁶UMR CNRS 6214 - INSERM 1083, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France

†Authors contributed equally to this work

***To whom correspondence should be addressed at:**

Département de Biochimie et Génétique

CHU d'Angers - 4 rue Larrey

F-49933 Angers, France

Tel : +33 241355542

Fax : +33 241354017

Email : pareynier@chu-angers.fr

Abstract

Acute intermittent porphyria (AIP), an autosomal dominant metabolic disease (MIM #176000), is due to a deficiency of hydroxymethylbilane synthase (HMBS), which catalyzes the third step of the heme biosynthetic pathway. The clinical expression of the disease is mainly neurological, involving the autonomous, central and peripheral nervous systems. We explored mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the brain and skeletal muscle of the *Hmbs*^{-/-} mouse model first in the basal state, and then after induction of the disease with phenobarbital and treatment with heme arginate. The modification of the respiratory parameters, determined in mice in the basal state, reflected a spontaneous metabolic energetic adaptation to HMBS deficiency. Phenobarbital induced a sharp alteration of the oxidative metabolism with a significant decrease of ATP production in skeletal muscle that was restored by treatment with heme arginate. This OXPHOS defect was due to deficiencies in complexes I and II in the skeletal muscle whereas all four respiratory chain complexes were affected in the brain. To date, the pathogenesis of AIP has been mainly attributed to the neurotoxicity of aminolevulinic acid and heme deficiency. Our results show that mitochondrial energetic failure also plays an important role in the expression of the disease.

Introduction

Acute intermittent porphyria (AIP) is characterized by episodic neurovisceral attacks involving severe abdominal pain, peripheral neuropathy and psychiatric disturbances (1,2). Diffuse abdominal pain, mimicking the acute abdomen syndrome, is accompanied by other neurovisceral symptoms such as nausea, vomiting, constipation, or diarrhoea. These symptoms, together with tachycardia, cardiac arrhythmia and high blood pressure, are thought to be due to the dysfunction of the sympathetic autonomic nervous system (3). The central nervous system is also involved in AIP. Porphyrin attacks are often preceded by a prodromic phase with behavioural changes such as anxiety, restlessness and insomnia (4). In 20-30% of patients, signs of mental disturbance such as anxiety, insomnia, depression, disorientation, hallucinations, paranoia, agitation or confusion have been reported (5). Encephalopathy may also develop with altered consciousness and cortical lesions detected by brain MRI (6). Acute attacks can be life-threatening because of complications such as paralysis of the respiratory muscles. Indeed, unrecognized or untreated AIP is associated with a significant mortality of up to 10% (7). Muscle pain, weakness and paresis, beginning proximally in the arms and legs, also often develop during the crisis (5,8) as a consequence of peripheral neuropathy (3,2). Electromyography and muscle biopsies show features of denervation together with muscle atrophy (9,10). Pathological studies have shown widespread peripheral nerve degeneration and chromatolysis of the anterior horn cells (10). These neurophysiological features may resolve after the crisis, but the partial improvement and persistence of irreversible nerve damage and muscle atrophy may accompany the evolution of the disease especially after recurrent AIP attacks (11). Subtle anomalies of nerve conduction have also been identified in patients not in the acute phase of the disease, reflecting subclinical neuropathy between acute attacks (12).

The causes of this constellation of neurological features in AIP are far from being understood. AIP, an autosomal dominant metabolic disease (MIM #176000), is caused by the deficiency of hydroxymethylbilane synthase (HMBS, EC 2.5.1.61), which catalyzes the third step of heme biosynthetic pathway (13). Acute attacks are provoked by endocrine or environmental factors including malnutrition (14) and drugs such as phenobarbital that induce the gene expression of cytochrome P450 enzymes in the liver (15). AIP patients are unable to respond satisfactorily to the increased demand for heme. In addition, the relative lack of heme greatly activates hepatic aminolevulinate synthase-1 (ALAS-1), the first step of the heme biosynthetic pathway that catalyzes the synthesis of aminolevulinic acid (ALA). The increased hepatic ALAS-1 activity leads to the sharp accumulation of ALA and porphobilinogen (PBG), the heme precursors synthesized upstream of the HMBS blockage. Thus, during the AIP crisis, the liver is the main source of overproduction of ALA. The pre-eminence of the liver in the pathogenesis of AIP is supported by the reported remission of the disease after liver transplantation (16,17). The current treatment of AIP attacks associates the withdrawal of porphyrinogenic drugs, adequate intake of calories and carbohydrates, and intravenous administration of heme arginate (Normosang®) that restores the negative heme feedback on ALAS-1.

The diffusion of ALA from the liver to the rest of the body is thought to be the main factor in the neurological expression of AIP (18,19). The mechanism of ALA neurotoxicity may be linked to its pro-oxidant properties or to its structural homology with GABA (20,21,22,23). However, ALA neurotoxicity is probably not the unique cause underlying the neurological expression of AIP (2). Firstly, no close correlation was found between ALA levels during an AIP attack and the clinical expression of the disease (24). Secondly, administration of ALA to healthy individuals did not produce symptoms of porphyria (25,26). Thirdly, even in the

absence of phenobarbital induction, *Hmbs*^{-/-} mice spontaneously suffer from progressive motor dysfunction and axonal neuropathy due to axonal degeneration without any significant increase of ALA (27,28). The cause of this neurotoxicity in the absence of accumulation of ALA is unknown but the lack of heme might in itself contribute to the pathogenesis of the disorder (23).

The *Hmbs*^{-/-} mouse model was generated in 1996 (27). These C57BL6 mice are compound heterozygotes of one *Hmbs* null allele and a functional *Hmbs* allele with a milder mutation. *Hmbs*^{-/-} mice have 30% residual HMBS activity in the liver and present the typical biochemical characteristics of human AIP with increased ALAS-1 activity and massive urinary excretion of ALA and PBG after intraperitoneal administration of phenobarbital. We recently reported a failure of mitochondrial energetic metabolism in the liver of the *Hmbs*^{-/-} mouse model, with the first demonstration of a direct pathogenic mechanism linking the alteration of heme synthesis with the tricarboxylic acid cycle and impairment of the respiratory chain (29). Since neurological and muscular symptoms are the major consequences of mitochondrial defects, we hypothesized that such defects might be involved in the pleiotropic neurological dysfunctions observed in AIP. We therefore investigated mitochondrial energetic metabolism in the brain and the skeletal muscle of the *Hmbs*^{-/-} mouse model of AIP.

Results

Enzymatic activities of complexes I and II are altered in the muscle of *Hmbs*^{-/-} mice treated with phenobarbital

We verified that phenobarbital alone did not induce any enzymatic defects in the gastrocnemius of WT mice. WT mice injected with phenobarbital (WT-PB) showed no

significant impairment of the mitochondrial respiratory chain activity (Fig. 1A). Similarly, phenobarbital did not alter citrate synthase (CS) activity, making it possible to normalize the mitochondrial respiratory complex activity with respect to CS activity.

Measurement of the enzymatic respiratory complex activity (Fig. 1B) showed a spontaneous increase of complex I activity in the *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state (BS) in comparison to WT mice (+ 86%, $p < 0.05$). Exposure to phenobarbital led to a significant decrease in the activity of complexes I and II, with a reduction of 40% ($p < 0.05$) for complex I and 30% ($p < 0.05$) for complex II. These activities were not significantly restored by heme arginate treatment. The enzymatic activity of the hemic complexes III and IV was not significantly affected.

Respiration driven by complexes I and II is altered in *Hmbs*^{-/-} mice in the muscle treated with phenobarbital

The ADP-stimulated respiration driven by complex I was spontaneously increased in the gastrocnemius of *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state (BS) compared to that in WT mice (+60%, $p < 0.05$) (Fig. 2, EIII MP). The respiration driven by complexes I and II was significantly affected in the gastrocnemius by the administration of phenobarbital in *Hmbs*^{-/-} mice compared to that in BS mice. The respiration driven by complex I was reduced by 64% ($p < 0.01$) (Fig. 2, EIII MP) in the phosphorylating condition. This respiratory defect was not significantly restored by heme arginate treatment. The respiration driven by complex II was significantly altered by exposure to phenobarbital with a reduction of 68% ($p < 0.01$) in the phosphorylating condition with partial compensation after treatment with heme arginate (+100%, $p < 0.05$) (Fig. 2, EIII SR).

ATP production is decreased in the muscle of *Hmbs*^{-/-} mice treated with phenobarbital

ATP synthesis in the gastrocnemius of *Hmbs*^{-/-} mice was significantly affected by the administration of phenobarbital. Phenobarbital induced a 48% decrease ($p < 0.01$) in ATP production that was completely restored after treatment with heme arginate (+100%, $p < 0.05$) (Fig. 3). The ATP/O ratio was maintained in this muscle with a similar efficacy of ATP synthesis.

Enzymatic activities of the four respiratory chain complexes are altered in the brain of *Hmbs*^{-/-} mice treated with phenobarbital

We verified that phenobarbital alone did not induce any enzymatic defect in the brain of WT mice. WT mice injected with phenobarbital (WT-PB) showed no significant impairment of respiratory complex activity (Fig. 4A). Similarly, phenobarbital did not alter citrate synthase (CS) activity, making it possible to normalize respiratory complex activity with respect to CS activity. Complex I activity was significantly reduced in the brain of *Hmbs*^{-/-} mice after exposure to phenobarbital compared to BS mice (-45%, $p < 0.05$) (Fig. 4B). Complex I activity was restored by treatment with heme arginate (+55%, $p < 0.05$). Complex II activity was spontaneously increased in the brain of *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state (BS) compared to WT mice (+40%, $p < 0.05$), and the administration of phenobarbital induced a significant decrease of 30% ($p < 0.05$) that was not restored by heme arginate. Complex III activity was significantly reduced by phenobarbital (-35%, $p < 0.05$) and was restored by heme arginate (+86%, $p < 0.05$). Complex IV activity was affected by phenobarbital with a significant decrease of 30% ($p < 0.05$) that was not restored by heme arginate. Respiration driven by complexes I and II (ADP-stimulated or not) were not significantly affected in the *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state (BS) or after exposure to phenobarbital (Fig. 5).

Discussion

Alterations of mitochondrial energy production are involved in many inherited diseases and common disorders. Although the clinical expression of inherited mitochondrial disorders is highly heterogeneous involving most of the organs, neurological and muscular impairments are most frequently observed. The sensitivity of the nervous system and muscle to mitochondrial dysfunction is related to their particularly high energy demand. In cases of inherited mitochondrial dysfunction, the neuromuscular expression of the disorder is highly heterogeneous and pleiotropic, affecting the central, peripheral and autonomous nervous systems. The neuromuscular alterations observed in AIP together with the close relationship between the biosynthesis of heme and mitochondrial energetic metabolism led us to investigate the possible contribution of a mitochondrial energetic defect to the clinical expression of AIP.

We found that *Hmbs*^{-/-} mice have a bioenergetic phenotype distinct from that of WT mice with the same nuclear background. The mitochondrial energetic metabolism of *Hmbs*^{-/-} mice was found to be spontaneously modified in the brain and muscle tissues in comparison to controls. The respiration driven by complex I and the enzymatic activity of complex I were spontaneously higher in the muscle of the *Hmbs*^{-/-} mice, whereas complex II activity alone was spontaneously higher in the brain than in controls. In a previous study on the spontaneous adaptation of complexes I-III in the liver of *Hmbs*^{-/-} mice, we used a cocktail of antibodies against complexes I-IV to show that the alteration of the mitochondrial respiratory activity was not due to a modification of protein expression (29). These modifications, probably due to the action of adaptive mechanisms, reflect the establishment of a re-equilibrium of the mitochondrial energetic metabolism with regard to HMBS deficiency. The spontaneously modified activities of the respiratory complexes in the brain and the muscles may result from

the allosteric regulation occurring in response to the imbalance between the three interdependent mitochondrial metabolite functions, i.e. heme biosynthesis, the Krebs cycle and the respiratory chain.

When the AIP phenotype was exacerbated by phenobarbital induction, the mitochondrial energy metabolism was severely affected in the brain as well as in the muscle tissues. In the brain, the compensatory increase of complex II activity observed in *Hmbs*^{-/-} mice disappeared after administration of phenobarbital, and the enzymatic activities of complexes I-IV were significantly altered without affecting the respiration. In the muscle, the increase in complex I activity was reversed after administration of phenobarbital, with a reduction of respiration and a decrease in the enzymatic activities of complexes I and II, finally leading to the collapse of ATP production. In addition, we found that treatment with heme arginate was highly effective in restoring the capacity of ATP production in the muscle and rectifying several of the phenobarbital-induced OXPHOS alterations.

We have reported deficiencies of complexes I-III in the liver of the *Hmbs*^{-/-} mouse model (29). This OXPHOS impairment was thought to be produced by a mechanism of tricarboxylic acid cycle cataplerosis due to the hyperactivation of ALAS-1, leading to a decreased supply of reduced cofactors to the mitochondrial respiratory chain. Since the hyperactivation of ALAS-1 during the AIP crises is mainly liver-specific, a similar mechanism cannot be evoked in the case of brain and muscle tissues. The neurotoxicity of ALA, overproduced by the liver, remains the most plausible hypothesis for explaining the AIP-associated OXPHOS defect in the brain and muscle. Working with HepG2 cells, we recently reported that, in addition to inducing an oxidative stress, ALA also directly impaired mitochondrial respiration and decreased ATP content (30). We cannot exclude a direct effect of heme deprivation on

respiratory chain in the brain where all the four complexes are affected. However, in the muscle, only the non-hemic complexes are affected. In addition, heme arginate is not known either to release free heme or to be incorporated in hemoproteins. OXPHOS impairment may also be related to the tight interdependency of the mitochondrial metabolic pathways. For instance, the heme synthesis begins in the mitochondria by the condensation of glycine, with succinyl-CoA being supplied by the tricarboxylic acid cycle, which itself is closely linked to the respiratory chain (31).

Although OXPHOS is severely impacted by the exacerbation of the AIP phenotype by phenobarbital in the liver, the brain, and the muscle of *Hmbs*^{-/-} mice, the respiratory dysfunction observed is not identical in the three tissues. The differences are probably due to the tissue diversity of the mitochondrial and OXPHOS proteomes. Indeed, approximately half of the mitochondrial proteins have a tissue-specific expression (32). Interestingly, it was shown that the mitochondrial proteome was sharply altered by heme depletion in cultured mouse hepatocyte (33). Such heme-depletion elicited down-regulation of the mitochondrial proteome specifically included several ATP synthase subunits. A decrease in ATP synthase expression could worsen the ATP synthesis deficiency that was observed upon phenobarbital-mediated increased heme demand. The various tissues consume different physiological energy substrates and, at the functional level, there is a great diversity in the kinetic parameters of the four respiratory complexes (34). These differences may also reflect the presence of the brain-blood barrier that considerably limits the delivery of ALA and heme arginate to the brain.

Our results suggest that the level of OXPHOS alteration is compatible with the neurological and muscular clinical expression of AIP. Such mitochondrial energy deficits incurred for the purposes of concurrent ALA generation could synergize its neurotoxicity and contribute to the

clinically observed neurovisceral manifestations of AIP attacks. The muscular clinical expression of the disease, mainly muscle weakness, is usually attributed to peripheral neuropathy and muscle denervation that have been evidenced in human patients and the mouse model. Our results strongly argue for the participation of primary muscular dysfunction due to bioenergetic failure. The implication of the mitochondrial respiratory dysfunction in AIP highlights the importance, already well known, of providing patients with appropriate energetic and carbohydrate supplies for the management of acute attacks of the disease (14). Moreover, the prospect of a subcutaneous RNAi treatment targeting aminolevulinate synthase-1 (ALAS-1) underscores the necessity for a better characterization of the relationship between ALAS-1, the tricarboxylic acid cycle, the mitochondrial respiratory complex and OXPHOS in extra-hepatic tissues (35). The investigation of the impaired mitochondrial energetic metabolism of muscle and brain in the AIP mouse model, throwing new light on the pathophysiology of the disease, constitutes a prerequisite step to the introduction of novel ALAS-1 biotherapy in AIP. The further knowledge of the mitochondrial involvement in AIP may be expected to lead to a better understanding of the factors influencing the penetrance, expressivity and treatment of the disease.

Materials and methods

Animals

The murine *Hmbs*^{-/-} model of AIP used in this study was generated by Lindberg *et al.* (27,28). These mice are compound heterozygotes of two different disruptions: one null allele of the *Hmbs* gene from the T1 strain C57BL/6-*Hmbs*^{tm1(neo)Uam}, and a functional allele with a milder mutation from the T2 strain C57BL/6-*Hmbs*^{tm2(neo)Uam}.

The specific impact of phenobarbital on mitochondria was assessed by comparing the enzymatic activities of the mitochondrial respiratory complexes I-IV and of citrate synthase (CS) in the gastrocnemius and the brain tissues of five WT mice subjected to intraperitoneal administration of the drug with five untreated control WT mice, under the same conditions as imposed on the *Hmbs*^{-/-} mice. The effect of heme-arginate on respiratory chain was also tested by complexes I-IV enzymatic activities measurements in isolated brain mitochondria. We did not observed any significant impact of heme-arginate on respiratory chain complexes (data not shown).

Twenty-four female mice (8-10 weeks old) were allocated into four groups, each comprising six mice. The first group (WT), consisting of six wild type *Hmbs*^{+/+} mice with the same C57BL/6 genetic background, served as controls. The second group (BS), consisted of six *Hmbs*^{-/-} mice in the basal state. The third group (PB) consisted of six *Hmbs*^{-/-} mice subjected to intraperitoneal administration of phenobarbital (Gardenal®) at 100 mg/Kg for 3 consecutive days as described elsewhere (36). These mice were sacrificed 15 hours after the last injection. The fourth group (PB-HA) consisted of six *Hmbs*^{-/-} mice exposed to phenobarbital (PB) and treated by an intraperitoneal injection of heme arginate (HA) (Normosang®) at 8 mg/kg for two consecutive days. These mice were sacrificed two hours after the last injection. The metabolic profiles of urinary ALA and PBG, analysed in the four groups of mice confirmed the specific and reversible accumulation of ALA and PBG during exposure to phenobarbital (29).

All the animal experiments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition, 2011, National Research Council, National Academies Press, Washington, DC, USA. The mice were anaesthetised with isoflurane, in

accordance with European Community guidelines (directive 86/609/CEE), before decapitation and dissection. The whole brain was dissected immediately before homogenization and preparation of brain mitochondria for oxygraphy and enzymology. The gastrocnemius was dissected immediately at the level of its white section before dissection and permeabilization of the muscle fibres for oxygraphy, and homogenization of muscle mitochondria for enzymology.

Mitochondrial enzymatic activities

The activities of the mitochondrial respiratory complexes I-IV and citrate synthase (CS) were measured on the gastrocnemius and brain homogenates at 37°C with a Beckman DU-640B spectrophotometer (Beckman Coulter) using standard methods (37).

Mitochondrial respiratory rates

The mitochondrial respiration rates were measured in the gastrocnemius muscle fibres (38) and in brain (39), using a two-channel high-resolution oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria). State II respiration was initiated in the presence of either complex I substrates (5 mM malate and 2.5 mM pyruvate) or complex II substrates (10 mM succinate supplemented with 10 µM rotenone in order to inhibit complex I). The active respiratory states (state III, coupled-respiration) were initiated by saturating the ADP concentration to 0.5 mM in isolated brain mitochondria or to 1.5 mM in the muscle fibres. Cytochrome c (8 µM) was added to check the integrity of the mitochondrial outer membrane (result not shown).

ATP synthesis

The ATP synthesized *in situ* in permeabilized muscle fibres was measured as described (40). Aliquots were sampled at 30-second intervals, quenched with equal volumes of 7% perchloric

acid, and preserved at 80°C. The ATP content was measured from neutralized supernatants by an assay based on a tandem enzyme reaction driven by hexokinase (0.9 U/ml) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 U/ml), which, in the presence of ATP and glucose (1 mM), converts NADP (0.5 mM) to NADPH at an equimolar ratio (41).

Statistical analysis

Statistical comparisons were made with the Mann-Whitney U test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All results are expressed as mean \pm SEM.

Acknowledgements

We are grateful to Kanaya Malkani for critical reading and comments on the manuscript.

Conflict of Interest statement. None declared.

Funding

This work was supported by grants from the following patients' foundations: "*Association contre les Maladies Mitochondriales*", "*Ouvrir les Yeux*", "*Retina France*", "*Union Nationale des Aveugles et Déficients Visuels*", and from the Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11. LABX-0051 is funded by the program "*Investissements d'avenir*" of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02.

References

1. Anderson, K.E., Bloomer, J.R., Bonkovsky, H.L., Kushner, J.P., Pierach, C.A., Pimstone, N.R., Desnick, R.J. (2005) Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann. Intern. Med.*, **142**, 439-450.
2. Lin, C.S., Lee, M.J., Park, S.B., Kiernan, M.C. (2011) Purple pigments: the pathophysiology of acute porphyric neuropathy. *Clin. Neurophysiol.*, **122**, 2336-2344.
3. Albers, J.W., Fink, J.K. (2004) Porphyric neuropathy. *Muscle Nerve*, **30**, 410-422.
4. Crimlisk, H.L. (1997) The little imitator-porphyria: a neuropsychiatric disorder. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **62**, 319-328.
5. Puy, H., Gouya, L., Deybach, J.C. (2010) Porphyrias. *Lancet*, **375**, 924-937.
6. Utz, N., Kinkel, B., Hedde, J.P., Bewermeyer, H. (2001) MR imaging of acute intermittent porphyria mimicking reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *Neuroradiology*, **43**, 1059-1062.
7. Siegesmund, M., van Tuyll van Serooskerken, A.M., Poblete-Gutiérrez, P., Frank, J. (2010) The acute hepatic porphyrias: current status and future challenges. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **24**, 593-605.
8. Thadani, H., Deacon, A., Peters, T. (2000) Diagnosis and management of porphyria. *B.M.J.*, **320**, 1647-1651.
9. Albers, J.W., Robertson, W.C.Jr., Daube, J.R. (1978) Electrodiagnostic findings in acute porphyric neuropathy. *Muscle Nerve*, **1**, 292-296.
10. Yamada, M., Kondo, M., Tanaka, M., Okeda, R., Hatakeyama, S., Fukui, T., Tsukagoshi, H. (1984) An autopsy case of acute porphyria with a decrease of both uroporphyrinogen I synthetase and ferrochelatase activities. *Acta Neuropathol.*, **64**, 6-11.
11. Pischik, E., Kauppinen, R. (2009) Neurological manifestations of acute intermittent porphyria. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, **55**, 72-83.

12. Kochar, D.K., Poonia, A., Kumawat, B.L., Shubhakaran, Gupta, B.K. (2000) Study of motor and sensory nerve conduction velocities, late responses (F-wave and H-reflex) and somatosensory evoked potential in latent phase of intermittent acute porphyria. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*, **40**, 73-79.
13. Puy, H., Deybach, J.C., Lamoril, J., Robreau, A.M., Da Silva, V., Gouya, L., Grandchamp, B., Nordmann, Y. (1997) Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 1373-1383.
14. Delaby, C., To-Figueras, J., Deybach, J.C., Casamitjana, R., Puy, H., Herrero, C. (2009) Role of two nutritional hepatic markers (insulin-like growth factor 1 and transthyretin) in the clinical assessment and follow-up of AIP patients. *J. Intern. Med.*, **266**, 277-285.
15. Waxman, D.J., Azaroff, L. (1992) Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.*, **281**, 577-592.
16. Soonawalla, Z.F., Orug, T., Badminton, M.N., Elder, G.H., Rhodes, J.M., Bramhall, S.R., Elias, E. (2004) Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria. *Lancet*, **363**, 705-706.
17. Dowman, J.K., Gunson, B.K., Mirza, D.F., Bramhall, S.R., Badminton, M.N., Newsome, P.N., UK Liver Selection and Allocation Working Party. 2012 Liver transplantation for acute intermittent porphyria is complicated by a high rate of hepatic artery thrombosis. *Liver Transpl.*, **18**, 195-200.
18. Moore, M.R. (1990) A century of porphyria. The pathogenesis of acute porphyria. *Mol. Aspects Med.*, **11**, 49-57.
19. Solis, C., Martinez-Bermejo, A., Naidich, T.P., Kaufmann, W.E., Astrin, K.H., Bishop, D.F., Desnick, R.J. (2004) Acute intermittent porphyria: studies of the severe

- homozygous dominant disease provides insights into the neurologic attacks in acute porphyrias. *Arch. Neurol.*, **61**, 1764-1770.
20. Pereira, B., Curi, R., Kokubun, E., Bechara, E.J. (1992) 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J. Appl. Physiol.*, **72**, 226-230.
 21. Demasi, M., Penatti, C.A., DeLucia, R., Bechara, E.J. (1996) The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implication in neuropsychiatric manifestations in porphyries. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 291-299.
 22. Onuki J., Chen Y., Teixeira, P.C., Schumacher R.I., Medeiros M.H., Van Houten B., Di Mascio, P. (2004) Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **432**, 178-187.
 23. Meyer, U.A., Schuurmans, M.M., Lindberg, R.L. (1998) Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations. *Semin. Liver Dis.*, **18**, 43-52.
 24. Gorchein, A., Webber, R. (1987) Delta-Aminolaevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects. *Clin. Sci. (Lond.)*, **72**, 103-112.
 25. Dowdle, E., Mustard, P., Spong, N., Eales, L. (1968) The metabolism of (5-14C)delta-aminolaevulinic acid in normal and porphyric human subjects. *Clin. Sci.*, **34**, 233-251.
 26. Mustajoki, P., Timonen, K., Gorchein, A., Seppäläinen, A.M., Matikainen, E., Tenhunen, R. (1992) Sustained high plasma 5-aminolaevulinic acid concentration in a volunteer: no porphyric symptoms. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22**, 407-411.
 27. Lindberg, R.L., Porcher, C., Grandchamp, B., Ledermann, B., Bürki, K., Brandner, S., Aguzzi, A., Meyer, U.A. (1996) Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat. Genet.*, **12**, 195-199

28. Lindberg, R.L., Martini, R., Baumgartner, M., Erne, B., Borg, J., Zielasek, J. Ricker, K., Steck, A. Toyka, K.V., Meyer, U.A. (1999) Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. *J. Clin. Invest.*, **103**, 1127-1134.
29. Homedan, C., Laafi, J., Schmitt, C., Gueguen, N., Lefebvre, T., Karim, Z., Desquiret-Dumas, V., Wetterwald, C., Deybach, J.C. Gouya, L. et al. (2014) Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in a mouse model. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **51**, 93-101.
30. Laafi, J., Homedan, C., Jacques, C., Gueguen, N., Schmitt, C., Puy H., Reynier, P., Carmen Martinez, M., Malthiery, Y. (2014) Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial dysfunction of HepG2 cells. *Biochimie*, **106**, 157-166.
31. Carichon, M., Pallet, N., Schmitt, C., Lefebvre, T., Gouya, L., Talbi, N., Deybach, J.C., Beaune, P., Vasos, P., Puy, H. et al. (2014) Urinary metabolic fingerprint of acute intermittent porphyria analyzed by ¹H NMR spectroscopy. *Anal. Chem.*, **86**, 2166-2174.
32. Calvo, S.E., Mootha, V.K. (2010) The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **11**, 25-44.
33. Correia, M.A., Liu, Y., Wang, Y.Q., Liao, M., Engel, J., Guan, S. (2013) Heme-Regulated Inhibitor (HRI) eIF2 α Kinase and the Heme-Regulated Turnover of Cytochromes P450 and Other Hepatic Proteins. In: Gloria C Ferreira editor. Handbook of Porphyrin Science; Vol. 30, Heme Proteins-Part II. pp. 103-133.
34. Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.P., Casteilla, L., Letellier, T., Rossignol, R. (2006) Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **291**, C1172-1182.
35. Yasuda, M., Gan, L., Chen, B., Kadirvel, S., Yu, C., Phillips, J.D., New, M.I., Liebow, A., Fitzgerald, K., Querbes, W. et al. (2014) RNAi-mediated silencing of hepatic Alas1

- effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **111**, 7777-7782.
36. Johansson, A., Möller, C., Fogh, J., Harper, P. (2003) Biochemical characterization of porphobilinogen deaminase-deficient mice during phenobarbital induction of heme synthesis and the effect of enzyme replacement. *Mol. Med.*, **9**, 193-199.
37. Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P. Lombes, A. (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*, **9**, 331-339.
38. Sarzi, E., Angebault, C., Seveno, M., Gueguen, N., Chaix, B., Bielicki, G., Boddaert, N., Mausset-Bonnefont, A.L., Cazevieille, C., Rigau, V. et al. (2012) The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain*, **135**, 3599-3613.
39. Guillet, V., Gueguen, N., Cartoni, R., Chevrollier, A., Desquiret, V., Angebault, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, P. Martinou, J.C. et al. (2011) Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation. *FASEB J.*, **25**, 1618-1627.
40. Ouhabi, R., Boue-Grabot, M., Mazat, J.P. (1998) Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: assessment of the ATP/O values in situ. *Anal. Biochem.*, **263**, 169-175.
41. Cairns, C.B., Walther, J., Harken, A.H., Banerjee, A. (1998) Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *Am. J. Physiol.*, **274**, R1376-1383.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Enzymatic activities of the four respiratory chain complexes in the gastrocnemius.

A: WT mice ($Hmbs^{+/+}$) with (WT-PB) or without (WT) treatment with phenobarbital. **B:** WT: wild type mice; BS: Basal state corresponding to $Hmbs^{-/-}$ mice without treatment; PB: $Hmbs^{-/-}$ mice treated with phenobarbital; PB-HA: $Hmbs^{-/-}$ mice treated with phenobarbital and heme arginate. Results normalized with respect to citrate synthase (CS) activity. Statistical significance: * $p < 0.05$.

Figure 2. Respiration in the gastrocnemius of the $Hmbs^{-/-}$ mouse. BS: Basal state corresponding to $Hmbs^{-/-}$ mice without treatment; PB: Phenobarbital; PB-HA: Phenobarbital + heme arginate. MP: malate-pyruvate substrates (complex I-driven respiration). SR: succinate-rotenone (complex II-driven respiration). EII: non-stimulated respiration (non-phosphorylating); EIII: ADP-stimulated respiration (phosphorylating). Statistical significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 3. ATP synthesis in the gastrocnemius of the $Hmbs^{-/-}$ mouse. BS: Basal state corresponding to $Hmbs^{-/-}$ mice without treatment; PB: Phenobarbital; PB-HA: Phenobarbital + heme arginate. Statistical significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 4. Enzymatic activities of the four respiratory chain complexes in the brain of the $Hmbs^{-/-}$ mouse. **A:** WT mice ($Hmbs^{+/+}$) with (WT-PB) or without (WT) treatment with phenobarbital. **B:** WT: wild type mice; BS: Basic state corresponding to $Hmbs^{-/-}$ mice without

treatment; PB: Phenobarbital; PB-HA: Phenobarbital + Heme arginate. Results normalized with respect to citrate synthase (CS) activity. Statistical significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 5. Respiration in the brain of the *Hmbs*^{-/-} mouse. BS: Basal state corresponding to *Hmbs*^{-/-} mice without treatment; PB: Phenobarbital; PB-HA: Phenobarbital + heme arginate. MP: Malate-pyruvate substrates (complex I-driven respiration); SR: succinate-rotenone (complex II-driven respiration). EII: non-stimulated respiration; EIII: ADP-stimulated respiration.

Figure 6: Proposed pathophysiological model of AIP. Phenobarbital administration sharply increases heme demand in the liver for the synthesis of cytosolic cytochrome-containing detoxification enzymes. In *Hmbs*^{-/-} mice, loss of the negative control exerted by heme increases ALAS1 activity, leading to the accumulation of heme precursors such as ALA. ALA diffuses in the body, inducing an inhibitory effect on the respiratory chain. An AIP crisis alters the activity of the non-hemic complexes I and II, as well as the respiration driven by these complexes in the muscle, leading to an impairment of ATP production. In the brain, the enzymatic activities of the four respiratory chain complexes are altered whereas the respiratory rates are conserved. The nervous system and skeletal muscle, having the highest energy demands in the organism, are particularly vulnerable to bioenergetic defects leading, at least in part, to the neuromuscular expression of AIP. This pathophysiological cascade can be reversed by heme arginate, which restores the negative retrocontrol on ALAS1 in the liver.

ABBREVIATIONS

AIP: Acute Intermittent Porphyria; ALA: aminolevulinic acid; ALAS: aminolevulinate synthase; CS: Citrate Synthase; HMBS: hydroxymethylbilane synthase; MIM: Mendelian Inheritance in Man; MP:

Malate-Pyruvate; MRI: Magnetic Resonance imaging; OXPHOS: Oxidative Phosphorylation; PBG: porphobilinogen; RNAi: RNA interference; WT: Wild Type.

Fig 1

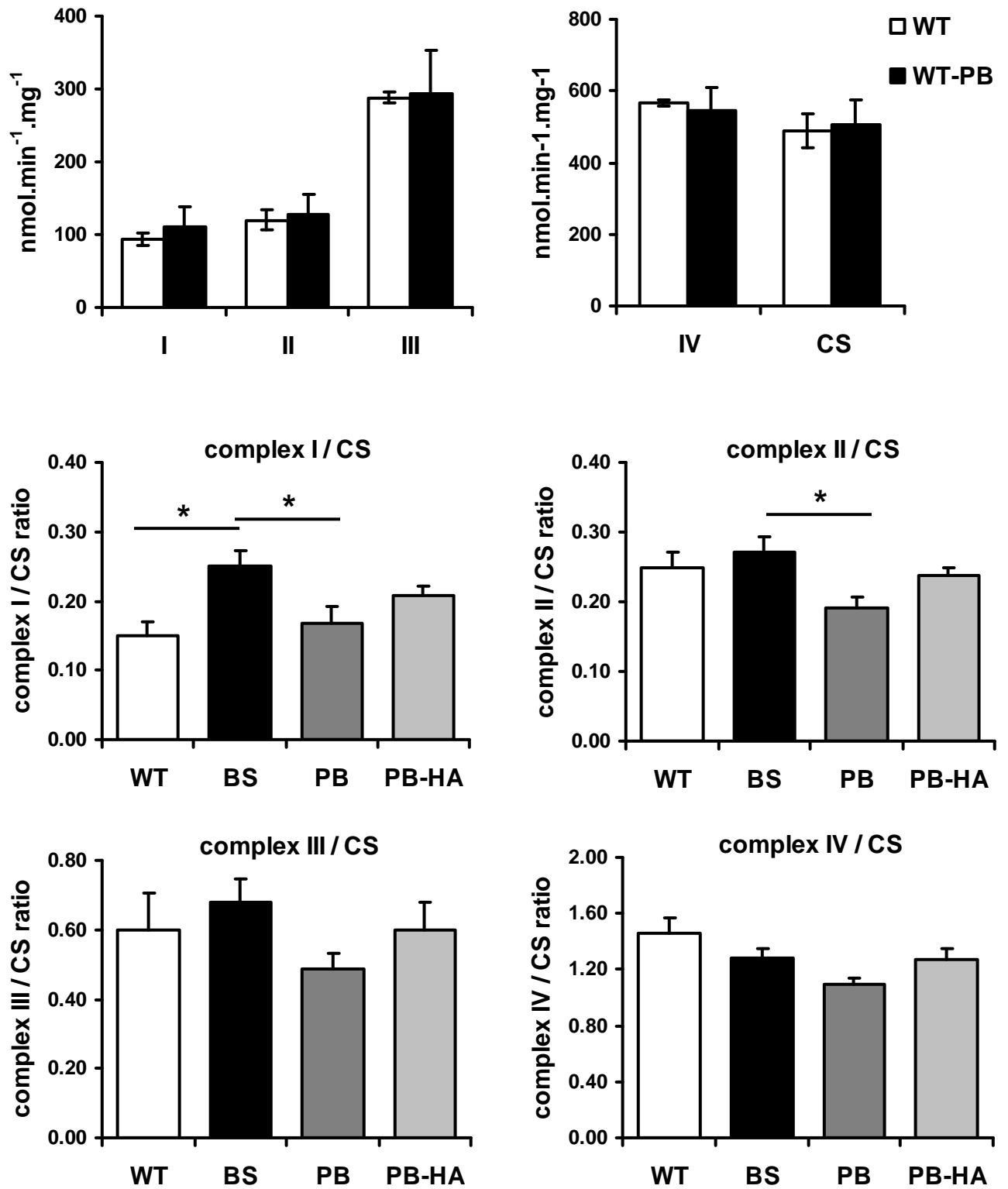


Fig 2

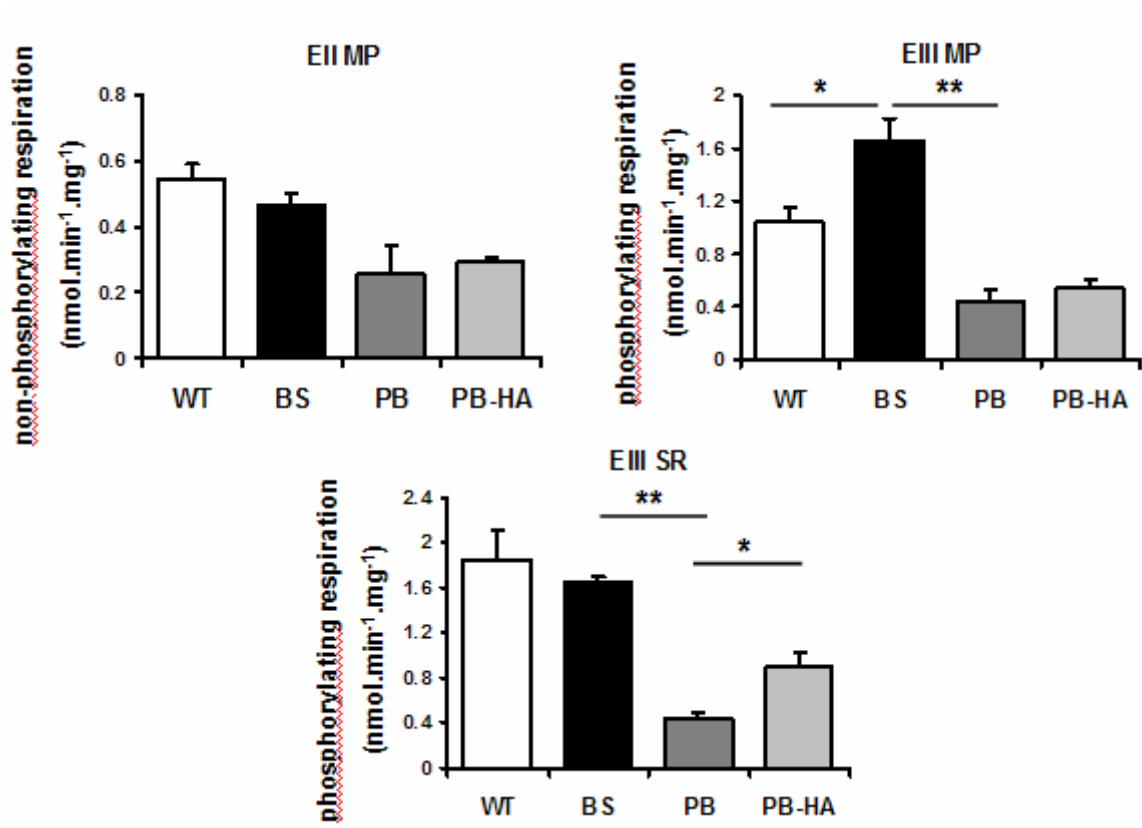


Fig 3

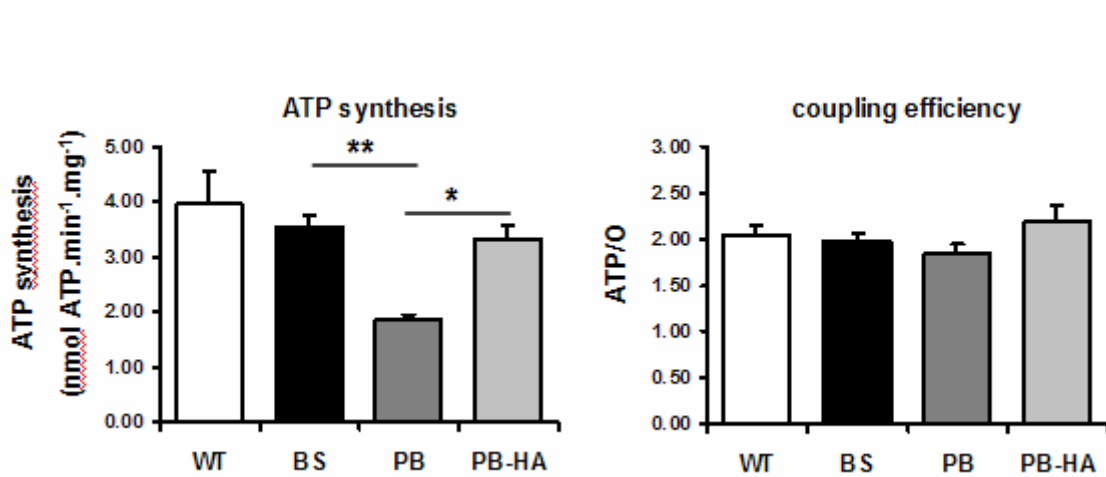


Fig 4

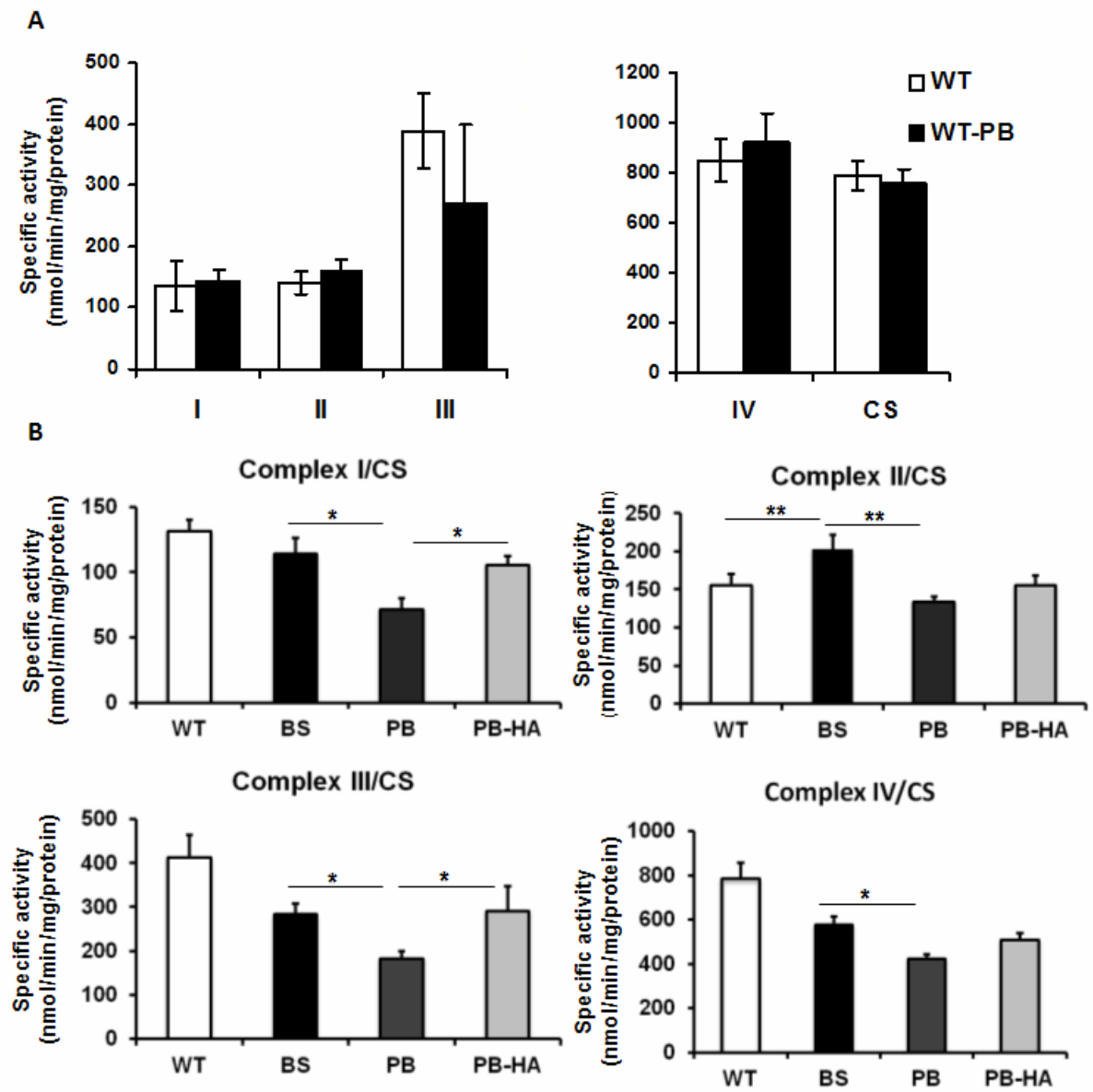
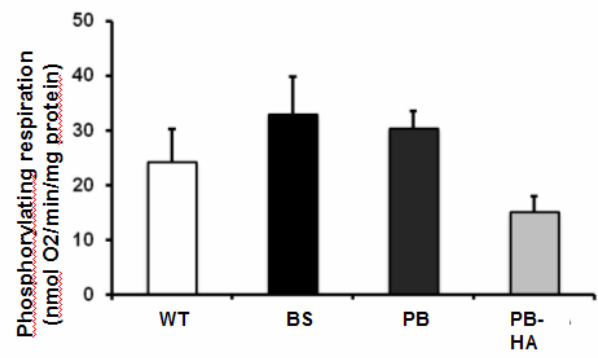
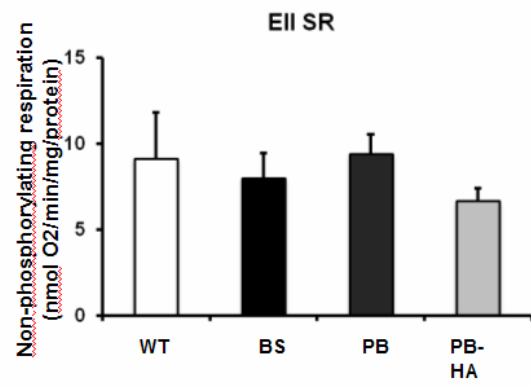
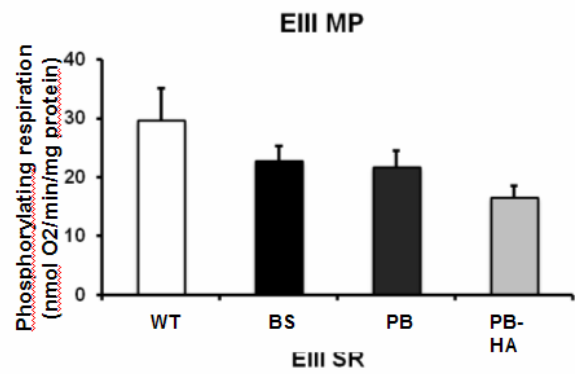
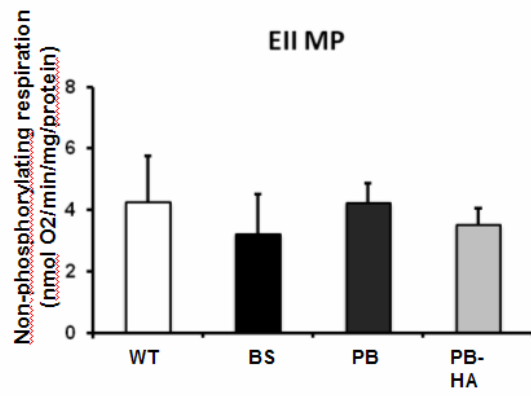


Fig 5



Discussion articles 1 et 2

Peu d'études ont abordé la question de la participation éventuelle de défauts énergétiques mitochondriaux dans la physiopathologie de la PAI. Pereira 1992 a montré que le traitement chronique de rats avec de l'ALA entraînait une diminution de l'activité de la citrate synthase dans le foie et les muscles squelettiques Ogura 2011 a rapporté que l'administration d'ALA chez la souris conduit à une augmentation de 1,5 fois de l'activité du cytochrome c oxydase dans le foie, accompagnée d'une production accrue d'ATP.

Notre étude sur un modèle de souris PAI révèle une défaillance du métabolisme énergétique mitochondrial dans le foie, le muscle et le cerveau. Le métabolisme énergétique mitochondrial des souris HMBS^{-/-} s'est révélé modifié spontanément par rapport aux témoins dans les 3 tissus étudiés (foie, cerveau et muscle). Ces modifications, probablement dues à des mécanismes d'adaptation, reflètent la mise en place d'un rééquilibrage du métabolisme énergétique mitochondrial sans doute pour compenser le déficit en HMBS.

Dans le foie, au cours de l'exposition au phénobarbital, la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs sont significativement affectés avec le plus souvent une récupération partielle ou complète lors de l'administration d'hème arginate. Contrairement à notre hypothèse de départ, ce ne sont pas les composants de la chaîne respiratoire qui contiennent de l'hème qui sont touchés (complexe III, IV et cytochrome c). En revanche, les activités des complexes I, II et III sont affectées dans le foie lors de l'exposition phénobarbital. Nous avons vérifié que cette diminution d'activités enzymatiques n'était pas due à une diminution de l'expression de ces complexes. La respiration à partir des substrats du complexe II, qui est généralement privilégiée dans les hépatocytes, est elle aussi significativement affectée par le phénobarbital.

Les complexes I, II et III contiennent tous des centres fer-soufre qui pourraient être la cible du stress oxydatif généré par la surproduction de l'ALA dans l'PAI. Les centres fer-soufre sont des petits cofacteurs inorganiques formés par la coordination tétraédrique d'atomes de fer avec les groupes de soufre de résidus d'acides aminés. Ces centres fer-soufre sont connus pour représenter des cibles critiques pour les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Rötig 2002) qui contribuent à la physiopathologie de la PAI (Hermes-Lima 1990). Dans le modèle murin que nous avons exploré, les taux de superoxydes dismutases cytosolique (CuZnSOD) et mitochondriale (MnSOD), connues pour être des marqueurs sensibles de réponse au stress oxydatif ne sont pas modifiés ce qui n'est pas en faveur d'un stress oxydant dans ce modèle.

Les trois premiers complexes de la chaîne respiratoire constituent tous des points d'entrée pour les électrons dans la chaîne respiratoire. Ainsi, nous avons supposé que la diminution des substrats énergétiques (NADH_2 pour le complexe I et FADH_2 pour complexe II) pourrait expliquer le défaut de l'oxydation phosphorylante. De plus, la biosynthèse de l'hème est étroitement liée au cycle de TCA qui fournit le succinyl-CoA en tant que source de carbone pour l'étape initiale de la biosynthèse de l'hème. Nous avons constaté que le cycle de Krebs est affecté à au moins trois niveaux, à savoir ceux de la citrate synthase, l'enzyme de régulation qui oriente la première étape du flux de TCA et au niveau des deux enzymes impliquées dans la synthèse ou l'utilisation de la succinyl-CoA, à savoir α -KGDH (l'un des trois enzymes régulatrices du cycle TCA) et la SDH.

La forte augmentation de l'activité ALAS1 pendant les crises de PAI consomme probablement la majorité du succinyl-CoA disponible dans les mitochondries. La soustraction aiguë de ce métabolite intermédiaire pourrait modifier le flux de métabolites à travers le cycle de Krebs, un phénomène connu sous le nom cataplérose, qui est généralement compensé par des réactions anaplérotiques (Nelson 2000).

Nos résultats, offrent la première démonstration d'une implication transitoire des enzymes de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs dans la physiopathologie hépatique de la PAI. L'utilisation aiguë du succinyl-CoA pour la synthèse de l'ALA durant la crise conduit à une cataplérose telle que le cycle de Krebs est incapable de fournir les substrats réduits à la chaîne respiratoire. La diminution du NADH_2 et FADH_2 qui en résulte réduit l'activité des complexes I-III, ce qui conduit à une défaillance énergétique. Ces résultats suggèrent un rôle bénéfique des siRNA inhibant l'ALAS1 et sont en accord avec le rôle curatif de l'hème arginate et de glucides.

Bien que l'excès de production de précurseurs d'hème dans la PAI soit principalement d'origine hépatique, la fonction hépatique est souvent conservée chez les patients et seule une minorité d'entre eux montre une augmentation des transaminases.

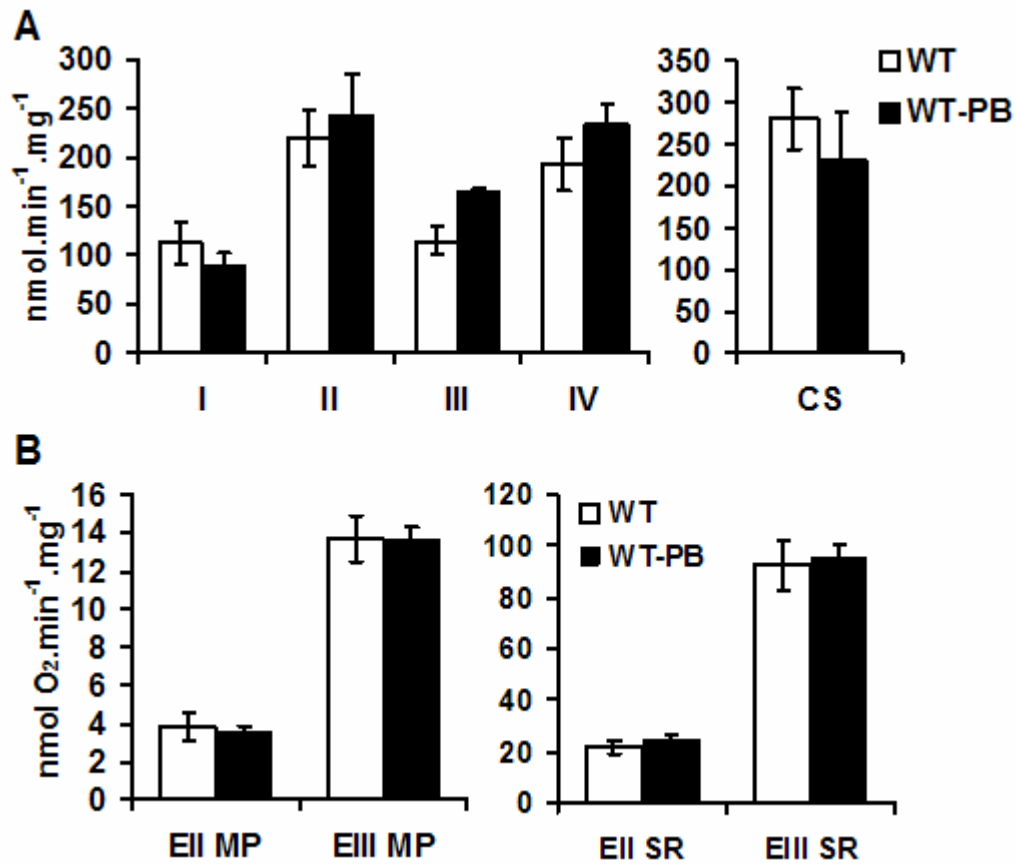
Nous avons voulu déterminer dans un deuxième temps si un dysfonctionnement mitochondrial similaire affectait aussi le muscle et le cerveau car l'expression clinique de la maladie est principalement neurologique.

Le métabolisme énergétique mitochondrial s'est révélé sévèrement affecté dans le cerveau et le muscle. Dans le cerveau, les activités enzymatiques des complexes I-IV sont significativement diminuées sans affecter la respiration. Dans le muscle, lors de l'induction par phénobarbital, on observe une réduction de la respiration et une diminution des activités enzymatiques des complexes I et II, conduisant finalement à l'effondrement de la production d'ATP. Le traitement avec l'hème arginate s'est révélé très efficace pour restaurer cette capacité de production d'ATP dans le muscle.

Bien que le métabolisme énergétique soit affecté dans le foie, le cerveau et le muscle, le dysfonctionnement respiratoire observé n'est pas totalement identique dans les trois tissus. Ces différences sont probablement dues à la diversité tissulaire des mitochondries et de leur protéome. En effet, environ la moitié des protéines mitochondriales ont une expression tissu-spécifique (Calvo 2010). Fait intéressant, il a été montré que le protéome mitochondrial était fortement influencé par la carence en hème dans des hépatocytes de souris en culture (Correia 2013). Les différents tissus consomment différents substrats énergétiques physiologiques et, au niveau fonctionnel, il y a une grande diversité dans les paramètres cinétiques des quatre complexes respiratoires (Benard 2006).

Au final, les résultats de ces deux articles suggèrent que le niveau d'altération de l'oxydation phosphorylante est compatible avec l'expression clinique neurologique et musculaire de la PAI. Ceci souligne l'importance, déjà bien connue, de fournir aux patients des apports énergétiques et de glucides appropriés pour la gestion de la crise aiguë (Delaby 2009).

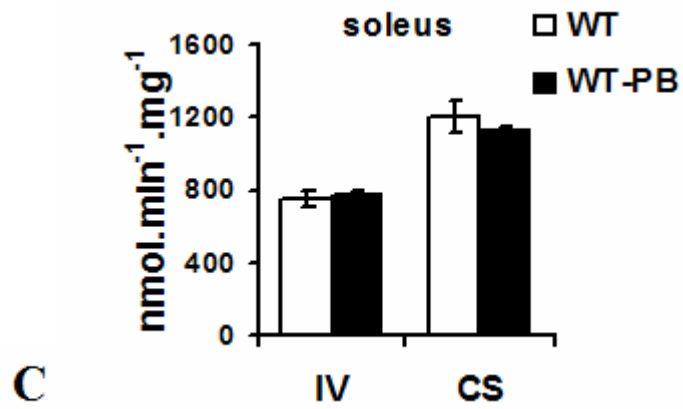
Résultats supplémentaires



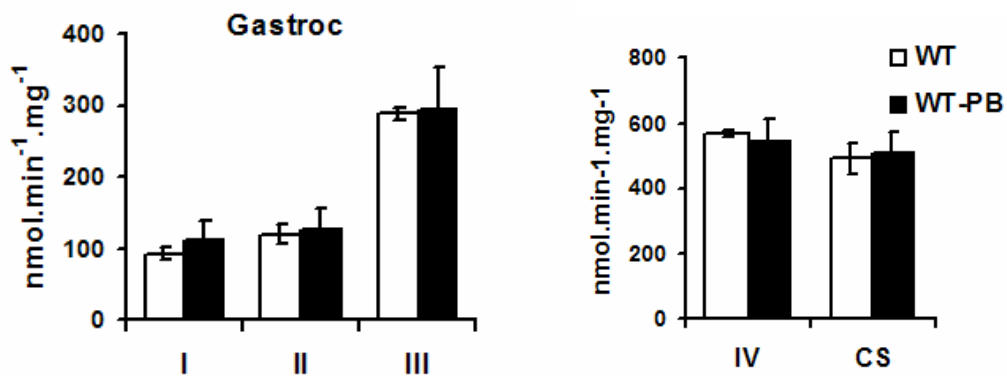
Dosage de l'activité enzymatique (complexes de la CRM et citrate synthase) et de la respiration dans des mitochondries isolées du foie des souris témoins (WT) et cela avec et sans injection en phénobarbital

- (A) Activités enzymatiques des complexes I, II, III, et IV
- (B) Vitesse de respiration mitochondriale, à l'état II et III, en présence des substrats du complexe I : malate et pyruvate (MP) et en présence des substrats du complexes II : succinate et roténone (SR)

Signification statistique P* < 0.05, P** < 0.01



(C) Dosage de l'activité enzymatique (complexe IV de la CRM et la citrate synthase) dans des fibres perméabilisés du muscle Soleus des souris témoins (WT) et cela avec et sans injection en phénobarbital.



(D) Dosage de l'activité enzymatique (complexes de la CRM et citrate synthase) dans des fibres perméabilisés du muscle Gastrocnémien des souris témoins (WT) et cela avec et sans injection en phénobarbital.

Signification statistique $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$.

Introduction article 3

L'acide delta amino-levulinique (ALA) est un précurseur de l'hème, formé lors de la première étape de la biosynthèse de l'hème et des tétrapyrroles. Cette étape s'effectue au sein de la matrice mitochondriale par l'action de l'ALA synthase (ALAS) qui induit la condensation d'une glycine et d'un succinyl-CoA. L'ALA s'accumule dans plusieurs situations pathologiques, héréditaires dans le cas des porphyries aiguës ou de la tyrosinémie de type I, ou acquise comme le cas de l'intoxication au plomb (saturnisme).

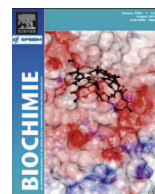
Le dosage de l'ALA dans les urines est utilisé comme test diagnostique devant un tableau clinique évoquant une crise aiguë de porphyrie (Stacpool 2006) ou une intoxication au plomb.

Le foie est le principal site de production de l'ALA. Chez les patients atteints de porphyrie aiguë intermittente (PAI), la concentration plasmatique de l'ALA augmente, pouvant atteindre jusqu'à 100 fois la concentration normale. (Onuki 2004)

La molécule d'ALA est considérée comme pro-oxydante à des valeurs physiologiques de pH, car elle peut engendrer une surproduction de radicaux libres oxygénés (ROS) et du 4,5-acide dioxovalérique (DOVA) (Monteiro1986). L'ALA induit probablement des dommages au génome nucléaire, ainsi qu'au génome mitochondrial (ADNmt) (Cekite 2007). Plusieurs travaux ont décrit une prévalence augmentée du cancer hépatocellulaire chez les patients PAI et cela a été attribué à l'excès d'ALA. Il a d'ailleurs été démontré que l'incubation des mitochondries de rat en présence d'un excès d'ALA cause des dommages oxydatifs à ces mitochondries avec altération des structures mitochondriales (Vercesi 1994), (Hermes Lima 1995).

Peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'excès d'ALA sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ogura a pourtant montré que l'ALA stimule le métabolisme énergétique en augmentant l'activité du complexe IV (Ogura 2011).

Le but de notre étude est d'étudier l'effet d'un excès d'ALA sur la fonction énergétique mitochondriale dans un modèle de cellules hépatiques humaines (Hep G2). Plusieurs concentrations sont utilisées pour mimer les concentrations plasmatiques du sujet sain (témoin), de patients porteurs d'une PAI en situation basale ou en état de crise ou encore en cas d'intoxication par le plomb.



Research paper

Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial dysfunction of HepG2 cells



Jihane Laafi ^{a, 1}, Chadi Homedan ^{a, b, *, 1}, Caroline Jacques ^a, Naig Gueguen ^{b, f},
 Caroline Schmitt ^{c, d, e}, Hervé Puy ^{c, d, e}, Pascal Reynier ^{b, f}, Maria Carmen Martinez ^a,
 Yves Malthiery ^{a, b}

^a LUNAM Université, INSERM UMR 1063, IBIS, IRIS, rue des capucins, 49100 Angers, France

^b Centre Hospitalier Universitaire, Département de Biochimie et Génétique, IBIS, IRIS, rue des capucins, 49100 Angers, France

^c Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre Français des Porphyrries, Hôpital Louis Mourier, Université Paris Diderot, 178 rue des Renouillers, 92700 Colombes, France

^d INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon, Paris, France

^e Université Paris Diderot, 5 Rue Thomas Mann, 75013 Paris, France

^f CNRS UMR 6214 – INSERM 1083, IBIS, IRIS, rue des capucins, 49100 Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2014

Accepted 22 August 2014

Available online 8 September 2014

Keywords:

5-Aminolevulinic acid

Mitochondria

Energetic dysfunctions

Oxidative phosphorylation

Respiratory chain

Oxidative stress

ABSTRACT

Heme biosynthesis begins in the mitochondrion with the formation of delta-aminolevulinic acid (ALA). In acute intermittent porphyria, hereditary tyrosinemia type I and lead poisoning patients, ALA is accumulated in plasma and in organs, especially the liver. These diseases are also associated with neuromuscular dysfunction and increased incidence of hepatocellular carcinoma. Many studies suggest that this damage may originate from ALA-induced oxidative stress following its accumulation. Using the MnSOD as an oxidative stress marker, we showed here that ALA treatment of cultured cells induced ROS production, increasing with ALA concentration. The mitochondrial energetic function of ALA-treated HepG2 cells was further explored. Mitochondrial respiration and ATP content were reduced compared to control cells. For the 300 μ M treatment, ALA induced a mitochondrial mass decrease and a mitochondrial network imbalance although neither necrosis nor apoptosis were observed. The up regulation of *PGC-1*, *Tfam* and *ND5* genes was also found; these genes encode mitochondrial proteins involved in mitochondrial biogenesis activation and OXPHOS function. We propose that ALA may constitute an internal bioenergetic signal, which initiates a coordinated upregulation of respiratory genes, which ultimately drives mitochondrial metabolic adaptation within cells. The addition of an antioxidant, Manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP), resulted in improvement of maximal respiratory chain capacity with 300 μ M ALA. Our results suggest that mitochondria, an ALA-production site, are more sensitive to pro-oxidant effect of ALA, and may be directly involved in pathophysiology of patients with inherited or acquired porphyria.

© 2014 Elsevier B.V. and Société française de biochimie et biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

* Corresponding author. Centre Hospitalier Universitaire, Département de Biochimie et Génétique, Angers, France. Tel.: +33 2 41 35 40 21; fax: +33 2 41 35 40 17.

E-mail addresses: laafi_jihane@hotmail.com (J. Laafi), chomedan@chu-angers.fr, chadihomedan@yahoo.fr (C. Homedan), caroline.jacques@univ-angers.fr (C. Jacques), nagueguen@chu-angers.fr (N. Gueguen), caroline.schmitt@lmr.aphp.fr (C. Schmitt), herve.puy@bch.aphp.fr (H. Puy), pareynier@chu-angers.fr (P. Reynier), carmen.martinez@univ-angers.fr (M. Carmen Martinez), yves.malthiery@univ-angers.fr (Y. Malthiery).

¹ Equally contributors.

1. Introduction

5-Aminolevulinic acid (ALA) is a heme precursor [1,2] that is accumulated during the acute attack of porphyria, inherited forms, as acute intermittent porphyria (AIP) [3] and hereditary tyrosinemia type I (HTI) [4,5], or acquired forms as lead poisoning [6,7]. In patients, detection of elevated levels of ALA is performed using urine test [8]. Clinical manifestations of porphyria are similar in patients, such as severe abdominal pain associated to a variety of neurovisceral symptoms due, at least in part, to increased hepatic production of ALA [9]. A higher hepatocellular carcinoma incidence has been previously demonstrated in patients with porphyria

[10,11], probably due to ALA-induced DNA damage [12]. Damage to mitochondrial DNA (mtDNA) was also described to be more important compared to nuclear DNA damage [13–16]

The liver and the brain are the major source of excess precursor production [17,18]. Although the mechanism through which ALA is transported to the brain is uncertain, several reports show that accumulation of ALA in the brain may occur through passive diffusion between the blood/brain barrier [19] or by specific active transport of peptides selective transporters (PEPT2) [20,21]. In the liver, a major site of ALA production and metabolism, ALA concentration is estimated to reach values close to 100 μM [22]. In AIP patients, the plasmatic concentration is 4–100 fold higher than in normal individuals (0.1 μM) [23]. It has been reported that chronic increased levels of ALA could lead to the generation of free radicals and subsequently to hepatic carcinogenesis [24–26]

First step of heme synthesis begin in mitochondrial matrix, and four steps out of eight-take place in the mitochondrion. ALA synthesis comes from the condensation of a tricarboxylic acid cycle (TCA) metabolite, the succinyl-CoA, with a glycine, and is catalysed by the 5-aminolevulinic synthase enzyme. Eight steps are requested for the final product, the heme, which is a crucial cofactor of key oxidative phosphorylation (OXPHOS) enzymes such as the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (complex III), the cytochrome c oxidase (complex IV) and the cytochrome c (that performs the electron transport from complex III to complex IV)

ALA is considered as a pro-oxidant molecule at physiological pH with production of reactive oxygen species (ROS) and 4,5-dioxovaleric acid (DOVA) [1]. It has also been demonstrated that ALA induces oxidative damage in rat liver mitochondria [27,28] and generates mitochondrial structure and function alterations [29]. ALA and mitochondrial respiratory chain are important contributors to ROS production, the oxidative stress playing a central role in the pathophysiology of both porphyria and mitochondrial disorders [30,31]. Although Ogura et al. [32] have demonstrated that ALA administration promotes aerobic energy metabolism, especially complex IV activity, very few studies have focused on ALA accumulation impact on mitochondrial energetic function.

The aim of the present study was to investigate the energetic mitochondrial profile in the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 cells after administration of ALA. Various concentrations of ALA were used mimicking plasmatic concentrations in healthy subjects (0.1 μM ALA) or in patients with AIP and lead poisoning (1 μM –10 μM) or hepatic concentration (100 μM) as described by Onuki [22]. We have found that mitochondrial energetic function is altered in presence of ALA with disturbances affecting mitochondrial mass and network structure at 300 μM ALA.

2. Materials and methods

2.1. Cell line and growth conditions

The Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM), Hams'F12 medium, fetal bovine serum (FBS), phosphate buffer saline solution (PBS), trypsin, L-glutamine and antibiotics were obtained from Lonza (Verviers, Belgique); the 5-aminolevulinic acid (ALA), oligomycine, antimycine A, mClCCP, from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France)

The HepG2 human hepatocarcinoma cell line was grown in DMEM-F12 supplemented with FBS (10%), L-glutamine (2 mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (2 mM). Cells were grown in 75 cm^2 flasks for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere (CO₂ 5%). An ALA stock solution (50 mM) in PBS was prepared and further diluted in PBS at a concentration range of 1–300 μM .

2.2. ALA and HepG2 viability, apoptosis and necrosis

Viability of cells was tested using the trypan blue test. Any concentration of ALA used affect cell viability (24 h) (data not shown). Necrosis and apoptosis induced by ALA (1–300 μM) were evaluated on HepG2 cells by flow cytometry and the Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) Kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Neither apoptosis nor necrosis were significantly detected (data not shown). For further experimentations, we worked with all the concentrations explored for these tests.

2.3. Protoporphyrin IX accumulation measurement

Protoporphyrin IX (PpIX) contents in cell samples was measured using the Cytomics FC 500 MPL cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). The excitation and the emission lasers were set to 488 nm and 650 nm, respectively.

2.4. Citrate synthase activity

Citrate synthase (CS) activity was measured on cell lysates recording the change in optical density at 412 nm of 5, 5'-DiThiobis (2-NitroBenzoic acid) (DTNB), a substrate of CS as previously described by Desquiret et al. [33].

2.5. mtDNA quantification

TotalDNA was extracted from HepG2 cells using DNA Tissue kit (Macherey–Nagel, Gutenberg, France). The samples were quantified using the NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, France). The quantifications reaction was performed using the CFX96™ Real-Time PCR Detection System and the iQ™ SYBR[®] Green Supermix starting with at least 40 ng/ μl of totalDNA for a final reaction volume of 20 μl . Table 1 recapitulates the forward and reverse primers and the annealing/elongation temperatures used. mtDNA quantification was normalized by reference to the actin gene for each sample.

2.6. Measurement of mitochondrial membrane potential in intact cells

2×10^6 Cells were grown as already described by Desquiret [34]. Three days after seeding, cells were collected by trypsinization and washed in PBS with 10% FBS. The cells were then resuspended in PBS–FBS 5%–50 mM KCl and incubated with 20 nM cationic fluorescent dye DiOC₆(3) in a 96-well plate (10^5 cells per well) for 30 min. The oligomycin [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ –inhibition of ATP synthesis] and mClCCP [10 μM –dissipate the proton gradient] treated wells received inhibitors before incubation. After washing, the cells were incubated with PI (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to check membrane integrity. The fluorescent intensity was read using Cytomics FC 500 MPL cytometer (Beckman Coulter). Laser excitation of DiOC₆(3) was at 484 nm and emission was read at 511 nm. PI fluorescence was detected at 610 nm.

2.7. O₂-production measurement

Production of superoxide in HepG2 cells was assayed using dihydroethidium (DHE; Sigma–Aldrich) which is oxidized to oxyethidium in the presence of superoxide; oxyethidium binds to nuclear DNA leading to a fluorescence emission (620 nm). 5×10^5 cells are incubated with ALA during 24 h in 6-well plates; supernatant was removed, cells were washed twice with PBS, trypsinized, then incubated with DHE (3 μM) for 30 min. Cells were

centrifuged (5 min at $1500\times g$ at Room Temperature [RT]), and resuspended in PBS. The fluorescence intensity and the number of DHE-positive cells after treatment with ALA was measured by flow cytometry as previously described by De Iuliis et al. [35]. The experiment was performed in 6 independent cell preparations and measurements were done in duplicates.

2.8. Western blot analysis

Pellets of 1×10^6 cells were lysed and stored at -80°C until used for western blot analysis. Protein concentration was determined using the spectrophotometer NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific). Whole-cell lysates were boiled for 10 min at 70°C . Twenty μg of protein were separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted to a PVDF membrane (Amersham Biosciences, UK). Membranes were saturated with a 5% non fat milk-TBS-Tween 0.1% solution for 1 h at RT and incubated overnight at 4°C with the primary antibody (listed below). Membranes were washed three times in TBS-Tween 0.1% and incubated with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (1:20,000) for 1 h at RT. The immunoreactive proteins were visualized using the ECL Western Blotting Detection Reagents kit (Amersham Biosciences). Primary antibodies: monoclonal mouse anti-MnSOD (1:2000 Abcam, Cambridge, UK); Mfn2 (1:1000 Abcam); anti-VDAC (1:1000 Abcam) and anti- β -Actin (Sigma Aldrich), VDAC protein was chosen to normalize the expression of Mfn2 because its expression is not modified under oxidative conditions [36]. Band intensities were quantified using Chemcapt software. The experiment was performed in 4 independent cell preparations and measurements were done in duplicates.

2.9. Respiratory parameters in intact cells

We investigated the respiratory parameters in intact cells by polarography with a Clark-type oxygen electrode (Oroboros Oxygraph-2k, Oroboros, Innsbruck, Austria) as described previously by Loiseau et al. [37]. The basal respiration rate of intact cells ($4\text{--}5 \times 10^6$ cells resuspended in $200 \mu\text{l}$ DMEM at 37°C) was determined by measuring the linear rate of oxygen consumption. The non-phosphorylating respiration rate was recorded after addition of oligomycin ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$). The maximal uncoupled respiration rate was measured after addition of $0.5\text{--}5 \mu\text{M}$ of the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP). The mitochondrial respiratory control ratio (RCR) of the cells was calculated as the ratio the "FCCP respiration" versus the "oligomycin" respiration. The experiments were also performed in the presence of MnTMPyP, an anti-oxidant that acts as a ROS sensor. The experiment was performed on 14 independent cell preparations.

2.10. Analysis of lactate and pyruvate

Lactate concentration in the culture media was determined by spectrophotometry (Hitachi-Roche apparatus, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Pyruvate concentration was determined by measuring NADH concentration decrease in the presence of the lactate dehydrogenase enzyme using spectrophotometry (340 nm). Lactate and pyruvate productions were normalized to total cellular protein content, which was assayed by the bicinchoinic acid assay kit (Uptima, Interchim, Montluçon, France) using bovine serum albumin as the standard.

2.11. Mitochondrial enzyme activities

All assays were performed on cell lysates as described by Desquiret [34]. Cytochrome c oxidase activity was measured as already

described by Horie [38]. After three freezing/thawing cycles, the absorbance resulting from the oxidation of reduced cytochrome c (550 nm) was recorded. The activity of complex I (NADH:Ubiquinone oxidoreductase) was determined by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm as described by Kuznetsov and Gnaiger [39]. The complex II (Succinate Ubiquinone Reductase) activity was measured by following the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) at 600 nm as described previously by James et al. [40]. The complex III activity was measured after a frozen-thawing step as described by Rustin [41]. The experiment was performed on 6 independent cell preparations and measurements were done in duplicates. Sigma Aldrich provides all chemical products.

2.12. ATP and ADP cellular concentration measurement

After the ALA treatment, cells were harvested by trypsinization, washed with PBS, centrifuged at $1500\times g$ for 5 min at RT and resuspended (PBS). Cell number was obtained using a Malassez chamber. 10^6 cells were resuspended in adenylate extraction solution chloroform-methanol (1:1 v/v). Adenine nucleotides were separated by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Dionex Corp., Sunnyvale, CA) on a IonPac AS11 column (Dionex). Intracellular ATP and ADP contents were determined using a standard curve. The experiment was performed on 6 independent cell preparations.

2.13. Confocal microscopy

Mitochondria were stained using 100 nM MitoTracker[®] Red dye (Molecular Probes, Carlsbad, CA) for studying mitochondrial structure according to the manufacturer's instructions. Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde for 15 min. Stacks of images were captured by Zeiss LSM 700 confocal microscope (Carl Zeiss; Jena, Germany) using a Zeiss Plan-Apochromat X63 oil immersion objective (NA: 1.4) and z slices of $0.393 \mu\text{m}$. Red fluorescence was excited with a 555 nm laser and the images were captured at a 996×996 -pixel resolution. No treated cells (control), exposed cells to $300 \mu\text{M}$ or to 1 mM ALA for 24 h were quantified using Zeiss Zenlight 4.8 software.

2.14. RNA extraction and quantitative real-time RT PCR

Total RNA was isolated from cells using the RNA extraction kit Macherey–Nagel (Hoerdtt, France). Quantification, degradation and contamination of the samples were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (6000 Nano Assays – Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) following the manufacturer's procedure. The samples were stored at -80°C until the quantification step. For the total RNA samples, the retrotranscriptions were performed in duplicates starting each from $0.5 \mu\text{g}$ of total RNA using the PrimeScript[™] RT reagent kit (Perfect Real Time) as recommended by the manufacturer (TAKARA, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). The two reactions were pooled and diluted in order to perform the quantification reactions on 40 ng cDNA for a $20 \mu\text{l}$ final reaction volume. The quantifications were performed using the iQ[™] Green Supermix following the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA) and the CFX96[™] Real-Time PCR Detection System (BioRad). The standards were obtained by PCR performed on total cDNA of control cells as described previously [42,43]. The forward and reverse primers used and the corresponding annealing/elongation temperature are summarized in Table 2. Gene expression was normalized by reference to the actin gene expression for each sample.

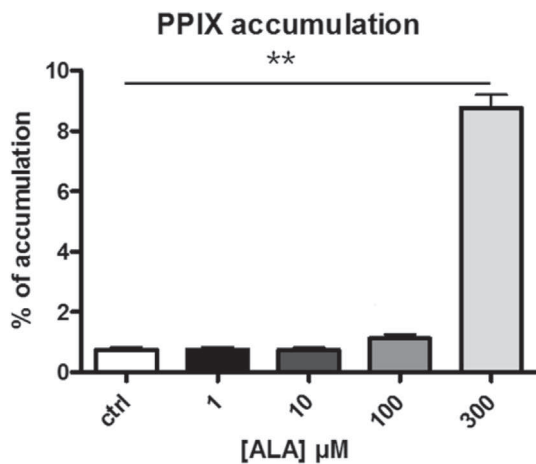


Fig. 1. The Protoporphyrin IX (PpIX) content measured by flow cytometry. HepG2 cells were incubated 24 h with ALA (1–300 μM), then washed, resuspended in PBS and analysed by flow cytometry. Results are expressed as the percentage versus control. Ten thousand events were considered for each condition. Values are expressed as means \pm S.E.M. We measured 6 samples per group. ** $p < 0.01$ vs control.

2.15. Statistical analysis

Significant differences ($p < 0.05$) between the treated groups and the control were assessed using a non-parametric Mann–Whitney test. Results are expressed as mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1. ALA induces the Protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in HepG2 cells

PpIX, the heme precursor synthesized in the mitochondrial matrix was significantly accumulated (900%, $p < 0.01$) in HepG2 cells after 24 h of 300 μM ALA treatment compared to control group (Fig. 1). For a 100 μM ALA treatment, the accumulation of PpIX was about 150% but not significant ($p = 0.08$) versus control. This increase of PpIX rate suggests that ALA entry in HepG2 cells is, at least in part, dedicated to heme biosynthesis pathway.

3.2. Diminution of the mitochondrial mass following a 300 μM ALA treatment

We explored the mitochondrial content by performing the spectrophotometric analysis of the citrate synthase (CS) activity

and the quantification of the mtDNA by quantitative PCR (Fig. 2). Both mtDNA content and CS activity remained unchanged at ALA concentrations lower than 100 μM. However, 300 μM ALA reduced mtDNA content by 50% ($p < 0.05$) and CS activity by 71% ($p < 0.01$) compared to control cells. These results suggest a decrease in the mitochondrial mass for a 300 μM ALA administration, without apoptosis or necrosis (Fig. S1).

3.3. ALA induces cell hyperpolarization associated with ROS production in HepG2 cells

After treatment with various concentrations of ALA, the HepG2 cells displayed a significant increase for the mitochondrial membrane potential as reflected by the enhanced fluorescence signal detected; with +51% increases for 1 μM ALA to +290% increases for 300 μM ALA (Fig. 3A). Under the same conditions, DHE fluorescence increases in an ALA concentration-dependent manner with a significant increase for 10 μM ALA ($p < 0.05$) to 300 μM ALA ($p < 0.001$) (Fig. 3B). The ROS production was also accompanied by the significant up-regulation of the mitochondrial superoxide dismutase isoform MnSOD (Fig. 3C).

3.4. Mitochondrial respiration is altered in the presence of ALA and corrected by the presence of antioxidant MnTMPyP in HepG2 cells

Twenty four hours 300 μM ALA treatment induced respectively a 67%, 68% and 86% decrease of routine, “oligomycin-insensitive”, and uncoupled respirations. The respiratory control ratio (RCR) was also modified at this concentration (78% reduction). No significant change in routine and “oligomycin-insensitive” respirations was observed with the other concentrations tested. However, the maximal capacity of the respiratory chain (uncoupled respiration) decreased significantly ($p < 0.05$) for the 10 μM (42% reduction) and 100 μM (47% reduction) ALA treatments (Fig. 4).

Under the same conditions, lactate and pyruvate productions were not significantly different between control and ALA-treated cells (Fig. 5).

We then assessed the respiration rates of HepG2 cells treated with 300 μM ALA (control: PBS) in presence or not of the antioxidant Manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) Porphyrin (MnTMPyP). In with the presence of MnTMPyP, the routine, “oligomycin-insensitive” and maximal respirations were significantly enhanced compared to control cells still maintaining the RCR. However, incubation with MnTMPyP prevented the decrease of mitochondrial respiration induced by 300 μM ALA treatment. Thus, no significant differences were found between both control-MnTMPyP and 300 μM ALA-MnTMPyP (Fig. 6).

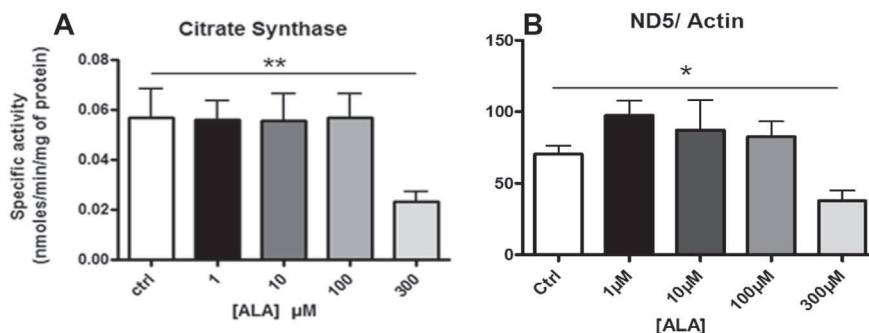


Fig. 2. Citrate synthase activity and mtDNA quantification. A. The CS activity was measured on cell lysates recording the DTNB optical density reduction at 412 nm **: $p < 0.01$; significant differences versus control (Ctrl). B. mtDNA copy number was deduced from the ratio of ND5 to β -Actin genes quantification. DNA level was determined by real-time PCR in HepG2 cells treated or not (control) with ALA (1–300 μM) for 24 h ($n = 6$). Results are expressed as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; significant differences versus control (Ctrl).

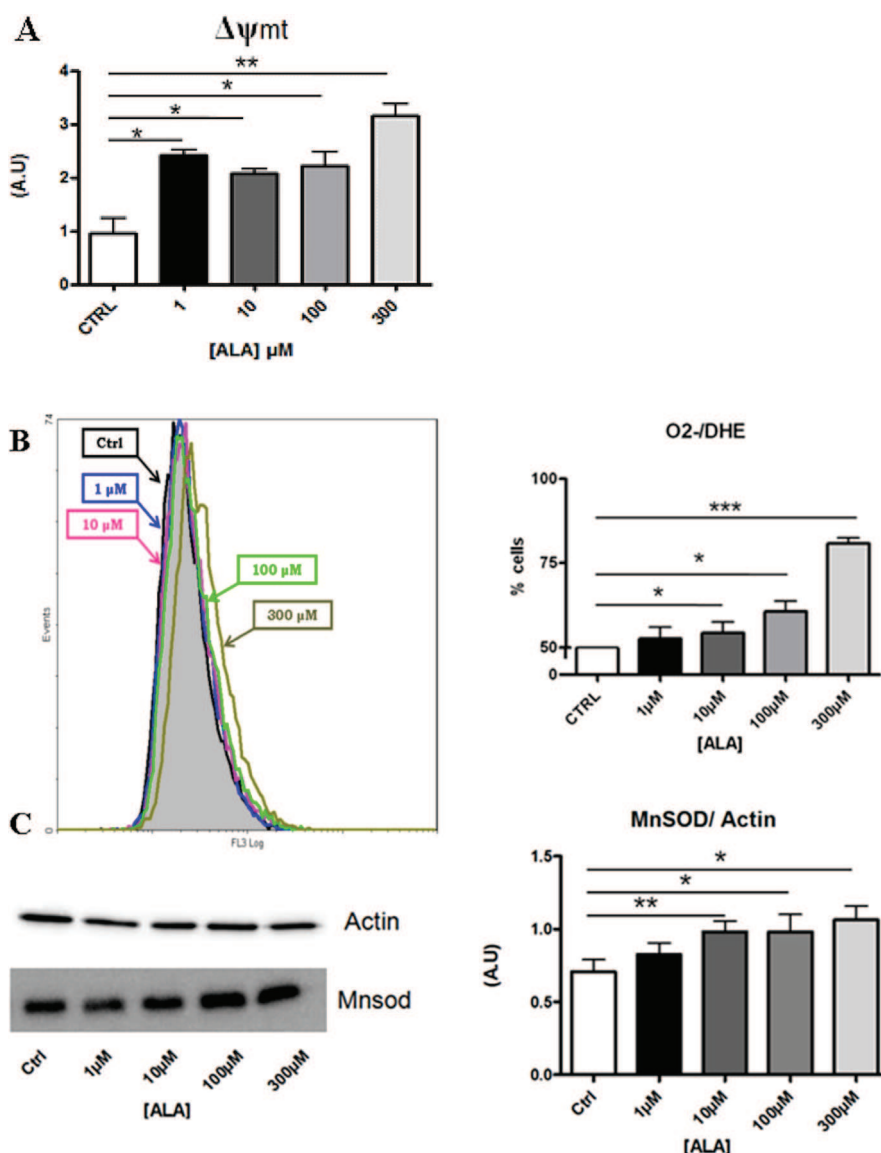


Fig. 3. Mitochondrial potential determination, ROS production and MnSOD expression. A. Determination of mitochondrial membrane potential. Fluorescence of control (PBS) and treated cells (1–300 μM ALA) pre-stained with DiOC₆(3) (20 nM) was determined by flow cytometry. Residual fluorescence emitted in the presence of 10 μM mCICCP was subtracted from the fluorescence of cells incubated with oligomycin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Data are expressed in arbitrary units, compared to control and expressed as means \pm S.E.M. The experiment was performed in 6 independent cell preparations measured in triplicate. Laser excitation of DiOC₆(3) was at 484 nm and emission was read at 511 nm. PI fluorescence was detected at 610 nm *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. B. HepG2 cells O₂ production measurement by flow cytometry using dihydroethidium (DHE) following 24 h of ALA treatment (1–300 μM – control: PBS). The experiment was performed in 6 independent cell preparations. Data are expressed as the percentage of fluorescence intensity versus control values and expressed as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus control. C. Expression of MnSOD protein in HepG2 cells. HepG2 cells were cultured in the presence of various ALA concentrations (1–300 μM – control: PBS) for 24 h. Protein extracts were subjected to Western blotting using MnSOD and Actin primary antibodies. After incubation with the horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody, the emitted signals were quantified (in duplicates). The experiment was performed in 4 independent cell preparations Results are expressed as ratio MnSOD/actin (means \pm S.E.M.) measured. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control.

3.5. Enzymatic activities of mitochondrial complexes and ATP concentration are diminished in HepG2 cells treated with ALA

Compared to control cells, 300 μM ALA treatment induced a drastic decrease in complex I ($p < 0.01$), complex II ($p < 0.001$) and complex IV ($p < 0.01$) activities (66%, 80% and 72% respectively); no significant difference was observed in complex III activity. But technical limitations prevents from accurately measuring complex III. Therefore the lack of significant statistical conclusions concerning complex III variations may be related to the large standard error of the mean (SEM) observed in the control group (Fig. 7). The ATP and ADP concentrations explored in the same conditions, revealed a significant decrease in ATP concentration for the ALA

treatments (1–300 μM). The ATP/ADP ratio was also significantly decreased for the 100 μM and 300 μM ALA treatments (Fig. 8).

3.6. Fragmentation of the mitochondrial network in HepG2 cells treated with 300 μM and 1 mM ALA

The mitochondrial network was studied by imaging HepG2 cells with a specific marker of mitochondria, the MitoTracker Red dye. Control cells were compared with ALA-treated cells (300 μM and 1 mM). In the control cells, mitochondria were interconnected and formed a balanced network. In contrast, for the 300 μM and 1 mM ALA treatments, the mitochondrial network was highly fragmented with a higher proportion of shorter mitochondria (Fig. 9). Then,

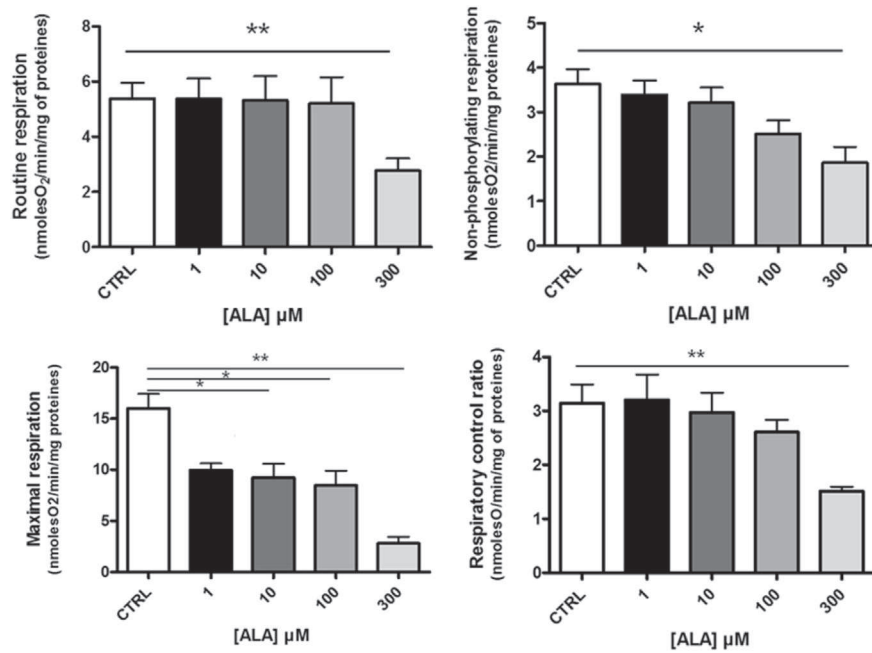


Fig. 4. Respiration rates of HepG2 intact cells incubated for 24 h with various concentrations of ALA (1–300 μM -Control: PBS). The cell respiration (routine, oligomycin insensitive and uncoupled respirations) was measured on a 5.10^6 cell suspension. Respiratory control ratio (“uncoupled”/“oligomycin” ratio) is also presented here. Results were obtained from 14 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control.

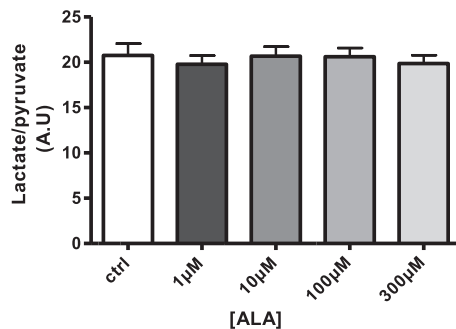


Fig. 5. Measurement of lactate and pyruvate concentrations. Cells were first seeded and treated with ALA (1–300 μM -Control: PBS). 24 h after seeding, the culture medium was removed and analyzed for lactate and pyruvate concentrations. The experiment was performed in 11 independent cell preparations. Results are expressed as lactate versus pyruvate ratio. Values are expressed as means \pm S.E.M.

Western blotting of Mitofusin 2 protein level (MFN2) was normalized with VDAC protein (expression is not modified), it showed a significant decrease of protein expression for 100 μM –300 μM ALA-treated cells (Fig. 9).

3.7. Expression of *PGC1*, *Tfam*, *NRF1*, *ND5*, *ATP synthase*, *MFN2*, and *UCP2* genes

Expression of mitochondrial biogenesis markers was explored in HepG2 cells treated with 1–300 μM ALA. The expression of *PGC1 α* and *ND5* increased significantly for respectively 10–300 μM and 100–300 μM ALA treatments. Although not always significant, most of the quantified biogenesis factors (*Tfam*, *NRF1*, *ATP synthase* and *MFN2*) show similar patterns (Fig. 10). Interestingly, a significant decrease in *UCP2* mRNA levels was detected in HepG2 cells after 24 h of incubation with 300 μM of ALA (Fig. S2).

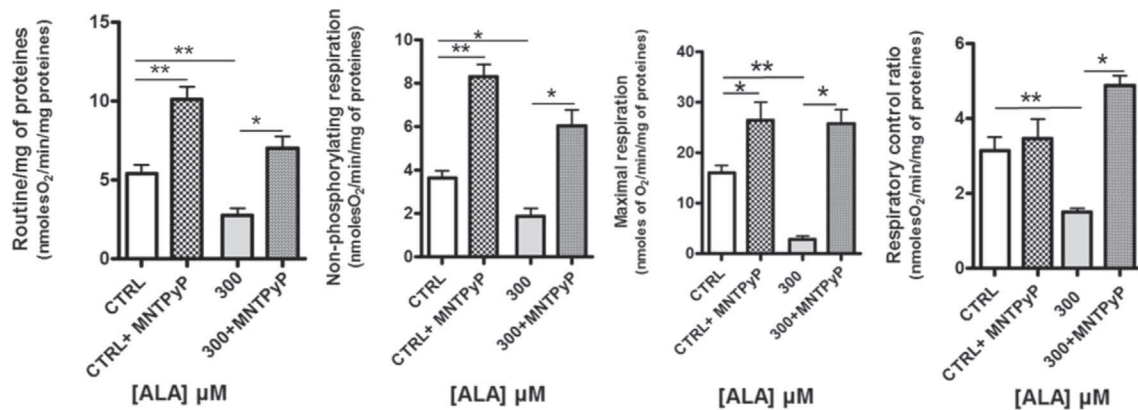


Fig. 6. Respiration rates of HepG2 intact cells after a 24 h treatment with ALA (300 μM -Control: PBS) in presence of MnTPyP, a Manganese SOD mimetic. Cells were first incubated for 30 min with 100 μM MnTPyP, then 24 h with 300 μM ALA. Respiration (routine, “oligomycin insensitive” and “uncoupled”) was recorded on a 5.10^6 cell suspension. The experiment was performed on 6 independent cell preparations. Respiratory control ratio (uncoupled/“oligomycin insensitive” ratio) is also presented here. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control.

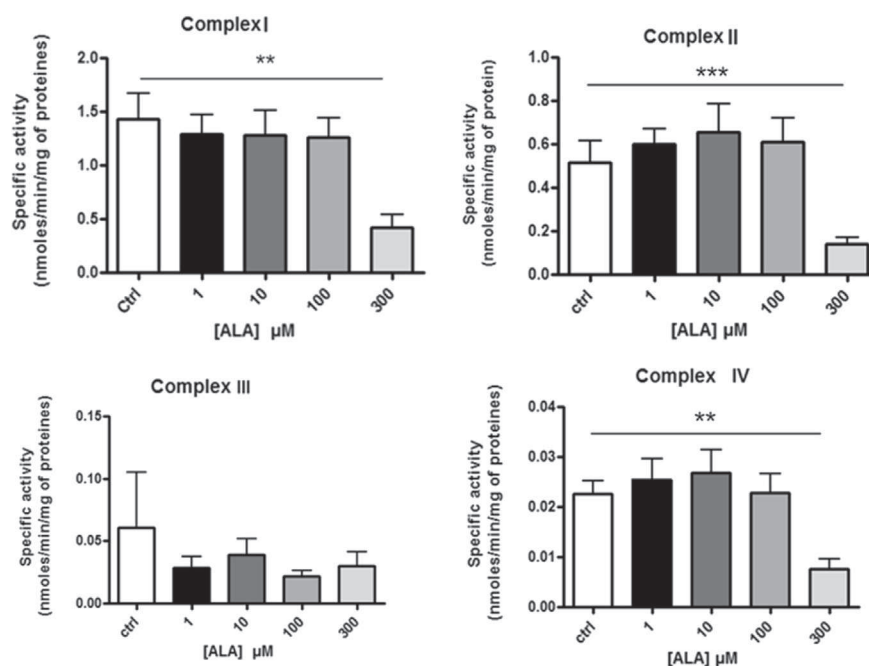


Fig. 7. Enzymatic activities of the respiratory chain complexes of HepG2 cells treated with ALA (1–300 μM -Control: DMEM-F'12) for 24 h. After a step of freezing/thawing and sonication if needed (complex I), the cells were resuspended in a phosphate buffer, assayed for the mitochondrial complexes activities. The experiment was performed on 6 independent cell preparation and measurements were performed in duplicate. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control.

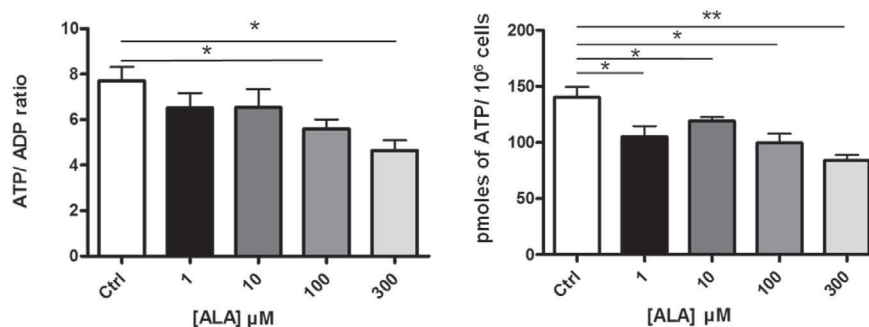


Fig. 8. ATP and ADP cellular content measurement. 1.10^6 cell pellets were used to determine intracellular ATP and ADP contents. ATP/ADP ratio was calculated. Results are expressed in pmol of ATP/ 10^6 cells. The experiment was performed on 6 independent cell preparations. Values are expressed as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control.

4. Discussion

The present study shows that ALA is directly implicated in mitochondrial toxicity in a concentration-dependent manner. At higher concentrations than 100 μM , pharmacologically active dose used for photodynamic therapy [44,45], ALA treatment induces a mitochondrial mass reduction, which is accompanied by the decrease of complexes activities and mitochondrial respiration. In addition, ALA treatment induces an increase of oxidative stress that is accompanied with up-expression of MnSOD and changes in the mitochondrial membrane potential. Interestingly, incubation with a membrane permeant mimetic of SOD prevents the decrease in mitochondrial respiration induced by ALA. For ALA concentrations ranged between 1 μM and 100 μM , the routine and oligomycin insensitive respiration rates were not affected, whereas maximal respiration was diminished. The lactate and pyruvate productions are unchanged compared to control, indicating that metabolic adaptation of HepG2 cells does not require increased glycolytic activity. Elevated blood lactate concentration has been previously evidenced in chronically ALA-treated rats suggesting that ALA itself

could induce OXPHOS dysfunction [46]. It should be noted that we also observed the disruption of mitochondrial function using MTT assay (data not shown).

The effects of ALA accumulation are suspected to be related to ALA pro-oxidant properties [47]. Thus, it has been previously shown that, in the presence of ALA, HepG2 cells are particularly sensitive to oxidative damage on mitochondrial and nuclear DNA [22]. In this respect, the administration of ALA, whatever the concentration, induces a mitochondrial membrane hyperpolarization with an increase ROS production and a decrease ATP content indicating that ALA induces an important metabolic stress on mitochondria. The pro-oxidant properties of ALA have been well demonstrated in the nervous system [48–51], and proteins as UCP2 are known to negatively modulate ROS production. To further explore the molecular basis of our observations, we studied the UCP2 gene expression. The significant decrease of UCP2 expression following the 300 μM ALA treatment indicates that ROS neutralization is managed by another mechanism. We also showed that mitochondria enhanced MnSOD expression levels suggesting that mitochondria enhance its detoxification activity.

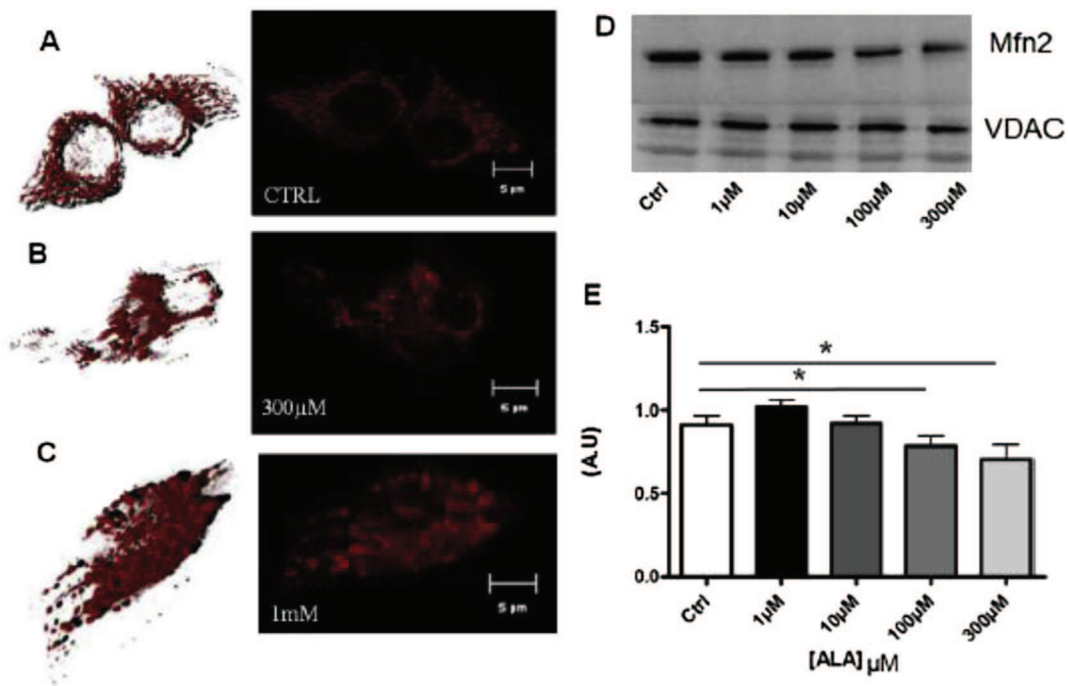


Fig. 9. Mitochondrial network fragmentation in HepG2 cells treated with 300 μ M or 1 mM ALA. The HepG2 24 h treated cells were studied using confocal microscopy after staining with the MitoTracker Red dye: A. Control cells; B. 300 μ M ALA treated cells; C. 1 mM ALA treated cells. Scale bar: 5 μ m. D. Western blotting using Mfn2 and VDAC primary antibodies. E. Signal quantification of the western blot spots for Mfn2 and VDAC (performed in duplicates). The experiment was performed on 4 independent cell preparations. Values are expressed relative to control as means \pm S.E.M. * p < 0.05 versus control.

The key enzymes of PpIX synthesis are localized in the mitochondrial matrix; highly reactive ROS generated by PpIX photoactivation would then react primarily in this compartment [52,53]. In the present study, we demonstrated that exogenous ALA is metabolized, at least in part, by the heme biosynthesis pathway. Indeed, PpIX measurement showed a 900% accumulation of PpIX in cells treated with ALA as already described by Bhowmick [54]. Navarro [55] shows that elevated levels of PpIX modified

intracellular ATP requirements as well as hepatic mitochondrial respiratory chain enzymatic activities. In a recent study, a mitochondrial premature membrane damage was shown to inhibit PpIX [56]. Our data suggest that, after a 300 μ M ALA treatment of cells, PpIX may generate the mitochondrial metabolic disturbances observed via the ROS production.

To verify whether the effects induced by ALA treatment on mitochondrial respiration are mediated by ROS, we treated the

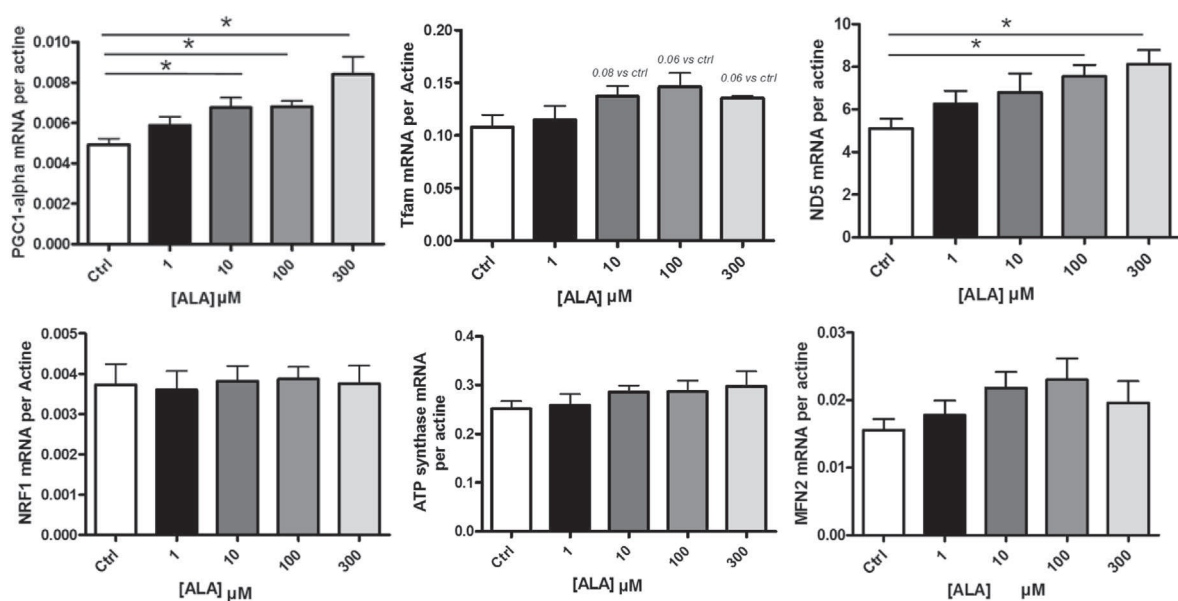


Fig. 10. Quantitative real-time RT PCR for mitochondrial biogenesis markers in HepG2 cells treated with ALA (1–300 μ M-Control: DMEM-F12) for 24 h. Total RNA was extracted from cells. The quantitative PCR was performed in duplicates on 40 ng of cDNA to explore the expression of *PGC1- α* , *NRF1*, *TfAM*, *ATP synthase*, *ND5*, *MFN2* and β -*Actin*. cDNA levels were standardized with cDNA level of β -*Actin*. The experiment was performed in 6 independent cell preparations. Values are expressed as means \pm S.E.M. * p < 0.05 versus control.

HepG2 cells with 300 μM ALA and the membrane permanent mimetic SOD, MnTMPyP [57]. Interestingly, MnTMPyP prevented the ALA-induced alterations on mitochondrial respiration. These results support the hypothesis of pro-oxidant effects of ALA on mitochondrial function.

Mitochondrial disturbances are known to amplify mitochondrial biogenesis signaling to the nucleus [58]. The flow of metabolites or the structural changes of the organelle itself may be part of this signaling. For the 300 μM ALA treatment, we observed ALA induced a mitochondrial network imbalance, favoring fission, and probably due to excessive ROS production. The expression level of MFN2, a mitochondrial protein involved in fusion, showed that this protein is down regulated for the 100 μM ALA treatment. These changes in mitochondrial bioenergetics and morphology influence the expression of nuclear genes, which would in back regulate mitochondrial function and therefore cellular metabolism as previously described in HepG2 cells by Desquret et al. [33]. Among the mitochondrial biogenesis actors described in the literature, we explored the expression of *PGC1 α* , *NRF1*, *Tfam*, *ATPsynthase* and *ND5*. *PGC1 α* and *ND5* were found significantly increased for respectively 10–300 μM and 100–300 μM ALA treatments, respectively. It is plausible that pro-oxidant effects of ALA treatment stimulated mitochondrial biogenesis, by a positive feedback of *PGC1 α* and *ND5* expressions in order to compensate the impairment of mitochondrial function. Our data confirm the modulation of the mitochondrial–nuclear dialog when cells are exposed to ALA. We notice some of these factors are modulated only with 1 μM ALA, which is the plasmatic concentration in AIP and lead poisoning patients. These results suggest a major implication of ALA in porphyria.

To our knowledge, the present study is the first to show the direct effect of ALA on mitochondria with alteration of structure, respiration and membrane potential. This ALA induced mitochondrial stress was prevented by an antioxidant opening new therapeutic approaches for patients with ALA accumulation.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

We are grateful to Emilie Lauret for microscopy technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.08.014>.

References

- [1] H.P. Monteiro, D.S. Abdalla, A. Fajoni-Alario, E.J. Bechara, Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and delta-aminolevulinic acid, *Biochim. Biophys. Acta* 881 (1986 Mar 19) 100–106.
- [2] A. Kappas, S. Sassa, R.A. Galbraith, Y. Nordmann, The porphyrias, in: C.R. Scriver, A.L. Beudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 2103–2159.
- [3] J.T. Hindmarsh, The porphyrias: recent advances, *Clin. Chem.* 32 (1986) 1255–1263.
- [4] R. Berger, H. van Faassen, G.P. Smith, Biochemical studies on the enzymatic deficiencies in hereditary tyrosinemia, *Clin. Chim. Acta* 134 (1983 Oct 31) 129–141.
- [5] G. Mitchell, J. Laroche, M. Lambert, J. Michaud, A. Grenier, H. Ogier, M. Gauthier, J. Lacroix, M. Vanasse, A. Larbrisseau, K. Paradis, A. Weber, Y. Lefevre, S. Melançon, L. Dallaire, Neurologic crises in hereditary tyrosinemia, *N. Engl. J. Med.* 322 (1990) 432–437.
- [6] H. Gurer, N. Ercal, Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 927–945.
- [7] T. Sakai, Y. Morita, T. Araki, M. Kano, T. Yoshida, Relationship between delta-aminolevulinic acid dehydratase genotypes and heme precursors in lead workers, *Am. J. Ind. Med.* 38 (2000) 355–360.
- [8] P.W. Stacpoole, D.S. Kerr, C. Barnes, T. Bunch, P.R. Carney, E.M. Fennell, N.M. Felitsyn, R.L. Gilmore, M. Greer, G.N. Henderson, A.D. Hutson, R.E. Neiberger, R.G. O'Brien, L.A. Perkins, R.G. Quisling, A.L. Shroads, J.J. Shuster, J.H. Silverstein, D.W. Theriaque, E. Valenstein, Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children, *Pediatrics* 117 (2006) 1519–1531.
- [9] H. Puy, L. Gouya, J.C. Deybach, Porphyrias, *Lancet* 375 (2010) 924–937.
- [10] R. Kauppinen, P. Mustajoki, Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma, *Br. J. Cancer* 57 (1988) 117–120.
- [11] P.L. Thunnissen, J. Meyer, R.W. de Koning, Acute intermittent porphyria and primary liver-cell carcinoma, *Neth. J. Med.* 38 (1991) 171–174.
- [12] T. Douki, J. Onuki, M.H.G. Medeiros, E.J.H. Bechara, J. Cadet, P. Di Mascio, Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid, *FEBS Lett.* 428 (1998) 93–96.
- [13] G.L. Wilson, N.J. Patton, S.P. LeDoux, Mitochondrial DNA in beta-cells is a sensitive target for damage by nitric oxide, *Diabetes* 46 (1997) 1291–1295.
- [14] D.E. Sawyer, B. Van Houten, Repair of DNA damage in mitochondria, *Mutat. Res.* 434 (1999) 161–176.
- [15] S. Shahzidi, T. Stokke, H. Soltani, J.M. Nesland, Q. Peng, Induction of apoptosis by hexaminolevulinatemediated photodynamic therapy in human colon carcinoma cell line 320DM, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 25 (2006) 159–171.
- [16] L. Cekaite, Q. Peng, A. Reiner, S. Shahzidi, S. Tveito, I.E. Furre, E. Hovig, Mapping of oxidative stress responses of human tumor cells following photodynamic therapy using hexaminolevulinatemediated, *BMC Genomics* 13 (2007) 273.
- [17] Z.F. Soonawalla, T. Orug, M.N. Badminton, G.H. Elder, J.M. Rhodes, S.R. Bramhall, E. Elias, Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria, *Lancet* 363 (2004) 705–706.
- [18] J.K. Dowman, B.K. Gunson, D.F. Mirza, S.R. Bramhall, M.N. Badminton, P.N. Newsome, UK Liver Selection and Allocation Working Party, Liver transplantation for acute intermittent porphyria is complicated by a high rate of hepatic artery thrombosis, *Liver Transpl.* 18 (2012) 195–200.
- [19] S.R. Ennis, A. Novotny, J. Xiang, P. Shakui, T. Masada, W. Stummer, D.E. Smith, R.F. Kee, Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain, *Brain Res.* 959 (2003) 226–234.
- [20] S.M. Ocheltree, H. Shen, Y. Hu, J. Xiang, R.F. Kee, D.E. Smith, Role of PEPT2 in the choroid plexus uptake of glycylsarcosine and 5-aminolevulinic acid: studies in wild-type and null mice, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1680–1685.
- [21] M. Zimmermann, A.C. Stan, PepT2 transporter protein expression in human neoplastic glial cells and mediation of fluorescently tagged dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-7-amino-4-methyl-coumarin-3-acetic acid accumulation, *J. Neurosurg.* 112 (2010) 1005–1014.
- [22] J. Onuki, Y. Chen, P.C. Teixeira, R.I. Schumacher, M.H. Medeiros, B. Van Houten, P. Di Mascio, Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid, *Arch. Biochem. Biophys.* 432 (2004) 178–187.
- [23] A. Gorchein, R. Webber, Delta-aminolaevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects, *Clin. Sci. (Lond.)* 72 (1987) 103–112.
- [24] C. Andant, H. Puy, C. Bogard, J. Faivre, J.C. Soulé, Y. Nordmann, J.C. Deybach, Hepatocellular carcinoma in patients with acute hepatic porphyria: frequency of occurrence and related factors, *J. Hepatol.* 32 (2000) 933–939.
- [25] J. Onuki, P.C. Teixeira, M.H. Medeiros, D. Dörnemann, T. Douki, J. Cadet, P. Di Mascio, Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 48 (2002) 17–26.
- [26] C. Andersson, L. Bjersing, F. Lithner, The epidemiology of hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria, *J. Intern. Med.* 240 (1996) 195–201.
- [27] A.E. Vercesi, R.F. Castilho, A.R. Meinicke, V.G. Valle, M. Hermes-Lima, E.J.H. Bechara, Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca²⁺ and membrane protein thiols, *Biochim. Biophys. Acta* 1188 (1994) 86–92.
- [28] M. Hermes-Lima, How do Ca²⁺ and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 381–390.
- [29] Y. He, X. Xia, C. Xu, H. Yu, D. Bai, J. Xiang, A.W. Leung, 5-Aminolaevulinic acid enhances ultrasound-induced mitochondrial damage in K562 cells, *Ultrasonics* 50 (2010) 777–781.
- [30] D.C. Wallace, A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 359–407.
- [31] J. Nunnari, A. Suomalainen, Mitochondria: in sickness and in health, *Cell* 148 (2012) 1145–1159.
- [32] S. Ogura, K. Maruyama, Y. Hagiya, Y. Sugiyama, K. Tsuchiya, K. Takahashi, F. Abe, K. Tabata, I. Okura, M. Nakajima, T. Tanaka, The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome C oxidase activity in mouse liver, *BMC Res. Notes* 17 (2011) 66.
- [33] V. Desquret, D. Loiseau, C. Jacques, O. Douay, Y. Malthiery, P. Ritz, D. Roussel, Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 21–30.
- [34] V. Desquret, N. Gueguen, Y. Malthiery, P. Ritz, G. Simard, Mitochondrial effects of dexamethasone imply both membrane and cytosolic-initiated

- pathways in HepG2 cells, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40 (2008) 1629–1641.
- [35] G.N. De Iulius, J.K. Wingate, A.J. Koppers, E.A. McLaughlin, R.J. Aitken, Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 1968–1975.
- [36] M. Colombini, VDAC structure, selectivity and dynamics, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1457–1465.
- [37] D. Loiseau, A. Chevrollier, C. Verny, V. Guillet, N. Gueguen, M./A. Pou de Crescenzo, M. Ferré, M.C. Malinge, A. Guichet, G. Nicolas, P. Amati-Bonneau, Y. Malthiery, D. Bonneau, P. Reynier, Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease, *Ann. Neurol.* 61 (2007) 315–323.
- [38] S. Horie, M. Morrison, Cytochrome c oxidase components. I. Purification and properties, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1855–1860.
- [39] A.V. Kuznetsov, E. Gnaiger, Laboratory Protocol. Complex I (NADH: Ubiquinone Oxidoreductase, EC 1.6.5.3) Mitochondrial Membrane Enzyme, *MitNet* 8.15, 2003, pp. 1–8.
- [40] A.M. James, Y.H. Wei, C.Y. Pang, M.P. Murphy, Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations, *Biochem. J.* 318 (1996) 401–407.
- [41] P. Rustin, D. Chretien, T. Bourgeron, B. Gerard, A. Rotig, J.M. Saudubray, A. Munnich, Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin. Chim. Acta* 228 (1994) 35–51.
- [42] C. Jacques, A. Chevrollier, D. Loiseau, L. Lagoutte, F. Savagner, Y. Malthiery, P. Reynier, mtDNA controls expression of the death associated protein 3, *Exp. Cell. Res.* 312 (6) (2006 Apr 1) 737–745.
- [43] C. Jacques, J.F. Fontaine, B. Franc, D. Mirebeau-Prunier, S. Triau, F. Savagner, Y. Malthiery, Death-associated protein 3 is overexpressed in human thyroid oncocyctic tumours, *Br. J. Cancer* 101 (2009) 132–138.
- [44] J.F. Cornelius, P.J. Sloty, M. El Khatib, A. Giannakis, B. Senger, H.J. Steiger, Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 11 (1) (2014 Mar) 1–6.
- [45] M.D. Kars, R. Kara, Y. Gündoğdu, A. Kepceoğlu, H.S. Kılıç, Femtosecond laser induced photodynamic therapy on 5-ALA treated SKMEL-30 cells: an efficient theranostic strategy to combat melanoma, *Biomed. Pharmacother.* 68 (5) (2014 Jun) 657–662.
- [46] B. Pereira, R. Curi, E. Kokubun, E.J. Bechara, 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats, *J. Appl. Physiol.* 72 (1992) 226–230.
- [47] N. Felitsyn, C. McLeod, A.L. Shroads, P.W. Stacpoole, L. Notterpek, The heme precursor delta-aminolevulinic acid blocks peripheral myelin formation, *J. Neurochem.* 106 (2008) 2068–2079.
- [48] M. Demasi, C.A. Penatti, R. DeLucia, E.J. Bechara, The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 291–299.
- [49] A.A. Juknat, M.L. Kotler, A. Quaglino, N.M. Carrillo, T. Hevor, Necrotic cell death induced by delta-aminolevulinic acid in mouse astrocytes. Protective role of melatonin and other antioxidants, *J. Pineal Res.* 35 (2003) 1–11.
- [50] A. Adhikari, C.A. Penatti, R.R. Resende, H. Ulrich, L.R. Britto, E.J. Bechara, 5-Aminolevulinic acid and 4, 5-dioxovalerate ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain, *Brain Res.* 1093 (2006) 95–104.
- [51] E.J. Bechara, F. Dutra, V.E. Cardoso, A. Sartori, K.P. Olympio, C.A. Penatti, A. Adhikari, N.A. Assuncao, The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146 (2007) 88–110.
- [52] Z. Malik, H. Lugaci, Destruction of erythroleukemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins, *Br. J. Cancer* 56 (1987) 589–595.
- [53] Q. Peng, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, J.M. Nesland, 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research, *Photochem. Photobiol.* 65 (1997) 235–251.
- [54] R. Bhowmick, A.W. Girotti, Rapid upregulation of cytoprotective nitric oxide in breast tumor cells subjected to a photodynamic therapy-like oxidative challenge, *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 378–386.
- [55] S. Navarro, P. Del Hoyo, Y. Campos, M. Abitbol, M.J. Morán-Jiménez, M. García-Bravo, P. Ochoa, M. Grau, X. Montagutelli, J. Frank, R. Garesse, J. Arenas, R.E. de Salamanca, A. Fontanellas, Increased mitochondrial respiratory chain enzyme activities correlate with minor extent of liver damage in mice suffering from erythropoietic protoporphyria, *Exp. Dermatol.* 14 (2005) 26–33.
- [56] M. Hefti, I. Albert, V. Luginbuehl, Phenytoin reduces 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in malignant glioma cells, *J. Neurooncol.* 108 (2012) 443–450.
- [57] T. Takeuchi, H.B. Gray, W.A. Goddard, III- Electronic structures of Halogenated porphyrins: spectroscopic properties of ZnTFPPX8 (TFPPX8 = Octa-beta-halotetrakis (pentafluorophenyl)porphyrin; x = Cl, Br), *Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 9730–9732.
- [58] M.T. Ryan, N.J. Hoogenraad, Mitochondrial-nuclear communications, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 701–722.

Discussion Article 3

Les résultats de cette étude mettent en évidence des effets toxiques, doses-dépendantes, de l'ALA sur la mitochondrie et son métabolisme.

Le traitement des cellules hépatiques par l'ALA induit une diminution de la masse mitochondriale accompagnée d'une baisse de l'activité des complexes de la CRM. Il induit également un stress oxydant dont témoigne l'augmentation de l'expression de la super-oxyde dismutase mitochondriale (MnSOD), enzyme inductible dont la fonction est la détoxification des espèces oxygénées réactives (ROS).

Le traitement par l'ALA ne montre pas de modification des ratios lactate/pyruvate, contrairement à une précédente étude chez un autre modèle animal (rat) qui montrait une augmentation des taux du lactate induit par une administration chronique d'ALA (Pereira 1992). Cela montre que les cellules HepG2 n'ont pas stimulé le métabolisme glycolytique à la suite de l'exposition à des différentes doses d'ALA.

Les effets toxiques d'ALA sont reliés à des particularités pro-oxydantes de cette molécule (Flistyn 2008). Il avait déjà été montré que l'exposition chronique à l'ALA cause des dommages aux génomes nucléaires et mitochondrial (Onuki 2004). En outre, des effets pro-oxydants ont été démontrés dans le tissu nerveux (Bechara 2007). Nous pensons que l'administration de l'ALA induit, même à faible concentration, une hyperpolarisation de la membrane cellulaire avec une surproduction de ROS, ainsi qu'une baisse de la quantité d'ATP synthétisée.

Des protéines, telles que l'UCP2, sont utilisées par la cellule pour moduler la production des ROS. Dans notre étude nous trouvons que l'expression de cette protéine baisse à la suite du traitement des cellules par une concentration d'ALA supérieure ou égale à 300 μ M, ce qui laisse penser que les cellules Hep G2 utilisent un autre mécanisme pour s'adapter au stress oxydant induit par l'ALA. Nous retrouvons par ailleurs une augmentation de l'activité de l'enzyme MnSOD mitochondriale, enzyme connue pour ses effets de détoxification des ROS, ce qui pourrait expliquer l'absence de stimulation transcriptionnelle des protéines UCP.

La protoporphyrinogène oxydase, septième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, prend place dans la matrice mitochondriale. Son produit, la protoporphyrine IX, est une molécule photo-active dont l'activation aboutit à une surproduction de ROS (Peng 1997). Nous montrons que les cellules exposées à l'ALA accumulent, d'une manière importante, la

protoporphyrine IX (+900%). Navarro a montré que l'accumulation de protoporphyrine IX dans la cellule hépatique modifie son besoin en ATP ainsi que l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les cellules hépatiques HpG2 incubées avec l'ALA à la concentration de 300 μ M accumulent la protoporphyrine IX qui, à son tour, perturbe le fonctionnement mitochondrial à travers une surproduction des ROS.

Les effets mitochondriaux d'une concentration de 300 μ M d'ALA sont corrigés en présence d'un produit antioxydant (MnTMPyp, Takeuchi1994). Ceci semble confirmer que les ROS participent aux effets de l'ALA sur la fonction énergétique mitochondriale.

L'analyse, en microscopie confocale, montre que le réseau mitochondrial subit une fragmentation significative par augmentation du processus de fission à la suite d'une exposition à des doses élevées d'ALA à (300 μ M et 1 mM). En outre, nous retrouvons un niveau très abaissé de MFN2, protéine impliquée dans la fusion mitochondriale, à partir d'une exposition d'ALA de 100 μ M.

Parallèlement à cette perturbation morphologique, la biogenèse mitochondriale est stimulée. Nous observons une augmentation significative de l'expression de deux gènes nucléaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale, PGC1 α et ND5. Cette augmentation de la biogenèse s'expliquerait par une stimulation du dialogue nucléo-mitochondrial induite par l'excès de ROS traduisant la souffrance mitochondriale.

Cette étude montre les effets néfastes de l'ALA (et peut-être des précurseurs de l'hème) sur la fonction énergétique mitochondriale, le potentiel de membrane ainsi que la morphologie du réseau mitochondrial. Ces effets sont très probablement consécutifs à un stress oxydant vis-à-vis duquel les mécanismes de détoxification se sont montrés insuffisants.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'implication de la mitochondrie a été proposée pour expliquer la physiopathologie de certaines pathologies liées au déficit de synthèse de l'hème tels la porphyrie aiguë intermittente PAI (Hermes-Lima 1991 ; Vercesi 1994 ; Onucki 2004, Navarro 2005 ; Ogura 2011 ; Besur 2014).

Notre projet de thèse était d'étudier la fonction énergétique mitochondriale en situation de blocage de la synthèse de l'hème. Pour cela, nous avons analysé la porphyrie aiguë intermittente (PAI) qui est la porphyrie hépatique la plus sévère (Ventura 2014).

Notre étude s'est appuyée sur une approche expérimentale utilisant deux modèles. Le premier modèle *in-vivo* est un modèle murin mimant biochimiquement la crise de PAI sur lequel nous avons étudié le métabolisme énergétique mitochondrial dans un modèle murin transgénique disposant une activité résiduelle à 30% de HMBS (Meyer 1998). Cette étude nous a permis d'étudier la mitochondrie dans son environnement physiologique, et cela lors d'une activation massive de la voie de synthèse de l'hème suite à l'induction par le phénobarbital. Le deuxième modèle *in vitro* est un modèle de cellules hépatiques humaines, la lignée HepG2. Ce modèle a été utilisé pour analyser la répercussion mitochondriale d'un excès d'ALA.

Le modèle animal, s'appliquait à des souris femelles de 8 semaines de vie car la PAI touche le plus fréquemment les femme jeunes (Puy 2010). Nous avons étudié la fonction énergétique mitochondriale dans 3 tissus différents, le foie, le muscle squelettique et le cerveau. La pathologie a une origine hépatique car le foie est le site principal d'accumulation des précurseurs d'hème notamment l'acide delta amino-levulinique (Dowman 2012) et ces précurseurs diffusent dans l'ensemble de l'organisme à partir du foie (Puy 2010).

La carence en hème au niveau neurologique ainsi que la neurotoxicité de l'ALA ont été proposées comme explication de la physiopathologie de la PAI (Lin 2011 ; Tracy 2014 ; Besur 2014) (Fig19). Lors des crises de PAI, les signes neurologiques font partis du tableau des crises de PAI (Eun Young ; Neil 2011).

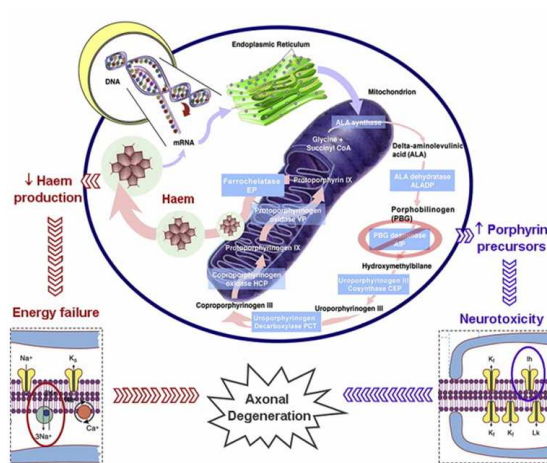


Fig19 : Mécanismes de l'atteinte neurologique dans la PAI (Cindy 2011)

Dans le même modèle murin utilisé dans notre étude Lindberg 1999 a décrit la survenue d'une neuropathie de type axonale comme complication à long terme même en absence d'une induction par phénobarbital.

Les signes musculaires comme la myalgie ou la faiblesse musculaire peuvent apparaître chez des patients porteurs de PAI, dans les cas sévères, les complications musculaires peuvent même menacer le pronostic vital (Wu Cl 2015; Bonkovsky 2014; Albers 2004), les signes musculaires représentent un symptôme fréquent chez les patients atteints d'une cytopathie mitochondriale (Sharp 2014). En effet, le tissu musculaire est un grand consommateur de l'énergie produite essentiellement grâce à l'oxydation phosphorylante OXPHOS (Heppel 2014).

Notre modèle animal nous a permis de mettre en évidence un impact sur le fonctionnement de la CRM de la « crise » induite par le phénobarbital. Cet impact s'est traduit par une diminution de l'activité des complexes de la CRM. Cette baisse a été partiellement restaurée suite à l'administration de l'hème exogène (Normosang®). La diminution de l'activité des complexes s'accompagne dans le foie et dans le muscle par une baisse de la vitesse de respiration mitochondriale et d'une baisse drastique de la synthèse d'ATP dans le muscle.

Ces modifications ne seraient pas liées à une carence en hème au niveau de la mitochondrie, car contrairement à notre attente, l'activité du complexe IV qui contient des hémoprotéines (*a* et *a3*) était intacte dans le muscle et le foie, le traitement des souris par l'hème exogène (Normosang®) a apporté des améliorations variables sur les paramètres étudiés, par ailleurs nous n'avons pas la preuve que ces effets sont dus à la restauration d'une éventuelle carence héminique au niveau de la mitochondrie, car l'hème humaine apporté par le Normosang® est de type *b* (Schaer 2013), tandis que l'hème qui rentre dans la structure des complexes de la

CRM est de nature *a*, *b*, et *c*. Nous ne pouvons pas par ailleurs confirmer que l'hème exogène d'origine humaine agit dans notre modèle murin de la même manière que lorsqu'il est utilisé chez les patients PAI, c'est à dire exercer un retro-contrôle négatif sur l'activité de l'ALAS1.

Il n'est pas exclu que cet effet de l'hème arginate soit en fait dû à l'éloignement chronologique de l'induction par le phénobarbital, et l'administration Normosang[®] étant réalisée 48 h après l'arrêt de phénobarbital. Le retour partiel à la normal pourrait ainsi être uniquement dû à l'atténuation de l'effet du phénobarbital.

Ce changement du métabolisme mitochondrial ne peut pas être expliqué par la baisse de l'expression des protéines mitochondriales car l'expression protéique étudiée par Western blots dans le foie n'a révélé aucune différence entre les groupes de souris étudiées.

Notre étude du modèle (HBMS^{-/-}) a mis en évidence un élément propre à la souris transgénique, car dans les trois tissus étudiés et en dehors de l'induction par phénobarbital (état basal), nous avons montré une activité spontanément augmentées des complexes de la CRM, cette augmentation concerne le complexe I dans le muscle et le II dans le foie et le cerveau. Ceci est probablement dû à une adaptation mitochondriale différente chez la souris transgénique en réponse à l'activité réduite de l'enzyme HMBS.

Le complexe II se partage entre le cycle du Krebs et la CRM via son activité succinate déshydrogénase (SDH). De plus, le cycle du Krebs est connecté à la synthèse de l'hème avec l'utilisation d'un intermédiaire commun, le succinyl-CoA. Cette molécule constitue avec la glycine, la première molécule de la voie de biosynthèse de l'hème l'ALA, qui est synthétisée par l'enzyme ALAS1 dont l'activité augmente d'une manière spectaculaire lors de la crise de PAI (Puy 2010). Dans notre modèle, suite à l'induction par phénobarbital (Lindberg 1996), cet emballement de l'activité de l'ALAS1 provoque probablement une carence de la biodisponibilité du succinyl Co-A, perturbant ainsi le fonctionnement du cycle du Krebs. Cela est confirmé par la baisse de l'activité de trois enzymes du cycle de Krebs : la citrate synthase, l'alpha céto-glutarate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase. La citrate synthase et l'alpha ceto-glutarate déshydrogénase agissent en amont du succinyl-COA tandis que la succinate-déshydrogénase agit en aval de cet intermédiaire. Nous pensons donc qu'un mécanisme de cataplérose pourrait être à l'origine d'une inhibition du cycle du Krebs et en conséquent, responsable du dérèglement du flux des coenzymes réduits nécessaires au fonctionnement des complexes de la CRM (Fig20).

concentrations similaires à celles rapportées dans la littérature, chez les patients atteints de la PAI ou du saturnisme. Nos résultats montrent clairement des effets toxiques directs de l'ALA sur la fonction énergétique mitochondriale, cette perturbation se traduit à plusieurs niveaux. Sur le plan fonctionnel, comme dans le modèle animal, nous avons noté une baisse de la vitesse maximale de la respiration mitochondriale, une diminution de l'activité des complexes (I, II et IV) de la CRM et une baisse du contenu en ATP. Sur le plan morphologique, nous avons constaté que l'ALA exogène induit une fragmentation du réseau mitochondrial avec une augmentation du phénomène de fission et cela est accompagné par une diminution de la masse mitochondriale. Nous avons également observé dans les cellules un effet pro-oxydant de l'ALA avec une surproduction de ROS et une augmentation de l'expression de l'enzyme détoxifiante MnSOD. Ces effets ont été nettement améliorés suite au traitement par un anti-oxydant. Enfin, sur le plan de la biogenèse mitochondrial, nous avons trouvé une augmentation de l'expression de certains acteurs de la biogenèse mitochondriale (PGC1 α et ND5) en faveur d'une induction de la biogenèse mitochondriale et une réadaptation du dialogue nucléo-mitochondrial, en réponse à l'agression par l'ALA accumulée.

En conclusion : Notre étude est la première qui démontre l'implication de l'oxydation phosphorylante dans la physiopathologie de la PAI. Les deux approches menées blocage de la voie de synthèse de l'hème (*in-vivo*) et sur l'accumulation de précurseurs de l'hème (*in-vitro*) ont permis de mettre en évidence des perturbations similaires du métabolisme mitochondrial. Cela souligne le fait que la PAI en tant que maladie métabolique a un important versant énergétique. A ce stade de l'étude nous sommes convaincus que la pathologie ne peut être uniquement expliquée par la carence cellulaire en hème et que le déficit énergétique que nous avons mis en évidence contribue de manière importante à la maladie. Enfin, ce déficit énergétique est parfaitement compatible avec l'expression neuromusculaire de la maladie, par analogie avec les maladies mitochondriales.

Perspectives

Dans le but de compléter cette étude nous pourrions envisager les expérimentations suivantes :

1- Catplérose : Dans le modèle animal, et afin de vérifier l'hypothèse de cataplérose, il serait intéressant de doser, après l'administration du phénobarbital, le succinyl-coA et les autres intermédiaires du cycle du Krebs. Ces dosages pourraient être réalisés par spectrométrie de masse MS/MS, dans le sang, les urines et les homogénats de tissus. Nous envisageons d'étudier dans les mêmes échantillons le ratio NADH^+/NAD . Ce ratio pourra renseigner sur la disponibilité en coenzymes réduits provenant du cycle du Krebs et alimentant la CRM.

2- Stress oxydant : Il serait important d'approfondir l'étude du stress oxydant dans le modèle murin afin de voir s'il est aussi présent dans ce modèle. Celui-ci serait réalisé par cytométrie en flux par le dosage de l'activité et l'expression des enzymes anti-oxydantes notamment les superoxydes dismutases cytosolique et mitochondriale.

3- Afin de vérifier le rôle du Normosang[®], il est important de refaire l'expérimentation en remplaçant le Normosang[®] par du sérum physiologique.

4- Au niveau génétique et afin de mieux comprendre les différences enregistrées entre les souris transgéniques et les souris témoins, il serait intéressant de mener une étude d'expression génique afin d'étudier le comportement des gènes codant les protéines mitochondriales et de ceux qui contrôlent la biogenèse mitochondriale.

BIBLIOGRAPHIE

Aarsand AK., Petersen PH., Sandberg S. (2006) "Estimation and application of biological variation of urinary delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in healthy individuals and in patients with acute intermittent porphyria". *Clin Chem*, 52, P 650-656.

Ahn BH., Kim HS., Song S., Lee IH., Liu J., Vassilopoulos A., Deng CX., Finkel T. (2008) "A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis". *Proceeding of the national academy of sciences of the united states of America*, 23, 105(38), P 14447-14452.

Albers JW., Fink JK. (2013) "Porphyric neuropathy". *Handbook of Clinical Neurology*, chapter 36, 115, P 613-627.

Albers JW., Fink JK. (2004) "Porphyric neuropathy". *Muscle Nerve*, 30, P 410-422.

Albers JW., Robertson WC Jr., Daube JR. (1978) "Electrodiagnostic findings in acute porphyric neuropathy". *Muscle Nerve*, 1, P 292-296.

Anderson KE., Bloomer JR., Bonkovsky HL et al. (2005) "Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias". *Ann Intern Med* 142, P 439-450.

Andersson K., Sassa A., Bishop D. (2001) "Disorders of heme biosynthesis : X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In : Scriver C., Beaudet A., Sly W., Valle D. et al. (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*". McGraw-Hill, New York, P 2991-3062.

Andrew G. R., Elder GH. (2001) "Alternative splicing and tissue-specific transcription of human and rodent ubiquitous 5-aminolevulinic synthase (ALAS1) genes" *Biochimica et Biophysica Acta* 1518, 95-105, P 95-105.

Ashwani KS., Parker C., Bowden C., Thapar M., Liu L., McGuire1 BM. (2014) "Liver Transplantation in the Management of Porphyria" 60, 3, P 1082-1089.

Balwani M., Desnick RJ. (2012) "The porphyrias: advances in diagnosis and treatment" *Hematology*, P 19-27.

Battersby AR. (1987) "Nature's pathways to the pigments of life" *Nat Prod Rep*, 4,1, P 77-87.

Bechara EJ. (1996) "Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid" *Brazilian journal of medical and biological research*, 29 7, P 841-851.

Bechara EJ., Dutra F., Cardoso VE., Sartori A., Olympio KP., Penatti CA., Adhikari A. and Assuncao NA. (2007) "The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146, P 88-110.

- Benard G., Faustin B., Passerieux E., Galinier A., Rocher C., Bellance N., et al. (2006) "Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation". *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C11 P 72-82.
- Besur S., Hou W., Schmeltzer P., Bonkovsky HL. (2014) "Clinically important features of porphyrin and heme metabolism and the porphyrias" *Metabolites*, 4, P 977-1006.
- Blaban RS., Nemoto S., Finkel T. "Mitochondria, oxidants, and aging". (2005), *Cell*, 120, 4, P 483-495.
- Bonkovsky HL., Guo JT., Hou W., Li T., Narang T., Thaper M. (2013), "Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias" *Comprehensive physiology*, 3, (1) P 365-401.
- Bottomley, SS., Foerster JP., Lukens JN., Rogers GM., Paraskevas F., Glader BE., eds (2004). "Sideroblastic anemias". In *Wintrobe's Clinical Hematology*, Greer. (Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins), P. 1012–1033.
- Bouchard MF., Bellinger DC., (2009) "Blood lead levels and major depressive disorder, panic disorder, and generalized anxiety disorder in US young adults". *Arch Gen Psychiatry*.16,12 P 1313-1319.
- Brand MD., Buckingham JA., Esteves TC., Green K., Lambert AJ., Miwa S., Murphy MP., Pakay JL., Talbot DA., Echtay KS. (2004) "Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production". *Biochemical and society symposium*, 71, P 203-213.
- Brand MD., Pakay JL., Ocloo A., Kokoska J., Wallace DC., Brookes PS., Cornwall EJ. (2005) "The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content", *The biochemical journal*, 1,392 (2), P 353-362.
- Bykova NV., Stensballe A., Egsgaard H., Jensen ON., Moller IM. (2003) "Phosphorylation of formate dehydrogenase in potato tuber mitochondria". *The journal of biological chemistry*. 11,278 28, P 26021-26030.
- Bylesjo I., Wikberg A., Andersson C. (2009) "Clinical aspects of acute intermittent porphyria in northern Sweden: a population-based study". *Scand J Clinical Laboratory investigations*, 69, P 612–618.
- Calvo SE., Mootha VK. (2010) "The mitochondrial proteome and human disease". *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 11, P 25-44.
- Capitanio N., Capitanio G., Demarinis DA., De Nitto E., Massari S., Papa S. (1996) "Factors affecting the H⁺/e⁻ stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase : influence of the rate of electron flow and transmembrane delta pH". *Biochemistry*. 20, 35, 33, P 10800-10806.

Cindy S-Y. Lin, Ming-Jen Lee, Susanna B. Park C, Matthew C. Kiernan. (2011) "Purple pigments: The pathophysiology of acute porphyric neuropathy" *Clinical Neurophysiology* 122, P 2336–2344

Cekaite L., Peng Q., Reiner A., Shahzidi S., Tveito S., Furre IE., Hovig E. (2007) "Mapping of oxidative stress responses of human tumor cells following photodynamic therapy using hexaminolevulinat". *BMC Genomics*, 8, P 273.

Chabrol B., De Lonlay P. (2011). "Maladies Métaboliques Héréditaires" (livre), doing, Chapitre 9. P 133-134.

Correia M.A., and Lunetta, J.M., (1989). "Acute hepatic heme depletion: impaired gluconeogenesis in rats". *Semin. Hematol*, 26, P 120–127.

Crimlisk HL. (1997) "The little imitator-porphyria: a neuropsychiatric disorder." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 62, P 319-328.

Dailey TA., Woodruff JH., Dailey HA. (2005) "Examination of mitochondrial protein targeting of haem synthetic enzymes: In vivo identification of three functional haem-responsive motifs in 5-aminolaevulinic synthase". *Biochem. J.* 386, P 381–386.

Dayan F., Dayan E., (2013) "Les porphyrines : les couleurs de la vie" . *Pour la Science - n°* 423.

Delaby C., To-Figueras J., Deybach JC., Casamitjana R., Puy H., Herrero C. (2009) "Role of two nutritional hepatic markers (insulin-like growth factor 1 and transthyretin) in the clinical assessment and follow-up of acute intermittent porphyria patients". *J Intern Med*, 266, P 277-285.

De Marchi U., Santo-Domingo J., Castelbou C., Sekler I., Wiederkehr A., Demaurex N. (2014) "NCLX protein, but not LETM1, mediates mitochondrial Ca²⁺ extrusion, thereby limiting Ca²⁺-induced NAD(P)H production and modulating matrix redox state". *The journal of biological chemistry*. 18, 289 (29), P 20377-20385.

Dowdle E., Mustard P., Spong N., Eales L. (1968) "The metabolism of (5-14C)delta-aminolaevulinic acid in normal and porphyric human subjects." *Clin Sci*, 34, P 233-251.

Dowman J.K., Gunson B.K., Mirza D.F., Bramhall S.R., Badminton MN., Newsome P.N. 2012 "Liver transplantation for acute intermittent porphyria is complicated by a high rate of hepatic artery thrombosis" *Liver transplantation* 18,2, P195-200.

Douki T., Onuki J., Medeiros MH., Bechara EJ., Cadet J., Di Mascio P. (1998). "Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid". *FEBS Lett.* 428 (1-2), P 93-6.

Elder G., Harper P., Badminton M., Sandberg S., Deybach JC. (2012) "The incidence of inherited porphyrias in Europe" *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36, (5), P 849-8597.

- Felitsyn N., McLeod C., Shroads AL., Stacpoole PW., Notterpek L. (2008) "The heme precursor delta-aminolevulinate blocks peripheral myelin formation". *J Neurochem.* 106(5), P 2068-2079.
- Ferreira Fr., Silva CA., Costa SX. (2011) "Acute intermittent porphyria, an important and rare differential diagnosis of acute abdomen: case report and literature review" 23, 4, P 510-514.
- Floderus Y., Shoolingin-Jordan PM., Harper P. (2002) "Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new mutations found in the porphobilinogen deaminase gene". *Clinical Genetics*, 62, P 288–97.
- Garnier R., (2005) "Toxicité du plomb et de ses dérivés", EMC (Elsevier Masson SAS) Pathologie Professionnelle et de l'Environnement. P 67-88.
- Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer AK., Chin S., Wu PH., Meyer UA., Spiegelman BM. (2005) "Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha". *Cell*, 122, P 505-515.
- Hermann JM., Rimer J. (2010) "The intermembrane space of mitochondria" *Antioxid Rdox Signal*, 13 (9), P 1341-1358.
- Hermes-Lima M., Valle VG., Vercesi AE., Bechara EJ. (1991) "Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning". *Biochim Biophys Acta*, 1056(1), P 57-63.
- Hermes-Lima M., Castilho RF., Valle VG., Bechara EJ., Vercesi AE. (1992) "Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid". *Biochim Biophys Acta*, 1180(2), P 201-206.
- Herrick AL., Fisher BM., Moore MR., Cathcart S., McColl KE., Goldberg A. (1990) "Elevation of blood lactate and pyruvate levels in acute intermittent porphyria—a reflection of haem deficiency ?". *Clin Chim Acta.* 190(3), P 157-162.
- Hildenbeutel M., Hegg EL., Stephan K¹, Gruschke S., Meunier B., Ott M. 2014 "Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome b to regulate mitochondrial translation". *J.C. Biol*, 26,205.4. P 511-524.
- Hift RJ., Davidson BP., Van der Hooft C., Meissner DM., Meissner PN. (2004) "Plasma fluorescence scanning and fecal porphyrin analysis for the diagnosis of variegate porphyria : precise determination of sensitivity and specificity with detection of protoporphyrinogen oxidase mutations as a reference standard". *Clin Chem*, 50, P 915–923.
- Holley AK., Bakthavatchalu V., Velez-Roman JM., St Clair DK. (2011) "Manganese Superoxide Dismutase : Guardian of the Powerhouse" *International journal of molecular sciences.* 12(10), P 7114–7162.

- Hopper RK., Carroll S., Aponte AM., Johnson DT., French S., Shen RF., Witzmann FA., Harris RA., Balaban RS. (2006) "Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry*", 28, 45, 8 P 2524-2536.
- Huang ML., Lane DJ., Richardson DR. (2011) "Mitochondrial mayhem: the mitochondrion as a modulator of iron metabolism and its role in disease". *Antioxid Redox Signal*, 15, P 3003-3019.
- Hubert AJ., Else PL., Manolis SC., Brand MD. (2002) "Proton leak in hepatocytes and liver mitochondria from archosaurs (crocodiles) and allometric relationships for ectotherms" *172(5)*, P 387-397.
- Hunte C., Palsdottir H., Trumpower BL. (2003) "Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex". *FEBS Lett.* 545, P 39-46.
- Imlay JA., Chin SM., Linn S. (1988) "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro". *Science.* 240, P 640-642.
- Jornayvaz FR., Shulman GI. (2010) "Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry*" .47, P 69-84.
- Jover R., Hofmann F., Scheffer-Koh V., Lindberg RL. (2000) "Limited heme synthesis in porphobilinogen deaminase-deficient mice impairs transcriptional activation of specific cytochrome P450 genes by Phenobarbital" *Eur J Biochem*, 267, P 7128-7137.
- Kappas A., Sassa S., Galbraith RA., Nordmann, Y., (1995). "The porphyrias. In: Scriver, CR., Beaudet AL., Sly WS., Valle D., Stanbury JB., Wibgaarden JB., Fredrickson DS. (Eds.), *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*". New York, McGraw-Hill. P 2103–2159.
- Kaappinen R., von und zu Fraunberg M. (2002) "Molecular and biochemical studies of acute intermittent porphyria in 196 patients and their families". *Clin Chem*, 48, P 1891–1900.
- Kim HJ., Khalimonchuk O., Smith PM., Wing DR. (2014) "Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes" *Biochimica et Biophysica acta*, 1823 (9), P 1604-1616.
- Kim SC., Sprung R., Chen Y., Xu Y., Ball H., Pei J., Cheng T., Kho Y., Xiao H., Xiao L., Grishin NV., White M., Yang XJ., Zhao Y. (2006) "Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey". *Molecular Cell* 23(4), P 607-618.
- Lang E., Schafer M., Scwender H., Nuemann NJ., Franck J. (2015) "Occurrence of Malignant Tumours in the Acute Hepatic Porphyrias". *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports*. Epub ahead of print.
- Lin C.S-Y., L Ming-Jen., Park S.B, Kiernan M.C. (2011) "Purple pigments: The pathophysiology of acute porphyric neuropathy" *Clinical Neurophysiology*, 122, P 2336-2344.

Lindberg RL., Porcher C., Grandchamp B., Ledermann B., Bürki K., Brandner S., Aguzzi A., Meyer UA. (1996) “Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria”. *Nature Genetics*, 12 (2), P 195-199.

Lindberg RL., Martini R., Baumgartner M., (1999) “Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria”. *J Clin Invest* 103 (8), P 1127–1134.

Liu CM., Wang RY., Saijilafu ZX., Zhang BY., Zhou FQ. (2013) “MicroRNA-138 and SIRT1 form a mutual negative feedback loop to regulate mammalian axon regeneration” *Genes and development*, 1, (27), P 1473-1483.

Lyouni S., Abitbol M., Rainteau D., Karim Z., Bernex F., Oustric V., Millot S., Lettéron P., Heming N., Guillmot L., Montagutelli X., Berdeaux G., Gouya L., Poupon R., Deybach JC., Beaumont C., Puy H. (2011) “Protoporphyrin retention in hepatocytes and Kupffer cells prevents sclerosing cholangitis in erythropoietic protoporphyria mouse model”. *Gastroenterology*.141 (4) P 1509-19.

Maldonado EN., Lemasters JJ., (2012) “Warburg Revisited: Regulation of Mitochondrial Metabolism by Voltage-Dependent Anion Channels in Cancer Cells” *Perspectives in Pharmacology*, 342, P 637–641.

Medeiros MHJ., Marchiori PE., Bechara EJH., (1982) “Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in the erythrocytes of patients with intermittent acute porphyria” *Clinical Chemistry*, 28 (1), P 242-243.

Meyer UA., Schuurmans MM., Lindberg RL. (1998) “Acute porphyries : pathogenesis of neurological manifestations”. *Semin Liver Dis*, 18, P 43-52.

Milon M., Wong L.J. (2013) “Diagnosis of mitochondrial myopathies” *Molecular Genetics and Metabolism*, 110, P 35-41.

Monteiro HP., Abdalla DS., Augusto O., Bechara EJH. (1989) “Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: Induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies”. *Arch.Biochem.Biophys.* 271, P 206-216.

Moore MR. (1990) “A century of porphyria. The pathogenesis of acute porphyria”. *Mol Aspects Med.* 11, P 49-57.

Murphy MP. (2009) “How mitochondria produce reactive oxygen species.” *Biochen J* 1, 417, 1, P 1-13.

Murphy MP. (1989). “Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation”. *Biochim Biophys Acta* 977 (2), P 123-141.

Mustajoki P., Nordmann Y. (1993) “Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks”. *Arch Intern Med*, 153, P 2004–2008.

- Namba H., Narahara K., Tsuji K., Yokoyama Y., Seino Y. (1991) "Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24.1–q24.2 by in situ hybridization and gene dosage studies, Cytogenet". *Cell Genet.* 57, P 105–108.
- Napiwotzki J., Kadenbach B. (1998) "Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV". *Biological Chemistry*, 379 (3), P 335-339.
- Navarro S., Del Hoyo P., Campos Y., Abitbol M., Morán-Jiménez MJ., García-Bravo M., Ochoa P., Grau M., Montagutelli X., Frank J., Garesse R., Arenas J., de Salamanca RE., Fontanellas A. (2005) "Increased mitochondrial respiratory chain enzyme activities correlate with minor extent of liver damage in mice suffering from erythropoietic protoporphyria". *Exp Dermatol.* 14,1, P 26-33.
- Neil G.S., Herkes G.K. (2011) "The neurologic manifestations of the acute porphyrias" *Journal Of Clinical Neuroscience*, 18, P 1147-1153.
- Nelson DL., Cox M.M. (2000) "Lehninger Principles of Biochemistry" 3d edition, P 567-597, P 662-663.
- Nordmann Y. (1994) "Porphyries et porphyrinuries" - Editions techniques - *Encycl. Med. Chir. (Paris- France), Endocrinologie - nutrition*, 10-360-E-10, P 14.
- Ogura S., Maruyama K., Hagiya Y., Sugiyama Y., Tsuchiya K., Takahashi K., Abe F., Tabata K., Okura I., Nakajima M., Tanaka T. (2011) "The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver". *BMC Res Notes*, 4:66.
- Oliveri LM., Davio C., Batlle AM., Gerez EN. (2012) "ALAS1 gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1 by vanadate in diabetic mice" *Biochem J*, 442, P 303-310.
- Onuki J., Teixeira PC., Medeiros MH., Dörnemann D., Douki T., Cadet J., Di Mascio P. (2002) "Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria?" *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. Feb 48 (1), P 17-26.
- Onuki J., Chen Y., Teixeira PC., Schumacher RI., Medeiros MH., Van Houten B., Di Mascio P. (2004) "Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid". *Arch Biochem Biophys*, 432, P 178-87.
- Pagliarini DJ, Dixon JE. (2006) "Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage?" *trends Biochem Sci*, 31, 1, P 26-34.
- Papa S., Petruzzella V., Scacco S., Vergari R., Panelli D., Tamborra R., Corsi P., Picciariello M., Lambo R., Bertini E., Santorelli FM. (2004) "Respiratory complex I in brain development and genetic disease. *Neurochemical research*", 29 (3), P 547-560.
- Park EY., Kim YS., Lim KJ., Lee HK., Lee S K., Choi H., Kang MH. 2014 "Severe neurologic manifestations in acute intermittent porphyria developed after spine surgery under general anesthesia a case report" *Korean Journal of Anesthesiology*. 67, 3, P 217-220.

- Pereira B., Curi R., Kokubun E., Bechara EJ. (1992) "5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats". *J Appl Physiol*, 72, P 226-30.
- Phillips JD., Kushner JP., Bergonia HA., Franklin MR. (2011) "Uroporphyrin in the *Cyp1a2*^{-/-} mouse". *Blood Cells Mol Dis*. 47 (4), P 249-254.
- Pischik E., Kauppinen R. (2009) "Neurological manifestations of acute intermittent porphyria". *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 55, P72-83.
- Podvinec M., Handschin C., Looser R., Meyer UA. (2004) "Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinic acid synthase". *Proceeding of the national academy of sciences of the united states of America*, 101, P 9127-9132.
- Ponka, P. (1997) "Tissue-Specific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells". *Blood*, 89, P 1-25.
- Puigserver P. (2005) "Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- α ." *Int J Obes (Lond)*, 29, (Suppl 1), P 5-9.
- Puy H., Deybach JC., Lamoril J. et al (1997) "Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria". *Am J Hum Genet*, 60, p 1373–1383.
- Puy H., Gouya, L., Deybach JC. (2010) "Porphyrias". *Lancet* 375, P 924–937.
- Roberts AG., Redding SJ., Llewellyn DH., (2005) "An alternatively-spliced exon in the 5'-UTR of human ALAS1 mRNA inhibits translation and renders it resistant to haem-mediated decay". *FEBS Lett.* (2005), 579, P 1061–1066.
- Rocha ME., Dutra F., Bandy B., Baldini RL., Gomes SL., Faljoni-Alário A., Liria CW., Miranda MT., Bechara EJ. (2003) "Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid". *Arch Biochem Biophys*. 409, (2), P 349-56.
- Rötig A., Sidi D., Munnich A., Rustin P. (2002) "Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies". *Trends Mol Med*, 8, P 221-224.
- Russell T. Hepple. 2014 "Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle" *Aging Neuroscience*, 6, P 1-13.
- Schaer D.J., Buehler P.W., Alayash A.I., Belcher J.D., Vercellotti G.M. (2013) "Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins" *Blood*, 121,8, P 1276-1284.
- Schatz G. (1995) "Mitochondria : Beyond oxidative phosphorylation" *Biochemistry Biophys Acta*, 1271, (1), P 123-126.
- Scassa ME., Guberman AS., Ceruti JM., Cánepa ET. (2004) "Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5-aminolevulinic acid synthase gene expression and are involved in insulin repression". *The journal of Biological Chemistry*, 279, P 28082-28092.

Schneider YX., Hergersberg M., Goldgar DE, et al. (2002) “Ancestral founder of mutation W283X in the porphobilinogen deaminase gene among acute intermittent porphyria patients”. *Humann Heredity* ; 54, (2), P 69–81.

Sharma LK, Lu J., and Bai Y. (2009) “Mitochondrial respiratory complex I : structure, function and implication in human diseases”, *Current Medicinal Chemistry* 16, (10), P 1266-1277.

Sharp LJ., Haller RG. (2014) “Metabolic and mitochondrial myopathies”. *Neurologic Clinics*, 32, 3, P 777- 799.

Siegesmund M., van Tuyll van Serooskerken AM., Poblete-Gutiérrez P., Frank J. (2010) “The acute hepatic porphyrias : current status and future challenges”. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24, P 593-605.

Silva AC., Almeida S., Laço M., Duarte AL., Domigues J., Oliveira CR., Juanario C., Rego AC. “Mitochondrial respiratory chain complex activity and bioenergetic alterations in human platelets derived from pre-symptomatic and symptomatic Huntington's disease carriers”(2013), *Mitochondrion*, 13, (6) , P 801-809.

Snidreman KL., Trahms L., Scott CR. (2014) “Tyrosinemia Type I”. *GeneReviews*.

Solis C., Martinez-Bermejo A., Naidich TP., Kaufmann WE., Astrin KH., Bishop DF., Desnick RJ. (2004) “Acute intermittent porphyria : studies of the severe homozygous dominant disease provides insights into the neurologic attacks in acute porphyries”. *Arch Neurol*, 61, P 1764-70.

Soonawalla ZF., Orug T., Badminton MN., Elder GH., Rhodes JM., Bramhall SR. (2004) “Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria”. *Lancet*, 363, P 705-706.

Spriet LL., Heigenhauser GJ. (2002) “Regulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in human skeletal muscle during exercise”. *Exercise and sport sciences reviews*, 30, 2, P 91-95.

Stein LR., Imai S. (2012) “The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in Endocrinology and Metabolism*”, 23, (9), P 420-428.

Strumilo S. (2005) “Short-term regulation of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by energy-linked and some other effectors” *Biochemistry (Mosc)*, 70, (7), P 726-9.

Tchernitchko D., Robréau AM., Lefebvre T., Lamoril J., Deybach JC., Puy H. (2012) “Comprehensive cytochrome P450 CYP1A2 gene analysis in French caucasian patients with familial and sporadic porphyria cutanea tarda”. *Br J Dermatol*. 166, (2), P 425-9.

Thadani H., Deacon A., Peters T. (2000) “Diagnosis and management of porphyria”. *BMJ* 2000, 320, P 1647-51.

Tian Q., Li T., Hou W., Zheng J., Schrum LW., Bonkovsky HL. "Lon peptidase 1 (LONP1)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase protein by heme in human liver cells". *J. Biol. Chem.* (2011), 286, P 26424-26430.

Tracy JA., Dyck PJ. (2014) "Porphyria and its neurologic manifestations" *Handbook of Clinical Neurology*, chapter 56, 120, P 839-849.

Travaglini-Allocatelli. C. (2013) "Protein Machineries Involved in the Attachment of Heme to Cytochrome c: Protein Structures and Molecular Mechanisms" *Scientifica (cairo)* P 505-714

Tretter, L., Adam-Vizi V. (2004) "Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase". *J. Neurosci.* 24, P 7771-8.

Turkan A., Hiromasa Y., Roche TE. (2004) "Formation of a complex of the catalytic subunit of pyruvate dehydrogenase phosphatase isoform 1 (PDP1c) and the L2 domain forms a Ca²⁺ binding site and captures PDP1c as a monomer". *Biochemistry.* 30, 43, (47), P 15073-15085.

Turnes JF. (2003) "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *The journal of physiology*, 15, 552, 2, P 335-344.

Unzu C., Sampedro A., Mauleón I., Alegre M., Beattie SG., de Salamanca RE., (2011) "Sustained enzymatic correction by rAAV-mediated liver gene therapy protects against induced motor neuropathy in acute porphyria mice". *Mol Ther*, 19, P 243-50.

Utz N., Kinkel B., Hedde JP., Bewermeyer H. MR. (2001) "imaging of acute intermittent porphyria mimicking reversible posterior leukoencephalopathy syndrome." *Neuroradiology*, 43, P1059-1062.

Ventura P., Cappellini M.D., Biolcati G., Guida C.C., Rocchi E., Porfiria G.I. (2014) "challenging diagnosis for potential fatal diseases: Recommendations for diagnosing acute porphyrias" *European Journal Of Internal Medecine*, 25, P 497-505.

Vercesi AE., Castilho RF., Meinicke AR., Valle VG., Hermes-Lima M., Bechara EJ. (1994) "Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca²⁺ and membrane protein thiols". *Biophys Acta*; , 1188, 1-2, P 86-92.

Walther DM, Papic D., Bos MP., Thommassen J., Rapaport D. 2009 "Signals in bacterial beta-barrel proteins are functional in eukaryotic cells for targeting to and assembly in mitochondria" *Processing of national academy of sciences of united sates of America.* 24, 106 (8), P 2531-2536.

Waxman DJ., Azaroff L. (1992) "Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression". *Biochem J*, 281, P 577-92.

Whatley SD., Ducamp S., Gouya L., Grandchamp B., Beaumont C., Badminton MN., Elder GH., Holme SA., Anstey AV., Parker M., Corrigall AV., Meissner PN., Hift RJ., Marsden JT., Ma Y., Mieli-Vergani G., Deybach JC., Puy H. (2008) "C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload". *Am J Hum Genet.* 83, (3), P 408-414.

Wu CL., Ro LS., Jung SM., Tsai TC., Chu CC., Lyu RK., Huang CC., Kuo HC. (2015) "Clinical presentation and electrophysiological findings of porphyric neuropathies: a follow-up study". *Muscle and Nerve*, 51, P 363-369.

Yamada M., Kondo M., Tanaka M., Okeda R., Hatakeyama S., Fukui T., Tsukagoshi H. (1984) "An autopsy case of acute porphyria with a decrease of both uroporphyrinogen I synthetase and ferrochelatase activities". *Acta Neuropathol*, 64, P 6-11.

Yankovskaya V., Horsefield R., Törnroth S., Luna-Chavez C., Miyoshi H., Léger C., Byrne B., Cecchini G., Iwata S. (2003) "Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation". *Science*. 299, P 700-704.

Yasuda M., Gan L., Chen B., Kadirvel S Yu C., Phillips JD., New MI., Liebow A., Fitzgerald K, Querbes W., Desnick RJ. (2014) "RNAi-mediated silencing of hepatic Alas1 effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice". *Proc Natl Acad Sci USA*. 27, 111, 21, P 7777-7782.

Zheng J., Shan, Y., Lambrecht RW., Donohue SE., Bonkovsky HL. "Differential regulation of human ALAS1 mRNA and protein levels by heme and cobalt protoporphyrin". (2008). *Molecular and cellular Biochemistry*. 319, P 153-161.

Zhuang J., Reddi AR., Wang Z., Khodaverdian B., Hegg EL., Gibney BR. (2006) "Evaluating the roles of the heme a side chains in cytochrome c oxidase using designed heme proteins". *Biochemistry*. 45, P 12530-12538.

La fonction mitochondriale dans un modèle murin de Porphyrie Aiguë Intermittente (PAI)

HOMEDAN CHADI

Mitochondrial energetic function in a mice model of Acute Intermittent Porphyria (AIP)

Les déficits héréditaires de la synthèse de l'hème sont à l'origine de pathologies métaboliques appelées porphyries. La plus sévère est une porphyrie hépatique, la porphyrie aiguë intermittente (PAI). Des liens métaboliques étroits existent entre la synthèse de l'hème et la mitochondrie. L'objectif de ce travail était d'étudier l'impact de la crise aiguë de PAI sur le fonctionnement énergétique mitochondrial. Nous avons montré, dans un modèle murin déficitaire en hydroxymethylbilane synthase (HMBS) mimant biologiquement la crise de PAI, un dysfonctionnement énergétique mitochondrial. L'activité des complexes de la chaîne respiratoire, la respiration mitochondriale et l'activité des enzymes du cycle de Krebs se sont en effet révélées altérées dans ce modèle, tant à l'état basal qu'après induction par le phénobarbital, et ceci dans le foie, le muscle squelettique et le cerveau. Afin d'évaluer les effets d'un excès de précurseurs métaboliques de l'hème, nous analysons, dans un modèle cellulaire, l'effet de l'administration d'acide delta-aminolévulinique (ALA). Cela provoque une altération, dose dépendante, de la fonction énergétique mitochondriale et une surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nos résultats suggèrent un impact profond de la crise de PAI sur la fonction mitochondriale in vivo et in vitro, ce qui pourrait expliquer certaines anomalies métaboliques et cliniques de la maladie.

Hereditary porphyrias are a group of metabolic disorders of the haem biosynthesis pathway, the most severe and important porphyria is the Acute Intermittent Porphyria (AIP). Several metabolic links exist between haem biosynthesis and mitochondria, which is an organelle specialized in energy production. The aim of this work was to examine the impact of the acute attack of AIP on the mitochondrial energetic function. We have shown in a mice model of AIP, with deficiency in the hydroxymethylbilane synthase (HMBS), a mitochondrial metabolic dysfunction, an important alteration in the mitochondrial respiratory complexes activity, and those of Krebs cycle. This deficiency concerned the mice at basal state and after induction by phenobarbital in different tissues (liver, skeletal muscle and brain). In vitro, the administration of delta-aminolevulinic acid, precursor of haem accumulating in AIP caused a dose-dependent impairment of mitochondrial function with an overproduction of reactive oxygen species (ROS). Our results suggest that acute attack of AIP alters the mitochondrial function in vivo and in vitro. This new data allows better understanding of the pathophysiology and the clinical expression of this disease.

MOTS-CLÉS (en français) :

- | | |
|----------------------|----------------------------------|
| 1 Synthèse de l'hème | 4 métabolisme énergétique |
| 2 porphyrie | 5 acide delta-aminolévulinique |
| 3 mitochondrie | 6 espèces réactives de l'oxygène |