

## Le complexe pyruvate déshydrogénase : de l'organisation moléculaire à la pathologie

Françoise Fouque  
Cécile Marsac  
Chantal Benelli

Le déficit en pyruvate déshydrogénase (PDH), décrit pour la première fois en 1970, est une maladie héréditaire du métabolisme intermédiaire affectant principalement le système nerveux. Plus d'une centaine d'observations en ont déjà été rapportées, mettant en évidence l'extrême hétérogénéité clinique et moléculaire de ce déficit. Cette hétérogénéité est liée à deux caractéristiques de la PDH : (1) sa structure caractérisée par l'assemblage de six sous-unités dont l'une est codée par un gène situé sur le chromosome X ; (2) son rôle dans le métabolisme du glucose et sa régulation, en particulier au niveau cérébral. La découverte d'un grand nombre de mutations différentes a conduit à mieux comprendre les mécanismes moléculaires complexes responsables de la diversité des tableaux cliniques observés dans les déficits en PDH.

**L**e complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) est l'un des systèmes enzymatiques majeurs impliqués dans le contrôle du métabolisme oxydatif des substrats énergétiques. Localisé dans la membrane interne mitochondriale, il catalyse la décarboxylation oxydative irréversible du pyruvate en acétyl coenzyme A, selon la réaction globale :

Pyruvate + co-enzyme A (CoA) + NAD<sup>+</sup> → Acétyl-CoA + NADH + CO<sub>2</sub>  
Son rôle dans le métabolisme énergétique est fondamental puisqu'il permet, dans le foie, le muscle ou le cerveau, la transformation du glucose en acétyl-CoA, substrat du cycle de Krebs. En effet, lorsque l'apport d'oxygène est suffisant, l'oxydation

mitochondriale des substrats énergétiques (pyruvate, acides gras et corps cétoniques) fournit à la cellule la majeure partie de l'ATP, grâce au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire. Le pyruvate provient de divers composés tricarbonés tels que le lactate, issu de la glycolyse, l'alanine et d'autres acides aminés. Il pénètre dans la mitochondrie grâce à un système de transport spécifique unidirectionnel pour y être, soit carboxylé en oxaloacétate, soit décarboxylé en acétyl-CoA. Ces deux composés se condensent pour former du citrate, composé à six carbones, substrat du cycle de Krebs et point de départ du métabolisme oxydatif producteur d'ATP. Selon l'état nutritionnel et les besoins cellulaires, l'une des deux

### ADRESSES

F. Fouque : *ingénieur d'étude au Cnrs*. C. Benelli : *chargée de recherche à l'Inserm*. Inserm U.30, Mécanisme d'action cellulaire des hormones, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France. C. Marsac : *maître de conférences des universités, praticien hospitalier*. Laboratoire de biochimie médicale B, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

voies métaboliques est activée préférentiellement. A jeun, le pyruvate est carboxylé en oxaloacétate par l'intermédiaire de la pyruvate carboxylase (PC); c'est la première étape de la néoglucogenèse qui permet de maintenir une glycémie stable. A l'état nourri, le pyruvate est décarboxylé en acétyl-CoA par la PDH.

Dans le foie ou dans d'autres tissus tels que la glande mammaire ou les adipocytes, la PDH participe également aux étapes initiales de la synthèse d'acides gras et de stéroïdes, fonction anabolique essentielle à la croissance et à la maturation cérébrale. Il existe deux autres  $\alpha$ -cétoacides décarboxylases (ou déshydrogénases) mitochondriales qui présentent, sur le plan structural et fonctionnel, de grandes similitudes avec le complexe PDH: les décarboxylases des acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine et valine) et l' $\alpha$ -cétoglutarate décarboxylase. Celles-ci jouent, comme la PDH, un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique cellulaire (figure 1).

Le complexe PDH est une macromolécule de 7 à 8,5  $10^3$  kDa, située dans la membrane interne mitochondriale et composée de six unités: quatre composants catalytiques (E1, E2, E3 et la protéine X) et deux enzymes régulatrices, la PDH kinase et la PDH phosphatase qui contrôlent, par phosphorylation/déphosphorylation, l'activité du composant E1, ce dernier étant le facteur limitant de l'activité du complexe. Le complexe s'organise autour d'une structure centrale formée de soixante monomères de E2 à laquelle sont associés 30 tétramères de E1, six dimères de E3 et six copies de la protéine X [1] (figure 2).

Les sous-unités E1 et E2 sont spécifiques de la PDH et sont codées par des gènes différents alors que la sous-unité E3, qui est commune aux  $\alpha$ -cétoacides déshydrogénases, est codée par le même gène pour les trois complexes [1]. La sous-unité E1 ou pyruvate déshydrogénase est un tétramère composé de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  existe sous la forme de deux isomères codés par deux gènes différents. L'un des isomères (41 kDa) est exprimé dans tous les tissus somatiques et est codé par un gène situé sur le chromosome X qui

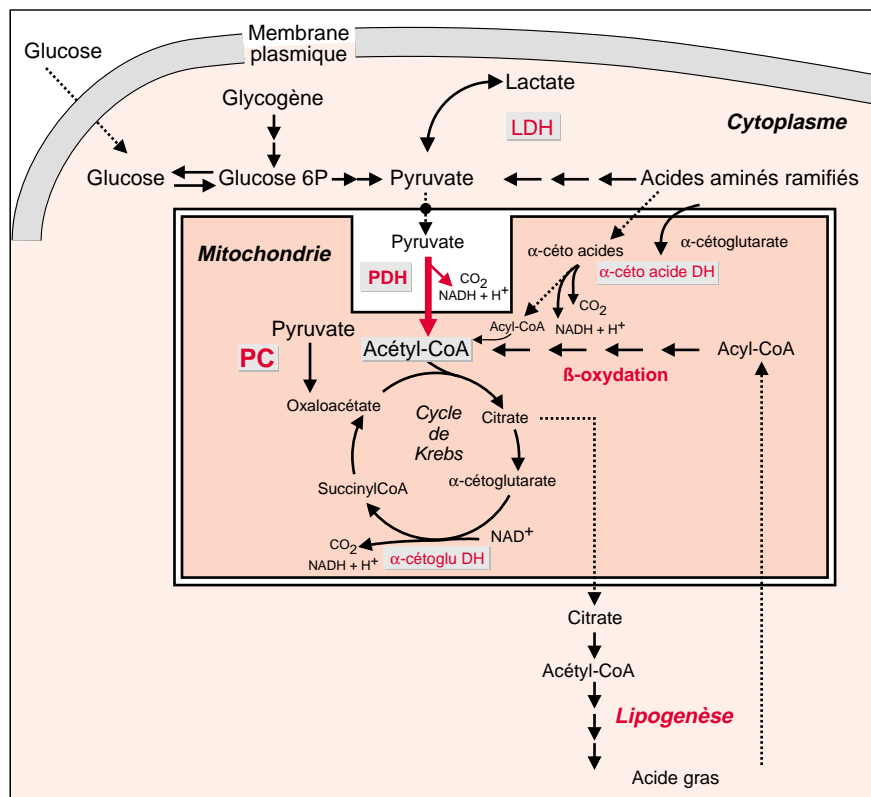


Figure 1. Localisation des  $\alpha$ -cétoacides déshydrogénases dans le métabolisme énergétique. PDH: pyruvate déshydrogénase;  $\alpha$ -cétoacide DH:  $\alpha$ -cétoacide déshydrogénase des acides aminés ramifiés;  $\alpha$ -cétoglu DH:  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase; LDH: lactate déshydrogénase; PC: pyruvate carboxylase.

a été cloné et séquencé. Ce gène mesure 17kb et contient 11 exons. L'autre isomère n'est exprimé que dans le testicule et est codé par un gène situé sur le chromosome 4. La sous-unité  $\beta$  (36 kDa) est codée par un gène situé sur le chromosome 3. Le cofacteur de E1 est la thiamine pyrophosphate (TPP). La sous-unité E2 ou dihydrolipoyltransacétylase est un monomère de 74 kDa qui a comme cofacteur l'acide lipoïque sous sa forme réduite. Son gène a été cloné, séquencé et localisé sur le chromosome 11. La sous-unité E3 ou dihydrolipoyldéshydrogénase est un homodimère de 55 kDa qui fixe le FAD (flavine adénine dinucléotide). Ce complexe a été cloné, séquencé et localisé sur le chromosome 7 [2]. Enfin, la protéine X (51 kDa) porte un groupe lipoyl qui s'acétyle en présence de pyruvate; bien que son rôle soit encore mal connu, elle pourrait intervenir dans le maintien de la cohésion du complexe en se liant aux sous-unités E2 et/ou E3. La par-

tie codante de son gène a été récemment clonée et le gène localisé sur le chromosome 11 [3].

### La régulation du complexe PDH

La régulation de l'activité du complexe s'effectue exclusivement sur la sous-unité E1; elle implique soit une modification covalente du complexe par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation, catalysé par la PDH phosphatase et la PDH kinase, soit une inhibition par les produits finaux de la réaction [4, 5]. Dans tous les tissus, la PDH existe sous deux formes, une forme active, dite basale, ou PDHa qui reflète son degré de déphosphorylation et une forme totalement déphosphorylée, dite totale.

La PDH kinase catalyse la phosphorylation de trois résidus sérine sur le composant E1 $\alpha$  et inactive ainsi le complexe. Elle est présente en faible quantité et est étroitement liée au

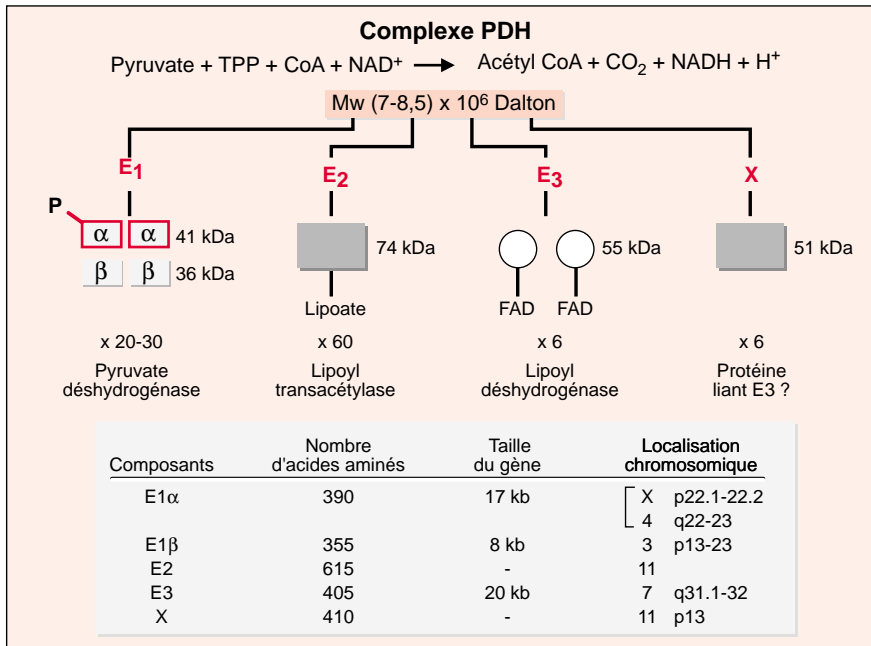


Figure 2. **Description et localisation chromosomique des sous-unités du complexe pyruvate déshydrogénase.** Le complexe PDH est une macromolécule de 7-8,5 × 10<sup>6</sup> Dalton, composée de 4 unités catalytiques (E1, E2, E3 et protéine X). Le complexe s'organise autour d'une structure centrale formée de 60 monomères de E2 à laquelle sont associés 20-30 tétramères de E1, 6 dimères de E3 et 6 monomères de protéine X. Sont également indiqués la localisation chromosomique, la taille des gènes et le nombre d'acides aminés des protéines constituant le complexe PDH.

complexe. Deux isoformes de cette enzyme ont eu récemment leurs ADNc clonées [6]; elles présentent une grande similitude avec les sérine/thréonine kinases en termes de sites de phosphorylation. La PDH phosphatase catalyse la déphosphorylation de E1α en présence de Ca<sup>2+</sup> et de Mg<sup>2+</sup>, ce qui active le complexe. Elle s'apparente à la phosphatase de type 2C par similitude de spécificité de substrat; deux ADNc ont été à ce jour isolés qui codent pour deux isoformes de phosphatase dont les caractéristiques fonctionnelles sont différentes [7]. Les principales molécules exerçant un effet activateur ou inhibiteur sur le système kinase/phosphatase sont présentées sur la figure 3. La régulation *feed-back* négative exercée par les produits finaux de la réaction (acétyl CoA et NADH) permet d'épargner le glucose dans les tissus qui disposent d'autres substrats (acides gras et corps cétoniques) capables de produire du NADH et de l'acétyl CoA. Ce mécanisme est particulièrement efficace

dans les muscles striés, et en particulier dans le cœur.

Compte tenu de sa place dans l'équilibre énergétique et biosynthétique de la cellule, la PDH doit s'adapter au besoin spécifique de chaque tissu. Certains tissus ont une activité basale extrêmement basse qui augmente de manière intermittente selon leurs propriétés physiologiques. Dans le foie, la PDH est inactivée à jeun pour favoriser la néoglucogenèse; dans les adipocytes, elle est fortement activée en période postprandiale pour fournir de l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse d'acides gras; dans le myocarde, la PDH est rapidement activable en cas de travail cardiaque accru. En revanche, d'autres tissus, comme le cerveau, ont une activité basale très élevée, à la limite des capacités maximales de l'enzyme. Le cerveau peut utiliser des corps cétoniques en remplacement du glucose, alors que la médulla rénale, la rétine et les érythrocytes sont totalement dépendants du glucose.

Les régulations à court et à long terme du complexe dépendent de facteurs nutritionnels, métaboliques et hormonaux [1-2, 4-5, 8-10]. Le jeûne, la consommation d'un régime riche en lipides, l'obésité et le diabète insulino-dépendant inactivent la

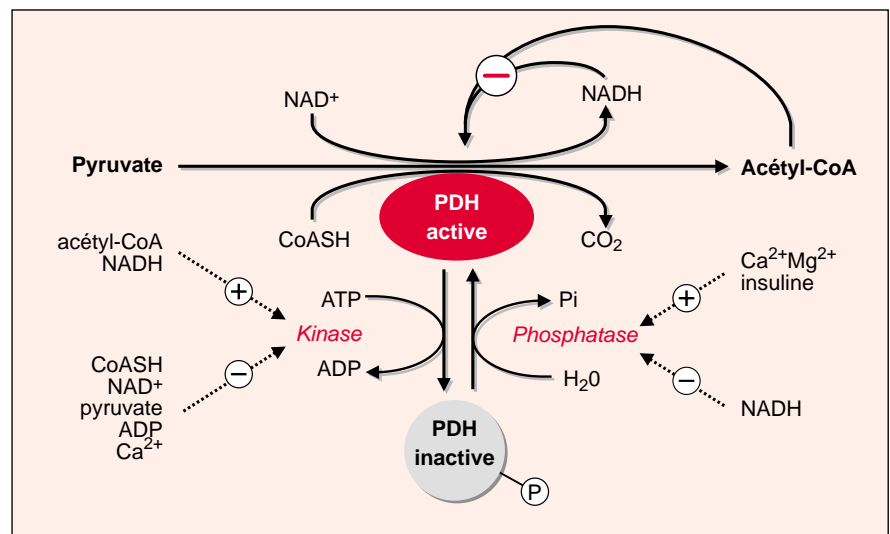


Figure 3. **Mécanismes de régulation du complexe PDH.** La régulation de l'activité du complexe PDH s'effectue par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation, catalysé par la PDH phosphatase qui active le complexe et par la PDH kinase qui l'inactive. Les produits finaux de la réaction (Acétyl-CoA et NADH) régulent le complexe par rétroaction négative. Sont représentés également les effecteurs qui régulent positivement ou négativement la phosphatase et la kinase.

PDH dans différents tissus. L'insuline active la PDH dans le foie, le cœur et le tissu adipeux. Les mécanismes impliqués dans ces régulations sont complexes; il semble, tout au moins dans le tissu adipeux, que les effets aigus de l'insuline s'exercent par une activation indirecte de la PDH phosphatase, *via* la modification de l'un de ses effecteurs [8-10]. L'implication d'un médiateur de petit poids moléculaire dans ces effets a été également proposée par différents auteurs mais reste encore aujourd'hui très controversée [9]. Dans le foie et le cœur, l'insuline stimule indirectement la PDH en diminuant la concentration plasmatique des acides gras libres [8-10].

Cependant, dans de nombreuses situations telles que le jeûne prolongé, le régime pauvre en hydrates de carbone et riche en graisses, le diabète insulino-dépendant, l'état d'activation de la PDH est en corrélation directe avec une augmentation stable de l'activité de la PDH kinase [11]; cette variation serait liée, soit à une augmentation de l'oxydation des acides gras, soit à une augmentation de la concentration d'AMPc, soit à une diminution de la concentration plasmatique d'insuline. Des études récentes ont permis de montrer une expression différentielle des isoformes de PDH kinase dans le foie et le cœur de rat [12], dont certaines peuvent être contrôlées au niveau prétranscriptionnel [13] et ainsi rendre compte de la régulation à long terme de l'activité PDH sous sa forme active.

Bien que généralement peu affectée dans les divers états physiopathologiques, l'activité totale de la PDH peut être modulée dans certaines conditions qui incluent, chez l'animal, les régimes riches en hydrates de carbone ou en graisses, la transition allaitement-sevrage et la période du développement [14-17]. Dans ces situations, il existe une régulation coordonnée des composants protéiques qui constituent la PDH, au niveau transcriptionnel et/ou au niveau post-transcriptionnel qui pourrait résulter d'une modulation des concentrations de glucose et/ou d'insuline. Chez l'homme, la quantité totale de la PDH peut être également déficitaire et rendre compte d'une maladie héréditaire qui touche

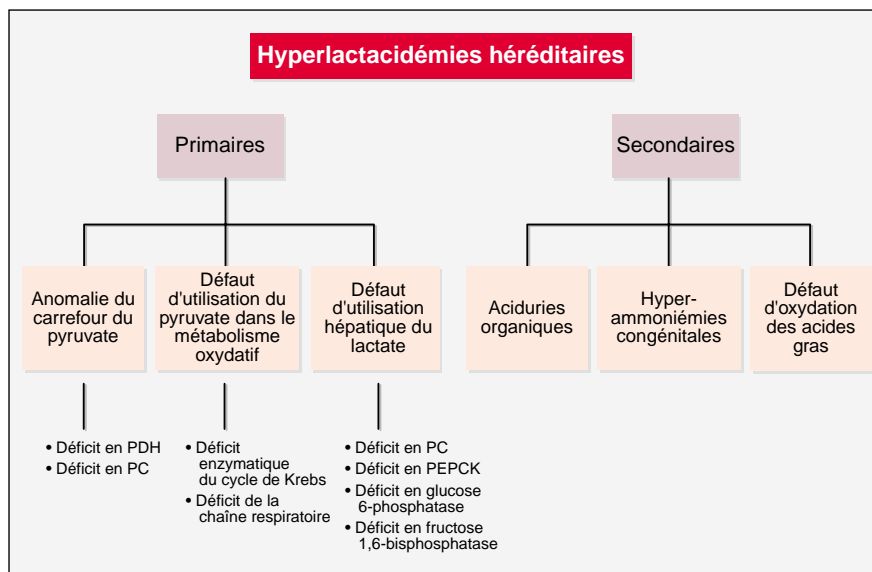


Figure 4. Place du déficit en PDH dans les hyperlactacidémies héréditaires chez l'enfant. PDH: pyruvate déshydrogénase; PC: pyruvate carboxylase; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase.

principalement le système nerveux et dont la première observation remonte à près de 25 ans [18].

### La physiopathologie des déficits en PDH

Les déficits en PDH sont extrêmement hétérogènes dans leurs manifestations cliniques et doivent être différenciés des déficits des enzymes de la chaîne respiratoire, des déficits en pyruvate carboxylase ou des enzymes du cycle de Krebs et des anomalies de la néoglucogenèse, qui tous sont à l'origine d'hyperlactacidémies héréditaires chez l'enfant [19, 20] (figure 4). Parmi les hyperlactacidémies héréditaires, on distingue les primaires, dans lesquelles l'hyperlactacidémie est un signe majeur (anomalie du carrefour du pyruvate, défaut d'utilisation du pyruvate par le métabolisme oxydatif ou défaut d'utilisation hépatique du lactate par déficit de la néoglucogenèse), et les secondaires dans lesquelles l'hyperlactacidémie est associée à d'autres anomalies (métabolisme des acides aminés, des acides gras, du cycle de l'urée). Le déficit en PDH représente la première cause d'acidose lactique congénitale primitive.

En cas de déficit, même partiel, de l'activité PDH, la glycolyse reste la seule voie métabolique utilisable pour fournir de l'énergie à partir du

glucose; le rendement de cette réaction est faible puisqu'elle produit à peine un dixième de l'ATP fourni normalement par l'oxydation du pyruvate. Du fait du blocage du métabolisme du pyruvate, les acides gras libres et les corps cétoniques sont les seuls substrats disponibles pour fournir de l'acétyl-CoA au cycle de Krebs. Les sources d'ATP sont donc extrêmement réduites, surtout au niveau cérébral où l'oxydation du glucose fournit normalement la quasi-totalité de l'énergie cellulaire. Sachant que le flux de pyruvate oxydé dans les conditions normales par la PDH cérébrale est très proche des capacités enzymatiques maximales, on comprend que le cerveau est l'organe le plus sensible à ce déficit enzymatique. Les anomalies structurales apparaissent très tôt au cours de la vie intra-utérine, en particulier dans les noyaux gris centraux, zone du cerveau dans laquelle l'activité PDH est la plus forte.

Le déficit enzymatique en PDH entraîne, en amont, une accumulation de pyruvate, et par conséquent d'alanine et de lactate, avec un rapport lactate/pyruvate normal dans le sang. L'hyperpyruvicémie et l'hyperlactacidémie sont accrues en période postprandiale et diminuées lors du jeûne. Quand ce profil métabolique est observé – dans le contexte d'un tableau clinique évocateur d'un défi-



cit en PDH – le dosage de son activité ne fait que confirmer le diagnostic. Au contraire, si le bilan métabolique sanguin de base est proche de la normale, des épreuves de charge en hydrates de carbone sont nécessaires pour révéler une hyperpyruvicémie et une hyperlactacidémie latentes. La mesure du lactate dans le liquide céphalo-rachidien peut être aussi très informative. La prise en charge nutritionnelle d'un déficit en PDH repose sur deux principes; «en amont du déficit», il s'agit d'éviter l'acidose lactique en réduisant l'apport de sucres et «en aval du déficit», de fournir à la cellule des substrats de substitution, en particulier des acides gras pour le métabolisme oxydatif. L'application de ces deux principes est à la base du «régime céto-gène», défini comme un régime délibérément déséquilibré (60 % de lipides, 25 % de glucides et 15 % de protides) pour favoriser la synthèse de corps cétoniques. Il est cependant encore difficile d'évaluer l'efficacité de ce type de régime, bien que son intérêt physiopathologique reste indiscutable. Dans certains cas, le traitement par la thiamine, co-facteur indispensable à l'activité de E1, peut avoir un effet bénéfique pour le malade. En revanche, l'efficacité du traitement par le 2-chloropropionate, activateur de la PDH, reste controversée.

Le diagnostic des déficits en PDH repose le plus fréquemment sur la mesure de l'activité PDH en suivant la formation de  $^{14}\text{CO}_2$  radioactif à partir de  $1\text{-}^{14}\text{C}$  pyruvate en présence de thiamine pyrophosphate, de Coenzyme A et de  $\text{NAD}^+$ . La mesure de l'activité totale de l'enzyme implique l'activation préalable de la PDH phosphatase par de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$ . La grande instabilité de l'enzyme sur tissu congelé, la variation de son activité et de son degré d'activation d'un tissu à l'autre et sur cellules en culture ainsi que la décarboxylation spontanée du pyruvate font que ce dosage reste d'interprétation délicate. Les premières observations de déficit enzymatique en PDH ont été faites sur des cultures de fibroblastes dès 1970 [18]. Nombreux sont les laboratoires qui utilisent ces cellules pour faire le diagnostic, mais il faut cependant préciser qu'elles ne sont pas d'une parfaite fiabilité, en raison des diffé-

Tableau I			
PRINCIPAUX SIGNES CLINIQUES ASSOCIÉS À UN DÉFICIT EN E1 $\alpha$ , E3 ET PROTÉINE X DU COMPLEXE PDH (D'après [20])			
Signes cliniques	E1 $\alpha$	E3	Protéine X
Retard de croissance et de développement	+++	+++	+++
Hypotonie	+++	+++	+++
Convulsions	++	+	-
Dégénérescence du SNC (syndrome de Leigh)	++	+	++
Malformations du SNC	+	-	+
Ataxie	+	+	+
Apnée, hypoventilation	+	+	+
Mort subite	+	-	+
Dysmorphisme	+	-	+
Neuropathie périphérique	+	-	-
Myopathie (muscle cardiaque ou squelettique)	-	-	-

+++ > 75 % ; ++ > 25-75 % ; + < 25 %.

rentes conditions de culture utilisées pour les conserver. De plus, l'activité PDH résiduelle chez les filles dépend de la proportion relative de l'inactivation du chromosome X normal, et les cellules ayant l'allèle normal peuvent avoir un avantage répliatif sur les cellules possédant une fraction d'allèle inactivé, et donc une activité PDH plus faible. La mesure de l'activité PDH sur d'autres types cellulaires (lymphocytes, muscle) est alors nécessaire pour confirmer le diagnostic.

Il est également possible d'étudier les différentes protéines du complexe PDH par immunodétection au moyen d'anticorps spécifiques dirigés, soit contre le complexe, soit contre l'une des sous-unités. Par cette approche, il est ainsi possible de faire la part des déficits liés à la sous-unité E1 de ceux liés à d'autres sous-unités, en particulier à la protéine X [21]. De plus, cette technique permet de suivre la modification simultanée ou non des deux sous-unités, E1 $\alpha$  et E1 $\beta$ , selon l'anomalie moléculaire trouvée et ainsi de définir de nouvelles relations structure/fonction dans le complexe.

### Les différents phénotypes cliniques des déficits en PDH

L'expression clinique des déficits en PDH est très polymorphe et beaucoup d'études ont tenté de corréler la gravité du phénotype clinique,

l'activité enzymatique résiduelle et l'anomalie moléculaire trouvée dans les différents cas étudiés. Les caractéristiques cliniques associées à un déficit en E1 $\alpha$  ne sont pas ou peu distinguables de celles associées à un déficit en protéine X ou en E3 (Tableau I).

Au regard de l'ensemble des données publiées, on peut distinguer quatre groupes phénotypiques.

- Le premier groupe inclut les formes les plus sévères, qui associent une hyperlactacidémie, une hypotonie et une encéphalopathie. Les patients atteints, le plus souvent des filles, décèdent au cours de la première année de vie. Les formes les plus fréquentes sont des retards psychomoteurs plus ou moins graves pouvant être compatibles avec plusieurs années de vie. L'hyperlactacidémie reste alors plus ou moins modérée.

- Le deuxième groupe est constitué le plus souvent de garçons qui présentent une encéphalomyélopathie nécrosante subaiguë, ou syndrome de Leigh, dont l'évolution est fluctuante, par poussées très évocatrices de ce syndrome, auxquels s'associent progressivement des troubles neurologiques. Dans ce groupe, l'hyperlactacidémie est souvent plus inconsistante et fugace.

- Un troisième groupe, ne comportant exclusivement que des garçons, est moins sévèrement atteint. Les patients ne présentent en effet le plus souvent qu'une ataxie chro-

nique ou à rechute avec peu ou pas de retard mental et des taux de lactate sanguin modérément élevés ou normaux. Paradoxalement, c'est dans ce groupe d'évolution clinique plutôt favorable que sont trouvées les activités enzymatiques les plus basses.

- Un dernier groupe rassemble les patients qui ne présentent aucune perturbation métabolique ni modification de l'activité PDH périphérique, et pour lesquels l'imagerie cérébrale a révélé des anomalies évocatrices d'un déficit en PDH; la plupart des observations décrites à ce jour ne concernent que des filles.

### La caractérisation moléculaire des déficits en PDH

Dans l'état actuel des connaissances, cinq composants du complexe peuvent être la cible d'une anomalie à l'origine d'un déficit enzymatique et d'une pathologie humaine. Ces anomalies affectent, par fréquence croissante: E2 (1 cas), la PDH-phosphatase (4 cas), la protéine X-PDH (6 cas dont 5 non reliés sur le plan familial), E3 (moins de 10 cas), E1 $\alpha$  (plus de 150 cas); aucun déficit n'est à ce jour connu pour la sous-unité E1 $\beta$ .

Une grande partie de ces anomalies a été rassemblée par Patel *et al.* (School of Medicine and Biomedical Sciences, State University of New York, NY, USA) [22].

Les déficits en E3-PDH se distinguent des autres déficits par la présence dans le sang des patients, outre un excès de lactate et de pyruvate, une augmentation d' $\alpha$  céto-glutarate et d'acides aminés ramifiés (valine, leucine, isoleucine). Le diagnostic se fait par la découverte d'une diminution de l'activité lipoamide déshydrogénase E3-PDH (0 % à 20 % d'activité résiduelle) dans les cultures de fibroblastes ou dans d'autres tissus [23]. Deux mutations dans l'ADNc codant pour la sous-unité E3 ont été identifiées (K37E et P453L) chez un patient ne présentant aucune activité E3 détectable et ayant de 10 % à 30 % d'activité résiduelle du complexe PDH [24].

Les déficits en PDH phosphatase sont rares. Aucune méthode directe ne permet de les détecter et leur existence se traduit par une perte de l'activation de la PDH par le Ca<sup>2+</sup> et le Mg<sup>2+</sup>. Quatre cas d'acidose lactique néonatale avec déficit en PDH phosphatase ont été rapportés [25, 26]. Aucune étude moléculaire n'a été encore réalisée. Les déficits en E2 et X-PDH sont éga-

lement très rares. Ces déficits ne se distinguent pas cliniquement des déficits en E1 $\alpha$ -PDH et le diagnostic se fait par l'étude en *Western blot* des sous-unités protéiques, excluant donc toute possibilité de différencier une protéine normale d'une protéine non fonctionnelle.

Une diminution importante d'activité transacétylase E2 a pu être mise en évidence chez un patient atteint d'acidose lactique congénitale sans modification des activités E1 et E3-PDH [27]. Plus récemment, une absence totale de protéine X-PDH a pu être détectée chez cinq enfants présentant un déficit important d'activité PDH (< 30 % d'activité résiduelle); quatre garçons présentant un syndrome de Leigh et une fille, une acidose lactique congénitale [3, 28]. La mise en évidence récente de la partie codante du gène de la protéine X a permis de définir les bases moléculaires de ce nouveau type de déficit. Pour deux des patients, il s'agissait de délétions importantes de 85 et 59 pb et, pour un autre, d'une absence quasi totale d'ARNm, suggérant une anomalie au niveau transcriptionnel (figure 5A).

Aucune mutation n'a encore été observée dans le gène E1 $\beta$ -PDH alors

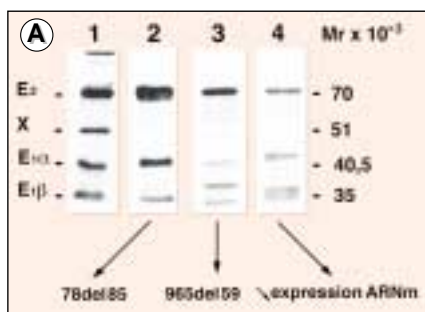
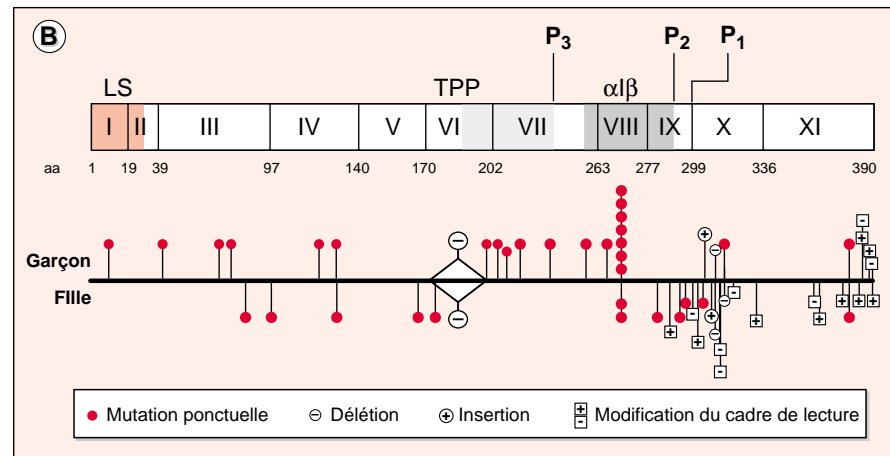


Figure 5. **A. Immunodétection des sous-unités du complexe PDH dans des mitochondries de fibroblastes humains.** Des mitochondries de fibroblastes ont été préparées par centrifugations différentielles chez un témoin (1) et trois patients atteints de déficit enzymatique en PDH (2, 3, 4) et analysées pour leur antigénicité vis-à-vis d'un anticorps polyclonal dirigé contre le complexe PDH. Ces patients présentent une absence de protéine X immunodétectable. Des délétions importantes ont été retrouvées sur le gène codant pour la protéine X chez les patients n°2 et n°3; une diminution importante du transcrite de ce gène (2,5 kb) a été décrite pour le patient n°4. **B. Tableau récapitulatif des différentes mutations pathogènes affectant le gène E1 $\alpha$ .** LS: séquence leader (29 acides aminés); TPP: motif conservé de fixation de la thiamine pyrophosphate;  $\alpha/\beta$ : régions d'interaction entre les deux sous-unités; P1, P2, P3: sérines phosphorylables. Les 11 exons du gène sont numérotés en chiffres romains. Les mutations chez les filles et chez les garçons sont représentées séparément et reliées par un trait plein s'il s'agit de la même mutation ou d'une mutation située dans le même codon. Les mutations différentes dans le même codon, et affectant le même sexe, sont, elles aussi, reliées par un trait plein.



que l'on peut répertorier aujourd'hui 52 mutations différentes dans le gène *E1 $\alpha$ -PDH* situé sur le chromosome X [1] (figure 5B).

Quarante-deux mutations n'ont été trouvées qu'une seule fois et six ont été décrites au moins trois fois (R72C, R263G, R302C, S312fs, Q382fs et S388fs). Les mutations observées chez les garçons diffèrent de celles trouvées chez les filles [29] à l'exception d'une mutation qui a été décrite comme étant pathologique dans les deux sexes (R278H). La majorité des insertions et des délétions siègent dans les exons 10 et 11 et affectent les filles (23 filles sur 32), à l'exception de la délétion de la totalité de l'exon 6 retrouvée chez deux garçons (cousins) et chez une fille. La majorité des mutations ponctuelles sont répertoriées sur les exons de 1 à 9, principalement chez des garçons (25 garçons/36). La mutation R263G dans l'exon 8 est la plus fréquemment décrite chez les garçons (sept cas non familiaux) et les phénotypes cliniques sont très comparables [30] : les enfants présentent des syndromes de Leigh tardifs ou des ataxies et le pronostic est moins sévère. Il en est de même pour quatre garçons atteints de la mutation R72C. Si l'on considère l'ensemble des mutations, on ne retrouve que dans 10 % des cas (R10P, R127P, V171del, R263G, R302C) la mutation chez les mères qui sont peu (ou pas) symptomatiques. La majorité des mutations sont donc des mutations *de novo* et un éventuel diagnostic anténatal des déficits en *E1 $\alpha$ -PDH* reste difficile à envisager dans ce type de maladie [31]. Le fait qu'il y ait un nombre égal de garçons et de filles affectés par un déficit en *E1 $\alpha$ -PDH* est la conséquence de la répartition aléatoire inégale dans les différentes cellules de l'inactivation du chromosome X sur l'allèle normal codant pour *E1 $\alpha$ -PDH*. Chez les filles hétérozygotes, le déficit peut être variable dans son expression tissulaire ; si c'est l'allèle normal qui est inactivé dans des régions cérébrales à forte activité oxydative, la maladie se traduira par des lésions cérébrales graves. Les formes cliniques dites « intracérébrales », sans perturbations métaboliques ni modification de l'activité *PDH* périphérique, sont probable-

ment soumises à une spécificité de tissu considérable. Chez les garçons, les déficits complets ne sont pas compatibles avec la vie et seuls les déficits plus ou moins partiels affectent de façon plus ou moins grave le métabolisme cérébral. Il convient également de rappeler que, quels que soient les mécanismes tissulaires qui modulent l'expression d'une mutation, le cerveau reste l'organe le plus sensible à un déficit en *PDH*, puisqu'au niveau cérébral, l'oxydation du glucose fournit la majorité de l'énergie cellulaire et le flux de pyruvate oxydé à l'état normal est très proche des capacités enzymatiques maximales. De plus, certaines parties du cerveau, comme les noyaux gris centraux ou le tronc cérébral, sont encore plus dépendantes du métabolisme aérobie oxydatif et sont donc les cibles privilégiées d'un déficit en *PDH*.

L'analyse des mutations dans le gène *E1 $\alpha$* , et des études structurales ont permis de définir plusieurs domaines fonctionnels de la protéine *E1 $\alpha$*  [22]. Plusieurs régions présumées d'interaction entre les sous-unités *E1 $\alpha$*  et *E1 $\beta$*  ont été mises en évidence, en particulier dans la région comprise entre les acides aminés 246 et 290 et dans la partie carboxy-terminale de la protéine qui est très conservée chez les mammifères et les eucaryotes [32]. Une anomalie moléculaire dans ces régions s'accompagne, dans tous les cas, d'une diminution des sous-unités *E1 $\alpha$*  et *E1 $\beta$*  immunoréactives, parallèle à la diminution d'activité du complexe *PDH*. C'est également dans cette région qu'a été retrouvée la mutation la plus fréquente, en position 263 (R263G) ; elle a en effet été décrite chez sept garçons non apparentés qui présentaient un tableau clinique comparable, une forte diminution d'activité *PDH* et une stabilité variable des sous-unités *E1 $\alpha$*  et *E1 $\beta$*  [30]. Les mères de quatre de ces patients étaient hétérozygotes pour la mutation et ne présentaient aucun signe clinique.

Une autre mutation située en position 378, dans la partie carboxy-terminale de la protéine, a également été retrouvée chez cinq garçons, non apparentés, qui présentaient tous une forte diminution d'activité *PDH* [33]. D'autres résidus ont été également identifiés, en particulier ceux interve-

nant dans le site de fixation de la thiamine pyrophosphate (TPP), comme les leucines 217 et 205 [34, 35], les alanines 199 et 231 [36] et la valine 210 [37]. Des mutations ponctuelles de ces acides aminés entraînent toutes une diminution d'activité *PDH* qui s'accompagne ou non d'une diminution des sous-unités immunoréactives *E1 $\alpha$*  et  $\beta$  ; on peut citer la mutation de leucine 217 en proline, qui entraîne une diminution de la stabilité de la sous-unité *E1 $\alpha$* , suggérant que le site de fixation à la TPP s'intègre aussi dans une région d'interaction des deux sous-unités *E1 $\alpha$*  et *E1 $\beta$*  [34]. D'autres acides aminés, situés en dehors de la région de fixation de la thiamine, ont également un rôle important dans ce mécanisme ; il s'agit en particulier de la mutation de l'arginine 44 en histidine qui a pour conséquence de modifier l'affinité de la *PDH* vis-à-vis de la thiamine [38]. Il est intéressant de noter que l'état clinique de ce patient a été sensiblement amélioré par un traitement approprié à la thiamine. Enfin, des mutations ponctuelles affectant des régions ou des résidus proches des trois sites de phosphorylation (Ser 300, 293, 232) entraînent également des anomalies fonctionnelles du complexe *PDH* [39] qui s'accompagnent le plus souvent d'une instabilité des sous-unités *E1 $\alpha$*  et *E1 $\beta$* . Dans certains cas, la mutation peut aussi modifier le niveau d'interaction de la *PDH* phosphatase avec le substrat *E1 $\alpha$*  phosphorylé [40].

## Conclusions et perspectives

Le déficit en pyruvate déshydrogénase est une des causes majeures de perturbation du métabolisme oxydatif chez l'enfant, entraînant une augmentation anormale de lactate dans le sang et le liquide céphalo-rachidien. Le déficit, qui se traduit très tôt dans la vie intra-utérine par un développement anormal du système nerveux central, se caractérise cependant par une très grande hétérogénéité des tableaux cliniques. Les mutations connues portent essentiellement sur le gène *E1 $\alpha$* , qui est localisé sur le chromosome X. A ce jour, 52 mutations différentes chez 76 individus non apparentés ont été réper-



torisées, dont seulement 10 % sont transmises par la mère. La caractérisation d'un nombre croissant de mutations et l'analyse de leur répercussion au niveau fonctionnel donnent aujourd'hui la possibilité de mieux comprendre les relations génotype/phénotype, les relations structure/fonction de la protéine E1 $\alpha$  et ses relations avec les autres composants du complexe PDH. Ainsi, les mutations dans le site de fixation de la thiamine semblent affecter la conformation du site de liaison et dans certains cas la stabilité de l'interaction entre les deux sous-unités E1 $\alpha$  et E1 $\beta$ . Des mutations, situées à proximité des trois sérines phosphorylables, affectent l'activité de l'enzyme alors que celles situées dans des régions conservées, impliquées dans l'interaction  $\alpha/\beta$ , entraînent une perte de la stabilité de ces sous-unités. Cependant, plusieurs mutations qui entraînent une diminution importante de l'activité PDH ont été décrites dans des régions n'ayant aucun rôle connu dans le site actif de l'enzyme.

La description récente de la partie codante du gène de la protéine X a permis de poser les premières bases moléculaires des déficits de cette protéine chez plusieurs patients présentant un fort déficit enzymatique et ainsi d'ouvrir la porte à des études approfondies pouvant mener à une meilleure compréhension de cette maladie et son dépistage ■

#### Remerciements

Nous remercions Bernard Desbuquois et Claude Forest pour leur lecture critique de ce manuscrit.

#### RÉFÉRENCES

1. Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J* 1990; 4: 3224-33.
2. Patel MS, Naik S, Johnson M, Dey R. Long-term regulation and promoter analysis of mammalian pyruvate dehydrogenase complex. In: Patel MS, Roche TE, Harris RA, eds. *Alpha-keto acid dehydrogenase complexes*. Boston: Birkhäuser Verlag, 1996: 197-212.
3. Aral B, Benelli C, Ait-Ghazala G, et al. Mutations in PDX1, the human lipoyl-containing component X of the pyruvate dehydrogenase complex gene on chromosome 11p1, in congenital lactic acidosis. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1318-22.

4. Behal RH, Buxton DB, Robertson JG, Olson MS. Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annu Rev Nutr* 1993; 13: 497-520.
5. Sugden MC, Holness MJ. Hormonal and nutritional modulation of PDHC activity status. In: Patel MS, Roche TE, Harris RA, eds. *Alpha-keto acid dehydrogenase complexes*. Boston: Birkhäuser Verlag, 1996: 163-76.
6. Harris RA, Popov KM. The mitochondrial  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenases kinases: molecular cloning, tissue-specific expression and primary structure analysis. In: Patel MS, Roche TE, Harris RA, eds. *Alpha-keto acid dehydrogenase complexes*. Boston: Birkhäuser Verlag, 1996: 139-49.
7. Huang B, Gudi R, Wu P, et al. Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J Biol Chem* 1998; 273: 17680-8.
8. Denton RM, Randle PJ, Bridges BJ, et al. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem* 1975; 31: 27-54.
9. Denton MD. Early events in insulin actions. In: Greengard P, Robison GA, eds. *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research*. New York: Raven Press, 1986: 314-8.
10. Wieland OH. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1983; 96: 124-70.
11. Kerbey AL, Richardson LJ, Randle PJ. The roles of intrinsic kinase and of kinase/activator protein in the enhanced phosphorylation of pyruvate dehydrogenase complex in starvation. *FEBS Lett* 1984; 176: 115-8.
12. Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase. *Biochem J* 1998; 329: 191-6.
13. Wu P, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J* 1998; 329: 197-201.
14. Da Silva LA, De Marcucci OL, Zunhler ZR. Dietary polyunsaturated fats suppress the high sucrose induced increase of rat liver pyruvate dehydrogenase levels. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1169: 126-34.
15. Maury J, Kerbey A, Priestman DA, et al. Pretranslational regulation of pyruvate dehydrogenase complex subunits in white adipose tissue during the suckling-weaning transition in the rat. *Biochem J* 1995; 311: 531-5.
16. Malloch GD, Munday LA, Olson MS, Clark JB. Comparative development of pyruvate dehydrogenase complex and citrate synthase in rat brain mitochondria. *Biochem J* 1986; 238: 729-36.
17. Patel MS, Harris RA. Mammalian  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects. *FASEB J* 1995; 9: 1164-72.

18. Blass JP, Avigan J, Uhlenendorf BW. A defect of pyruvate dehydrogenase in a child with an intermittent movement disorder. *J Clin Invest* 1970; 49: 423-32.
19. Helen Cross J, Connelly A, Gadian DG, et al. Clinical diversity of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Pediatr Neurol* 1994; 10: 276-83.
20. Robinson BH, Mac Mihan H, Petrova-Benedict R, Sherwood G. Variable clinical presentation in patients with defective E1 component of pyruvate dehydrogenase complex. *J Pediatr* 1987; 111: 525-33.
21. Geoffroy V, Fouque F, Poggi F, et al. Defect in the X-lipoyl-containing component of the pyruvate dehydrogenase complex in a patient with a neonatal lactic acidemia. *Pediatrics* 1996; 97: 267-72.
22. Kerr DS, Wexler ID, Tripatara A, Patel MS. Human defects of the pyruvate dehydrogenase complex. In: Patel MS, Roche TE, Harris RA, eds. *Alpha-keto acid dehydrogenase complexes*. Boston: Birkhäuser Verlag, 1996: 249-69.
23. Robinson BH. Lactic acidemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *Metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 1479-99.
24. Liu TC, Kim H, Arijmendi C, Kitano A, Patel MS. Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase deficient patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5186-90.
25. Sorbi S, Blass JP. Abnormal activation of pyruvate dehydrogenase in Leigh disease fibroblasts. *Neurology* 1982; 32: 555-8.
26. De Vivo DC, Haymond MW, Obert KA, Nelson JS, Pagliara AS. Defective activation of the pyruvate dehydrogenase complex in subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh disease). *Ann Neurol* 1979; 6: 483-94.
27. Robinson BH, MacKay N, Petrova-Benedict R, et al. Defects in the E2 lipoyl transacylase and X lipoyl containing component of the pyruvate dehydrogenase complex in patients with lactic acidemia. *J Clin Invest* 1990; 85: 1821-4.
28. Marsac C, Stansbie D, Bonne G, et al. Defect in the lipoyl-bearing protein X subunit of the pyruvate dehydrogenase complex in two patients with encephalomyelopathy. *J Pediatr* 1993; 123: 915-20.
29. Dahl HH. Pyruvate dehydrogenase E1 $\alpha$  deficiency: males and females differ yet again. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 553-7.
30. Marsac C, Benelli C, Desguerre I, et al. Biochemical and genetics studies of four patients with pyruvate E1  $\alpha$  deficiency. *Hum Genet* 1997; 99: 785-92.
31. Brown RM, Brown GK. Prenatal diagnosis of pyruvate E1 alpha subunit deficiency. *Prenat Diagn* 1994; 14: 435-42.
32. Wexler ID, Hemalatha SG, Patel MS. Sequence conservation in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and its similarity to branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase. *FEBS Lett* 1991; 282: 209-13.



## RÉFÉRENCES

33. Wexler MD, Hemalatha SG, McConnell J, *et al.* Outcome of pyruvate dehydrogenase deficiency treated with ketogenic diets. Studies in patients with identical mutations. *Neurology* 1997; 49: 1655-61.
34. Hemalatha SG, Kerr DS, Wexler ID, *et al.* Pyruvate dehydrogenase complex deficiency due to a point mutation (P188L) within the thiamine pyro-phosphate binding loop of the E1 $\alpha$  subunit. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 315-8.
35. Chun K, MacKay N, Petrova-Benedict R, *et al.* Mutations in the X-linked E1  $\alpha$  subunit of pyruvate dehydrogenase; Exon skipping, insertion of duplicate sequence, and missense mutations leading to the deficiency of the pyruvate dehydrogenase complex. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 558-69.
36. Chun K, MacKay N, Petrova-Benedict R, Robinson BH. Mutations in the X-linked E1  $\alpha$  subunit of pyruvate dehydrogenase leading to deficiency of the pyruvate dehydrogenase complex. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 449-54.
37. Tripatara A, Kerr DS, Lusk MM, *et al.* Three new mutations of the pyruvate dehydrogenase alpha subunit: a point mutation (M181V), 3 bp deletion (-R282) and 16 bp insertion/frameshift (K358SVS-TVDQS). *Hum Mutat* 1996; 8: 180-2.
38. Naito E, Ito M, Takeda E, *et al.* Molecular analysis of abnormal pyruvate dehydrogenase in a patient with thiamine-responsive congenital lactic acidemia. *Pediatr Res* 1994; 36: 340-6.
39. Matthews PM, Brown RM, Otero L, *et al.* Neurodevelopmental abnormalities and lactic acidosis in a girl with a 20-bp deletion in the X-linked pyruvate dehydrogenase E1  $\alpha$  subunit gene. *Neurology* 1993; 43: 2025-30.
40. Awata H, Endo F, Tanoue A, Kitano A, Matsuda I. Characterization of a point mutation in the pyruvate dehydrogenase E1  $\alpha$  gene from two boys with primary lactic acidemia. *J Inheret Metab Dis* 1994; 17: 189-95.

## Summary

### The pyruvate dehydrogenase complex: from molecular organization to clinical issues

The mammalian pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) plays a key role in the irreversible decarboxylation of pyruvate derived from glucose and amino acids to form acetyl-CoA in the mitochondria. This enzyme complex contains multiple copies of three catalytic components: pyruvate dehydrogenase (E1), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3), two regulatory components (E1-kinase, phospho-E1 phosphatase) and one non-catalytic protein X. The enzyme complex is under short – and long – term regulation by nutritional, metabolic, developmental and hormonal factors. Both E1-kinase and phospho-E1 phosphatase determine the activation (phosphorylation) state of the PDHc, and in many circumstances changes in the activation state correlate with the activity of E1-kinase. Certain dietary or hormonal manipulations result in changes in total PDHc activity with an increase in components proteins, with the major regulatory step in this process being positioned at the translational and/or postranslational level. PDHc deficiency is one of the major genetic disorders of oxidative metabolism, causing elevation of lactate in blood and/or CSF. The consequences primarily affect the developing central nervous system, but range vastly in severity. The most common defects are associated with mutations of the E1 $\alpha$  gene located on chromosome X. To date, some 52 mutations within the reading frame of E1 $\alpha$  have been reported in around 76 individuals, with less than 10 % recurring in the same family. Defects of other components are less common; to date, mutations have been characterized for E3 component and protein X. Characterization of a large variety of missense mutations of E1 $\alpha$ , consideration of their consequences and description of new mutations on protein X provide opportunities for better understanding the relationship of structure and function of these proteins and their respective role in the complex.

## TIRÉS À PART

C. Benelli.

# ANTHROPOLOGIE DES SYSTÈMES ET DES POLITIQUES DE SANTÉ

Paris, 6, 7 et 8 janvier 1999

Colloque organisé par AMADES  
avec le soutien de l'Union Européenne  
(DGXII, science, recherche et développement)

FIAP Jean-Monnet, 30, rue Cabanis, 75014 Paris, France

### Renseignements

Colloque anthropologie des systèmes de santé - LEHA  
346, route des Alpes,  
13100 Aix-en-Provence, France  
Fax : 04 42 21 13 31