



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

L'inhibition de l'activité mitochondriale induit l'activation du facteur de transcription CREB

Vankoningsloo, Sebastien

Award date:
2000

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**L'inhibition de l'activité mitochondriale induit l'activation
du facteur de transcription CREB**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Sébastien VANKONINGSLOO

Juin 2000

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur
Téléphone : + 32(0)81.72.44 – Téléfax = + 32(0)81.72.4420
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be
<http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**L'inhibition de l'activité mitochondriale induit
l'activation du facteur de transcription CREB**

VANKONINGSLOO Sébastien

Résumé

De nombreuses pathologies sont associées à un dysfonctionnement mitochondrial. Les mécanismes impliqués dans ces situations sont multiples et encore peu compris mais nécessitent une communication moléculaire entre les organites et plus particulièrement entre les mitochondries non fonctionnelles et le noyau. Le concept de la « communication rétrograde » qui sous-tend ce phénomène implique que la mitochondrie renseigne le noyau sur son état d'activité à travers l'activation de facteurs de transcription capables de modifier l'expression de gènes nucléaires codant ou non pour des protéines mitochondriales. Dans ce travail, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire à un stress énergétique. Nous avons caractérisé l'activation du facteur de transcription CREB induite par des inhibiteurs de l'activité mitochondriale tels que le FCCP, l'antimycine A et l'oligomycine. La phosphorylation de la Ser133 de ce facteur passe par une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre capable d'activer la CaMKIV, une kinase dépendante de la calmoduline. Cette voie de signalisation, caractérisée sur deux types cellulaires (HEK 293 et L929), est également observée sur des cellules Rho^o déplétées en génome mitochondrial. Nous montrons également que la phosphorylation de CREB pourrait, par une action encore peu comprise sur le cycle cellulaire, être responsable du ralentissement de la croissance cellulaire induite par une inhibition mitochondriale. Nous avons donc identifié CREB comme un des facteurs de transcription potentiellement impliqués dans l'expression de gènes médiée par le calcium et induite par une inhibition chronique ou aiguë de l'activité mitochondriale.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2000

Promoteur : T. Arnould

Co-promoteur : M. Raes

J'adresse mes premiers remerciements au professeur Remacle, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire.

Je voudrais ensuite envoyer un merci tout particulier (ainsi que mon infinie gratitude et ma reconnaissance sans fin) à THIERRY, toujours prompt à me prodiguer des conseils et des articles, pour la contribution énorme et précieuse qu'il a fournie lors de la réalisation de ce travail.

Je remercie ensuite les personnes qui ont corrigé mon mémoire (encore Thierry, et Martine Raes) car c'est un travail long, scabreux et minutieux (et je m'excuse mille fois pour tous les maux de tête que mes tournures ampoulées ont dû leur causer !).

Un autre grand merci est destiné à Andrée (que j'adore), pour sa patience et sa sagesse ainsi que pour sa disponibilité. Un merci incoercible à l'adresse de Patsy pour sa bonne humeur et pour ses clefs, et quelques menus mercis pour le reste de l'équipe.

Encore un merci pour tous ceux qui, durant des mois, ont dû répondre à mes questions stupides ou farfelues (ou les deux), et l'ont malgré tout fait avec le plus grand plaisir (je crois).

Que Dieu bénisse également tous ceux qui, un jour dans leur vie, m'ont aidé à mener à bien mes interminables Bradfords. Ils ont eux aussi contribué à la réussite de mon mémoire et méritent donc de figurer sur cette page de remerciements. Toutefois, je ne peux pas me rappeler tous leurs noms (la liste est trop longue), et c'est pourquoi j'espère qu'ils se reconnaîtront.

Je réserve un dernier merci à tous ceux qui m'ont permis de mener ces études à bien (financièrement : merci papa ; psychologiquement : merci Cédric et Björn ; avec agrément : merci Bill et le reste du kot)...

En bref, MERCI A TOUS !

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Antimycine A	LDH	Lactate déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique	HA	Hémaglutinine
ADNmt	ADN mitochondrial	HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
AID	Auto-inhibitory domain	HEK	Human Embryonic Kidney Cells
AIF	Apoptosis inducing factor	HRP	Horseradish peroxidase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	HSP	Heavy strand promoter
ANT	Adénine nucléotide translocase	Kd	Constante de dissociation
AP-2	Activating protein-2	LHON	Leber's Hereditary Optical Neuropathy
APS	Ammonium persulfate	LSP	Light strand promoter
ARN	Acide ribonucléique	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ARNm	ARN messenger	MDM	Mitochondrial Diabete Mellitus
ARNr	ARN ribosomal	MELAS	Mitochondrial Encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes
ARNt	ARN de transfert	MERRF	Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers
ATP	Adénosine triphosphate	MME	Membrane mitochondriale externe
BAPTA	Acide 1,2-bis(2-aminophénoxy) éthane-N,N,N',N'-tétraacétique	MMI	Membrane mitochondriale interne
β-Gal	β-Galactosidase	MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydro-pyridine
BSA	Bovine serum albumin	MRP	Mitochondrial RNA processing enzyme
CaM	Calmoduline	mtTFA	Mitochondrial transcription factor A
CaMK	Calmodulin-dependent kinase	NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
CaMKK	CaMK kinase	NARP	Neurogenic muscle weakness, ataxia and retinus pigmentosa
CBD	Calmodulin-binding domain	NF-κB	Nuclear factor-kappa B
CBP	CREB-binding protein	NRF	Nuclear respiratory factor
CPEO	Chronic progressive external ophtalmoplegia	PBS	Phosphate Buffer Saline
CTL	Contrôle(s)	pCREB	phosphoCREB
CRE	cAMP-response element	PDH	Pyruvate déshydrogénase
CREB	cAMP-response element-binding protein	PKA	Protein kinase A
DHG	Dubbelco's Modified Eagles Medium + High Glucose	PM	Poids moléculaire
D-loop	Displacement loop	PP2A	Protein phosphatase 2 A
DO	Densité optique	PTP	Permeability Transition Pore
DTT	Dithiothréitol	PVDF	Polyvinylidène fluoride
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay	RLU	Relative light unit
FAD	Flavine adénine dinucléotide	ROS	Reactive oxygen species
FBS	Fetal bovine serum	SDS	Sodium dodécyl sulfate
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoro-méthoxyphénylhydrazone	SOD	Superoxyde dismutase
FITC	Fluorescéine isothiocyanate	TBS	Tris Buffer Saline
FMN	Flavine mononucléotide	TIM	Translocase inner membrane
GDP	Guanosine diphosphate	TOM	Translocase outer membrane
GRBOX	Glycolysis-regulated box	UCP	Uncoupling protein
GSH	Gluthation		

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION	1
1.1	ORIGINE DES MITOCHONDRIES	1
1.1.1	<i>L'endosymbionte</i>	1
1.1.2	<i>Le génome proto-mitochondrial</i>	1
1.2	GENETIQUE MITOCHONDRIALE	2
1.2.1	<i>Le génome mitochondrial humain</i>	3
1.2.2	<i>Transcription et traduction</i>	4
1.2.3	<i>Réplication</i>	4
1.3	STRUCTURE ET FONCTIONS MITOCHONDRIALES	5
1.3.1	<i>Structure mitochondriale</i>	5
1.3.1.1	La membrane externe.....	5
1.3.1.2	La membrane interne.....	6
1.3.1.3	La matrice	7
1.3.1.4	L'espace intermembranaire.....	7
1.3.2	<i>Fonctions mitochondriales</i>	8
1.3.2.1	Les phosphorylations oxydatives.....	8
1.3.2.1.1	<i>La chaîne de transporteurs d'électrons</i>	8
1.3.2.1.2	<i>Les dérivés réactionnels de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species)</i>	9
1.3.2.1.3	<i>L'ATP synthase</i>	10
1.3.2.1.4	<i>L'adénine nucléotide translocase (ANT)</i>	11
1.3.2.1.5	<i>Inhibiteurs de la respiration mitochondriale</i>	12
1.3.2.1.5.1	Inhibiteurs des transporteurs d'électrons	12
1.3.2.1.5.2	Inhibiteurs de l'ATP synthase	13
1.3.2.1.5.3	Agents découplants.....	13
1.3.2.2	L'oxydation des acides gras.....	14
1.3.2.3	Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie du calcium.....	14
1.3.2.3.1	<i>Transports calciques mitochondriaux</i>	15
1.3.2.3.2	<i>Microdomaines à haute concentration calcique</i>	15
1.3.2.4	Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose	17
1.4	LES MALADIES MITOCHONDRIALES	18
1.4.1	<i>Réarrangements de l'ADN mitochondrial</i>	19
1.4.2	<i>Réarrangements de l'ADN nucléaire</i>	20
1.5	LA COMMUNICATION RETROGRADE.....	21
1.5.1	<i>Facteurs de transcription impliqués</i>	22
1.5.2	<i>Gènes différenciellement exprimés dans la communication rétrograde</i>	23
1.6	LES CELLULES Rho°	23
1.6.1	<i>Caractéristiques</i>	23
1.6.2	<i>Messagers moléculaires de la communication rétrograde entre la mitochondrie et le noyau</i> ..	24
1.6.3	<i>Gènes différenciellement exprimés dans les cellules Rho°</i>	25
1.6.4	<i>Potentiel de membrane mitochondrial</i>	25
1.6.5	<i>Potentialités</i>	26
1.7	cAMP-RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN (CREB).....	27
1.7.1	<i>La famille des facteurs de transcription répondant à l'AMPc</i>	27
1.7.2	<i>Activation de CREB par phosphorylation</i>	28
1.8	VOIE DES KINASES DEPENDANTES DE LA CALMODULINE (CaMK)	29
1.8.1	<i>Structure des CaMK</i>	29
1.8.2	<i>Activation et régulation des CaMK</i>	30
1.8.3	<i>Communication avec d'autres voies de transduction du signal</i>	30

2	MATERIELS ET METHODES	34
2.1	CULTURE CELLULAIRE ET SOUS-CULTURES	34
2.1.1	<i>Matériel</i>	34
2.1.2	<i>Méthode des sous-cultures</i>	34
2.2	MESURE DE LA CYTOTOXICITE	35
2.2.1	<i>Test de libération de la lactate déshydrogénase</i>	35
2.2.1.1	Principe	35
2.2.1.2	Méthodes	36
2.2.1.2.1	<i>Incubation</i>	36
2.2.1.2.2	<i>Dosage</i>	36
2.2.2	<i>Test à l'acridine orange</i>	37
2.2.2.1	Principe	37
2.2.2.2	Méthodes	37
2.2.2.2.1	<i>Incubation</i>	37
2.2.2.2.2	<i>Test</i>	38
2.3	DOSAGES D'ATP	38
2.3.1	<i>Principe</i>	38
2.3.2	<i>Méthodes</i>	39
2.3.2.1	Incubations	39
2.3.2.2	Extraction et dosages	39
2.3.2.2.1	<i>Extraction d'ATP</i>	39
2.3.2.2.2	<i>Dosage d'ATP</i>	40
2.3.2.2.3	<i>Dosage de protéines</i>	40
2.4	RETARDS SUR GEL	40
2.4.1	<i>Extraction de protéines nucléaires</i>	41
2.4.1.1	Principe	41
2.4.1.2	Méthode	41
2.4.2	<i>Marquage et purification de la sonde oligonucléotidique</i>	42
2.4.2.1	Principe	42
2.4.2.2	Méthode	42
2.4.2.2.1	<i>Réaction de marquage</i>	42
2.4.2.2.2	<i>Purification de la sonde marquée</i>	43
2.4.3	<i>Retard sur gel</i>	44
2.4.3.1	Principe	44
2.4.3.2	Méthode	44
2.4.3.2.1	<i>Préparation des échantillons</i>	44
2.4.3.2.2	<i>Migration</i>	45
2.4.3.2.3	<i>Révélation</i>	45
2.5	WESTERN BLOTTING	46
2.5.1	<i>Principe</i>	46
2.5.2	<i>Méthodes</i>	46
2.5.2.1	Sous-culture, incubations et préparation d'extraits protéiques totaux	46
2.5.2.2	Préparation des échantillons pour pCREB	47
2.5.2.3	Préparation des gels et migration	47
2.5.2.4	Transfert sur membrane de PVDF	48
2.5.2.5	Traitement de la membrane avec les anticorps et révélation	49
2.6	IMMUNOPRECIPITATION DE LA CaMKIV ET TEST D'ACTIVITE KINASE IN VITRO	49
2.6.1	<i>Immunoprécipitation</i>	49
2.6.1.1	Principe	49
2.6.1.2	Méthodes	50

2.6.1.2.1	<i>Sous-culture et incubations</i>	50
2.6.1.2.2	<i>Immunoprécipitation de la CaMKIV</i>	50
2.6.2	<i>Test d'activité kinase in vitro</i>	51
2.6.2.1	Principe	51
2.6.2.2	Méthodes	51
2.7	MARQUAGE DE CREB PHOSPHORYLE (pCREB) ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE.....	52
2.7.1	<i>Principe</i>	52
2.7.2	<i>Méthodes</i>	52
2.7.2.1	Sous-cultures et incubations	52
2.7.2.2	Marquage de phospho-CREB (pCREB).....	53
2.8	TRANSFECTION ET SYSTEME RAPPORTEUR LUCIFERASE.....	53
2.8.1	<i>Principe</i>	53
2.8.1.1	Transfection au phosphate de calcium	54
2.8.1.2	Dosages de la luciférase et de la β -galactosidase.....	54
2.8.2	<i>Méthodes</i>	55
2.8.2.1	Sous-culture	55
2.8.2.2	Transfection	55
2.8.2.3	Inhibitions	55
2.8.2.4	Dosages.....	56
2.8.2.4.1	<i>Lyse des cellules</i>	56
2.8.2.4.2	<i>Dosage de la luciférase</i>	56
2.8.2.4.3	<i>Dosage de la β-galactosidase</i>	56
2.9	MESURES DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM : SYSTEMES AEQUORINE ET FURA-2 .. 57	
2.9.1	<i>Système apoaequorine-coelenterazine</i>	57
2.9.1.1	Principe	57
2.9.1.2	Méthodes	58
2.9.1.2.1	<i>Sous-culture et transfection</i>	58
2.9.1.2.2	<i>Incubations</i>	58
2.9.1.2.3	<i>Dosages de calcium</i>	58
2.9.2	<i>Système de la sonde fluorescente Fura-2</i>	59
2.9.2.1	Principe	59
2.9.2.2	Méthodes	60
2.9.2.2.1	<i>Sous-culture et chargement de la sonde</i>	60
2.9.2.2.2	<i>Inhibition et dosage</i>	60
2.10	TEST D'INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE.....	61
2.10.1	<i>Principe</i>	62
2.10.2	<i>Méthodes</i>	62
2.10.2.1	Sous-culture et incubations.....	62
2.10.2.2	Lyse et dosages	62
2.11	ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	63
3	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	64
3.1	Mesure de la cytotoxicité des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives.....	64
3.1.1	<i>Résultats</i>	65
3.1.1.1	Tests de libération de la lactate déshydrogénase (LDH)	65
3.1.1.2	Tests à l'acridine orange	65
3.1.2	<i>Discussion</i>	66
3.2	Effets des inhibiteurs de l'activité mitochondriale sur le contenu cellulaire en ATP.....	67
3.2.1	<i>Résultats</i>	68

3.2.2	<i>Discussion</i>	69
3.3	Mise en évidence de l'activation de CREB suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives.....	70
3.3.1	<i>Etude de la liaison de CREB à une sonde ADN synthétique par la technique de retard sur gel</i>	71
3.3.1.1	Résultats.....	71
3.3.1.2	Discussion.....	73
3.3.2	<i>Mise en évidence de la phosphorylation et de la localisation de CREB par Western blotting et marquage immunocytochimique</i>	74
3.3.2.1	Résultats.....	74
3.3.2.1.1	<i>Western blotting</i>	74
3.3.2.1.2	<i>Marquage immunocytochimique</i>	74
3.3.2.2	Discussion.....	75
3.3.3	<i>Etude de l'activité transcriptionnelle de CREB par transfection d'un système rapporteur luciférase</i> 76	
3.3.3.1	Résultats.....	76
3.3.3.2	Discussion.....	78
3.4	Immunoprécipitation et dosage in vitro de l'activité de la CaMKIV.....	79
3.4.1	<i>Résultats</i>	79
3.4.2	<i>Discussion</i>	80
3.5	Mesure de la concentration en calcium libre suite aux inhibitions de l'activité mitochondriale.....	81
3.5.1	<i>Résultats</i>	81
3.5.1.1	Dosage du calcium par le système aequorine.....	81
3.5.1.2	Dosage du calcium par la sonde Fura-2.....	83
3.5.2	<i>Discussion</i>	84
3.6	Tests de prolifération suite aux inhibitions mitochondriales.....	85
3.6.1	<i>Résultats</i>	85
3.6.2	<i>Discussion</i>	87
4	<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	88
5	<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	92

Avant-Propos

« La mitochondrie fait son retour au premier plan de la recherche »

Il y a plus de 50 ans que la mitochondrie a capturé l'attention de physiologistes cellulaires pour la première fois. Elle a été utilisée comme matériel dans de très nombreuses études et a joué un rôle crucial dans les recherches conduisant à l'octroi du Prix Nobel couronnant la découverte des principes fondamentaux du métabolisme énergétique cellulaire (« FRITZ ALBERT LIPMAN, 1953 Nobel Laureate in Medicine for his discovery of co-enzyme A and its importance for intermediary metabolism »).

L'avènement de la biologie moléculaire rendant plus accessible l'étude des fonctions du noyau, l'intérêt pour la mitochondrie a régressé pendant plus de 20 ans. Cependant, les recherches actuelles sur la mitochondrie occupent de nouveau une place centrale dans des domaines aussi divers que la mort cellulaire, la biologie de l'évolution et la médecine moléculaire.

La découverte que cet organite joue un rôle majeur dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose, les questions relatives à l'origine et à la biogenèse de la mitochondrie, l'étude des mécanismes par lesquels les mitochondries se déplacent dans le cytosol et assurent leur répartition lors de la mitose, la découverte de nouvelles protéines mitochondriales ou la mise en évidence de la translocation de protéines mitochondriales dans d'autres compartiments subcellulaires pour y assurer des fonctions encore inconnues ainsi que la résolution des structures, à l'échelle atomique, des protéines de la membrane mitochondriale interne qui donne une meilleure compréhension du fonctionnement des 5 complexes enzymatiques participant aux phosphorylations oxydatives sont autant de points qui font que cet organite est redevenu un sujet de recherche qui captivera encore certainement l'attention de très nombreux chercheurs dans les années à venir.

Notre propre intérêt pour la mitochondrie porte essentiellement sur les interactions et relations moléculaires qui existent entre la mitochondrie et le noyau, et plus particulièrement dans le sens de l'étude de l'influence de l'activité mitochondriale sur l'expression de gènes nucléaires codant ou non pour des protéines mitochondriales. Ce concept étudié très récemment dans les cellules de mammifères, porte le nom de « communication rétrograde ». Ce phénomène, qui pourrait représenter un mécanisme par lequel la cellule peut s'adapter à des changements de l'activité et/ou de la biogenèse mitochondriale(s), a été presque exclusivement étudié dans la levure depuis une dizaine d'années, notamment pour la régulation de la transcription du gène de la citrate synthase-2 (*CIT-2*), une forme peroxisomale de l'enzyme (Liao and Butow, 1993).

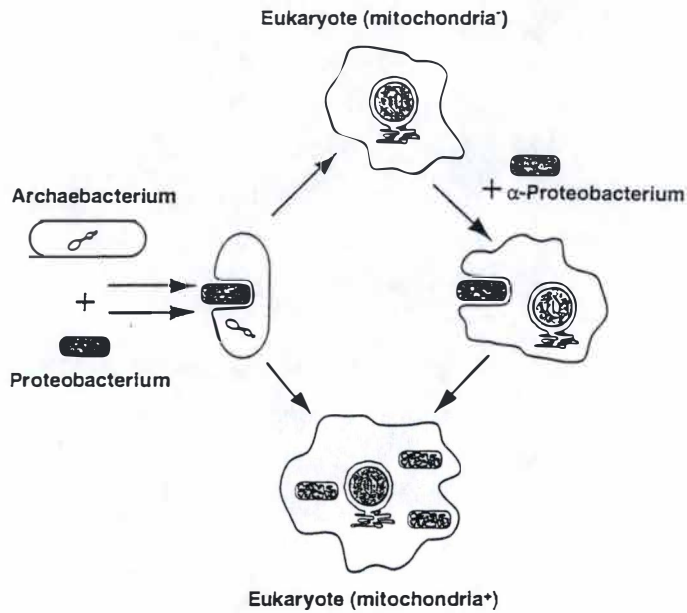


Fig.1.1 : Hypothèses décrivant l'origine de la cellule eucaryotique. La première hypothèse propose que la symbiose entre une Archéobactérie (hôte) et une α -Protéobactérie productrice d'hydrogène (endosymbionte) résulte en la formation d'une cellule pourvue d'un noyau (*eukaryote mitochondria⁻*) qui, après avoir internalisé une autre α -Protéobactérie, aurait acquis des mitochondries (*eukaryote mitochondria⁺*). La seconde hypothèse décrit l'apparition simultanée du noyau et des mitochondries suite à la symbiose entre ces bactéries. (D'après Gray M. W., 1999.)

PREMIERE PARTIE : MITOCHONDRIES ET DEFICIENCES ASSOCIEES

1 INTRODUCTION

1.1 ORIGINE DES MITOCHONDRIES

L'étude des mitochondries a souvent permis de souligner les nombreuses similarités, tant génomiques que structurales, qui existent entre cet organe et certaines souches bactériennes. Il semblerait en effet que les mitochondries soient les descendants d'une bactérie aérobie phagocytée par une cellule pourvue d'un noyau et possédant exclusivement un métabolisme glycolytique.

Cette théorie endosymbiotique de l'origine des mitochondries postule encore, dans un scénario monophylétique, que toutes les mitochondries existantes à ce jour sont le résultat des divisions d'un endosymbionte bactérien établi il y a 1,5 milliard d'années au sein d'une cellule proto-eucaryotique glycolytique. Les études portant sur les séquences des génomes bactériens et mitochondriaux renforcent l'origine d'un ancêtre commun à chercher probablement parmi les eubactéries. Cependant, certains points demeurent obscurs, notamment l'identité précise de l'endosymbionte et la nature exacte de l'hôte.

1.1.1 L'endosymbionte

Quoique l'origine bactérienne des mitochondries soit maintenant largement reconnue, la controverse existe quant à l'espèce qui aurait pu donner naissance à ces organites. A ce jour, les bactéries qui en sont génétiquement les plus proches (notamment en raison des grandes similarités entre leur génome et celui présent dans les mitochondries du Flagellé *Reclinomonas.americana*) appartiennent au groupe des α -Protéobactéries, parmi lesquelles on retrouve des genres tels que *Rickettsia* ou *Anaplasma*. Ces parasites intracellulaires obligés pourraient bien avoir évolué en mitochondries, mais les données disponibles actuellement ne permettent pas encore de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle *Rickettsia* et les mitochondries descendraient toutes deux d'un ancêtre commun. Les hypothèses récentes décrivant l'origine de la cellule eucaryote sont présentées à la figure 1.1.

1.1.2 Le génome proto-mitochondrial

Au cours de l'évolution, l'hôte a pu compléter la plupart des fonctions cellulaires de la bactérie internalisée telles que la biosynthèse des acides aminés, des nucléosides, des

phospholipides, de cofacteurs ; la glycolyse anaérobie, ainsi que certains mécanismes de régulation... C'est la raison pour laquelle le génome bactérien a subi une compaction par la perte et le transfert progressif de nombreux gènes vers le noyau de l'hôte, conservant ceux qui lui permettent d'assurer en partie les phosphorylations oxydatives et la traduction de ses transcrits (ARNt, ARNr). Le génome bactérien réduit résultant de cette symbiose constitue le *génomme proto-mitochondrial*, dont dériveraient tous les ADN mitochondriaux (ADNmt) contemporains. (Les génomes mitochondriaux séquencés à ce jour sont regroupés dans la base de données *GOBASE* : <http://megasm.bch.montreal.ca/gobase/>)

Bien que l'organisation de ce génome et la liste des gènes qu'il code soient encore inconnus, certaines espèces eucaryotes possèdent un ADNmt ancestral, proche de ce génome proto-mitochondrial. Un bon exemple est celui du Flagellé *Reclinomonas americana*, dont l'ADNmt a conservé des caractéristiques génomiques bactériennes vestigiales : gènes supplémentaires codant pour les grandes et petites sous-unités des ribosomes mitochondriaux et pour les peptides du complexe II, absence d'introns, gènes organisés en clusters, transcrits polycistroniques... Des analyses plus détaillées portant sur les ADNmt de ces Protozoaires devraient permettre d'approcher un peu plus le génome que renfermait la toute première mitochondrie (pour une revue récente : (Gray et al., 1999)).

1.2 GENETIQUE MITOCHONDRIALE

L'information génétique que renferment les mitochondries dans la plupart des espèces est constituée de plusieurs molécules circulaires d'ADN double brin. Cet ADNmt se distingue de l'ADN nucléaire à de nombreux égards : l'absence d'histones et d'introns, une hérédité exclusivement maternelle, un taux de mutation dix fois plus élevé que dans le noyau, le nombre de copies (de 2 à 10 par mitochondrie). Une cellule compte en moyenne plusieurs centaines de mitochondries. Ce nombre est fonction du type cellulaire et de son activité métabolique.

Le taux élevé de mutations apparaissant dans le génome mitochondrial s'explique, entre autres, par la proximité des transporteurs d'électrons, qui génèrent continuellement des radicaux libres, et par l'absence de systèmes de réparation de l'ADN dans la matrice mitochondriale (Liu et al., 1998). Quand une mutation survient dans le génome mitochondrial, la cellule contient à la fois de l'ADNmt sauvage et muté ; cette situation est nommée hétéroplasmie. Lors de la division d'une cellule présentant une hétéroplasmie, les ADNmt sauvages et mutés sont répartis au hasard parmi les cellules-filles. Au cours des générations, on observe une dérive (*shift*) à prédominance sauvage ou muté.

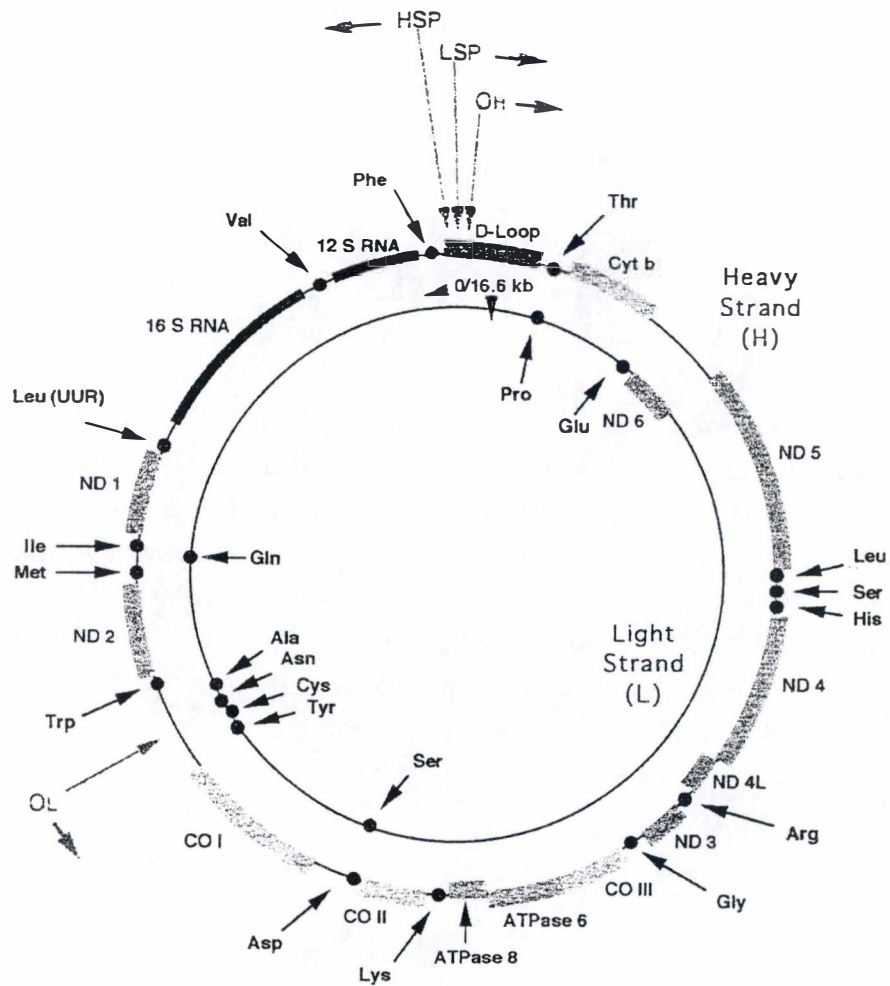


Fig.1.2 : Organisation du génome mitochondrial humain. Le *D-loop* contient l'origine de réplication du brin lourd (OH), ainsi que les promoteurs des deux brins (LSP et HSP). Les séquences codantes sont représentées par des *cercles* (gènes des ARNt mitochondriaux) et des *rectangles* (gènes des ARN 12S et 16S, et de sous-unités des complexes assurant les phosphorylations oxydatives). *ND* : NADH : ubiquinone oxydoréductase. *Cyt b* : cytochrome b. *CO* : cytochrome c oxydase. (D'après Lestienne P., 1999.)

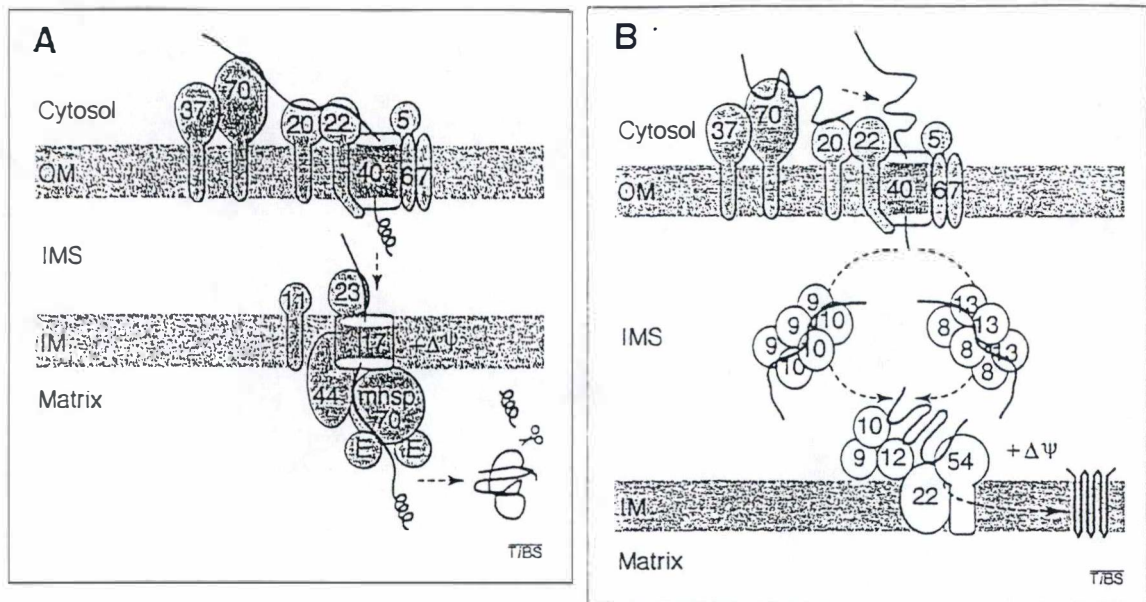


Fig. 1.3: Importation des protéines mitochondriales par les complexes TOM/TIM. (A) Voie des protéines matricielles. La reconnaissance de la séquence signal N-terminale et le guidage vers le pore (Tom40p) sont assurés par les Tom20p, 22p, 37p et 70p. Dès l'émergence de la protéine dans l'espace intermembranaire, la séquence signal est reconnue par Tim23p et guidée vers le pore Tim17p. La translocation de la protéine à travers la membrane interne requiert l'activité ATPasique de Tim44p, ainsi que la présence d'un potentiel de membrane mitochondrial. Une fois dans la matrice, des protéases clivent la séquence signal puis des chaperones peuvent aider à conformer la protéine. *OM* : outer membrane. *IM* : inner membrane. *IMS* : intermembrane space. *mhsp70* : mitochondrial heat shock protein 70. *E* : nucleotide exchange factor *GrpE*. $\Delta\Psi$: potentiel de membrane. (B) Voie des protéines de la membrane interne. Le complexe TOM transloque la protéine comme décrit en (A), puis la libère dans l'espace intermembranaire où elle est associée à un complexe formé de Tim9p et 10p ou de Tim8p et 13p. Le complexe composé de Tim9p, 10p, 12p, 22p et 54p assure ensuite l'insertion de la protéine dans la membrane interne en présence d'un potentiel de membrane. (D'après Koehler C. M., 1999.)

1.2.1 Le génome mitochondrial humain

La taille moyenne des ADNmt a diminué dans les différentes lignées animales. Ceci est probablement le résultat de la perte de gènes non essentiels et du transfert de gènes essentiels vers le noyau. Chez l'homme, le génome mitochondrial ne mesure plus que 16569 bp (84 kb chez *S. cerevisiae*) et ne code sur ses deux brins, dits *lourd* (*heavy strand*) et *léger* (*light strand*), que pour un nombre très limité de gènes : 13 peptides, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiaux (ARNr 12S et ARNr 16S) (Figure 1.2). Les 13 peptides synthétisés dans la matrice mitochondriale sont tous des sous-unités des complexes (I, III, IV et V) assurant les phosphorylations oxydatives dans la membrane interne. L'assemblage de ces complexes nécessite encore l'importation d'environ 80 sous-unités codées par le génome nucléaire, qui code également et exclusivement pour toutes les sous-unités du complexe II.

Une parenthèse nous permet de mentionner que l'importation de pré-protéines par la mitochondrie est sous la dépendance de chaperones, de récepteurs d'importation et de translocases. Les translocases sont des complexes multimoléculaires assurant l'importation de précurseurs protéiques synthétisés dans le cytoplasme suite à la formation de pores dans les membranes. On retrouve les TOM (*translocase of the outer membrane*) associés à membranes la mitochondriale externe et les TIM (*translocase of the inner membrane*) associés à la membrane interne. De plus, l'ensemble du processus d'importation protéique mitochondrial requiert un potentiel de membrane positif au niveau de la membrane mitochondriale interne ($\Delta\Psi_m > 0$) et l'hydrolyse d'ATP par le moteur de translocation composé de Tim44p, de la protéine de choc thermique mitochondriale (mhsp70) et du facteur d'échange nucléotidique mitochondrial (GrpE) (pour une revue : (Koehler et al., 1999)). Une représentation schématique de ce processus d'importation est présenté à la figure 1.3.

Les mécanismes moléculaires qui permettent la coordination de l'expression des gènes mitochondriaux et nucléaires afin de permettre l'assemblage des différentes sous-unités en complexes fonctionnels sont encore peu décrits. Parmi les quelques protéines connues codées par le noyau et impliquées dans l'expression de gènes mitochondriaux et/ou la biogenèse mitochondriale, mentionnons le facteur de transcription mtTF1/mtTFA/TCF6: (Parisi and Clayton, 1991), le facteur SSBP (*single-stranded-DNA binding protein*), l'endonucléase G (ENDOG) (Parisi and Clayton, 1991), le facteur de terminaison de la transcription mitochondriale mTERF (Fernandez-Silva et al., 1997) et l'ARN polymérase (h-mtRPOL) qui ont été clonés et caractérisés chez l'homme.

Ainsi, une mitochondrie présentant une déficience quantitative et/ou qualitative pour ces différentes sous-unités ne peut plus assurer la formation de complexes respiratoires fonctionnels et ne peut donc plus générer d'ATP. Cette situation peut survenir, par exemple, suite à l'apparition d'un réarrangement (de type mutation ponctuelle ou, le plus souvent, délétion) dans un gène mitochondrial ou nucléaire. Ce sujet sera abordé dans le chapitre sur les pathologies mitochondriales (point 1.4).

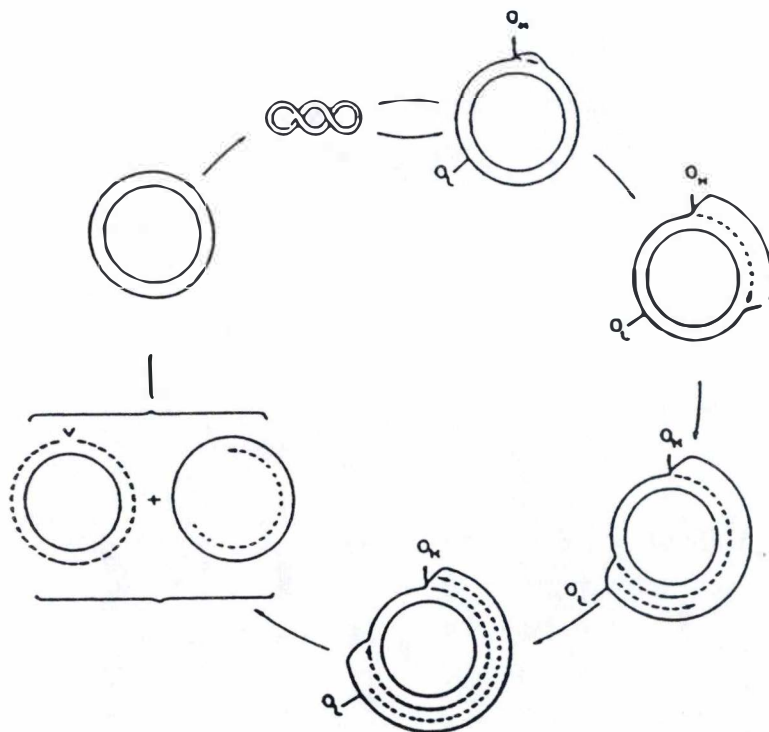


Fig. 1.4: Schéma de la réplication du génome mitochondrial chez les mammifères. La réplication du brin lourd commence à l' O_H , située dans la *D-loop*, et se poursuit jusqu'aux deux tiers environ de la molécule d'ADNmt, où la réplication du brin léger est initiée (O_L). La réplication de l'ADNmt est couplée à sa transcription, puisque la dégradation du transcrit synthétisé à partir du LSP fournit le *primer* d'ARN permettant à l'ADN polymérase γ d'initier la réplication du brin lourd depuis l' O_H . (D'après Clayton, 1982.)

1.2.2 Transcription et traduction

Chacun des deux brins de l'ADNmt contient un promoteur appelé *LSP* (*light strand promoter*) et *HSP* (*heavy strand promoter*), à partir duquel est produit un transcrit polycistronique. En effet, le génome mitochondrial renferme typiquement moins de 10 % de séquences non codantes, souvent sous la forme de fragments intergéniques (Gray et al., 1998). L'allumage de ces promoteurs est médié par le seul facteur de transcription mitochondrial connu à ce jour : le *mtTFA* (*mitochondrial transcription factor A*). Ce facteur active le LSP à faible concentration et ensuite le HSP, quand sa concentration augmente.

La traduction de ces deux transcrits polycistroniques débute par une N-formyl-méthionine. Elle est dirigée par des ribosomes 55S sensibles au chloramphénicol, contenant 85 protéines codées par le noyau. La machinerie de traduction mitochondriale est aussi composée partiellement de constituants codés par l'ADNmt, tels que les ARNr des petites et des grandes sous-unités des mitoribosomes. Les 22 ARNt sont, quant à eux, tous codés par le génome mitochondrial.

Il faut remarquer par ailleurs qu'il existe des différences entre les codes génétiques universel et mitochondrial. Ainsi par exemple, le codon stop UGA code pour le tryptophane dans la mitochondrie, et la méthionine est portée par un ARNt reconnaissant le codon AUA (isoleucine dans le cytoplasme) et non AUG.

1.2.3 Réplication

Pendant la division cellulaire, les mitochondries se dédoublent (mitogénèse) et sont alors en nombre suffisant pour être partagées entre les cellules-filles. Bien entendu, ce dédoublement s'accompagne de la réplication des ADN mitochondriaux.

Il apparaît que cette réplication est initiée par la transcription du brin léger, puisque ce transcrit peut, après clivage par la MRP (*mitochondrial RNA processing enzyme*), servir de *primer* à l'ADN polymérase γ , qui entame la réplication du brin lourd à partir de son origine de réplication (O_H), située en aval du LSP dans le D-loop (*Displacement loop*). L'élongation se poursuit jusqu'à l'origine de réplication de l'autre brin (O_L). A ce niveau, le brin lourd déplacé, simple brin, adopte une conformation reconnue par une primase synthétisant une amorce d'ARN, qui initie la réplication du brin léger par l'ADN polymérase γ (voir figure 1.4).

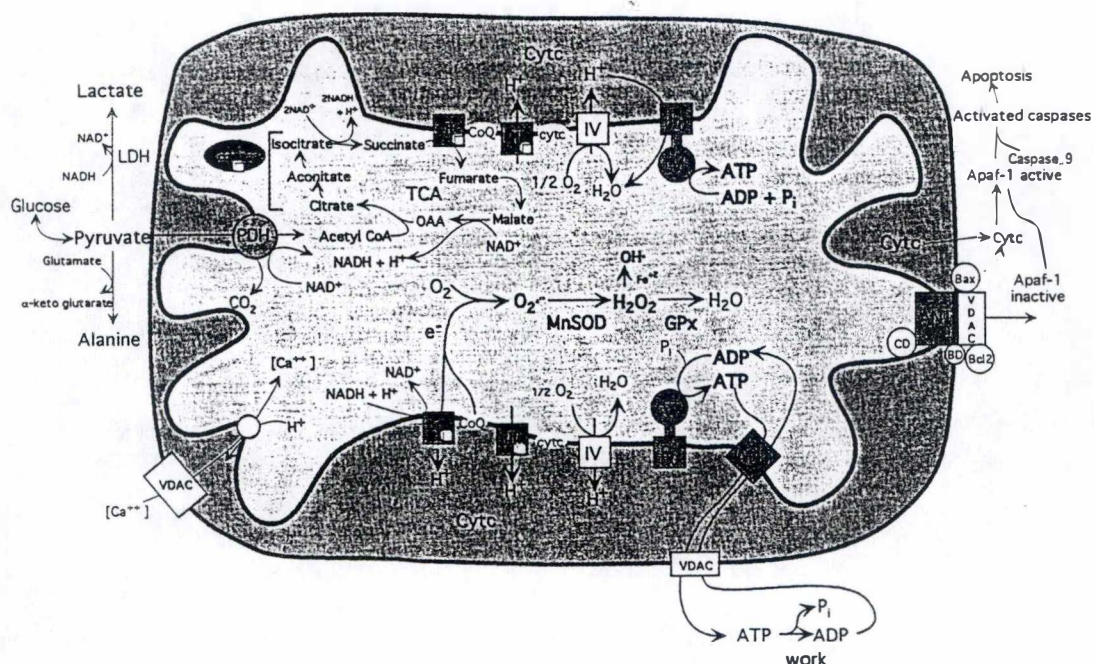


Fig. 1.5 : Schéma présentant les relations entre les phosphorylations oxydatives, la production de radicaux libres et l'initiation de l'apoptose au sein de la mitochondrie. Les électrons sont transférés depuis le NADH jusqu'à l' O_2 en passant successivement par le complexe I (ou II), l'ubiquinone (CoQ), le complexe III, le cytochrome c (cyt c) et le complexe IV. La F_0-F_1 -ATP synthase (complexe V) exploite le gradient de H^+ généré par la chaîne respiratoire et produit de l'ATP. L'ATP est exporté en échange d'un ADP par l'adénine nucléotide translocase (ANT) en membrane interne. Les cubes blancs dans les complexes respiratoires représentent des centres à Fe-S (un centre à Fe-S est également présent dans l'aconitase, enzyme du cycle de Krebs). Les radicaux superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) générés au niveau du complexe I et de l'ubiquinone sont dismutés par la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD). Le H_2O_2 résultant de cette réaction est réduit en H_2O par la glutathion peroxydase (GPx). L'initiation de l'apoptose par la mitochondrie est due à l'ouverture du *Permeability Transition Pore* (PTP), constitué par l'ANT, le *voltage-dependent anion channel* (VDAC), Bax, la cyclophiline D (CD) et le récepteur aux benzodiazépines (BD). L'ouverture du PTP s'accompagne de la libération de protéines (cytochrome c, AIF, pro-caspase-3), de la chute du potentiel de membrane mitochondrial et de la mort cellulaire par apoptose. (D'après Wallace D.C., 1999.)

1.3 STRUCTURE ET FONCTIONS MITOCHONDRIALES

Les mitochondries ont une structure fonctionnelle unique, conservée chez tous les êtres vivants qui en possèdent. En particulier, le système de double membrane partage l'intérieur de la mitochondrie en deux compartiments : la matrice entourée par la membrane mitochondriale interne (MMI) et l'espace intermembranaire délimité par la membrane mitochondriale externe (MME). Les compartiments mitochondriaux diffèrent par leur contenu ionique et moléculaire et donc, par les fonctions qui y sont assurées (figure 1.5).

Ajoutons encore que la structure isolée et la morphologie réniforme de la mitochondrie telles qu'elles ont été proposées suite aux premières observations en microscopie électronique ne correspondent plus vraiment à la réalité. Suite à l'apport des études menées à l'aide de sondes fluorescentes et à la microscopie confocale, il faut maintenant considérer les mitochondries comme un réseau mitochondrial dynamique (*mitochondrial reticulum* ou *MR*) dont l'organisation s'apparente fortement à celle du réticulum endoplasmique, auquel il semble étroitement associé (Yaffe, 1999). Ce réseau est constitué de connexions tubulaires (branchements) entre les mitochondries, et son importance dépend du type cellulaire ainsi que de l'état de différenciation et d'activité de la cellule (Yaffe, 1999).

1.3.1 Structure mitochondriale

1.3.1.1 La membrane externe

Il faut signaler d'emblée que, la mitochondrie n'appartenant pas au système endomembranaire, cette membrane externe ne peut en aucun cas libérer de vésicule de sécrétion ou fusionner avec une vésicule d'importation. Cet organite possède donc des systèmes spécialisés qui lui permettent d'interagir avec le cytoplasme.

La membrane mitochondriale externe est constituée de phospholipides et de protéines dans un rapport 1:1. Les protéines jouent des rôles divers, comme par exemple les *porines*, dont la plus étudiée est probablement la très abondante protéine VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*). VDAC autorise, en conditions physiologiques, le passage de petites molécules, mais il participe également à l'assemblage du *Permeability Transition Pore (PTP)* lors de l'apoptose et donc à la libération subséquente du cytochrome c, ainsi qu'à la dissipation du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). Des protéines régulant la prévention de ce phénomène apoptotique sont également associées à ou ancrées dans la MME, comme les membres de la famille de Bcl2 (Vander Heiden and Thompson, 1999).

Protein	Organism	Location	Mutant phenotype	Protein properties
KIF5B, KIF1B; KLP67A	Mouse; fly	Microtubules/ mitochondrial surface	Mitochondrial aggregation near nucleus	Kinesin homolog
Drp1; Dnm1p	Human; yeast	Cytoplasm	Mitochondrial aggregation, reduced lateral distribution and/or branching	Dynamin-related protein
CluA; Clu1p	Slime mold; yeast	Cytoplasm	Mitochondrial aggregation, reduced lateral distribution and/or branching	Coiled-coil domain containing protein
Mdm1p	Yeast	Cytoplasm	Defective mitochondrial transmission to buds; fragmentation of tubules	Intermediate filament-like protein
Mdm20p	Yeast	Cytoplasm	Defective mitochondrial transmission to buds	Coiled-coil domain containing protein
Mdm14p	Yeast	Cytoplasm	Defective mitochondrial transmission to buds;	Coiled-coil domain containing protein
Rsp5p	Yeast	Cytoplasm	mitochondrial aggregation Defective mitochondrial transmission to buds;	Ubiquitin-protein ligase
Mdm10p	Yeast; fungus	Mitochondrial outer membrane	mitochondrial aggregation Defective mitochondrial transmission to buds; giant spherical mitochondria	Integral membrane protein
Mmm1p	Yeast	Mitochondrial outer membrane	Defective mitochondrial transmission to buds; giant spherical mitochondria	Integral membrane protein
Mdm12p	Yeast	Mitochondrial outer membrane	Defective mitochondrial transmission to buds; giant spherical mitochondria	Integral membrane protein
Mgm1p	Yeast	Mitochondrial outer membrane	Defective mitochondrial transmission to buds; mitochondrial aggregation	Integral membrane protein; dynamin- related protein
Fuzzy onions, Fzo1p	Fly; yeast	Mitochondrial outer membrane	Aberrant mitochondrial fusion; fragmentation of tubules	Integral membrane protein; GTPase

Fig. 1.6 : Tableau reprenant quelques protéines qui semblent jouer un rôle dans la dynamique mitochondriale et l'interaction de cet organelle avec le cytosquelette. (D'après Yaffe M.P., 1999.)

D'autres protéines assurent la reconnaissance de la séquence d'adressage et la translocation de protéines à destination mitochondriale (*complexes TOM*).

Un dernier exemple sont les protéines qui permettent l'association des mitochondries avec des composants du cytosquelette, leur répartition lors de la division et leur distribution stratégique dans la cellule. En effet, l'actine contrôle la morphologie mitochondriale et la ségrégation lors de la division cellulaire. Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ce sont deux protéines intégrales de la MME (Mmm1p et Mdm10p) qui assurent le rôle de *docking* (Boldogh et al., 1998). Un tableau reprenant les protéines de la MME connues à ce jour pour jouer un rôle dans la dynamique mitochondriale est présenté à la figure 1.6.

1.3.1.2 La membrane interne

La membrane mitochondriale interne (MMI) constitue en soi un système développé d'un point de vue tant structurel que fonctionnel. En particulier, sa surface importante (cinq fois plus grande que la membrane externe) l'oblige à former des replis (nommés *crêtes*) dans la mitochondrie, permet une plus grande interface entre la matrice et l'espace intermembranaire et optimise la production d'énergie par le métabolisme oxydatif. Cette membrane résiste donc très bien au gonflement mitochondrial (*swelling*). Elle est de plus caractérisée par une teneur très élevée (près de 75 %) en protéines intégrales ou associées, qui interviennent dans diverses fonctions mitochondriales telles que :

- a) la chaîne de transport des électrons allant du NADH/FADH₂ à l'oxygène ;
- b) la phosphorylation de l'ADP par la F₀-F₁ ATP synthase ;
- c) le transport de métabolites :
 - * internalisation du pyruvate et des acides gras ;
 - * échange ADP/ATP par les isoformes 1 et 3 de l'ANT (adénine nucléotide translocase) ;
- d) la régulation des flux ioniques ;
- e) la translocation des protéines mitochondriales (*complexes TIM*).

En outre, cette membrane contient peu de cholestérol et beaucoup de cardiolipine, et est caractérisée par une grande imperméabilité en conditions physiologiques ; seuls des ions ou des solutés de taille inférieure à 1500 Da transitent de manière *contrôlée* au travers de canaux. Cette grande imperméabilité jouera un rôle crucial dans le stockage de l'énergie issue de l'oxydation de cofacteurs, sous la forme d'un gradient de protons dont les flux sont contrôlés.

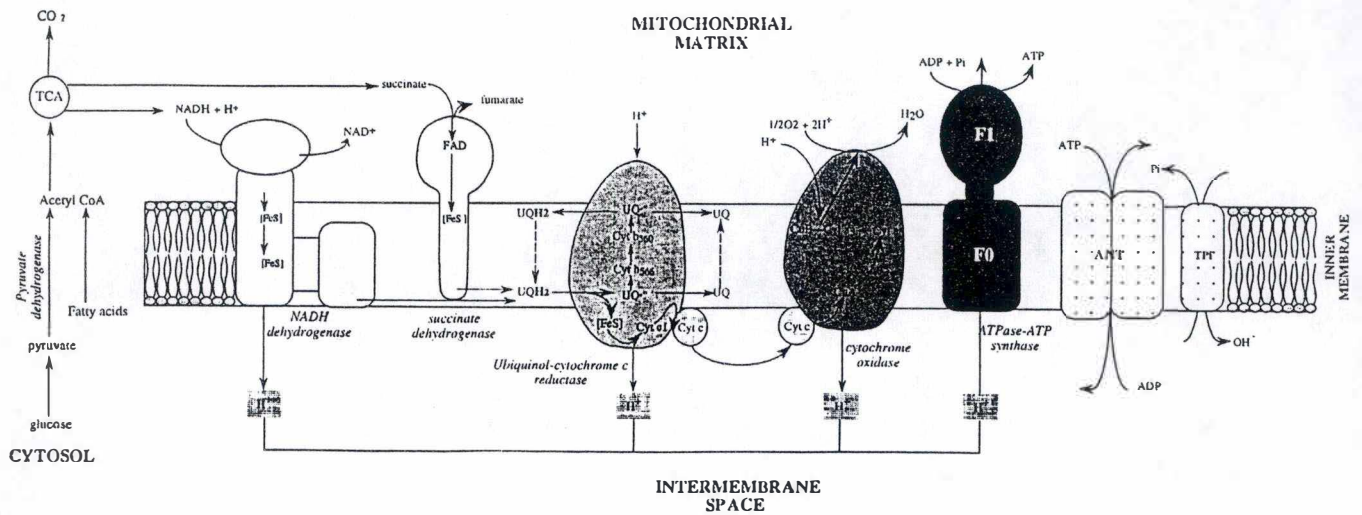


Fig. 1.7: Représentation schématique des complexes assurant la phosphorylation oxydative. Les électrons, issus de l'oxydation de l'acétyl-CoA, sont donnés à la *NADH déshydrogénase* ou à la *succinate déshydrogénase*, puis à l'ubiquinone (UQ). Le complexe *ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase* transfère les électrons un à un au cytochrome c (Cyt c), qui les cède ensuite à la *cytochrome c oxydase*, dans laquelle se trouve le site de réduction de l'O₂. Les H⁺ expulsés par les complexes respiratoires retournent dans la matrice via l'*ATPase-ATP synthase*. L'*ANT* (*adenine nucleotide translocase*) échange un ADP cytosolique contre un ATP mitochondrial. (D'après Lestienne P., 1999.)

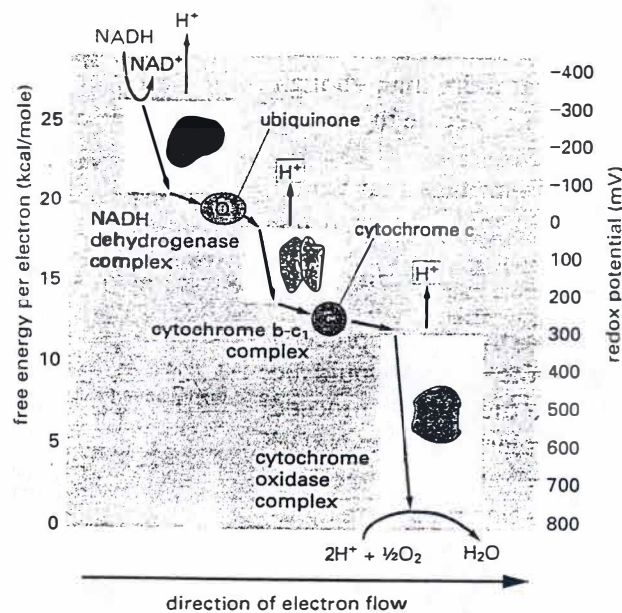


Fig. 1. 8: Evolution du potentiel redox le long de la chaîne des transporteurs d'électrons. L'oxydation du NADH + H⁺ (E = - 320 mV) par l'oxygène (E = + 810 mV) libère une énergie libre de 52,6 kcal/mol. Les complexes respiratoires récupèrent une partie de cette énergie par pompage de H⁺ contre leur gradient électrochimique. (D'après Alberts B., 1998.)

1.3.1.3 La matrice

Ce compartiment renferme l'information génétique propre aux mitochondries, présent en plusieurs copies, ainsi que la machinerie nécessaire pour assurer son expression (ARN polymérase, ribosomes, ARNt...) et sa réplication (ADN polymérase γ ...), dont le contrôle est assuré par le facteur de transcription mtTFA.

En outre, la matrice mitochondriale est le siège de réactions métaboliques importantes. En effet, elle contient de nombreux enzymes ou complexes enzymatiques qui participent, entre autres, au métabolisme énergétique (transformation du pyruvate, oxydation des acides gras, cycle de Krebs) et à la détoxification de radicaux libres.

1.3.1.4 L'espace intermembranaire

Dans ce compartiment, la mitochondrie accumule des protons grâce à l'action de la chaîne de transporteurs d'électrons. Ceci a deux conséquences directes : l'alcalinisation de la matrice et l'établissement d'une différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane interne, appelée *potentiel de membrane* ($\Delta\Psi_m$, qui varie entre 180 et 220 mV).

Le retour de ces protons vers la matrice (suivant leur gradient électrochimique) s'accompagne d'une libération d'énergie qui, si elle n'était récupérée en partie par un système ingénieux (la F_0-F_1 ATP synthase), se dissiperait entièrement sous une forme de chaleur. Cet espace intermembranaire contient de plus quelques protéines, dont le cytochrome c qui transporte un électron entre les complexes III et IV de la membrane interne, mais qui joue aussi un rôle pro-apoptotique quand il est libéré dans le cytoplasme. L'espace intermembranaire contient également des pro-caspases inactives comme la caspase-3 latente (Samali et al., 1999), l'*apoptosis inducing factor* (AIF) (Daugas et al., 2000) et l'adénylate kinase-2 (AK-2) (Kohler et al., 1999). Les autres isoformes de l'adénylate kinase (AK-1 et AK-3) sont respectivement localisées dans le cytosol et la matrice mitochondriale.

La mitochondrie possède donc une structure unique, caractéristique de son activité métabolique qui permet la production d'une molécule universelle stockant l'énergie dans un lien phosphate, l'ATP. Cet ATP est ensuite exporté vers le cytoplasme, où il sera utilisé par certaines réactions biochimiques. Ce transport d'ATP à travers la membrane interne est réalisé par un antiporteur spécifique (l'ANT), qui échange un ATP mitochondrial contre un ADP cytosolique.

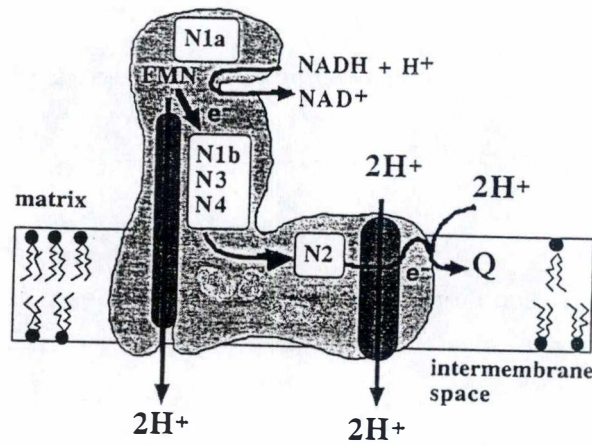


Fig.1.9: Schéma de la structure du complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase). Les électrons transitent *via* une flavine mononucléotide (FMN) et plusieurs centres à Fe-S (N1a, N1b, N2, N3, N4) avant d'être cédés à l'ubiquinone (Q). Le transport de 2 électrons par ce complexe s'accompagne de l'expulsion de 4 H⁺ dans l'espace intermembranaire. (D'après Duborjal H., 1999.)

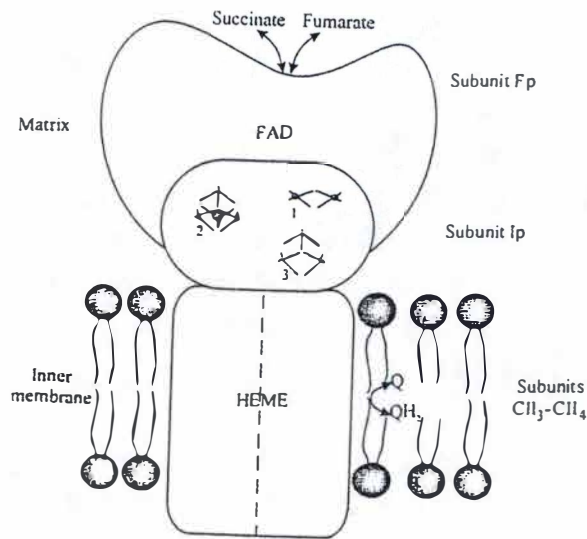


Fig. 1.10: Schéma de la structure du complexe II (succinate déshydrogénase). Les électrons issus de l'oxydation du succinate sont transférés à une flavine adénine dinucléotide (FAD) et plusieurs centres à Fe-S (1, 2 et 3), puis à l'ubiquinone. Ce complexe ne pompe pas de H⁺ dans l'espace intermembranaire. (D'après Lestienne P. et Desnuelle C., 1999.)

1.3.2 Fonctions mitochondriales

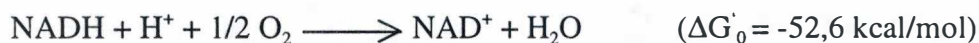
Trois aspects importants des fonctions mitochondriales dans la physiopathologie sont la production d'énergie, la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène, ou *reactive oxygen species (ROS)*, et le contrôle de la mort cellulaire par apoptose.

1.3.2.1 Les phosphorylations oxydatives

La mitochondrie peut utiliser le NADH (*nicotinamide adénine dinucléotide réduit*) généré par la glycolyse, mais elle en produit surtout *via* le cycle de Krebs, qui permet d'oxyder l'*acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA)*, une molécule-clef dans le métabolisme énergétique, jusqu'au stade CO₂ (tout en réduisant trois NAD⁺). L'acétyl-CoA est issu de la transformation du pyruvate ou de l'oxydation des acides gras par des enzymes matricielles – deux combustibles que la mitochondrie peut transporter à travers sa membrane interne. L'oxydation de cet acétyl-CoA conduit donc à une production de cofacteurs réduits à potentiel rédox très bas ($E_{\text{NADH}} = -320 \text{ mV}$), dont les électrons sont ensuite donnés aux complexes respiratoires.

1.3.2.1.1 La chaîne de transporteurs d'électrons

Quand les deux électrons du NADH sont cédés à l'oxygène moléculaire, leur énergie se dissipe sous forme de chaleur selon la réaction :



Cette réaction ne se passe cependant pas en une seule étape dans la mitochondrie : elle est décomposée par des complexes protéiques successifs, constitués de capteurs d'électrons de plus en plus oxydants, qui expulsent des protons matriciels dans l'espace intermembranaire lors du passage des électrons (voir figures 1.7 et 1.8). Une partie de cette énergie est donc récupérée et convertie sous forme d'un gradient de concentration en protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne.

Le complexe I (*NADH : ubiquinone oxydoréductase*) fixe le NADH matriciel, l'oxyde et relargue le NAD⁺ (voir figure 1.9). Ce complexe multimérique contient chez les mammifères 43 sous-unités différentes dans des proportions non encore déterminées. En particulier, le monomère de 900 kDa renferme une flavine mononucléotide (FMN), sept ou

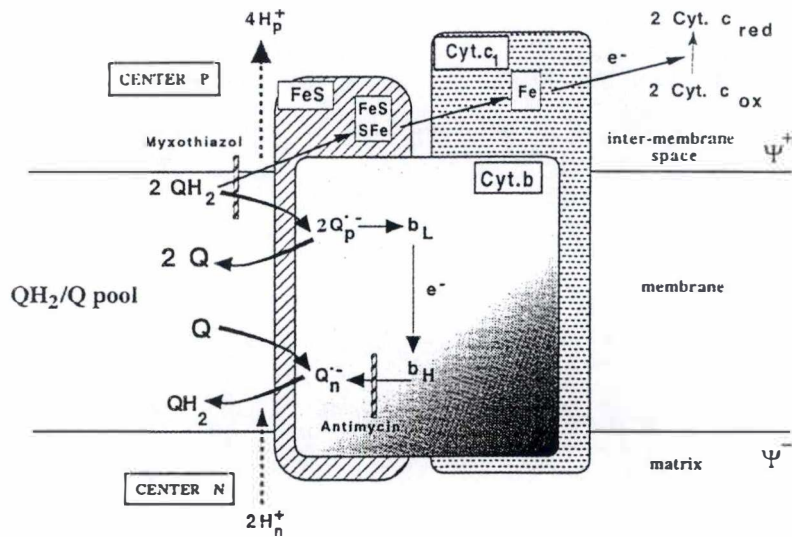


Fig. 1.11: Schéma de la structure des trois sous-unités catalytiques du complexe III (ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase). L'ubiquinol (QH_2) transfère au niveau du centre P son premier électron au centre à Fe-S de Rieske, qui le cède ensuite au cytochrome c_1 puis au cytochrome c. Le deuxième électron réduit les groupements hémiques b_L et b_H du cytochrome b, avant d'être capté par une molécule d'ubiquinone au centre N (formation d'un radical semi-quinone). Deux transferts d'électrons au centre P sont nécessaires pour réduire complètement une ubiquinone au centre N. Le transport de 2 électrons par ce complexe s'accompagne de l'expulsion de 4 H^+ dans l'espace intermembranaire. Le myxothiazol inhibe le transfert d'électrons au centre P, et l'antimycine empêche l'oxydation de l'hème b_H . (D'après Brasseur G., 1999.)

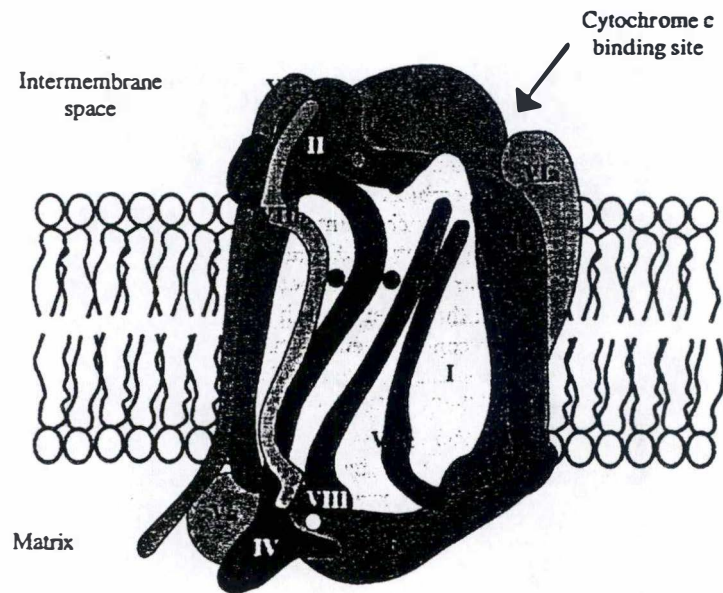


Fig. 1.12: Schéma de la structure du complexe IV (cytochrome c oxydase). L'électron apporté par le cytochrome c passe d'abord par le centre CuA, puis par l'hème du cytochrome a et enfin l'hème du cytochrome a_3 -CuB, où se trouve le site de réduction de l' O_2 . Le transport de 2 électrons par ce complexe s'accompagne de l'expulsion de 3 ou 4 H^+ dans l'espace intermembranaire. Les sous-unités peptidiques du complexe sont représentées par des chiffres romains. (Adapté d'après Tsukihara, 1996.)

huit centres à Fe-S et trois molécules de type quinone, qui transportent successivement les électrons du NADH à travers le complexe I jusqu'à une molécule d'ubiquinone qui, grâce à sa chaîne hydrocarbonée, peut diffuser dans la membrane jusqu'au complexe suivant.

Le complexe II (*succinate : ubiquinone oxydoréductase*) prend deux électrons au succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs, pour les céder directement à une FAD (*flavine adénine dinucléotide*), liée par covalence à l'un des peptides composant ce complexe (figure 1.10). Après passage par des centres à Fe-S, ces électrons sont repris par l'ubiquinone, et ceci est donc une voie alternative (qui ne pompe pas de protons) du transfert électronique par le complexe I.

Le troisième complexe (*ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase*) comprend onze éléments, dont seulement trois sous-unités fonctionnelles : le cytochrome b, le cytochrome c_1 et le centre à Fe-S de Rieske (Fe_2-S_2) (figure 1.11). Puisque ceux-ci ne peuvent capter qu'un seul électron à la fois, il existe deux voies de transport des électrons à travers le complexe III : l'ubiquinol, soluble et mobile dans la MMI, donne un premier électron au centre de Rieske, qui le lègue au cytochrome c_1 puis au cytochrome c (dans l'espace intermembranaire), tandis que l'autre électron est capté par le groupement hémique du cytochrome b puis rendu à l'ubiquinone pour former un radical semi-quinone associé au complexe. Ce radical peut alors, au cycle suivant, recevoir un deuxième électron du cytochrome b et fournir une molécule d'ubiquinol entièrement réduite, qui peut à son tour donner ses électrons au centre de Rieske d'une part et au cytochrome b d'autre part.

Le complexe IV (*cytochrome c oxydase*) marque l'étape finale du transport des électrons en oxydant le cytochrome c sur la face externe de la MMI et en donnant ses électrons à l'oxygène. A l'intérieur du complexe, constitué de treize sous-unités, les électrons passent du cytochrome a au cytochrome a_3 , qui contient le site de réduction de l' O_2 (figure 1.12).

En conclusion, l'oxydation d'une molécule de NADH, et donc le transfert de deux électrons par ces différents complexes, s'accompagne (sauf pour le complexe II) de la translocation de trois ou quatre H^+ matriciels vers l'espace intermembranaire, générant un gradient de concentration en H^+ et, donc, un potentiel électrochimique mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (de l'ordre de 180 mV) ainsi qu'une différence de pH (ΔpH) entre la matrice et l'espace intermembranaire (Dimroth et al., 2000).

1.3.2.1.2 Les dérivés réactionnels de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species)

Tous les électrons du NADH n'aboutissent cependant pas à l'oxygène après avoir transité par les complexes respiratoires : une partie de ces électrons (3% au moins) est cédée

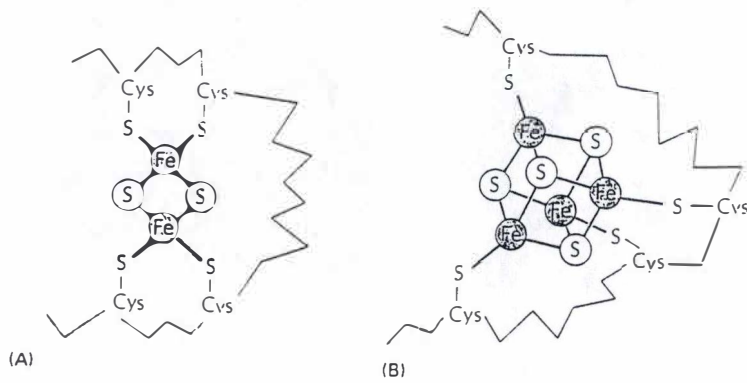


Fig. 1.13: Structure des centres à fer et à soufre (centres Fe-S). (A) Centre à 2 atomes de Fe et 2 atomes de S. (B) Centre à 4 atomes de Fe et 4 atomes de S. Ces centres, présents dans les complexes respiratoires I, II et III, peuvent transporter un seul électron à la fois. Ils sont coordonnés par certains résidus cystéines des sous-unités peptidiques du complexe. (D'après Alberts B., 1998.)

directement à l'oxygène au niveau du complexe I et de l'ubiquinol, avec pour résultat une production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), et ce même en conditions normales. Ces radicaux libres sont détoxifiés par de nombreuses enzymes mitochondriales, comme la *superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD)* ou cytoplasmiques (*Cu-SOD* ; *GSH peroxydase* : *glutathione peroxydase* ; *catalase*).

Ces ROS semblent jouer, au-delà de leur potentiel destructeur, divers rôles dans la cellule, notamment en tant que messenger suite à une altération mitochondriale (Suzuki et al., 1998). Le rôle des ROS dans la régulation de l'expression génique a été revu par Allen et Tresini (Allen and Tresini, 2000). Parmi les gènes sensibles aux conditions redox de la cellule, mentionnons les gènes codant pour la ferritine, la collagénase MMP-1 et l'interleukine-10 (IL-10). Leur expression passe par l'activation de nombreux facteurs de transcription tels que Myb, Egr-1 et plusieurs proto-oncogènes tels que *Jun-B*, *Jun-D*, *c-fos* et *fos-B*. Une littérature abondante existe également sur la liaison, l'activation et la stabilisation par les ROS des facteurs NF- κ B, AP-1 et HIF-1 α (Chandel et al., 2000), ainsi que sur la régulation par les ROS de nombreuses kinases et phosphatases en amont de ces facteurs (Allen and Tresini, 2000).

D'autre part, il a été montré qu'une déficience mitochondriale, engendrée par l'absence de protéines codées par l'ADNmt, entraîne une élévation de la quantité de l'ARNm de la GSH peroxydase, ainsi que de son activité (Brambilla et al., 1997). De plus, chez des patients atteints d'une déficience pour les protéines du complexe I, la sévérité de la déficience est corrélée à une augmentation de la production de radicaux $O_2^{\cdot-}$ et à l'induction des ARNm de la Mn-SOD (Pitkanen and Robinson, 1996). Les radicaux libres produits par la mitochondrie sont donc de bons candidats participant la communication moléculaire entre la mitochondrie et le noyau.

Cependant, les ROS contribuent chroniquement à des phénomènes comme le vieillissement ou certaines maladies car ils interfèrent avec certains processus physiologiques – ils diminuent par exemple l'activité des complexes I, II, III et IV en réagissant avec les protéines à Fe-S ou par d'autres mécanismes. Par ailleurs, l'aconitase (enzyme du cycle de Krebs) possède également un centre à Fe-S, ce qui contribue aussi à la diminution de la production d'énergie (Paradies et al., 2000). La structure des centres à Fe-S est présentée à la figure 1.13.

1.3.2.1.3 L'ATP synthase

Les protons accumulés dans l'espace intermembranaire retournent dans la matrice sous l'action conjuguée de deux forces : leur gradient de concentration et le potentiel de membrane

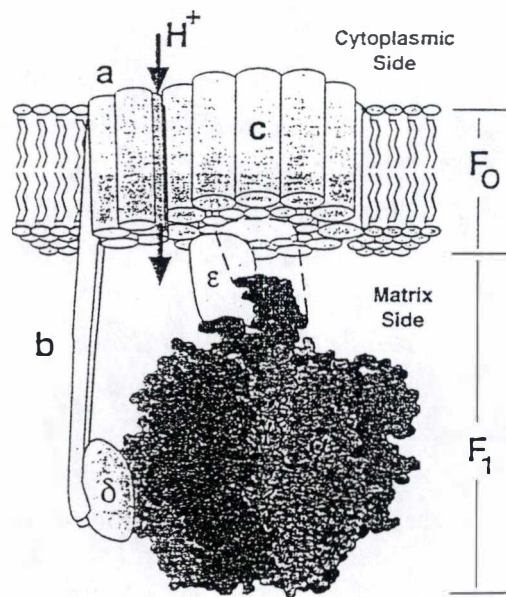


Fig. 1.14: Schéma de la F₀-F₁-ATP synthase. Le retour des H⁺ dans la matrice selon leur gradient électrochimique entraîne la rotation des protéines c de la partie transmembranaire F₀. Cette énergie de rotation est transmise à la sous-unité γ de la partie F₁ de l'ATP synthase, puis stockée dans le dernier groupement phosphate d'un ATP (réaction catalysée par les sous-unités β de la F₁-ATP synthase). (D'après Saraste M., 1999.)

mitochondrial (négatif sur la face interne de la MMI). Mais, en raison de l'imperméabilité de cette membrane, ils doivent emprunter un passage obligé qu'est l'ATP synthase.

Parfois appelé complexe V, l'ATP synthase est une enzyme fonctionnellement réversible qui peut tirer parti du gradient de H^+ pour phosphoryler l'ADP. Elle possède une première partie transmembranaire F_0 , non catalytique, qui peut capter des protons à l'extérieur de la matrice et les renvoyer à l'intérieur. Ce passage de protons s'accompagne d'une rotation de la partie F_0 et cette énergie de rotation, constituant l'ultime conversion énergétique avant le stade ATP, est transmise à la sous-unité γ de la partie catalytique F_1 (rotor), qui est flanquée de trois sous-unités α et trois sous-unités β matricielles. Ces dernières sous-unités comportent le site où l'ADP est fixé et phosphorylé. Ensuite, l'ATP formé est largué dans la matrice mitochondriale, puis exporté vers le cytoplasme par un échangeur ATP/ADP présent en membrane interne (Saraste, 1999). Un schéma de la F_0 - F_1 -ATP synthase est montré à la figure 1.14.

1.3.2.1.4 L'adénine nucléotide translocase (ANT)

L'ANT est un *carrier* qui échange un ATP^{4-} contre un ADP^{3-} – ce qui assure un équilibre entre la production et la consommation de l'énergie.

Cette protéine (l'une des plus abondantes de la membrane interne) est représentée chez l'homme par trois isoformes, codées par trois gènes différents et possédant une grande homologie de séquence entre elles. L'ANT1 est spécifiquement exprimé dans le cœur et les muscles squelettiques, alors que l'ANT3 est ubiquiste. Ces deux isoformes ont pour rôle de transloquer l'ATP provenant du métabolisme oxydatif dans le cytoplasme, tout en recyclant l'ADP dans la mitochondrie. Par contre, le gène de l'ANT2 semble peu ou pas exprimé, mais il est induit dans des cellules transformées ou tumorales, ainsi que dans des cellules dépourvues d'ADNmt (cellules Rho^o). Il a été suggéré que, dans ces cellules, le rôle de l'ANT2 serait de fournir à la mitochondrie l'ATP issu de la glycolyse (Giraud et al., 1998). L'activité de l'ANT peut être inhibée en utilisant des molécules telles que l'atractyloside et l'acide bongkrélique.

Le contrôle de l'expression de l'ANT2 a été étudié au niveau du promoteur proximal de ce gène. Il apparaît que ce promoteur contient cinq sites de fixation pour le facteur de transcription Sp1 : quatre boîtes activatrices en amont du *transcription start* (+1) et une boîte proche de ce nucléotide +1. La liaison de Sp1 à cette dernière boîte (*box C*) empêche la transcription de l'ANT2 et a donc un rôle suppresseur (Li et al., 1996).

Il semble également qu'un second facteur de transcription, AP-2 (*Activating Protein-2*) intervienne dans la régulation de l'expression du gène de l'ANT2, puisque son promoteur

Transcription factor and target genes	Reference
NRF-1	
rat somatic cytochrome <i>c</i>	(Evans and Scarpulla, 1989, 1990)
human somatic cytochrome <i>c</i>	(Evans and Scarpulla, 1990)
human ubiquinone binding protein	(Evans and Scarpulla, 1990)
human core protein I	(U. Brandt, personal communication)
mouse cytochrome oxidase subunit Vb ^a	(Virbasius <i>et al.</i> , 1993a)
rat cytochrome oxidase subunit Vb ^a	(Bachman <i>et al.</i> , 1996)
human/primate cytochrome oxidase subunit Vb ^a	(Bachman <i>et al.</i> , 1996)
rat cytochrome oxidase subunit VIc	(Evans and Scarpulla, 1990)
bovine cytochrome oxidase subunit VIIaL ^a	(Seelan <i>et al.</i> , 1996)
bovine ATP synthase γ -subunit	(Chau <i>et al.</i> , 1992)
mouse MRP RNA	(Evans and Scarpulla, 1990)
human MRP RNA	(Evans and Scarpulla, 1990)
human mitochondrial transcription factor A ^a	(Virbasius and Scarpulla, 1994)
rat 5-aminolevulinatase synthase	(Braidotti <i>et al.</i> , 1993)
NRF-2 (GABP)	
rat cytochrome oxidase subunit IV	(Virbasius and Scarpulla, 1991)
mouse cytochrome oxidase subunit IV	(Carter <i>et al.</i> , 1992)
mouse cytochrome oxidase subunit Vb ^a	(Virbasius <i>et al.</i> , 1993b)
rat cytochrome oxidase subunit Vb ^a	(Bachman <i>et al.</i> , 1996)
human/primate cytochrome oxidase subunit Vb ^a	(Bachman <i>et al.</i> , 1996)
bovine cytochrome oxidase subunit VIIaL ^a	(Seelan <i>et al.</i> , 1996)
human ATP synthase β -subunit	(Virbasius <i>et al.</i> , 1993b; Villena <i>et al.</i> , 1994)
human mitochondrial transcription factor A ^a	(Virbasius and Scarpulla, 1994)
mtTFA	
human/mouse mitochondrial heavy strand promoter	(Fisher <i>et al.</i> , 1987, 1989)
human/mouse mitochondrial light strand promoter	(Fisher <i>et al.</i> , 1987, 1989)
mTERF	
human mitochondrial transcription terminator	(Cooper <i>et al.</i> , 1993)
OXBOX/REBOX^b	
human adenine nucleotide translocator muscle isoform	(Chung <i>et al.</i> , 1992; Haraguchi <i>et al.</i> , 1994)
human ATP synthase β -subunit	(Chung <i>et al.</i> , 1992; Haraguchi <i>et al.</i> , 1994)
Mt Element Binding Proteins^b	
human ubiquinone binding protein	(Suzuki <i>et al.</i> , 1990)
human cytochrome <i>c</i> ₁	(Suzuki <i>et al.</i> , 1990)
human ATP synthase β -subunit	(Suzuki <i>et al.</i> , 1990)
rat somatic cytochrome <i>c</i>	(Suzuki <i>et al.</i> , 1990)
human mitochondrial D-loop	(Suzuki <i>et al.</i> , 1995)
MEF-2/E-box	
mouse cytochrome oxidase subunit VIaH	(Wan and Moreadith, 1995)
rat cytochrome oxidase subunit VIII	(Lenka <i>et al.</i> , 1996)

^a Genes contain functional recognition sites for both NRF-1 and NRF-2.

^b Defined as DNA binding activities only.

Fig. 1.15: Liste reprenant quelques facteurs de transcription impliqués dans l'expression de protéines de la chaîne respiratoire. (D'après Scarpulla R. C., 1999)

contient (en plus d'un site *Glycolytic Regulated-Box* ou *GRBOX* : boîte de séquence 5'-CATTGTT -3' sensible à l'activation de la glycolyse) deux *AP-2-response elements* (*AP-2-RE*), dont un recouvre partiellement la *box C* susmentionnée (Li et al., 1999). Lorsqu'AP2 se lie à cette boîte, il contre l'effet répresseur de Sp1 sur la *box C* et active la transcription de l'ANT2. Il est donc possible que le ratio AP-2/Sp1 influence en partie l'expression de ce transporteur.

A propos de Sp1, on peut également signaler d'une manière plus générale qu'il joue un rôle important dans l'expression de nombreux gènes liés aux phosphorylations oxydatives, puisque l'on retrouve plusieurs séquences consensus pour Sp1 dans les promoteurs proximaux de gènes comme le cytochrome c_1 , le mtTFA et la β -F₁-ATPase (Zaid et al., 1999). Une liste des principaux facteurs de transcription contrôlant l'expression de protéines de la chaîne respiratoire est présentée à la figure 1.15.

1.3.2.1.5 *Inhibiteurs de la respiration mitochondriale*

Nous avons vu que les phosphorylations oxydatives sont des processus complexes, nécessitant plusieurs étapes et faisant intervenir un grand nombre de protéines et de cofacteurs. Ce processus peut donc être inhibé à de multiples niveaux par différentes molécules, dont les actions diverses concourent à un effet commun : l'inhibition de la production d'ATP. Cependant, de par leur mécanisme d'action sur les phosphorylations oxydatives, chaque inhibiteur peut aussi avoir des effets secondaires non spécifiques sur différents paramètres mitochondriaux comme l'arrêt ou non de la chaîne de transporteurs d'électrons, la production ou non de ROS, la diminution ou l'augmentation du $\Delta\Psi_m$, etc.

1.3.2.1.5.1 Inhibiteurs des transporteurs d'électrons

Le complexe I peut être inhibé par un grand nombre de molécules à caractère hydrophobe, possédant une structure qui permet l'interaction avec le site de fixation de l'ubiquinone et, donc, la compétition avec celle-ci. Ce type d'inhibition est causé par des molécules telles que l'amytal, la roténone ou la piéricidine. Le MPP⁺ est, quant à lui, dérivé du MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). Cette molécule, lorsqu'elle est métabolisée spécifiquement par une enzyme des neurones dopaminergiques, s'accumule dans les mitochondries et inhibe l'activité du complexe I. Le MPP⁺ est utilisé dans les modèles d'étude de la maladie de Parkinson, également caractérisée par une déficience dans l'activité du complexe I (Han et al., 1999).

Certains inhibiteurs agissent sur le complexe II, également en empêchant la liaison de l'ubiquinone (carboxanilides, 2-alkyl-4,6-dinitrophénol). Les peptides β -amyloïdes, présents dans les plaques séniles des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, peuvent aussi inhiber l'activité de la succinate déshydrogénase.

Parmi les inhibiteurs du complexe III, on peut citer la mucidine et la stigmatelline, qui bloquent l'oxydation de l'ubiquinol issu du complexe I ou II, ou la funiculosine et l'antimycine, qui se lient au cytochrome b, près de son noyau hémique, et empêchent son oxydation par l'ubiquinone.

L'inhibition du complexe IV peut se produire au niveau du cytochrome a_3 , dernier accepteur d'électron avant l' O_2 . L'hème de ce cytochrome contient un atome de fer, coordonné par les quatre azotes du noyau tétrapyrrolique et par une histidine, ce qui laisse une coordination libre et, donc, une poche pour recevoir l' O_2 ou un inhibiteur tel que le CO, le CN^- ou le NaN_3).

1.3.2.1.5.2 Inhibiteurs de l'ATP synthase

Certaines molécules interfèrent avec la liaison de l'ADP à la sous-unité β de la F_1 -ATP synthase, comme l'aurovertine, tandis que d'autres empêchent la translocation de protons à travers la partie F_0 de l'ATP synthase (oligomycine, DCCD : dicyclohexylcarbodiimide).

1.3.2.1.5.3 Agents découplants

Parmi les molécules qui entravent les phosphorylations oxydatives en perméabilisant la membrane interne aux protons, on retrouve des inhibiteurs tels que le FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoro methoxy phenylhydrazone). Ces agents découplants sont des acides faibles hydrophobes qui agissent, à forte concentration, comme protonophores et dissipent le potentiel de membrane mitochondrial. L'énergie que les protons libèrent en retournant dans la matrice se dissipe alors entièrement sous forme de chaleur. A côté de ces protonophores, les cations divalents comme le $Cu(OP)_2$, le cristal violet, le Ca^{2+} et le Cd^{2+} ont également un effet découplant qui se marque par une accélération de la respiration (Shinohara et al., 1998).

Il existe par ailleurs des protéines qui découplent naturellement les mitochondries et qui jouent un rôle crucial dans la thermorégulation : les *UCP* (*uncoupling proteins*). Ces protéines inductibles permettent elles aussi le retour des protons vers la matrice mitochondriale et la libération de l'énergie sous forme de chaleur. Trois isoformes ont été décrites chez les mammifères. L'UCP2 est ubiquiste, tandis que l'UCP3 n'est exprimée que dans le muscle

squelettique et l'UCP1 n'est présent que dans le tissu adipeux brun des mammifères. L'induction de l'expression des UCP suit la demande de production de chaleur (exposition au froid...) mais est aussi observée dans la fièvre. La régulation de l'expression ces UCP dépend de plusieurs facteurs ; ainsi, le GDP (guanosine monophosphate) inhibe l'expression d'UCP1 alors que les acides gras l'induisent. D'autre part, les UCP2 peuvent être induites par l'acide rétinoïque (Rial et al., 1999). PGC-1 est un co-activateur récemment cloné et impliqué dans la thermorégulation à travers le contrôle de l'expression de l'UCP2. En effet, ce facteur de transcription est capable d'induire l'expression du facteur de transcription NRF-1 (*Nuclear Respiratory Factor-1*). Ces deux facteurs (PGC1 et NRF-1) induisent ensuite la transcription du gène de l'UCP2 (Wu et al., 1999).

1.3.2.2 L'oxydation des acides gras

Les acides gras constituent un combustible de choix pour les mitochondries. Avant de pouvoir entrer dans cet organe, l'acide gras est activé : il se lie à une molécule de coenzyme A par un lien thioester (cette réaction consomme l'énergie de deux liens phosphate), et peut ensuite traverser la membrane interne en s'associant à un transporteur tel que la carnitine. Une fois dans la mitochondrie, l'acyl-CoA est oxydé par des enzymes matricielles, tout en réduisant un FAD et un NAD⁺ à chaque cycle, qui cèdent leurs électrons aux complexes respiratoires. Le résultat de cette oxydation est la fragmentation de la chaîne hydrocarbonée des acides gras en de multiples molécules d'acétyl-coenzyme A, lesquelles peuvent alimenter le cycle de Krebs.

Tout ceci aboutit donc à une production d'énergie très importante, ce qui explique que les acides gras représentent la source énergétique principale pour certains organes à activité intense, comme le cœur.

1.3.2.3 Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie du calcium

Le calcium est un messager secondaire universel capable de réguler certaines voies de transduction dépendantes du calcium. En effet, souvent après fixation par la calmoduline (CaM), le calcium peut réguler la fonction de diverses protéines CaM-dépendantes : canaux ioniques, kinases, phosphatases, adénylate cyclases, phosphodiesterases... Sa concentration cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) est maintenue à environ 100 nM pour un bon fonctionnement de la cellule au repos. Elle augmente lors d'une stimulation suite à l'ouverture de canaux ioniques de la membrane plasmique et/ou du réticulum endoplasmique (RE).

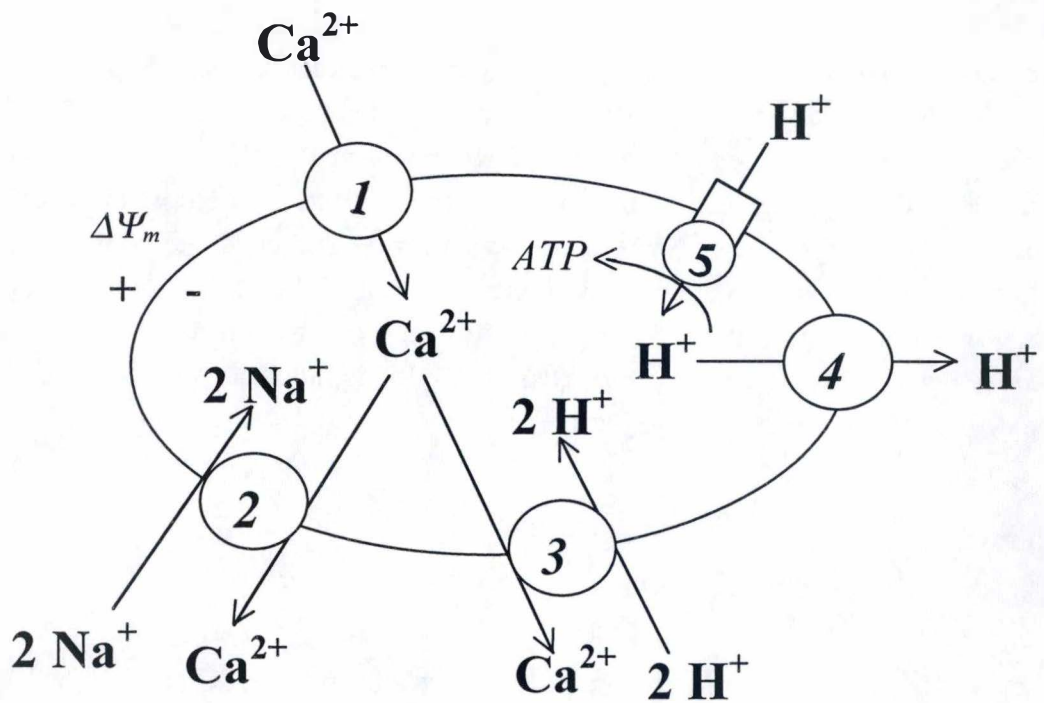


Fig. 1.16: Transports cationiques à travers la membrane mitochondriale interne. Le calcium entre dans la mitochondrie par diffusion facilitée *via* un uniporteur (1). Son expulsion active se fait par un antiport $\text{Ca}^{2+}/2 \text{Na}^+$ (2) ou $\text{Ca}^{2+}/2 \text{H}^+$ (3). Les H^+ sont pompés hors de la matrice mitochondriale sous l'action de la chaîne de transporteurs d'électrons (4), puis retournent dans la matrice à travers la $\text{F}_0\text{-F}_1\text{-ATP}$ synthase (5).

Cependant, l'effet du calcium sur les protéines cytosoliques ou nucléaires dépend de la cinétique des canaux qui le transportent ; ainsi, des pics de calcium brefs ou de fréquence faible n'augmentent la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ que localement (là où il est libéré), et son effet s'arrête alors aux protéines cibles proches de cette région. Au contraire, une entrée de calcium soutenue dans le temps ou des pics de fréquence élevée permettent à la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ de s'uniformiser dans le cytoplasme et dans le noyau. A ce moment, le complexe calcium/calmoduline exercera également ses effets modulateurs sur les protéines nucléaires (Teruel et al., 2000).

1.3.2.3.1 Transports calciques mitochondriaux

De plus en plus, la mitochondrie apparaît comme un acteur dans la régulation de la réponse calcique, et ceci suppose qu'elle est capable de transporter sélectivement cet ion à travers sa membrane interne (MMI). La figure 1.16 représente schématiquement les différents transporteurs cationiques mitochondriaux responsables des influx et des efflux calciques.

Le calcium entre dans la mitochondrie par un uniport, qui facilite son transport dans le sens de son gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$ négatif sur la face interne de la MMI) (Carafoli, 1987). Cette accumulation de calcium peut être rapide si la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ augmente brusquement, et la mitochondrie semble donc déjà fonctionner comme un *tampon* pour le calcium dans les régions cytoplasmiques où sa concentration augmente. Ensuite, la mitochondrie peut renvoyer le calcium lentement vers le cytoplasme, *via* un antiporteur non électrogène qui échange un ion Ca^{2+} contre deux ions Na^+ ou H^+ (Gunter and Pfeiffer, 1990) (Packer, 1994). En conditions normales, ces systèmes assurent un équilibre entre l'influx et l'efflux de calcium dans la mitochondrie, et sont donc responsables du cycle continu du calcium à travers cet organite (voir figure 1.16).

Mentionnons encore que le calcium peut également sortir de la mitochondrie en conditions oxydantes par le PTP (*Permeability Transition Pore*), puisque celui-ci peut être ouvert après exposition aux des radicaux libres (Reichman et al., 1994) (Crompton and Costi, 1990). Un stress oxydatif résulte donc en une élévation soutenue de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

1.3.2.3.2 Microdomaines à haute concentration calcique

Le système d'entrée du calcium dans la mitochondrie possède une affinité faible, si bien que les $[Ca^{2+}]_{cyt}$ normales ne peuvent suffire à accumuler cet ion dans cet organite. Toutefois, suite à une stimulation cellulaire, la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ augmente rapidement dans des zones localisées (près de la membrane plasmique et du RE), et les mitochondries proches de ces régions sont alors exposées à ces $[Ca^{2+}]_{cyt}$ suffisamment élevées pour l'internaliser. L'effet « tampon » des

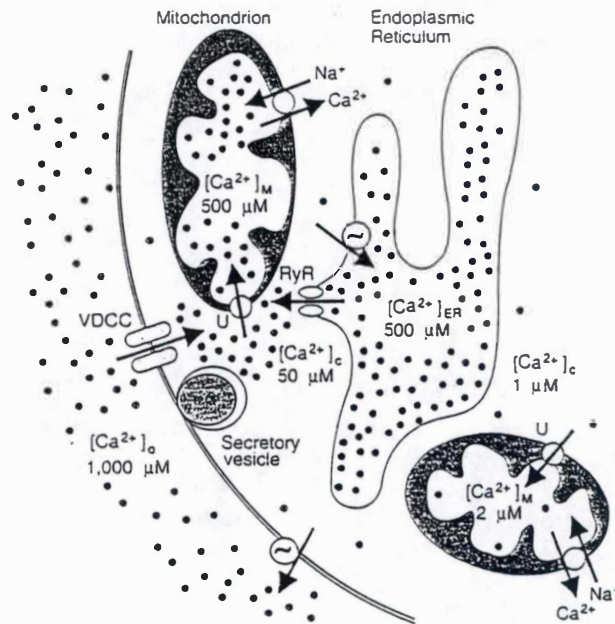


Fig. 1.17: Rôle de la mitochondrie dans les flux calciques en association avec la membrane plasmique (MP) et le reticulum endoplasmique (RE) dans des cellules neuronales chromaffines bovines. Suite à l'ouverture du *voltage-dependent Ca^{2+} channel (VDCC)*, la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ s'élève et provoque la libération de Ca^{2+} par le RE via les récepteurs à ryanodine (RyR). Les mitochondries proches sont alors exposées à des $[Ca^{2+}]_{cyt}$ très fortes et l'accumulent dans leur matrice par diffusion, facilitée grâce à l'uniporteur (U). Le retour du calcium dans le cytosol se fait par un échange contre $2 Na^+$. (D'après Montero M., 2000.)

mitochondries sur la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ne semble donc s'exercer qu'au niveau de ces microdomaines à haute concentration calcique, et ceci se produit *avant* que la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (qui ne dépasse pas 2 ou 3 μM) ne devienne uniforme dans le cytoplasme. Les mitochondries accumulent donc le calcium à certains endroits de la cellule, suite à une stimulation et en fonction de leur répartition, jusqu'à des concentrations de l'ordre de 5 à 20 μM . Ensuite, après une ou deux minutes, la $[Ca^{2+}]_{mi}$ diminue sous l'action d'un antiporteur.

Cependant, il a été montré que dans des cellules chromaffines neuronales bovines, cette $[Ca^{2+}]_{mi}$ peut monter jusqu'à 500 μM , et même 800 μM , suite à une stimulation (Montero et al., 2000). De plus, ces auteurs ont montré qu'en bloquant l'entrée de calcium dans la mitochondrie, on favorise nettement le processus d'exocytose, ce qui pousse à croire que la mitochondrie peut réguler la sécrétion dans les neurones en contrôlant la disponibilité en calcium dans le cytoplasme (Montero et al., 2000) (voir figure 1.17).

Il semble donc que, lors d'une activation cellulaire, des microdomaines à haute $[Ca^{2+}]_{cyt}$ sont générés par l'activité de canaux calciques, et que les mitochondries proches de ces canaux sont les premières à pouvoir accumuler cet ion. Les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ sont donc hétérogènes, et la $[Ca^{2+}]_{mi}$ dépend de la proximité des mitochondries par rapport à une source de calcium¹. Une fois dans la matrice mitochondriale, le calcium peut activer certaines enzymes du métabolisme énergétique, notamment la pyruvate déshydrogénase (*PDH*). La mitochondrie peut donc, grâce à cette entrée de calcium, anticiper les demandes énergétiques requises, par exemple, lors de la sécrétion ou de la contraction musculaire qui suivent l'élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Enfin, le relargage actif du calcium vers le cytoplasme permet d'en prolonger l'effet sur les processus Ca^{2+} -dépendants, ainsi que de régénérer les stocks calciques intracellulaires.

Toutes ces informations concernent le cas d'une accumulation transitoire de calcium par la mitochondrie, couplée à une stimulation du métabolisme oxydatif et à une diminution locale et rapide de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Cependant, on peut également imaginer que la mitochondrie soit capable de réguler la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans l'autre sens, c'est-à-dire en provoquant son augmentation. Ceci peut être rendu possible en favorisant le système d'efflux calcique ou en inhibant son influx (Biswas et al., 1999).

La mitochondrie semble donc, au vu de ces considérations, participer activement aux flux de calcium dans la cellule (en tamponnant par exemple des $[Ca^{2+}]_{cyt}$ fortes et éventuellement délétères) et contrôler par la même occasion certains processus cellulaires, comme la sécrétion de neurotransmetteur par les neurones ou encore la disponibilité en ATP dans les myocytes en contraction.

¹ La découverte de l'existence d'un *reticulum mitochondrial*, structure qui relie la plupart des mitochondries dans une cellule par un système de tubules, et de son association étroite *synaptic-like* avec le *reticulum endoplasmique (RE)*, permet d'imaginer comment une libération de calcium par le RE engendre des augmentations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ *directement* tamponnées par le réseau mitochondrial.

1.3.2.4 Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

Etant donné que ni l'apoptose ni la nécrose n'entre dans la problématique de ce travail, nous ne développerons pas ce sujet dans les détails. Toutefois, vu l'importance des recherches dans ce domaine, nous nous devons de décrire brièvement l'état actuel de la vision de la mitochondrie dans le contrôle de la mort cellulaire par apoptose. De manière générale, on peut diviser le phénomène de mort cellulaire par apoptose et dépendante de la mitochondrie en trois phases distinctes :

- * une phase d'*initiation* au cours de laquelle les effecteurs moléculaires agissent pour modifier la perméabilité des membranes mitochondriales.

- * une deuxième phase de *décision*, caractérisée par une augmentation de la perméabilité membranaire soit à travers le *PTP* (*Permeability Transition Pore*), soit par un autre mécanisme.

- * une phase de *dégradation* dans laquelle la libération de protéines normalement associées à la mitochondrie conduit à l'activation de protéases (caspases) et de nucléases. Cette phase de dégradation caractérise souvent la perte irréversible de fonctions vitales pour la cellule.

L'augmentation de la perméabilité de la MME résulte en la libération de protéines normalement confinées à l'espace intermembranaire de l'organite telles que le cytochrome c, certaines pro-caspases, l'adénylate kinase-2 (AK-2) et l'AIF (apoptosis-inducing factor).

L'augmentation de la perméabilité de la MMI lors de l'apoptose est sélective pour des solutés de taille inférieure à 1500 Da et se manifeste souvent par une dissipation du gradient de protons et d'une diminution du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$).

Si les différentes études s'accordent à dire que l'apoptose cellulaire médiée par une participation mitochondriale implique une augmentation de la perméabilité membranaire mitochondriale (MMI et/ou MME) libérant des protéines qui activent la voie des caspases, les mécanismes régulant ces processus sont encore méconnus et souvent controversés. De plus, les molécules pro-et anti-apoptotiques de la superfamille Bcl2, qui possèdent une certaine homologie de structure avec les toxines bactériennes formant des pores dans les membranes, peuvent balancer l'équilibre vers l'apoptose ou la survie cellulaire en fonction des interactions spécifiques entre ces partenaires et/ou des protéines de membranes mitochondriales (pour une revue récente ; (Kroemer and Reed, 2000)).

La mitochondrie apparaît donc comme un organite possédant une structure développée et assurant de nombreuses fonctions vitales pour la cellule. La structure unique de cet organite entouré d'une double membrane et possédant son propre génome permet également de

comprendre pourquoi la mitochondrie doit impérativement *communiquer* avec le reste de la cellule. De plus, la phosphorylation oxydative est un processus complexe qui se caractérise par un rendement élevé par rapport au métabolisme glycolytique, et dont le déroulement peut être interrompu à de multiples étapes. Un dysfonctionnement mitochondrial peut en effet être responsable ou associé à de nombreuses maladies. Nous allons donc maintenant passer quelques-unes de ces maladies en revue.

1.4 LES MALADIES MITOCHONDRIALES

Nous pouvons dresser une rapide classification des maladies mitochondriales, car ce terme recouvre en fait une multitude de syndromes dont les origines, quand elles sont comprises, sont souvent très différentes. Ainsi, on distingue les pathologies mitochondriales *héritées* et *acquises*. La première catégorie regroupe des dysfonctionnements mitochondriaux engendrés par une mutation ponctuelle (ou une délétion) dans l'ADN nucléaire ou mitochondrial, comme les encéphalopathies et les myopathies décrites brièvement dans ce chapitre. Par la suite, nous regrouperons *mutation ponctuelle* et *délétion* sous le terme de *réarrangement de l'ADN* ; ceci exclut donc les réarrangements de type *amplification*, *transposition*, etc. Parmi les pathologies acquises associées à un dysfonctionnement mitochondrial, on retrouve des maladies résultant par exemple d'une ischémie, du contact avec un agent exogène toxique capable d'inhiber un complexe des phosphorylations oxydatives, ou encore d'une mutation somatique dans l'ADNmt (Wallace, 1999).

Un dysfonctionnement mitochondrial au niveau des phosphorylations oxydatives, quelle qu'en soit l'origine, résulte en une série de symptômes cliniques. Les études menées sur des patients présentant ces symptômes ont décelé certains des mécanismes responsables de l'apparition de l'une ou l'autre de ces pathologies, regroupées sous le terme de *maladies mitochondriales*, mais nous sommes encore loin d'avoir tout découvert à leur sujet, et en particulier comment les soigner.

Les premières maladies mitochondriales dont les mécanismes moléculaires ont été élucidés il y a plus de dix ans sont la *neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)* et l'*ophtalmoplégie externe progressive chronique (CPEO)*, qui résultent respectivement d'une mutation de type *missense* (Wallace et al., 1988) et d'une délétion (Holt et al., 1988) dans l'ADNmt. Par la suite cependant, de nombreuses autres maladies ont été associées à un dysfonctionnement mitochondrial, provenant d'un réarrangement *soit* dans l'ADN mitochondrial, *soit* dans l'ADN nucléaire codant pour des protéines mitochondriales. On peut remarquer que les maladies associées à un réarrangement de l'ADN mitochondrial sont caractérisées par une *transmission matrilineaire*, alors que celles résultant d'un réarrangement de l'ADN nucléaire sont transmises de façon *mendélienne* au cours des générations.

MALADIE

CARACTERISTIQUES

<i>Ophtalmoplégie externe progressive chronique (CPEO)</i>	Paralysie des muscles oculaires réduisant la mobilité des yeux et myopathie d'origine mitochondriale.
<i>Dystonie</i>	Mouvements anormaux, rigidité musculaire ; souvent dégénérescence des noyaux gris centraux du cerveau.
<i>Syndrome de Kearns-Sayre (KSS)</i>	Paralysie des muscles oculaires et myopathie, associées à des troubles tels que détérioration de la rétine, maladie cardiaque, surdité, diabète et insuffisance rénale.
<i>Syndrome de Leigh</i>	Perte progressive des capacités motrices et verbales et dégénérescence des noyaux gris centraux ; maladie de l'enfance potentiellement mortelle.
<i>Neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)</i>	Cécité temporaire ou permanente due à une lésion du nerf optique.
<i>Encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux (MELAS)</i>	Fonctionnement anormal du tissu cérébral entraînant des crises d'épilepsie, des paralysies locales temporaires et une démence, associées à une myopathie mitochondriale et une acidose du sang.
<i>Epilepsie myoclonique et myopathie mitochondriale (MERRF)</i>	Crises d'épilepsie, détérioration des muscles, qui présentent souvent des « fibres rouges en lambeaux » (<i>ragged-red fibers</i> ou <i>RRF</i>), surdité et démence possibles.
<i>Faiblesse musculaire neurogène, ataxie et rétinite pigmentaire (NARP)</i>	Perte de la force et de la coordination musculaire, accompagnée d'une dégénérescence cérébrale locale et d'une détérioration de la rétine.

Fig. 1 .18: Liste de quelques maladies provoquées par une mutation ou une délétion au niveau de l'ADN mitochondrial et symptômes associés. (D'après Wallace D. C., 1997.)

1.4.1 Réarrangements de l'ADN mitochondrial

L'apparition d'une délétion ou d'une mutation ponctuelle de l'ADNmt dans un tissu homoplasmiqne ne se manifestera que lorsqu'elle se sera suffisamment répandue dans ce tissu pour que le dysfonctionnement mitochondrial qu'elle entraîne dépasse un seuil critique. Il faut remarquer par ailleurs que l'apparition spontanée d'une maladie mitochondriale résultant d'un réarrangement de l'ADNmt est favorisée par le vieillissement – qui s'accompagne, au niveau cellulaire, d'une élévation des taux de mutation et de délétion dans l'ADNmt (Liu et al., 1998).

Une mutation survenant dans l'ADNmt peut toucher un gène codant pour une sous-unité des complexes respiratoires, ce qui conduit à un peptide tronqué (suite à une mutation *nonsense*), à la substitution d'un acide aminé (dans le cas d'une mutation *missense*) ou à une séquence incorrecte (dans le cas d'un *frameshift* généré par la perte d'un ou deux nucléotides). Ces trois situations peuvent provoquer une désorganisation structurelle et fonctionnelle du complexe impliqué et la disruption de la chaîne des transporteurs d'électrons. Le résultat est donc une diminution de la capacité de phosphorylation de l'ADP en ATP, et l'apparition d'une pathologie.

La nature de cette pathologie et ses manifestations symptomatiques dépendront du tissu où se trouve la mutation ; ainsi par exemple, une mutation dans le gène d'une sous-unité des complexes I, II ou III peut résulter en un *mitochondrial diabete mellitus (MDM)* si elle est présente dans l'ADNmt des cellules β des îlots de Langerhans. En effet, la sécrétion d'insuline en conditions normales dépend de l'internalisation du glucose sanguin postprandial dans ces cellules β du pancréas par un transporteur pancréatique (GLUT2), où il sera ensuite phosphorylé par l'hexokinase IV. Cette réaction s'accompagne de la production d'ADP qui, après transport dans la matrice mitochondriale, peut stimuler la synthèse d'ATP. Cette quantité d'ATP accrue pourrait être responsable de la fermeture de canaux K^+ dans la membrane plasmique, et la dépolarisation subséquente conduirait à une entrée massive de calcium dans la cellule, déclenchant la sécrétion d'insuline (pour une revue récente : (Gerbitz et al., 1996)). Cependant, l'activation des hexokinases nécessite leur interaction avec une protéine-pore de la MME, dont la conformation dépend du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (Fiek et al., 1982) (Linden et al., 1982). On comprend alors comment l'inactivation de l'un ou plusieurs de ces complexes respiratoires (et la baisse de $\Delta\Psi_m$ subséquente) peut interférer avec la production d'insuline et engendrer un diabète.

Par ailleurs, une mutation peut également survenir dans un gène codant pour l'un des ARNr (12S et 16S), ce qui peut interférer avec la traduction des transcrits mitochondriaux, ou encore dans un gène de l'un des 22 ARNt mitochondriaux. Ce dernier type de mutation peut empêcher la liaison de l'ARNt à son acide aminé, mais peut aussi changer son anticodon et donc adresser l'acide aminé correspondant à un mauvais codon de l'ARNm. Ces différentes

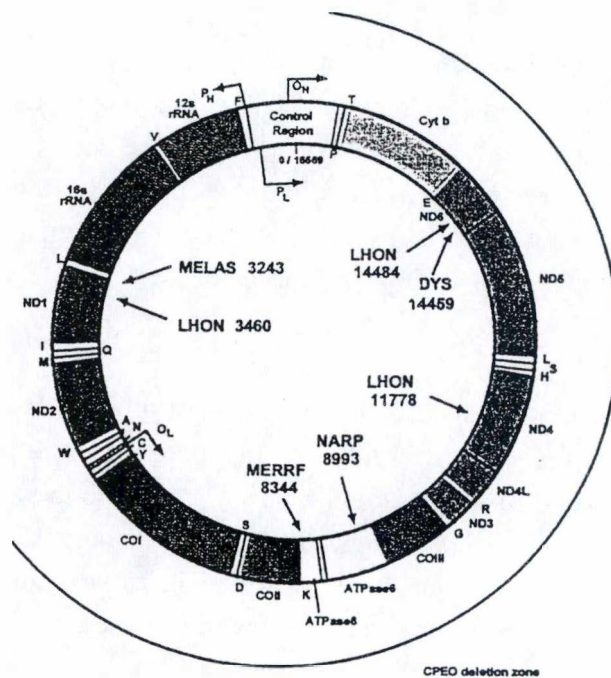


Fig. 1.19: Carte du génome mitochondrial humain, montrant la localisation de certaines mutations pathogéniques : *DYS* (dystonia), *LHON* (Leber's hereditary optic neuropathy), *MELAS* (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), *MERRF* (myoclonic epilepsy and ragged-red fibers), *NARP* (neurogenic muscle weakness, ataxia and retinosis pigmentosa). L'arc de cercle couvre la zone où se produisent des délétions associées à la *CPEO* : chronic progressive external ophthalmoplegia. (D'après Wallace D. C., 1999.)

mutations de l'ADNmt mènent donc les mitochondries atteintes, par différents mécanismes moléculaires, à une incapacité de produire de l'ATP. Ceci a un impact majeur sur les tissus qui consomment beaucoup d'énergie (systèmes cardiaque, musculaire, nerveux, endocrine...), et ces mutations sont donc à l'origine de symptômes cliniques subséquents. Une liste regroupant quelques pathologies causées par des réarrangements de l'ADNmt ainsi que leurs symptômes est présentée à la figure 1.18. La figure 1.19 quant à elle montre, sur une carte de l'ADNmt, la localisation des mutations responsables de différentes maladies mitochondriales.

1.4.2 Réarrangements de l'ADN nucléaire

Toutefois, nous savons maintenant que certaines maladies mitochondriales, associées à une déficience des phosphorylations oxydatives, trouvent leur origine dans un réarrangement de l'ADN nucléaire. En effet, la respiration mitochondriale est assurée par des complexes multimériques résultant de l'assemblage de sous-unités codées par les génomes nucléaire ou mitochondrial. On comprend donc facilement comment une mutation ou une délétion dans l'un de ces gènes nucléaires peut affecter la production d'énergie. De même, les mitoribosomes ne peuvent assurer la traduction des transcrits polycistroniques mitochondriaux qu'en présence d'environ 80 peptides codés par le génome nucléaire et importés dans la mitochondrie. Une mutation dans l'un de ces peptides pourrait, par exemple, entraver la reconnaissance avec les ARNt, ou une autre étape de la traduction. Mais l'origine de ce dysfonctionnement mitochondrial est parfois bien plus subtile, comme c'est le cas dans l'*ataxie de Friedreich*. Cette pathologie découle d'une mutation dans le gène (nucléaire) de la frataxine, dont le rôle est d'expulser le fer hors de la matrice mitochondriale. Cette mutation se manifeste donc par une accumulation de fer dans les mitochondries, ce qui favorise la réaction de Fenton à partir du peroxyde d'hydrogène dont le produit est le radical hydroxyl OH^\bullet . Ce radical, extrêmement réactionnel, inactive les centres à Fe-S présents dans la mitochondrie (dans les complexes I, II et III, ainsi que dans la *cis*-aconitase) et est donc indirectement responsable du déficit en ATP et de la pathologie (Rotig et al., 1997).

Cependant, l'apparition des phénotypes et des symptômes cliniques liés à ces déficiences mitochondriales s'avère bien plus complexe, car une mutation donnée n'est pas associée qu'à un seul ensemble unique de manifestations cliniques : par exemple, la maladie de Leber (LHON) et la dystonie peuvent résulter toutes deux de la substitution d'une guanine par une adénine ($G \rightarrow A$) dans le gène ND6 (en position 14459). L'explication de ce dernier cas n'est pas encore claire ; on a suggéré que la LHON est peut-être associée à un faible pourcentage de mutations, alors qu'au contraire la dystonie apparaîtrait lors d'un pourcentage élevé de mutations (Novotny et al., 1986) (Jun et al., 1994) (Shoffner et al., 1995). De plus, il apparaît qu'une pathologie peut survenir suite à différentes mutations (comme la maladie de Leber (LHON), qui peut apparaître suite à au moins quatre mutations ou substitutions dans l'ADNmt, aux positions 3460, 11778, 14459 et 14484). Ces positions sont toutes incluses

dans le gène d'une sous-unité du complexe I (ND1, ND4 et ND6), ce qui permet de comprendre pourquoi plusieurs mutations différentes sont à l'origine de cette pathologie (LHON).

Toutes ces considérations nous permettent donc d'appréhender la complexité des processus impliqués dans les déficiences mitochondriales et les pathologies associées, et de souligner que les connaissances actuelles dans ce domaine sont encore limitées. De plus, un autre problème se pose au niveau cellulaire: pour que la cellule soit capable de s'adapter à un dysfonctionnement mitochondrial en modifiant son pattern d'expression de gènes et/ou son régime métabolique, elle doit préalablement *percevoir* le changement (tel qu'un dysfonctionnement mitochondrial). Nous nous trouvons donc dans une situation où la mitochondrie, incapable d'assurer la production d'ATP, doit informer le reste de la cellule de son état fonctionnel afin d'aboutir à l'expression de gènes de réponse au stress énergétique. Ceci signifie donc que cette réponse passe par le noyau et l'activation de facteurs de transcription. Ce mécanisme, qui implique une communication moléculaire entre l'organite considéré et le noyau, s'inscrit dans un contexte de *communication rétrograde*, processus permettant une réponse nucléaire intégrée suite à un changement d'état survenu dans un organite. C'est ce concept qui sera développé dans le chapitre suivant, en ne considérant que l'axe mitochondrie/noyau.

1.5 LA COMMUNICATION RETROGRADE

Des expériences déjà anciennes ont montré que la quantité d'ADNmt ou son niveau d'expression affecte l'expression de gènes nucléaires, et également la biogenèse mitochondriale. Un exemple chez *Neurospora crassa* montre que le traitement de cellules par des inhibiteurs spécifiques de la transcription ou de la traduction du génome mitochondrial induit l'ARN polymérase et l'ARNt synthétase mitochondriales, codées par le noyau (Barath and Kuntzel, 1972).

L'expression de certains gènes nucléaires, dont les produits participent ou non aux fonctions mitochondriales, est donc sensible à l'état fonctionnel de la mitochondrie. Ce mécanisme, qui assure une coordination et une communication moléculaire entre ces organites, est communément désigné sous le terme de *communication rétrograde*.

Cette communication implique qu'un signal ou qu'un messager secondaire aboutisse à l'activation de facteurs de transcription capables de moduler l'expression génique. Parmi les candidats possibles capables de jouer le rôle de messager entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau, on retrouve le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Suzuki et al., 1998) (Miranda et al., 1999) et les variations de concentration en calcium cytosolique (Biswas et al., 1999).

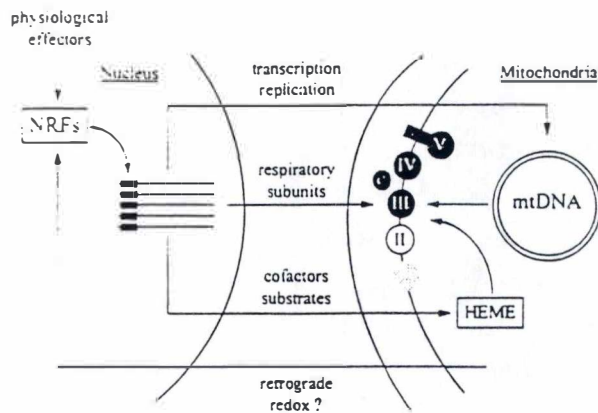


Fig. 1.20: Modèle du contrôle nucléaire des fonctions mitochondriales par l'expression de protéines mitochondriales. Les NRFs peuvent initier la transcription d'au moins une sous-unité des complexes III, IV, V et du cytochrome c, et stimulent également la production d'enzymes intervenant dans la biosynthèse des groupements hémiques mitochondriaux. De plus, ils induisent l'expression et la réplication du génome mitochondrial par l'intermédiaire du mtTFA, facteur de transcription régulé par NRF1. (D'après Scarpulla R. C., 1999)

1.5.1 Facteurs de transcription impliqués

Plusieurs facteurs de transcription, faisant le lien entre le stress mitochondrial et l'expression subséquente de gènes, ont déjà été identifiés, mais les voies qui régulent leur activité dans le cas de maladies mitochondriales sont encore peu connues.

Chez *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, les facteurs de transcription Rtg1p et Rtg3p (appartenant à la famille des *basic helix-loop-helix* ou *bHLH*) sont impliqués dans la communication noyau/mitochondrie sous conditions limitantes (croissance sur acétate). En effet, ces facteurs peuvent s'associer et se lier à une séquence activatrice (*UAS* : *upstream activation sequence*) située dans le promoteur du gène *CIT2*, qui code pour la citrate synthase 2, une forme peroxisomale de l'enzyme (Jia et al., 1997).

Dans les cellules de mammifères, le dialogue entre les génomes nucléaire et mitochondrial est essentiellement permis par deux facteurs de transcription : *NRF1* (*nuclear respiratory factor 1*) et *mtTFA* (*mitochondrial transcription factor A*). En effet, le premier peut contrôler l'expression du deuxième, lequel active alors la transcription et la réplication de l'ADNmt.

Les NRF's sont des facteurs de transcription (de la famille des *leucine zipper* ou *bZip*) qui régulent l'expression de protéines participant à la respiration mitochondriale (figure 1.20). On retrouve donc des sites de liaison aux facteurs NRF's dans les promoteurs de gènes codant pour des sous-unités des complexes respiratoires, les enzymes assurant la biosynthèse des groupements hémiques mitochondriaux, les constituants de la machinerie de transcription et de réplication de l'ADNmt, la MRP (*mitochondrial RNA processing enzyme*) ou encore le mtTFA.

Il a été montré que, dans des cellules subissant un stress mitochondrial chronique par perte de l'ADNmt, la quantité d'ARNm codant pour NRF1 est plus élevée que dans des cellules pourvues de mitochondries fonctionnelles (Miranda et al., 1999); on peut donc s'attendre à une induction des gènes sous contrôle de ce facteur.

On sait par ailleurs que NRF1 et NRF2 peuvent se lier à des séquences situées dans les promoteurs d'enzymes antioxydantes et induire l'expression de celles-ci (Venugopal and Jaiswal, 1998). Ils jouent donc un rôle dans la réponse rétrograde provoquée par un stress oxydatif.

1.5.2 Gènes différenciellement exprimés dans la communication rétrograde

Cette induction de NRF1 dans le contexte de communication rétrograde conforte donc l'activation de certains gènes rencontrée dans des cellules provenant de personnes atteintes d'une déficience mitochondriale chronique due à une mutation ponctuelle (*ANT 1*, *β -ATP synthase*) (Heddi et al., 1993), ou dans des cellules ayant perdu leur ADNmt (*COX IV*, *COX VIaL*, *ANT 1*, *ANT 2*) (Li et al., 1995). Il a également été montré qu'un stress aigu à l'antimycine A stimule l'expression des gènes des cytochromes b et c₁, et ce probablement *via* une production accrue de molécules oxydantes comme le H₂O₂ (Suzuki et al., 1998).

Ce processus de communication rétrograde permet donc à la cellule de répondre à un stress occasionné par une déficience mitochondriale transitoire ou chronique, en induisant l'expression spécifique de certains gènes. Cette réponse peut être considérée comme un exemple supplémentaire de la capacité que possède une cellule à pouvoir d'adapter à son environnement. Un modèle d'étude important de la communication rétrograde, tant dans les levures (Liao and Butow, 1993) que dans les cellules de mammifères (Biswas et al., 1999) a été le développement de cellules déplétées en génome mitochondrial (cellules Rho^o).

1.6 LES CELLULES Rho^o

Les cellules Rho^o sont caractérisées par la déplétion de leur ADN mitochondrial. On peut donc théoriquement obtenir des cellules Rho^o à partir de n'importe quelle lignée cellulaire, pourvu qu'elle contienne des mitochondries.

1.6.1 Caractéristiques

L'établissement d'une telle lignée est un long processus. Leur obtention nécessite d'abord plusieurs dizaines de sous-cultures en présence de bromure d'éthidium ou de dideoxycytidine (ddC). Le bromure d'éthidium bloque sélectivement la transcription et la réplication de l'ADNmt en inhibant l'hélicase ; l'ADNmt est donc dilué à chaque génération, jusqu'à sa disparition (Nass, 1972). On ajoute ensuite un inhibiteur de l'activité mitochondriale pour sélectionner dans la population les cellules (Rho^o) qui ne dépendent plus des mitochondries pour la production d'ATP. Notons que pour des raisons encore inconnues, ce phénotype Rho^o est réversible. Signalons encore que les cellules Rho^o subissent une adaptation métabolique, caractérisée par un *shift* vers la glycolyse pour la production d'ATP, et que ces cellules sont rendues auxotrophes pour l'uridine.

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une déficience du facteur ABF2 (homologue du mtTFA) est associée à une perte de l'ADNmt et donc à l'obtention d'une lignée Rho^o (Diffley and Stillman, 1991).

Bien que les mitochondries soient toujours présentes suite à ce traitement (Hayakawa et al., 1998), elles ne possèdent plus de complexes respiratoires fonctionnels puisque les sous-unités codées par l'ADNmt sont absentes. Ces complexes sont donc incapables de transporter des électrons, de pomper des protons et de permettre la production d'ATP par les phosphorylations oxydatives.

Cette déficience mitochondriale a plusieurs conséquences au niveau cellulaire : diminution de la quantité intracellulaire d'ATP, croissance plus lente, acidose, auxotrophie pour l'uridine... Du point de vue métabolique, les cellules Rho^o ne peuvent plus produire d'ATP que par la glycolyse pour assurer leurs besoins énergétiques. Cette ré-orientation métabolique s'accompagne de fermentation aérobie et de la libération d'acide lactique dans le milieu.

1.6.2 Messagers moléculaires de la communication rétrograde entre la mitochondrie et le noyau

Cette déplétion de l'ADNmt correspond à un stress énergétique chronique pour la cellule, auquel le noyau peut répondre par une modification de l'expression de certains gènes codant ou non pu des protéines mitochondriales dans un contexte de communication rétrograde.

Ce concept inclut nécessairement un relais entre la mitochondrie et le noyau. Ce relais pourrait provenir directement de la mitochondrie, sous forme de dérivés réactionnels de l'oxygène (ROS). En effet, il a été montré que des cellules HeLa Rho^o présentent une production de ROS supérieure aux cellules Rho⁺ (Miranda et al., 1999) et subiraient donc un stress oxydatif continu. Ces conditions oxydantes entraînent, au niveau nucléaire, une induction de NRF1 et de mtTFA, ce qui suggère que les ROS peuvent constituer, en partie du moins, un messager entre la mitochondrie et le noyau (Miranda et al., 1999). Cependant, ce point est actuellement controversé, car on a également montré, à partir d'études menées avec la sonde DCF (*dichlorofluoresceine*), que des cellules déplétées en ADNmt (SH-SY5Y Rho^o) produisent moins de radicaux libres en accord avec une réduction de l'activité de la chaîne de transporteurs d'électrons (Miller et al., 1996). De plus, une autre équipe a montré sur des cellules HEK 293 et des Hep3G que les ROS produits par le complexe III lors d'une hypoxie stabilise le facteur de transcription HIF-1 α . Si ceci atteste que les ROS peuvent moduler la réponse transcriptionnelle, ces effets ne sont plus observés dans les HEK 293 Rho^o et les Hep3G Rho^o, qui produisent moins de radicaux libres (Chandel et al., 2000).

Par ailleurs, une autre équipe a montré qu'une élévation de la concentration en calcium cytosolique dans des myocytes dépourvus d'ADNmt était responsable de l'activation de ATF-2 médiée par la JNK. ATF-2 est un facteur de transcription contrôlant l'expression de la COXVb et du RyR (*ryanodin receptor*) (Biswas et al., 1999). Ce messenger secondaire pourrait donc également être indirectement responsable de la transcription de gènes en réponse à un stress mitochondrial chronique.

1.6.3 Gènes différenciellement exprimés dans les cellules Rho^o

L'expression de certains gènes nucléaires, codant pour des protéines mitochondriales, augmente dans les cellules Rho^o par rapport aux cellules parentales Rho⁺. Ceci a été montré en particulier pour les sous-unités IV et VIaL de la cytochrome c oxydase (*COXIV*, *COXVIaL*), le cytochrome c et l'ANT2 (Li et al., 1995), ainsi que pour les chaperonines *cpn60* et *cpn10*, impliquées dans le *folding* des protéines mitochondriales (Martinus et al., 1996).

Cependant, l'induction de protéines liées aux phosphorylations oxydatives ne peut restaurer celles-ci dans les cellules Rho^o. Une hypothèse encore non validée serait que cet import accru de protéines membranaires pourrait maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale interne suite à la désorganisation des complexes respiratoires (Li et al., 1995). Dès lors, nous avons peut-être affaire à une réponse cellulaire visant à préserver les mitochondries structurellement et, donc, à leur permettre d'assurer d'autres fonctions que celles liées à la bioénergétique, même lorsque les phosphorylations oxydatives sont complètement inhibées. Par ailleurs, l'induction de chaperonines mitochondriales corrobore l'idée selon laquelle les mitochondries des cellules Rho^o, en dépit de leur déficience respiratoire, doivent continuer à importer des protéines assurant les autres fonctions que remplit cet organe dans la cellule. Ajoutons enfin que les cellules Rho^o maintiennent leur capacité de mourir par apoptose.

1.6.4 Potentiel de membrane mitochondrial

Normalement, les mitochondries génèrent une différence de potentiel atteignant 180-220 mV de part et d'autre de leur membrane interne. Ce potentiel résulte de l'expulsion de charges positives vers l'espace intermembranaire, suite à l'activité des transporteurs d'électrons.

Cependant, dans les cellules Rho^o, les mitochondries (qui restent partiellement couplées) ne peuvent créer ce potentiel électrochimique de cette manière puisque leurs complexes respiratoires sont incomplets et donc non fonctionnels. Il faut donc imaginer un autre mécanisme permettant aux cellules Rho^o de maintenir un potentiel de membrane mitochondrial qui est de l'ordre de 65 mV. Il a été proposé que ce potentiel de membrane réduit résulte de l'activité conjuguée de deux protéines : l'isoforme 2 de l'adénine nucléotide translocase (ANT2) et une ATP synthase incomplète et dissociée de la membrane, qui fonctionne alors en mode ATPasique (Buchet and Godinot, 1998).

L'ANT2, transporteur surexprimé dans les cellules Rho^o, fonctionne toujours comme un échangeur ATP/ADP, mais cette isoforme transloque un ATP⁴⁺ issu de la glycolyse dans la matrice mitochondriale et en expulse un ADP³⁻. Cet échange génère un déficit de charges négatives à l'extérieur de la MMI et, donc, un potentiel de membrane.

Le rôle de la F₁-ATPase consisterait à hydrolyser l'ATP⁴⁺ transloqué par l'ANT2, de manière à lui fournir en retour de l'ADP³⁻, assurant un échange continu ATP/ADP et le maintien d'un potentiel de membrane. Cette F₁-ATPase est soluble, car dissociée de la partie transmembranaire F₀; elle exerce donc son activité ATPasique au sein de la matrice mitochondriale.

1.6.5 Potentialités

Les cellules Rho^o servent de modèle d'étude pour explorer les voies de transduction menant à une réponse nucléaire induite par des perturbations chroniques de la respiration mitochondriale qui, comme nous l'avons vu au point 1.4 de cette introduction, peut être observée dans des maladies acquises ou héritées associées à un dysfonctionnement mitochondrial. Les cellules Rho^o offrent également l'avantage de pouvoir être repeuplées par des populations de mitochondries exogènes. Ces hybrides cytoplasmiques stables (*cybrids*) permettent d'étudier le phénotype métabolique lié à la population mitochondriale du donneur.

DEUXIEME PARTIE : CREB ET LA VOIE DES CALMODULIN-DEPENDENT KINASES

L'essentiel de notre travail ayant été de rechercher et de caractériser l'activation du facteur de transcription CREB suite à une inhibition de l'activité mitochondriale, nous terminerons cette introduction en dressant une rapide revue de ce facteur et des kinases qui le phosphorylent.

1.7 cAMP-RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN (CREB)

Cette protéine a été identifiée à l'origine comme un facteur de transcription phosphorylé par la *protein kinase A (PKA)*. Cette kinase étant régulée positivement par la concentration cytoplasmique en AMPc (adénosine monophosphate cyclique), CREB est donc un médiateur de la transcription dépendant de l'AMPc. Cependant, il apparaît aujourd'hui que CREB (ainsi que les autres membres de sa famille) se situe également en aval d'autres voies de transduction et répond donc à différents signaux.

1.7.1 La famille des facteurs de transcription répondant à l'AMPc

Chez les mammifères, au moins trois gènes codant pour des facteurs de transcription liant tous une séquence palindromique consensus nommée *cAMP-response element* ou *CRE* ont été identifiés ; leurs produits ont été appelés CREB, CREM et ATF1.

Chacun de ces gènes peut donner naissance à différentes isoformes *via* des mécanismes divers agissant aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel ou traductionnel. Ces isoformes exerceront un effet tantôt activateur, tantôt inhibiteur sur la transcription à partir des *CRE* selon les domaines protéiques présents dans l'isoforme considérée. Ces trois gènes présentent de plus une forte homologie de séquence et ont été bien conservés au cours de l'évolution.

Les facteurs de transcription CREB, CREM et ATF1 appartiennent à la famille des *basic domain-leucine zipper (bZip)*. Ils s'assemblent en homodimères ou en hétérodimères avant de se lier à la séquence *CRE* (5'-TGACGTCA-3'), et possèdent tous dans leur domaine C-terminal activateur une boîte phosphorylable (*P-box : phosphorylation box*) flanquée d'un ou deux domaines riches en glutamine respectivement pour ATF1 et pour CREB et CREM

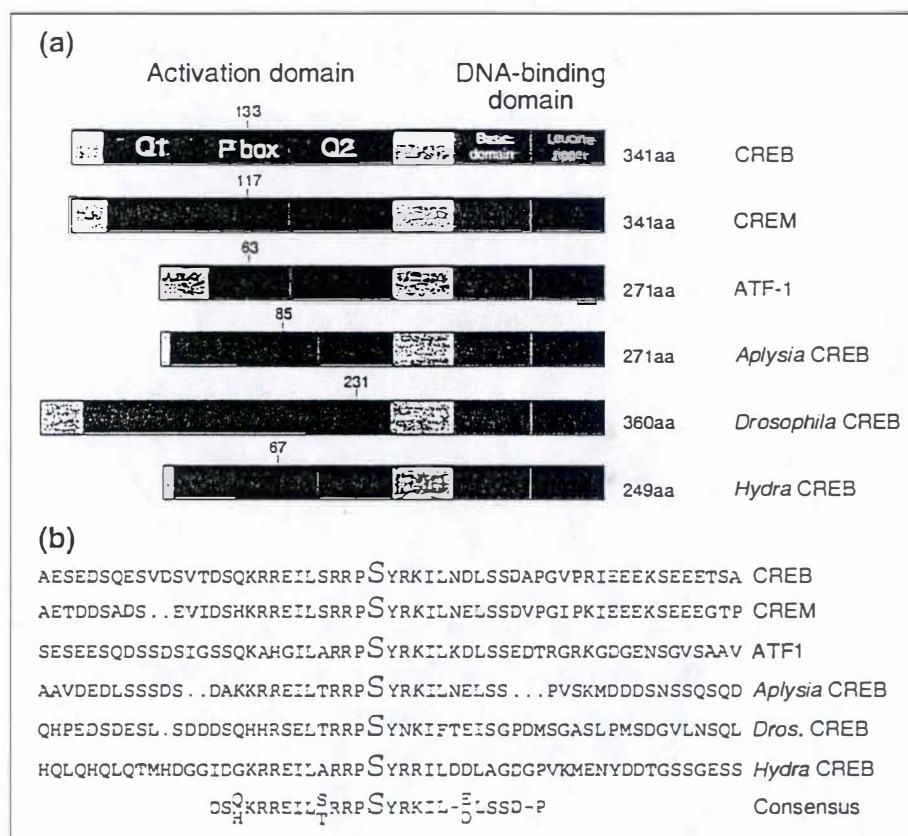


Fig. 1.21: Structure de CREB et des membres de sa famille. (a) Le *domaine d'activation* de CREB comprend deux domaines riches en glutamine (Q₁ et Q₂) et une boîte qui contient le résidu sérine. Le *domaine de liaison à l'ADN* est formé d'un domaine riche en acides aminés basiques, qui permettent l'interaction directe avec l'ADN, et un domaine de dimérisation de type *leucine zipper*. (b) Alignement des séquences de la *P box* dans quelques espèces. Le grand S représente la sérine phosphorylée par différentes kinases et est conservé dans tous les exemples montrés ici. Les acides aminés flanquant cette sérine sont également bien conservés (RRPSYRKI) entre espèces. (D'après de Cesare D., 1999.)

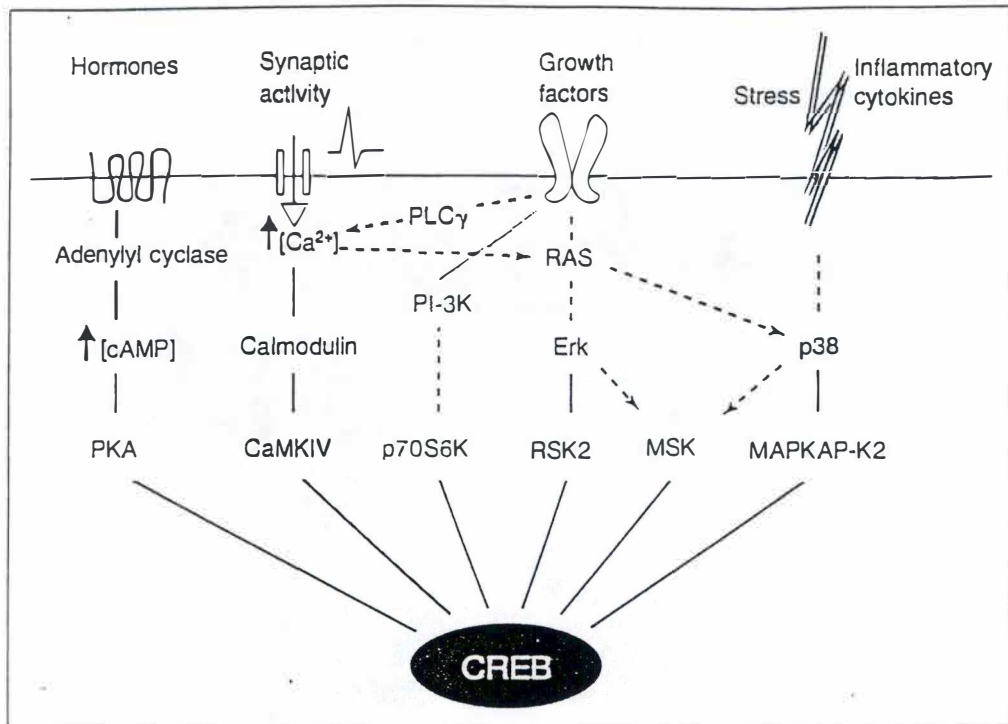


Fig. 1.22: Voies de transduction du signal menant à la phosphorylation du facteur CREB. Ce facteur de transcription se situe en aval de différents *stimuli* : activation cellulaire par une hormone, par une dépolarisation, par un facteur de croissance, par un stress physique ou une cytokine inflammatoire. Les flèches en pointillés montrent une voie nécessitant l'intervention d'autres kinases, non présentées sur le schéma. *cAMP* : adénosine monophosphate cyclique. *PKA* : protein kinase A. *CaMKIV* : calmodulin-dependent kinase IV. *PLC γ* : phospholipase C γ . *PI-3K* : phosphoinositide 3-kinase. *P70S6K* : p70 6S kinase. *Erk* : extracellular regulated kinase. *RSK2* : ribosomal S6 kinase 2. *MSK* : mitogen- and stress-activated kinase. *MAPKAP-K2* : MAP-kinase-activated protein kinase 2. (D'après de Cesare D., 1999.)

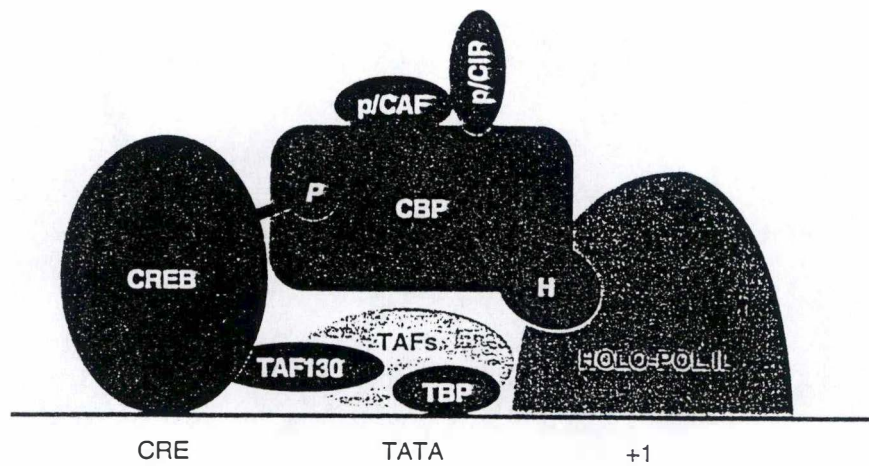


Fig. 1.23: Activation de la transcription médiée par CREB. Après la liaison à sa séquence consensus et sa phosphorylation, CREB peut recruter (via la pSer133) la CBP (*CREB binding protein*) qui, par interaction avec d'autres facteurs, relie les composants de la machinerie basale de transcription. La *TATA-box* est reconnue par TBP (*TATA-box binding protein*), qui interagit avec les TAFs (*TBP-associated factors*) dont l'un (TAF130) peut lier CREB. (D'après de Cesare D., 1999.)

(voir figure 1.21). La *P box* renferme un résidu sérine particulièrement bien conservé, cible de plusieurs kinases, tandis que les domaines riches en glutamine (Q_1, Q_2) permettent le pontage avec des composants de la machinerie basale de la transcription.

D'autre part, ces facteurs de transcription ont, à leur extrémité N-terminale, un domaine de dimérisation, de type *leucine zipper*, et un domaine riche en acides aminés basiques (*basic domain*), formant le domaine de liaison à l'ADN.

1.7.2 Activation de CREB par phosphorylation

La transcription dépendante du facteur CREB peut effectivement être activée en aval de la voie de l'AMP cyclique. Cette voie implique l'activation successive d'un récepteur à sept domaines transmembranaires associé à une protéine G, de l'adénylate cyclase et de la PKA. Les sous-unités catalytiques de cette dernière enzyme peuvent se dissocier et entrer dans le noyau lorsque la liaison de l'AMPc modifie la conformation de ses sous-unités régulatrices, et c'est là que la PKA phosphoryle CREB sur la Ser133 (Ser117 pour CREM, Ser63 pour ATF1).

Mais la phosphorylation de ces facteurs de transcription peut également résulter de l'activation d'autres voies de signalisation ; ainsi, CREB peut être activé par la voie des calmoduline-kinases (dépendant du calcium), par la voie des *Erk* (*extracellular regulated kinase*) suite à la liaison d'un facteur de croissance tel que l'EGF (*epidermal growth factor*), le NGF (*neuronal growth factor*) à son récepteur ou encore par la voie des *p38 kinases* suite à un stress (UV, *heat shock*, cytokine inflammatoire...) (voir figure 1.22). Le facteur CREB et les membres de sa famille peuvent donc être activés en réponse à différents *stimuli* qui initient plusieurs voies de transduction, activant des cascades de kinases multiples (De Cesare et al., 1999).

Ces différentes voies aboutissent toutes à la phosphorylation de CREB sur un résidu sérine de la *P box*, et cette phospho-sérine (pSer133) recrute alors la *CREB-binding protein* (CBP), tandis que le domaine Q_2 interagit avec un facteur associé à la protéine qui lie la boîte TATA, le *TATA box-binding protein-associated factor 130* (TAF 130) (figure 1.23).

La phosphorylation de CREB par les calmoduline-kinases, montrée à ce jour uniquement dans des neurones après dépolarisation, suggère que le calcium contrôle également la transcription induite par l'activation de CREB. Il semble que la déphosphorylation de pCREB, réalisée par les *protein phosphatases 1* et *2B* (PP1 et PP2B) nucléaires, dépende aussi du calcium (Bito et al., 1996). Parmi les gènes dont l'expression est régulée par le facteur CREB, citons le gène codant pour la 3-HMG-CoA synthase (Eggers et al., 2000), la 5-aminolévulinate synthase (Varone et al., 1999) et la carnitine

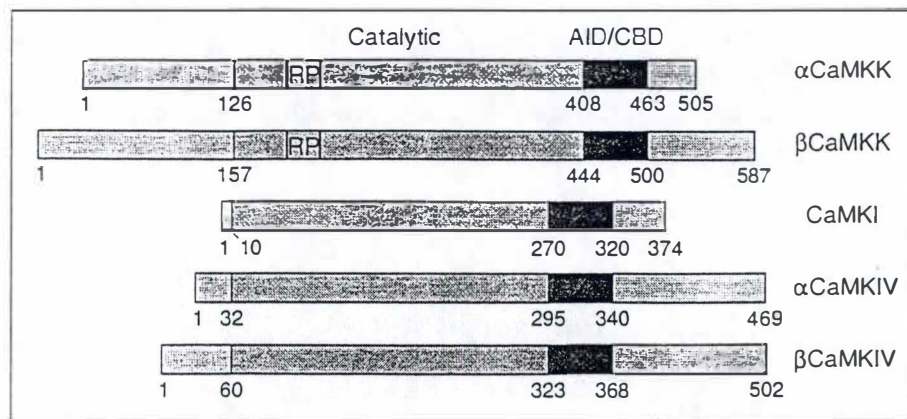


Fig. 1.24: Structure des membres de la famille des CaMK. Les CaMKK contiennent, dans leur domaine catalytique, une région riche en Arg et Pro (RP), qui permet la reconnaissance des CaMK par la CaMKK. Le domaine d'auto-inhibition (*AID*) empêche cette phosphorylation, sauf si le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ s'est fixé préalablement sur le domaine de liaison à la calmoduline (*CBD*). Remarquons que les isoformes α et β de la CaMKIV résultent d'un splicing alternatif, tandis que les CaMKK $_{\alpha}$ et CaMKK $_{\beta}$ sont le produit de deux gènes différents. (D'après Soderling T. R., 1999.)

palmitoyltransférase (Brady et al., 1992), qui sont toutes des protéines mitochondriales. Bien que ce facteur soit nucléaire, la localisation mitochondriale inattendue de CREB a été décrite récemment dans les mitochondries synaptiques et non synaptiques du cerveau de rat (Bevilaqua et al., 1999) (Cammarota et al., 1999).

1.8 VOIE DES KINASES DEPENDANTES DE LA CALMODULINE (CaMK)

L'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium est un signal qui mène à différentes réponses cellulaires, et ce souvent après sa liaison à un récepteur intracellulaire, la calmoduline (CaM). L'une d'entre elles est, dans certains types cellulaires, l'activation de la cascade des protéines kinases dépendantes de la calmoduline ou *calmodulin-dependent kinases* (CaMK).

1.8.1 Structure des CaMK

Le représentant de cette famille de Ser/Thr kinases qui est de loin le plus étudié à ce jour est certainement la *calmoduline-kinase IV* (CaMKIV). Cette enzyme, connue pour être exprimée spécifiquement dans certains tissus comme certaines régions du cerveau, les testicules, le thymus et la rate, présente une localisation nettement nucléaire – mais on en trouve également un peu dans le cytoplasme, alors que la *calmoduline-kinase I* (CaMKI), dont les fonctions sont peu connues, se situe exclusivement dans le cytoplasme.

En outre de leur activation par la calmoduline et donc le calcium, l'activité des CaMK est encore régulée par d'autres kinases appelées *CaM-dependent protein kinase kinases* (CaMKK). Ces kinases, en amont des CaMK, sont également exprimées surtout dans les tissus neuronal, testiculaire, thymique et splénique, et présentent une localisation cytoplasmique (CaMKK $_{\alpha}$) ou nucléaire (CaMKK $_{\beta}$).

Toutes les kinases susmentionnées (CaMK, CaMKK) possèdent une structure analogue car on retrouve des domaines communs dans leurs séquences primaires (figure 1.24). Lorsque l'enzyme est inactive, le domaine AID (*auto-inhibitory domain*) recouvre partiellement le domaine catalytique de l'enzyme et empêche la fixation de son substrat ainsi que celle de l'ATP. Le domaine adjacent CBD (*Ca²⁺-calmodulin-binding domain*) peut, suite à la liaison du complexe calcium-calmoduline, lever cette inhibition en modifiant la conformation de l'AID et en permettant alors l'exposition du site de liaison au substrat.

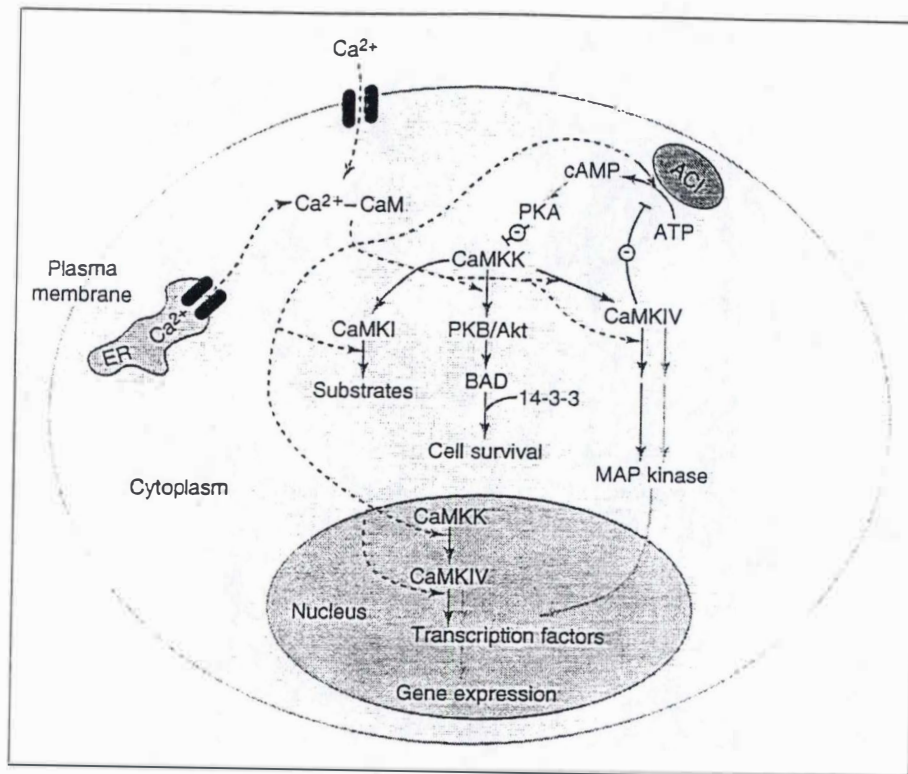


Fig. 1.25: Relations entre la cascade des CaMK et d'autres voies de kinases. Les membres de cette famille régulent la survie cellulaire (activation de la PKB) et la transcription par activation des MAPK. La CaMKIV peut également phosphoryler (et inactiver) l'adénylate cyclase de type I (ACI), diminuant donc le pool d'AMPC. Par ailleurs, la PKA peut phosphoryler (et inactiver) la CaMKK. L'activation de l'une de ces deux voies (CaMKIV et PKA) conduit donc à la *régulation négative* de l'autre. (D'après Soderling T. R., 1999.)

1.8.2 Activation et régulation des CaMK

Les CaMK I et IV sont activables par une augmentation de la concentration en calcium, mais leur activité est cependant augmentée lorsqu'elles sont phosphorylées par la kinase en amont, la CaMKK, qui possède dans son domaine catalytique une région riche en arginine et en proline (*RP-rich*) intervenant dans la reconnaissance des CaMK. Cette phosphorylation se produit sur un résidu thréonine (Thr177 et 200 pour les CaMK I et IV respectivement), et fait nécessairement suite à la liaison du complexe CaM/Ca²⁺ au domaine CBD. La CaMKIV peut encore, après activation par la CaMKK, s'autophosphoryler sur des résidus sérine/thréonine, ce qui augmente encore l'activité de la CaMKIV.

Une fois activée, la CaMKIV peut à son tour phosphoryler différents substrats, dont plusieurs facteurs de transcription : CREB (Ser133), ATF1 (Ser63), SRF (*serum response factor*, Ser103)..., et permettre la transcription régulée indirectement par le calcium.

La régulation de cette réponse est rapide : la CaMKIV phosphorylée sur la Thr200 s'associe à la *protein phosphatase 2A (PP2A)*, qui déphosphoryle la thréonine 200 et inactive l'enzyme (Westphal et al., 1998).

1.8.3 Communication avec d'autres voies de transduction du signal

Les interactions entre voies de transduction permettent à la cellule de fournir une réponse spécifique suite à l'effet intégré d'une multitude de facteurs endogènes ou exogènes. Ainsi, la voie des *calmoduline-kinases* peut être modulée par d'autres voies de transduction du signal, qui agissent à différents niveaux de la cascade menant aux CaMK.

Par exemple, l'AMP cyclique exerce un effet inhibiteur sur cette voie car la PKA activée phosphoryle les CaMKK sur leur CBD (sauf si le complexe calcium/calmoduline s'y est fixé préalablement). D'autre part, l'adénylate cyclase de type I peut être activée en liant le complexe CaM/Ca²⁺, tandis qu'elle est inactivée par la CaMKIV, qui phosphoryle un acide aminé dans son CBD (Wayman et al., 1996).

Un autre exemple est l'activation de la voie des MAP kinases (*Erk*, *JNK* ou *p38* selon les cas) par la CaMKIV cytosolique (Enslin et al., 1996). Mentionnons également un rôle dans l'apoptose médié par les CaMKK activées. En effet, celles-ci peuvent phosphoryler la *protein kinase B (PKB)* (Yano et al., 1998) qui, activée, phosphoryle à son tour BAD. Cette protéine est une molécule pro-apoptotique apparentée à Bcl2 qui, sous sa forme phosphorylée, est séquestrée par la protéine 14-3-3 et ne peut plus jouer son rôle pro-apoptotique (Datta et al., 1997). La CaMKK activée jouerait donc un rôle protecteur contre l'apoptose (voir figure 1.25).

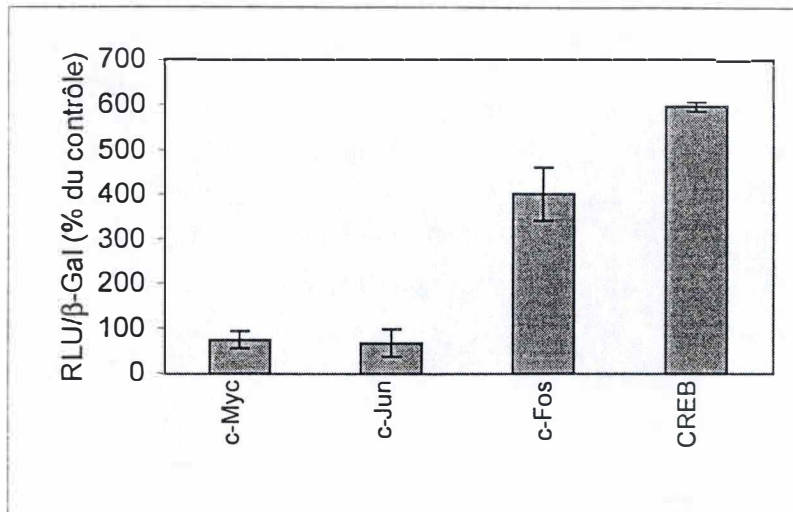


Fig. 1.26 : Recherche de l'activation de facteurs de transcription dans les cellules L929 Rho^o suite à la transfection de différents systèmes rapporteurs luciférase. Les cellules sont co-transfectées avec un plasmide codant pour la luciférase et avec un plasmide qui code pour la β -galactosidase pendant 8 h. Le gène de la luciférase est placé sous le contrôle soit d'un promoteur synthétique contenant plusieurs sites de liaison pour *c-Myc* ou pour *c-Jun*, soit du promoteur authentique de *c-Fos* (qui contient un site de liaison pour CREB) ou de l' α -inhibine (qui contient plusieurs sites de liaison pour CREB). Les résultats sont exprimés en RLU/ μ g de protéines, puis exprimés en pourcentages du contrôle. Ils représentent la moyenne \pm un écart-type pour 3 valeurs ($n = 3$).

Contexte de la recherche et objectifs de ce mémoire

Un nouveau sujet de recherche qui porte sur la “communication rétrograde” a récemment été lancé au sein de l’URBC. Il vise à étudier les effets d’une inhibition de l’activité mitochondriale sur l’expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales dans les cellules de mammifères et de rechercher les effecteurs moléculaires (médiateurs et facteurs de transcription) capables de renseigner le noyau sur l’état d’activité de la mitochondrie. Pour ce faire, nous utilisons les techniques de “differential display” et l’analyse protéomique sur des mitochondries purifiées (*via* des gels à deux dimensions) pour étudier, par deux approches différentes, les protéines mitochondriales exprimées de manière différentielle lorsque l’activité mitochondriale est inhibée. Deux modèles ont été choisis. D’une part, l’utilisation d’une lignée de cellules issues d’un fibrosarcome murin (L929) pour laquelle nous possédons une lignée déplétée en génome mitochondrial (L929 Rho^o) obtenue par un traitement au bromure d’éthidium. Ces cellules nous ont été données généreusement par le Dr. J. Grooten de l’Université de Gand. Ce modèle nous permet d’étudier une inhibition chronique de l’activité mitochondriale et de rechercher les protéines participant à l’adaptation métabolique. D’autre part, l’utilisation d’inhibiteurs de l’activité mitochondriale pendant quelques heures permet d’approcher les changements induits suite à une perturbation aigüe. Ces travaux, encore préliminaires, nous ont cependant déjà permis de visualiser environ 400 bandes potentielles en “differential display” alors que l’analyse du protéome révèle environ 25 candidats protéiques mitochondriaux dont l’expression est induite ou augmentée suite à un traitement au bromure d’éthidium.

Résumé des recherches antérieures à ce mémoire :

En utilisant le modèle cellulaire de fibroblastes murins (L929 Rho^o), nous avons montré précédemment au laboratoire que le facteur de transcription CREB, est phosphorylé en permanence dans cette lignée de cellules déplétées en génome mitochondrial (Arnould *et al.*, 2000), comme l’a montré une expérience de transfection antérieure à ce mémoire (figure 1.26). La caractérisation de ce modèle nous permet de proposer que la phosphorylation de CREB sur la Ser133 est le résultat d’une augmentation de l’activité de la calmoduline kinase IV (CaMKIV) dans ces cellules alors que l’activité de la protéine kinase A (PKA) n’est pas modifiée. De plus, on retrouve dans ces cellules une concentration basale en calcium cytosolique libre qui est environ 3 fois supérieure à celle mesurée dans la lignée parentale contrôle (L929). Des études sur la régulation de l’activité de cette kinase, on montré que l’interaction physique entre la CaMKIV et une phosphatase régulatrice (PP2A) est fortement diminuée. La conjonction de ces deux facteurs explique probablement l’activation constitutive de la CaMKIV dans les cellules L929 Rho^o (Arnould *et al.*, 2000). Cependant, la réorientation métabolique que ces cellules ont mis en place lors de la sélection et du traitement par le bromure d’éthidium est certainement plus complexe que la simple inhibition des

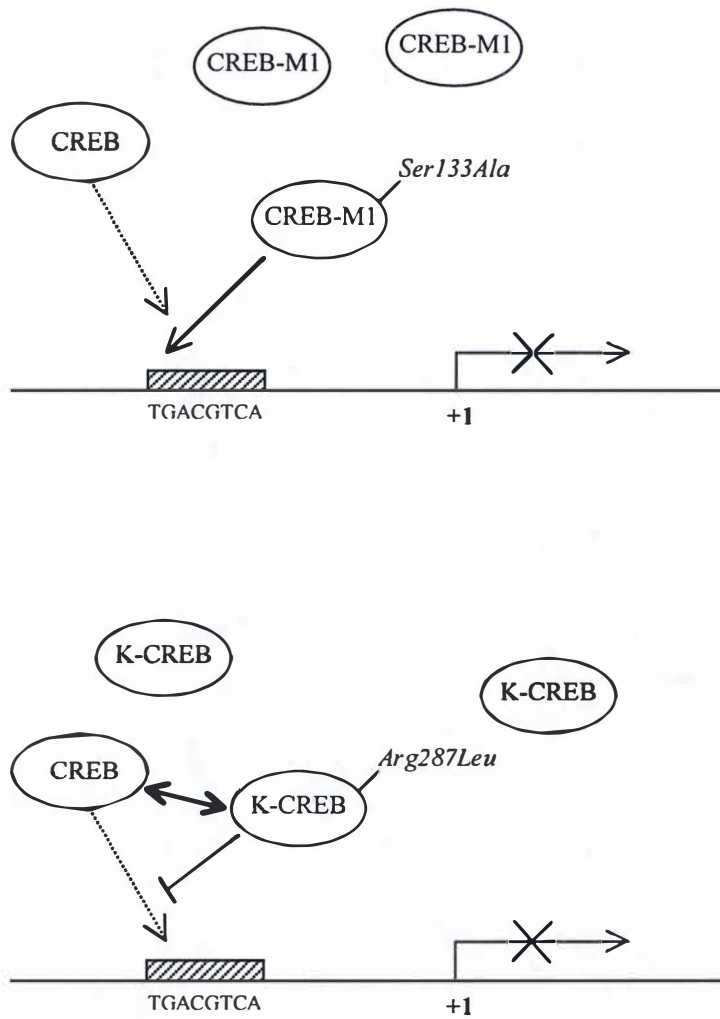


Fig. 1.27 : Schéma illustrant les mécanismes d'action de deux dominants négatifs de CREB. *En haut*, CREB-M1 empêche la liaison du facteur CREB endogène par compétition pour la séquence consensus TGACGTCA, mais ne peut être phosphorylé (Ser133 substituée par une Ala). *En bas*, K-CREB dimérise avec le facteur CREB endogène, et empêche alors sa liaison à la séquence consensus.

phosphorylations oxydatives et ne permet pas d'affirmer que le changement de l'activité mitochondriale soit la cause de la phosphorylation du facteur CREB observée.

Objectifs de ce mémoire

Le premier objectif de ce mémoire est donc de rechercher puis de confirmer que l'activité de la mitochondrie, et plus particulièrement une inhibition de celle-ci, est responsable de l'activation de la CaMKIV conduisant à la phosphorylation de CREB. Pour ce faire, nous avons utilisé une molécule découplante et deux inhibiteurs bien décrits dans la littérature tels que le FCCP, l'antimycine A et l'oligomycine. Après la mise au point des conditions expérimentales, nous avons recherché une activation éventuelle du facteur CREB suite à ces traitements en utilisant les techniques de l'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), de la microscopie confocale pour localiser le facteur dans la cellule, de gènes rapporteurs et de *Western blotting*. Ces différentes approches permettent d'étudier l'activation de CREB tant au niveau de sa liaison à sa séquence consensus qu'au niveau de son activité transcriptionnelle. Le rôle de la CaMKIV et la participation du calcium dans cette activation ont également été recherchés, en utilisant la transfection pour surexprimer un dominant négatif de la CaMKIV (CaMKIV T200A), en traitant les cellules avec du BAPTA, un chélateur de calcium intracellulaire, en dosant l'activité de la CaMKIV *in vitro* et en mesurant les concentrations en calcium libre cytosolique et mitochondrial.

Le second objectif de ce travail est de rechercher un effet éventuel de cette activation de CREB sur la physiologie cellulaire suite à un mauvais fonctionnement de la mitochondrie. Pour ce faire, nous aurions pu étudier la régulation de gènes connus dont l'expression est sous le contrôle de ce facteur. Nous avons préféré nous pencher sur le rôle que ce facteur de transcription pouvait avoir sur la prolifération cellulaire, suite à un stress énergétique. Les premiers résultats obtenus, bien qu'encore préliminaires sont très encourageants.

Mentionnons encore que les études qui vont suivre ont été réalisées sur deux types cellulaires différents : une lignée de cellules murine (L929 : cellules de fibrosarcome murin) et une lignée humaine de cellules de reins embryonnaires (HEK 293 : *human embryonic kidney cells*). Outre l'avantage de pouvoir confirmer les effets obtenus sur deux lignées cellulaires différentes, l'intérêt d'utiliser les 293 réside dans son haut pouvoir de transfectabilité par la méthode de précipitation au phosphate de calcium, ce qui constitue un avantage certain lorsqu'on a recours aux gènes rapporteurs et aux dominants négatifs, tels que les dominants négatifs pour la CaMKIV (CaMKIV T200A) et pour CREB (CREB-M1 et K-CREB), dont les mécanismes d'action sont présentés à la figure 1.27.

Constructions utilisées dans ce travail

Certaines des expériences que nous avons réalisées nécessitent la transfection d'un plasmide. Les différentes constructions que nous avons utilisées sont :

- . Un plasmide rapporteur, contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, contenant plusieurs sites de liaison pour le facteur CREB. Cette construction nous a été donnée par le Prof. K. Mayo (*Department of Biochemistry, Northwestern University, Evanston, IL, USA*) ;
- . Un plasmide contenant le gène de la β -galactosidase d'*E. coli*. Cette construction, utilisée pour normaliser les taux de transfection, contient le gène de la β -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur fort (*SV-40*) et nous a été fournie par le Prof. C. Cepko (*Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA*) ;
- . Deux plasmides codant pour des dominants négatifs du facteur CREB (CREB-M1 et K-CREB). Ces deux constructions nous ont été données par le Prof. E. Greenberg (*Children's Hospital, Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA*) ;
- . Un plasmide codant pour un dominant négatif de la CaMKIV (T200A), généreusement donné par le Prof. K. Anderson (*Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University, Durham, NC, USA*) ;
- . Un plasmide (*cytAEQ/pcDNAI*) contenant le gène de l'apoaéguorine, fusionné à une séquence *tag* constituée d'un épitope présent sur l'hémagglutinine (HA) (*Molecular Probes*) ;
- . Un plasmide (*mtAEQ/pcDNAI*) contenant la même construction que le plasmide *cytAEQ/pcDNAI*, avec en plus une séquence d'adressage vers la mitochondrie, issue du gène *COX VIII* (qui code pour la sous-unité VIII de la cytochrome oxydase) (*Molecular Probes*).

Ces différentes constructions ont été amplifiées dans la souche bactérienne *E. coli* *SURE* (*Stratagene, USA*), dont les membranes sont perméabilisées au CaCl_2 (bactéries « CaCl_2 -compétentes ») avant la transformation par choc thermique. La purification des constructions amplifiées permet de récupérer les plasmides qui, après mesure de leur concentration au photomètre (Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne), seront utilisés dans les expériences de transfection (méthodes décrites par Ausubel *et al.*, (1996)). Les techniques de transformation, d'amplification et de purification plasmidiques étant des techniques classiques de la biologie moléculaire, elles ne seront pas décrites ici.

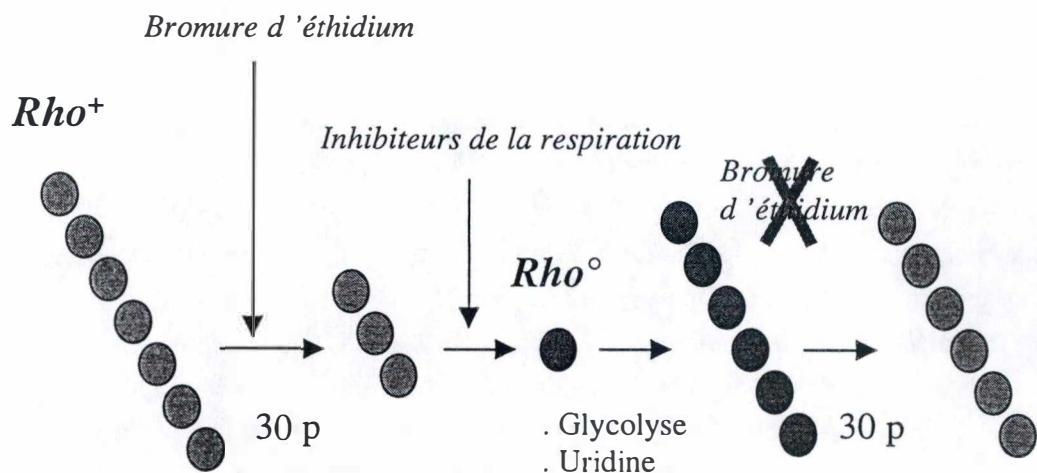


Fig. 2.1 : Schéma reprenant les étapes essentielles conduisant à l'obtention d'une lignée de cellules déplétées en ADN mitochondrial (Rho°). La souche parentale est sous-cultivée pendant 30 passages en culture dans un milieu contenant du bromure d'éthidium. Cette molécule interagit avec l'hélicase mitochondriale et inhibe les processus de transcription et de réplication de l'ADNmt. Au cours des générations, le génome mitochondrial est donc dilué dans la sous-culture. Ensuite, une sélection est réalisée avec des inhibiteurs de la respiration, de manière à ne conserver que les cellules Rho° , caractérisées par un métabolisme exclusivement glycolytique et une auxotrophie pour l'uridine (U). La pression de sélection est ensuite maintenue dans la culture de cellules Rho° par l'ajout de bromure d'éthidium au milieu de culture, car le phénotype Rho° est réversible.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 CULTURE CELLULAIRE ET SOUS-CULTURES

2.1.1 Matériel

Les cellules utilisées dans le cadre de ce mémoire sont d'une part des HEK 293 (*human embryonic kidney cells*) issues de reins embryonnaires humains, transformées par le virus SV40 (*ECACC : European Collection of Cell Cultures*), et d'autre part des cellules fibroblastiques provenant d'un fibrosarcome murin (L929). Pour cette dernière lignée, nous possédons également des cellules déplétées en l'ADN mitochondrial obtenues par un traitement chronique au bromure d'éthidium. Ces cellules (Rho^o) nous ont été aimablement données par le professeur J. Grooten, de l'Université de Gand (RUG). Une représentation schématique de leur obtention est présentée à la figure 2.1. La sélection est maintenue au cours de la culture en ajoutant 400 ng/ml de bromure d'éthidium à chaque sous-culture, afin d'éviter la réversibilité du phénotype. De plus, le milieu des cellules L929 Rho^o est encore supplémenté par de l'uridine (5 µg/ml).

Les cellules 293 et L929 sont cultivées respectivement en boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (Corning, USA) ou en boîtes de 75 cm² (T75, Costar, USA), dans du milieu DHG (Dubbelco's Modified Eagle's Medium + High Glucose (4,5 mM)) contenant 10% de sérum de veau fœtal (*FBS : foetal bovine serum*) (Gibco BRL, Grande Bretagne). Ce milieu contient également des antibiotiques comme la pénicilline (Sigma, USA) (50 U/ml) et l'amphotéricine B (Sigma, USA) (5 µg/ml). Les cellules sont maintenues à 37°C, dans une étuve à CO₂ (5 % CO₂, 95 % air humide) (Heraeus, Allemagne). Lorsqu'elles arrivent à confluence, les cellules sont sous-cultivées selon le protocole décrit ci-dessous.

2.1.2 Méthode des sous-cultures

Le milieu de culture est enlevé et remplacé par 10 ml de PBS préchauffé (*Phosphate Buffer Saline* : 0,9 % NaCl, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄; pH 7,4) afin d'éliminer toute trace de sérum. (Tous les sels utilisés proviennent de la firme Merck, Allemagne.)

On ajoute ensuite 0,5 ml de trypsine (Gibco BRL, Grande Bretagne) et on laisse agir quelques minutes à température ambiante. La solution de trypsine (0,5 g/l), préparée dans une solution de Puck, permet la digestion des composants de la matrice extracellulaire. L'arrondissement des cellules et leur détachement du fond de la boîte sont alors suivis au microscope à contraste de phase.

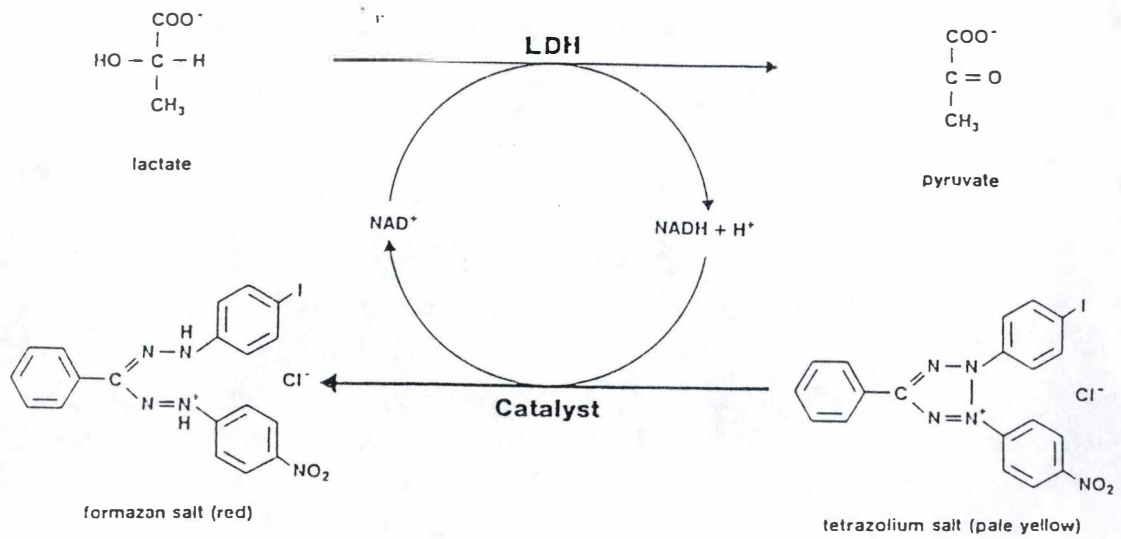


Fig. 2.2 : Schéma représentant les réactions enzymatiques permettant le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). En présence de LDH, le lactate cède deux électrons au NAD^+ (produit de l'oxydation = pyruvate) qui les donne ensuite, en présence de diaphorase (*catalyst*), à un sel de tétrazolium. Sous sa forme réduite, ce sel (sel de formazan) est rouge et absorbe à 405 nm. La mesure de l'absorbance permet donc une quantification de l'activité LDH. (Issu du manuel fourni avec le *Cytotoxicity Detection Kit*, Roche, Allemagne.)

Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume déterminé de milieu DHG contenant 10 % de FBS, lequel inactive la trypsine. Sur cette suspension, on peut effectuer un comptage cellulaire à l'aide d'une chambre de Neubauer (Marienfeld, Allemagne).

Enfin, la suspension cellulaire est soit fractionnée en trois ou quatre pour les 293 – en cinq en six pour les L929 – dans de nouvelles boîtes, soitensemencée dans des boîtes multipuits à une densité déterminée, en fonction du type d'expérience à réaliser. Ajoutons enfin que les cellules sont sous-cultivées tous les trois ou quatre jours.

2.2 MESURE DE LA CYTOTOXICITE

La toxicité des différents inhibiteurs de l'activité mitochondriale utilisés dans ce travail a été mesurée par deux méthodes : un test basé sur la libération de la lactate déshydrogénase et un test d'internalisation du bromure d'éthidium.

2.2.1 *Test de libération de la lactate déshydrogénase*

2.2.1.1 Principe

La mort cellulaire peut se produire suite aux dommages qui surviennent à la membrane plasmique, ceux-ci se manifestant souvent par une augmentation de la perméabilité membranaire. Les cellules incubées en présence d'une molécule cytolytique perdent donc une partie de leurs constituants cytoplasmiques, dont la lactate déshydrogénase (LDH), utilisée comme une enzyme marqueur.

Ce test consiste à doser l'activité de la LDH, libérée par les cellules dans le milieu d'incubation, au moyen du *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche, Allemagne). Ce kit repose sur le principe suivant : le milieu conditionné des cellules ayant été incubées (*tests*) ou non (*contrôles*) avec la molécule à tester, est mis en présence d'une mixture réactionnelle préparée conformément aux instructions du manuel fourni avec le kit. Cette mixture renferme tous les composants nécessaires au déroulement d'une réaction enzymatique en deux étapes, possible uniquement en présence de LDH : (1) le NAD^+ est réduit au cours de l'oxydation du lactate par la LDH et (2) la diaphorase transfère les électrons du NADH/H^+ à un substrat chromogène (sel de tétrazolium). Celui-ci, sous sa forme réduite (sel de formazan), absorbe surtout à 490 nm et permet donc une quantification de l'activité LDH libérée. Cette activité est directement proportionnelle à la mortalité cellulaire (voir Figure 2.2).

2.2.1.2 Méthodes

2.2.1.2.1 Incubation

Les cellules HEK 293 ou L929 sont sous-cultivées dans du milieu DHG + 10 % de FBS, à une densité de 10^5 cellules par puits dans des boîtes à 12-puits (Costar, USA).

Le lendemain, les cellules sont incubées pendant 6 h à 37°C (5 % CO₂) dans du milieu DHG sans sérum contenant – ou ne contenant pas (contrôle) – la molécule à tester à la concentration désirée. Certains tests sont réalisés avec une période de récupération (24 h) dans du milieu DHG + 10 % de FBS. Les concentrations utilisées au cours de ce travail pour les différents inhibiteurs mitochondriaux sont :

- . FCCP (Sigma, USA) 10 μ M, 100 nM et 1 nM (solution stock : 40 mM dans l'éthanol 100 % (Merck, Allemagne))
- . Oligomycine (Sigma, USA) 8 μ M, 80 nM et 0,8 nM (solution stock : 4 mM dans l'éthanol 100 %)
- . Antimycine A (Sigma, USA) 1 μ M, 10 nM et 0,1 nM (solution stock : 1 mM dans l'éthanol 100 %)

Après dilution, la concentration en éthanol est toujours inférieure à 0,2 %, et des tests préliminaires réalisés avec de l'éthanol seul ont montré la non toxicité de ce solvant, au moins jusqu'à une teneur de 0,5 %.

2.2.1.2.2 Dosage

Le milieu des puits est récupéré sur glace (4°C), puis centrifugé 2 min à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) pour sédimenter les cellules éventuellement détachées. Ensuite, 100 μ l du surnageant sont mélangés à 100 μ l de la mixture réactionnelle dans une boîte à 96 puits (Costar, USA), et on laisse incuber durant 30 min à l'obscurité, avant de lire l'absorbance à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultramark, BioRad, Allemagne).

La cytotoxicité ne peut être calculée que si l'on effectue des contrôles adéquats :

Le *background control* correspond à l'activité de la LDH présente dans le milieu de culture et est déduit de toutes les valeurs obtenues ;

Le *low control* représente l'activité de la LDH libérée par des cellules non traitées ou contrôles;

Le *high control* est l'activité maximale de la LDH que les cellules peuvent libérer. Cette valeur est obtenue par une lyse des cellules de 30 min avec 2 % de Triton X-100 (Merck, Allemagne).

L'équation suivante permet de calculer le pourcentage de cytotoxicité :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Valeur test} - \text{low control}}{\text{High control} - \text{low control}} \times 100$$

2.2.2 Test à l'acridine orange

2.2.2.1 Principe

Les cellules, après traitement, sont exposées à une solution contenant autant d'acridine orange que de bromure d'éthidium, deux colorants fluorescents aux propriétés différentes. L'acridine orange pénètre dans des cellules intactes et lie les acides désoxyribo- ou ribonucléiques (ADN ou ARN) par intercalation ou attraction électrostatique. Excité par un rayonnement UV, le complexe ADN/acridine orange a une fluorescence verte, avec un maximum d'émission à 525 nm. Le bromure d'éthidium, quant à lui, ne peut entrer que dans les cellules dont la membrane est perméabilisée et reste exclus des cellules intègres. Il peut s'intercaler entre les brins d'ADN et présente alors un maximum d'émission proche de 600 nm (Molecular Probes, USA). Une simple observation au microscope à fluorescence permet ensuite de visualiser et de compter le nombre de cellules mortes (orange) et de cellules vivantes (vertes).

2.2.2.2 Méthodes

2.2.2.2.1 Incubation

Les cellules sont sous-cultivées dans des boîtes de 35 mm de diamètre (Corning, USA), à raison de $1,5 \times 10^5$ cellules par boîte. Le lendemain, les molécules à tester sont incubées comme décrit au point 2.2.1.2.1.

2.2.2.2 Test

Le milieu de culture des boîtes est enlevé et remplacé par 250 µl du mélange d'acridine orange (Sigma, USA) et de bromure d'éthidium (Sigma, USA) pour couvrir les cellules. On dépose ensuite une lamelle couvre-objet sur les cellules avant l'observation.

Au microscope à fluorescence, on compte dans un champ déterminé le nombre de cellules mortes et de cellules vivantes, dont la somme fournit le nombre de cellules totales. Les comptages ont été effectués sur une centaine de cellules. On peut ensuite déterminer le pourcentage de cytotoxicité de l'inhibiteur utilisé grâce à la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules mortes}}{\text{Nombre de cellules totales}} \times 100$$

2.3 DOSAGES D'ATP

Nous avons testé l'effet des inhibiteurs de l'activité mitochondriale sur le contenu cellulaire en ATP, ainsi que la capacité des cellules à rétablir leur potentiel énergétique après 24 h de récupération dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS.

2.3.1 Principe

Ce dosage est réalisé au moyen d'un système luciférine-luciférase, qui émet de la lumière en présence d'ATP et d'O₂.

L'ATP est extrait des cellules par un tampon de lyse (*Somatic Cell ATP Releasing Reagent*, Sigma, USA) qui perméabilise les membranes plasmiques aux petites molécules. Ensuite, la quantité d'ATP dans ces échantillons est dosée avec une mixture réactionnelle (glycine 75 mM, HEPES 75 mM, DTT 75 µM, EDTA 125 µM, MgCl₂ 6,25 mM ; pH 7,7) contenant de la luciférine et de la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*), permettant une réaction en deux étapes :

- (1) Sous l'action de la luciférase, l'ATP et la luciférine réagissent pour former une molécule de luciféryl-adénylate, fortement liée au site catalytique de l'enzyme :



- (2) En présence d'oxygène moléculaire, le luciféryl-adénylate (*état excité*) est oxydé en oxyluciférine (*état plus stable*). Cette oxydation s'accompagne d'une libération d'énergie sous forme de photons :



Le nombre de photons émis est directement proportionnel à la concentration en ATP, ce qui permet une quantification de celle-ci. Cette méthode de dosage est sensible et spécifique, mais nécessite cependant une normalisation des résultats par rapport à la quantité de cellules (estimée par un dosage de protéines).

2.3.2 Méthodes

2.3.2.1 Incubations

Les cellules sontensemencées dans du DHG + 10 % de FBS, dans des boîtes de 12-puits (Costar, USA), à une densité de 5×10^4 cellules par puits. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence des différents inhibiteurs comme décrit au point 2.2.1.2.1. (FCCP 10 μM , 100 nM, 1 nM ; oligomycine 8 μM , 80 nM, 0,8 nM ; antimycine A 1 μM , 10 nM, 0,1 nM).

2.3.2.2 Extraction et dosages

2.3.2.2.1 Extraction d'ATP

Après 6 h d'incubation avec les inhibiteurs, suivies ou non d'une période de 24 heures de récupération, les cellules sont rincées deux fois délicatement par 1 ml de PBS (4°C). Ensuite, on ajoute 400 μl de tampon de lyse (Sigma, USA) (4°C) sur les cellules, pendant 15 s, avant de le récupérer dans des eppendorfs (Sarstedt, Allemagne) placés sur glace (4°C).

Ces échantillons sont alors rapidement congelés à -70°C en attendant le dosage, tandis que le tapis cellulaire restant est hydrolysé pendant 30 min dans 500 μl de NaOH 0,5 N. Sur

ces échantillons, on effectuera un dosage de protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2.3.2.2.2 *Dosage d'ATP*

La mixture réactionnelle, conservée à -70°C , est dégelée à température ambiante une heure avant usage. Le dosage proprement dit ne peut pas dépasser trois quarts d'heure pour des raisons de stabilité de la mixture.

L'échantillon à doser est dilué 30 fois dans l' H_2O distillée, sur glace, puis vortexé brièvement. 10 μl de cet échantillon sont mélangés à 100 μl de mixture de luciférine-luciférase, et l'émission de photons est mesurée grâce à un bioluminomètre (Biocounter M2010, Lumac, Pays-Bas). Le signal mesuré, exprimé en RLU (*relative light units*), est intégré pendant 30 s.

2.3.2.2.3 *Dosage de protéines*

Nous avons, dans ces expériences de dosage d'ATP ainsi que dans la suite de ce travail, dosé les protéines par la méthode décrite par Bradford en 1976 (Bradford, 1976).

Le dosage consiste à vortexer l'échantillon et à en prélever entre 1 et 10 μl (de manière à obtenir des valeurs de DO à 595 nm de l'ordre de 0,5), qu'on mélange à 1 ml de colorant de Bradford dilué 5x (BioRad, Allemagne). Après 5 minutes d'incubation, la DO est mesurée au spectrophotomètre (Stasar III, Gilford, USA) à 525 nm.

Le calcul des concentrations de protéines (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) est effectué grâce à un étalon *BSA* (*Bovine Serum Albumin*) dont la concentration connue (5 mg/ml) permet de déterminer la quantité de protéines dans l'échantillon.

2.4 RETARDS SUR GEL

Nous avons utilisé la technique de retard sur gel, ou *EMSA* (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), pour mettre en évidence l'activation de facteurs de transcription suite aux incubations des cellules avec les inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Cette technique a été utilisée à de nombreuses reprises pour différents facteurs de transcription, tels que NF- κB ,

AP-1, CREB..., pour mettre en évidence leur liaison à une séquence oligonucléotidique consensus marquée .

2.4.1 Extraction de protéines nucléaires

2.4.1.1 Principe

La méthode utilisée pour la préparation des extraits nucléaires se base sur celle décrite par Cohen *et al.*, (1997).

Dans une première étape, les cellules sont fragilisées dans un tampon hypotonique. Elles sont ensuite récupérées et resuspendues dans un tampon contenant un détergent, pour lyser les membranes plasmiques et entraîner la libération du cytoplasme. Cette lyse est une étape critique et doit être de courte durée pour ne pas endommager les membranes nucléaires.

Enfin, les noyaux (sédimentés par une centrifugation) sont repris dans un tampon salin, afin de permettre l'extraction des protéines nucléaires.

2.4.1.2 Méthode

Les cellules sont sous-cultivées dans des boîtes de 10 cm de diamètre (Corning, USA). Lorsqu'elles atteignent environ 90% de confluence, on les incube pendant 6 h en présence des différents inhibiteurs (FCCP, oligomycine, antimycine A) dilués dans 8 ml de milieu DHG sans sérum, aux concentrations de 10 μ M, 100 nM et 1 nM pour le FCCP; 8 μ M, 80 nM et 0,8 nM pour l'oligomycine et 1 μ M, 10 nM et 0,1 nM pour l'antimycine A. Ces incubations sont suivies de 18 h de récupération dans 10 ml de milieu DHG contenant 10 % de FBS.

Au terme de ces incubations, les cellules sont d'abord rincées avec 5 ml de PBS (4°C), puis raclées dans 1 ml de PBS contenant des inhibiteurs de phosphatases (1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 10 mM p-nitrophénylphosphate, 10 mM β -glycérophosphate). Les différents tampons utilisés lors de la préparation des extraits nucléaires doivent être maintenus à 4°C.

Les cellules sont ensuite sédimentées par 10 min de centrifugation à 1000 rpm (4°C) (Labofuge 400R, Heraeus, Allemagne), puis resuspendues dans 1 ml de tampon hypotonique (*Hypotonic Buffer HB* : 20 mM HEPES, pH 7,9 ; 5 mM NaF; 1 mM Na_2MoO_4 ; 0,1 mM EDTA; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne) et de phosphatases (1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 10 mM p-nitrophénylphosphate, 10 mM β -glycérophosphate).

La suspension centrifugée à 1000 rpm pendant 4 min (4°C) (Labofuge 400R, Heraeus, Allemagne). Le culot de cellules est alors homogénéisé dans 500 µl de HB contenant 0,2% de NP-40 (Sigma, USA).

La suspension est ensuite centrifugée 30 s à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne), et la fraction nucléaire ainsi obtenue est rapidement resuspendue dans un volume équivalent (environ 100 µl) de tampon HB contenant 20% de glycérol (Merck, Allemagne). L'extraction des protéines nucléaires est réalisée en incubant les noyaux en présence d'un volume équivalent (environ 200µl) de HB contenant 20% de glycérol (Merck, Allemagne) et 0,8 M en NaCl, sur un agitateur rotatif à 4°C pendant 30 min minimum.

Enfin, on centrifuge 10 min à 13000 rpm (4°C) (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) et on récupère le surnageant (*extrait nucléaire*), qui est aliquoté en fractions de 20 µl congelées à -70°C.

2.4.2 Marquage et purification de la sonde oligonucléotidique

2.4.2.1 Principe

La sonde est marquée avec du phosphore radioactif (^{32}P), qui émet un rayonnement β capable d'imprimer un film radiographique – ceci permet donc de détecter sa position sur le gel après migration. Cet atome radioactif est présent dans le dernier groupement phosphate d'une molécule d'ATP, et est transféré à la sonde par phosphorylation de ses extrémités 5' par une polynucléotide kinase (PNK).

Après marquage, la sonde est ensuite purifiée sur une colonne à tamis moléculaire, de manière à éliminer le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP non consommé par la kinase. Ce type de colonne permet de récupérer la sonde dans les premières fractions, alors que l'ATP radioactif est retenu plus longtemps en raison de sa petite taille.

2.4.2.2 Méthode

2.4.2.2.1 Réaction de marquage

On ajoute à 5 µl d'eau distillée :

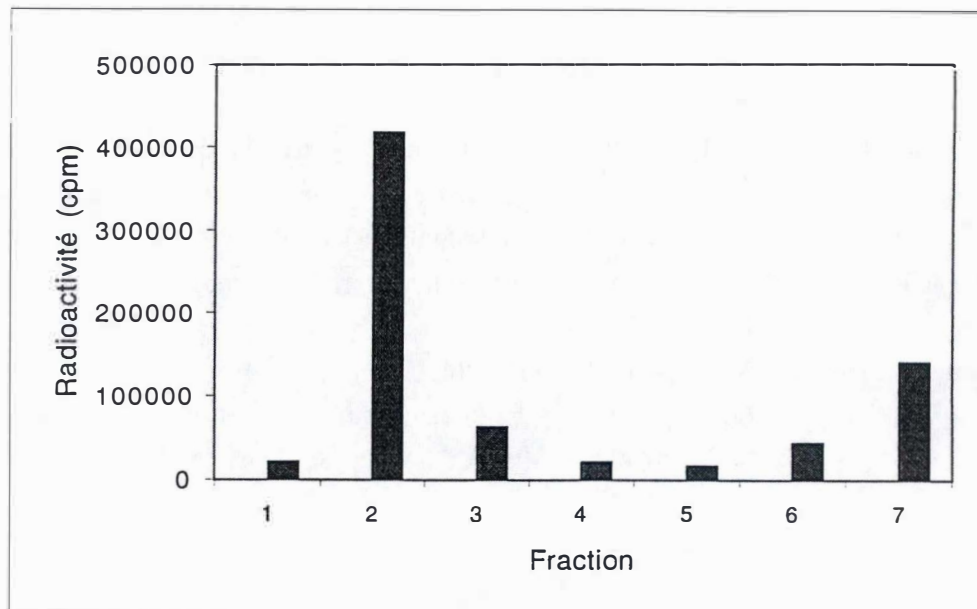


Fig. 2.3 : Profil-type obtenu après marquage d'une sonde oligonucléotidique synthétique au ^{32}P et purification sur tamis moléculaire (G25). La sonde, attendue dans les premières fractions, correspond au pic de radioactivité de la fraction 2 (résultats exprimés en cpm). L'ATP radioactif résiduel se retrouve élué dans la fraction 7, plus tardive.

- . 10 unités de T4 PNK (Roche, Allemagne) (1 µl)
 - . 1 µl tampon de phosphorylation (Roche, Allemagne) (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µM EDTA, 5 mM DTT, 100 µM spermidine ; pH 8,2)
 - . 10 µCi [γ -³²P] ATP (Nen, USA) (1 µl)
 - . 3,5 pmol de sonde oligonucléotidique (Promega, USA) (2 µl)
- Le marquage est réalisé pendant 30 min à 37°C.

La sonde consensus liant les facteurs de la famille CREB a la séquence suivante :

5'- AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG -3'
 3'- T CT CTA ACG GAC TGC AGT CTC TCG ATC -5'

Les nucléotides soulignés correspondent à la séquence consensus minimale de reconnaissance de ces facteurs.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé une sonde mutée et non reconnue par les facteurs, dérivée de celle mentionnée ci-dessus, mais présentant une substitution de deux bp (5'-AC-3' →5'-TG-3') au niveau du site consensus de liaison à CREB:

5'- AGA GAT TGC CTG TGG TCA GAG AGC TAG -3'
 3'- T CT CTA ACG GAC ACC AGT CTC TCG ATC -5'

2.4.2.2.2 Purification de la sonde marquée

On ajoute 10 µl d'eau distillée aux 10 µl de sonde marquée au point 2.4.2.2.1. Ces 20 µl sont centrifugés sur une colonne G25 (Roche, Allemagne) pendant 2 min à 2400 rpm (Jouan B3.11, Vel, Allemagne). Le premier éluat est récupéré et la colonne est rincée avec 40 µl d'eau distillée (2400 rpm, 2 min) (Jouan B3.11, Vel, Allemagne) pour obtenir une deuxième fraction, puis une troisième, et ainsi de suite.

Pour mesurer au compteur à scintillations (Beckmann LS 1801, USA) la radioactivité associée à chaque fraction, on en prélève 2 µl, qu'on mélange à 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas). La première fraction éluee présentant un pic de radioactivité contient la sonde marquée au ³²P. Celle-ci est alors diluée dans l'eau distillée de manière à obtenir entre 40000 et 50000 cpm/µl, puis congelée à -20°C. Un profil de purification type obtenu pour la sonde liant le facteur CREB est montré à la figure 2.3.

2.4.3 Retard sur gel

2.4.3.1 Principe

Sur un gel de polyacrylamide, on charge des extraits de protéines nucléaires, issus de cellules stimulées (ou non). Ces extraits sont préalablement incubés avec une sonde ADN double brin liant le facteur de transcription dont on veut tester la liaison. Cette sonde est marquée radioactivement pour permettre une révélation par autoradiographie.

Après migration, la sonde libre se retrouve dans le bas du gel alors que, si le facteur de transcription en question s'y lie, le complexe formé est retardé sur le gel et l'on obtient un « signal EMSA », caractéristique de la liaison du facteur à sa séquence consensus.

2.4.3.2 Méthode

Ces expériences de retard sur gel ont été réalisées au moyen d'une sonde oligonucléotidique double brin liant le facteur de transcription CREB. La séquence de cette sonde a été donnée au point 2.4.2.2.1.

2.4.3.2.1 Préparation des échantillons

Chacune des pistes aménagées dans le gel recevra un mélange de 25 µl contenant :

- . 5 µl de *Gel Shift Binding Buffer* (4% glycérol ; 1 mM MgCl₂ ; 0,5 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 50 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 0,05 mg/ml poly-dIC)
- . 5 µg d'extrait nucléaire préparé au point 2.4.1.2.
- . 40000-50000 cpm (1 µl) de sonde radioactive préparée au point 2.4.2.2.1.

Dans certains échantillons, on remplace la sonde sauvage par 1 µl de sonde mutée, également marquée radioactivement. Des tests de compétition sont aussi réalisés en présence d'un excès de 10x ou de 100x en sonde non marquée (sauvage ou mutée) par rapport à la sonde marquée.

Pour les expériences de compétition, la sonde en excès est pré-incubée 10 min à température ambiante avec les extraits nucléaires. On ajoute ensuite 0,014 pmol de sonde radioactive préparée au point 2.4.2.2, et on laisse incuber 20 min à température ambiante. Enfin, pour les tests de *super-shift*, on ajoute encore 1 µg d'anticorps anti-CREB (Santa Cruz,

USA) ou 1 µg d'anticorps anti-pCREB (Upstate, USA) après les incubations permettant la liaison et ce pour une incubation supplémentaire d'une heure à 4°C avant de charger les échantillons sur le gel. Le volume des différents échantillons est enfin ajusté à 25 µl avec de l'H₂O distillée.

2.4.3.2.2 Migration

Les échantillons sont chargés dans les puits aménagés au sommet d'un gel coulé entre deux plaques de verre, polymérisé 45 min (minimum) à température ambiante et monté dans une cuve d'électrophorèse. Ce gel, dont la composition est détaillée ci-dessous, est préalablement soumis à un pré-run d'une heure (120 V) dans du tampon TBE 0,5x avant de recevoir les échantillons.

- . 41 ml eau distillée
- . 7 ml d'une solution d'acrylamide 30 % (Gibco BRL, Grande Bretagne) et de bis-acrylamide 1 % (Gibco BRL, Grande Bretagne)
- . 2,5 ml TBE 10x (Gibco BRL, Grande Bretagne) (107,8 g Tris-base ; 55 g acide borique ; 7,44 g EDTA par litre)
- . 150 µl d'ammonium persulfate (APS) 20 % (BioRad, Allemagne)
- . 25 µl TEMED (N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylènediamine) (BioRad, Allemagne)

La migration des échantillons dure 1 h à 100 V, puis 30 min à 130 V.

Le gel est ensuite séché sous vide à 80°C, pendant 45 min. Une pré-visualisation du résultat est effectuée à l'Instant Imager (Electronic Autoradiography, Packard, Australie). Ensuite, on expose un film autoradiographique (Hyperfilm MP, Amersham, Grande Bretagne) sur le gel pendant 24-48 h à -70°C avant de pouvoir révéler.

2.4.3.2.3 Révélation

Après exposition, le film est plongé quelques minutes dans une solution de révélateur (Ilford 200RT, Ilford, Grande Bretagne) puis lavé à l'eau distillée avant d'être fixé quelques minutes dans une solution de fixateur (Ilford 200RT, Ilford, Grande Bretagne). Le film est ensuite bien rincé à l'eau pour éliminer toute trace de fixateur, et laissé sécher à l'air libre avant d'être scanné.

2.5 WESTERN BLOTTING

Nous avons utilisé la technique de *Western blotting* pour montrer la phosphorylation de CREB dans des cellules traitées avec des inhibiteurs de l'activité mitochondriale, pour contrôler la quantité de protéine immunoprécipitée lors de tests d'activité kinase *in vitro* (voir point 2.6), ainsi que pour vérifier les taux d'expression de photoprotéines (apoequorine) transfectées lors des dosages de calcium (voir point 2.9.1).

2.5.1 Principe

Les extraits cellulaires sont chargés sur un gel de polyacrylamide, de pourcentage défini, soumis à une différence de potentiel qui entraîne leur migration dans le gel et, donc, la séparation des protéines en fonction de leur taille. Un marqueur de poids moléculaire coloré, contenant un mélange de protéines de poids moléculaires connus facilement repérables après la migration, est utilisé afin de vérifier la taille de la protéine recherchée. Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene fluoride), tout en respectant leurs positions relatives. On peut alors – après un traitement destiné à limiter la fixation non spécifique des anticorps sur la membrane – détecter la position de la protéine d'intérêt avec un anticorps dirigé contre l'un de ses épitopes, comme par exemple, le domaine contenant le site de phosphorylation privilégié de CREB. Cette région comprend en particulier une sérine, en position 133 (Ser133), qui est la cible directe de plusieurs kinases (PKA, CaMK IV). L'activation de CREB *via* phosphorylation de cette sérine permet l'expression de différents gènes placés sous le contrôle de ce facteur, alors dénommé *pCREB* (*phospho-CREB*).

La seconde étape consiste à ajouter un anticorps secondaire, qui reconnaît les fragments F_c de l'anticorps primaire anti-pCREB. Cet anticorps secondaire est conjugué à une peroxydase extraite du raifort, la *HRP* (*horseradish peroxidase*). Enfin, l'étape de révélation se fait en présence en présence du substrat de l'enzyme et de luminol qui permet l'émission de photons capable d'imprimer un film autoradiographique. Le système ECL (Enhanced ChemiLuminescence) utilisé provient de chez NEN (USA).

2.5.2 Méthodes

2.5.2.1 Sous-culture, incubations et préparation d'extraits protéiques totaux

Les cellules HEK 293 sont sous-cultivées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (Corning, USA) et incubées pendant 6 h en présence ou non (cellules contrôles) de FCCP 10

μM , d'oligomycine $8 \mu\text{M}$ et d'antimycine A $1 \mu\text{M}$. Après 18 h de récupération dans du milieu DHG + 10 % de FBS, les cellules sont rincées avec 5 ml de PBS, récoltées dans 1 ml de PBS, centrifugées à 1000 rpm pendant 10 min puis lysées pendant 30 min dans 1 ml de tampon de lyse (40 mM Tris ; pH 7.5, 300 mM KCl, 2 mM EDTA, 1% Triton) contenant des inhibiteurs de phosphatases (1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 10 mM p-nitrophénylphosphate, 10 mM β -glycérophosphate) et des inhibiteurs de protéases en tablettes (Roche, Allemagne). Les lysats obtenus sont alors centrifugés 15 min à 13000 rpm (4°C). Les protéines sont dosées à partir des surnageants (lysats clairs) de chacun de ces échantillons par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2.5.2.2 Préparation des échantillons pour pCREB

On prépare un mélange de 50 μl contenant :

- . 20 μg d'échantillon (extraits cellulaires totaux préparés en 2.5.2.1) portés à 40 μl avec du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de phosphatases
- . 10 μl *sample buffer 5x* (0,5 M Tris pH 6,8 ; 20 % SDS ; 20 % glycérol ; 1 % bleu de bromophénol ; 20 % bromo-mercapto-éthanol)

Ces échantillons sont portés à 100°C pendant 5 min, refroidis sur glace, centrifugés par un *spin* de 1 min à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) avant d'être chargés dans les puits du gel. 25 μl du marqueur de poids moléculaire *Rainbow RPN 800* (Amersham, Grande Bretagne) sont également chargés à côté des échantillons pour un repérage aisé de la protéine d'intérêt.

2.5.2.3 Préparation des gels et migration

La migration se fait successivement à travers un gel de deux compositions différentes : le premier concentre les protéines qui sont ensuite séparés en fonction de leur poids moléculaire dans le second. La composition de ces gels est détaillée ci-dessous :

Gel de concentration :

- . 1,5 ml d'une solution de polyacrylamide 30 % (Gibco BRL, Grande Bretagne) et de bis-acrylamide 0,8 % (Gibco BRL, Grande Bretagne)
- . 3,5 ml H_2O
- . 5 ml *buffer B* (121 ml Tris-HCl 2 M; 4 ml Tris-base 2 M; 10 ml SDS 20 % ; 365 ml H_2O ; pH 6,8)
- . 40 μl d'ammonium persulfate (APS) 25 % (BioRad, Allemagne)

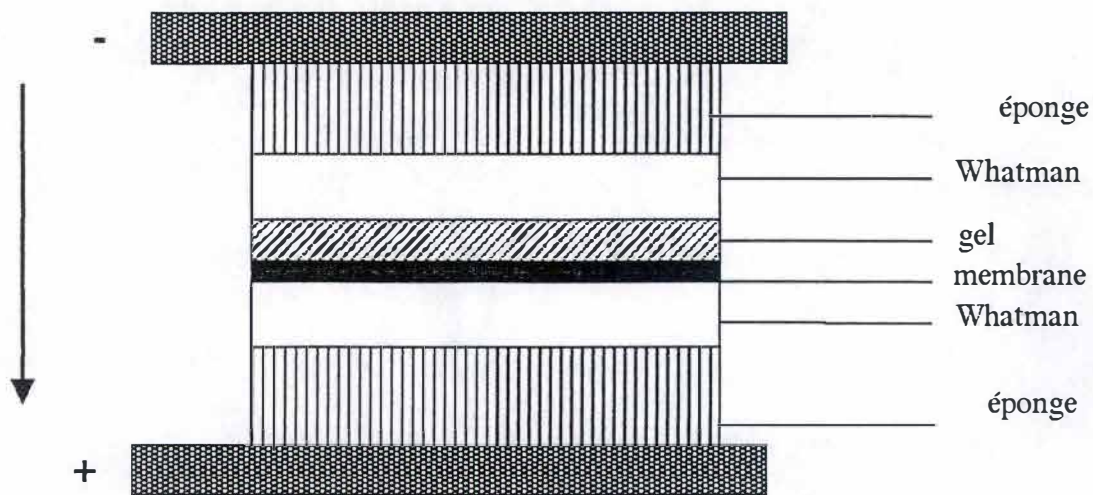


Fig. 2.4 : Représentation schématique du montage « en sandwich » utilisé pour le transfert des protéines du gel sur une membrane de PVDF dans les expériences de *Western blotting*.

. 15 µl TEMED (BioRad, Allemagne)

Gel de séparation :

. 15 ml d'une solution de polyacrylamide 30 % (Gibco BRL, Grande Bretagne) et de bis-acrylamide 0,15 % (Gibco BRL, Grande Bretagne)

. 7,5 ml H₂O

. 22,5 ml *buffer A* (90 ml Tris-HCl 2 M; 285 ml Tris-base 2 M; 10 ml SDS 20 %; 115 ml H₂O ; pH 8,8)

. 200 µl d'ammonium persulfate (APS) 25 % (BioRad, Allemagne)

. 75 µl TEMED (BioRad, Allemagne)

Les sels proviennent de chez Merck (Allemagne) et le bleu de bromophénol de chez Janssen Chimica (Belgique) et la concentration des gels de séparation (8, 10 ou 12%) est fonction du PM de la protéine d'intérêt. Chacun de ces gels est coulé entre les plaques de montage et doit polymériser à température ambiante pendant 45 min (minimum). Des puits sont créés au sommet gel à l'aide d'un peigne pour permettre de déposer les échantillons.

La migration a lieu dans un tampon de migration ou *running buffer 1x* (0,05 M Tris-base; 0,38 M glycine; 0,1 % g SDS). Les échantillons migrent dans le gel de concentration pendant 45 min (90 volts et 50 mA), puis dans le gel de séparation pendant 4 heures (150 volts et 50 mA).

2.5.2.4 Transfert sur membrane de PVDF

Cette étape de « *blotting* » se déroule dans un tampon de transfert dont la composition est la suivante: 0,5 M Tris-base, pH 8.3; 0,76 M glycine (ICN, USA); 0,1 % SDS et 15% en méthanol (Acros, Belgique). Le gel, après démoulage, est déposé sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene flouride)(Polyscreen, Nen, USA), ayant approximativement la taille du gel dans un assemblage selon une disposition « en sandwich ». Deux électrodes enserrant le montage suivant : la membrane (vers l'anode) et le gel (vers la cathode) sont placés entre deux papiers Whatman (Macherey-Nagel, Allemagne) imbibés de tampon de transfert, puis entre deux éponges également imbibées. Un schéma du montage est présenté à la figure 2.4. Il faut absolument éviter la formation de bulles d'air entre les différentes couches de ce montage. On applique alors un courant de 150 mA entre les électrodes pendant 2 h pour permettre le transfert et la fixation des protéines (chargées négativement en présence de SDS) à la membrane.

2.5.2.5 Traitement de la membrane avec les anticorps et révélation

Le tampon employé lors du marquage de la membrane est le TBS (*Tris buffer saline*) de composition par litre: 2,4 g Tris; 8 g NaCl; pH 7,4, auquel on ajoute 0,1 % de Tween 20 pour obtenir du TBS-T. Les sels et réactifs sont de chez Roche (Allemagne).

Afin de saturer les sites de liaison non spécifiques que pourraient reconnaître l'anticorps primaire utilisé, la membrane est *bloquée* une heure sous agitation dans du TBS-T contenant 5 % de BSA (*bovine serum albumin*) (Sigma, USA) avant d'être incubée la nuit, à 4°C, avec l'anticorps primaire de lapin (anti-phospho CREB, Upstate, USA), dilué 1000 fois dans du TBS-T contenant 5 % de BSA.

Le lendemain, la membrane est rincée 3 X 5 min au TBS-T contenant 5 % de lait (Gloria, Nestlé, Belgique), puis incubée 45 min, à température ambiante, avec l'anticorps secondaire (anticorps d'âne anti-anticorps de lapin) couplé à la HRP (Amersham, Grande Bretagne) dilué 2000 fois dans du TBS-T contenant 5 % de lait. Trois derniers rinçages de 20 min dans le TBS-T sont réalisés avant de révéler la membrane 2-3 min dans une solution contenant 50 % d'H₂O₂ et de 50 % de luminol (ECL, Nen, USA).

En chambre noire, on expose alors un film autoradiographique (Hyperfilm MP, Amersham, Grande Bretagne) sur la membrane, pendant des périodes variables allant d'une seconde à une min, de manière à obtenir l'exposition souhaitée. Ce film est révélé comme cela a été décrit précédemment au point 2.4.3.2.3.

2.6 IMMUNOPRECIPITATION DE LA CaMKIV ET TEST D'ACTIVITE KINASE IN VITRO

Par la technique d'immunoprécipitation, nous avons isolé la *calmodulin-dependent kinase IV (CaMKIV)* à partir de lysats de cellules préalablement incubées ou non (contrôles) en présence d'inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Nous avons ensuite dosé l'activité de cette enzyme par un test d'activité kinase *in vitro* selon la méthode décrite par Anderson *et al.* (1998).

2.6.1 Immunoprécipitation

2.6.1.1 Principe

On peut purifier une molécule présente dans un lysat cellulaire en incubant celui-ci avec des anticorps dirigés contre un épitope de la protéine qu'on cherche à isoler. Ces anticorps

peuvent ensuite aller se greffer par leur fragment F_c sur des billes d'agarose ou de sépharose coatées à la protéine A ou G, qui permettent une sédimentation facile des immunocomplexes formés. Quelques rinçages assurent l'élimination des molécules qui n'ont pas d'affinité ni pour les anticorps ni pour les billes.

2.6.1.2 Méthodes

2.6.1.2.1 *Sous-culture et incubations*

Les cellules (HEK 293) utilisées dans cette expérience sont sous-cultivées à confluence dans des boîtes de Pétri (Corning, USA) de 10 cm de diamètre. Le lendemain, elles sont incubées pendant 6 h en présence de FCCP (10 µM), d'oligomycine (8 µM) ou d'antimycine A (1 µM), dilués dans du DHG sans sérum. Au terme de l'incubation, le milieu est remplacé par du DHG contenant 10 % de FBS pendant 18 h.

2.6.1.2.2 *Immunoprécipitation de la CaMKIV*

Après les incubations, les cellules sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS et lysées pendant 30 min (4°C) dans 1 ml de tampon de lyse (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 % Triton X-100 contenant un ensemble d'inhibiteurs de protéases (*Proteases inhibitors cocktail*, Roche, Allemagne). Après une centrifugation de 15 min à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) pour éliminer tout matériel insoluble au détergent, la CaMKIV est immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires par 5 µg/test d'anticorps polyclonal de chèvre anti-CaMKIV (Santa Cruz, USA). Les échantillons sont incubés à 4°C pendant 2 h sur un rotor.

Les complexes immuns sont ensuite immobilisés par une nouvelle incubation de 2 heures à 4°C avec 75 µl de *Protein G PLUS/Protein A-Agarose* (Oncogene, USA). Après cette immobilisation, ces complexes sont sédimentés par un spin (1 min) à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) puis rincés 3 X avec 800 µl de tampon de lyse et 2 X avec 800 µl de tampon de réaction (20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 0,5 mM DTT ; 0,1 % Tween 20 ; 8 mM MgCl₂ ; 20 µM ATP ; 1,2 mM CaCl₂ ; 1 µM calmoduline). Lors du dernier rinçage, 200 µl de suspension sont repris, centrifugés à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) et resuspendus dans 20 µl de tampon de Laemmelli (*sample buffer*) (0,5 M Tris pH 6,8 ; 20 % SDS ; 20 % glycérol ; 1 % bleu de bromophénol ; 20 % bromo-mercapto-éthanol). La quantité de CaMKIV immunoprécipitée sera ensuite analysée par Western blotting sur chaque fraction en utilisant l'anticorps anti-CaMKIV (dilution : 1/1000) et un

anticorps secondaire de lapin anti-chèvre couplé à la HRP (dilution : 1/2000) (DAKO, Danemark). L'étape de blocage de la membrane est réalisée dans du TBS-T + 5 % lait (Gloria, Nestlé, Belgique) pendant 1 h à 37°C, et la révélation est identique à celle décrite au point 2.5.2.5.

1.6.2 Test d'activité kinase *in vitro*

1.6.2.1 Principe

Ce test permet de mesurer l'activité kinase de la CaMKIV immunoprécipitée ci-dessus (point 2.6.1.2). Il est réalisé en présence d'un peptide synthétique utilisé comme substrat (*CREB Phosphopeptide*, New England BioLabs, USA) contenant le site de phosphorylation de CREB. Mis en présence de CaMKIV et d'ATP marqué au ^{32}P , ce peptide est reconnu, phosphorylé et donc marqué radioactivement.

La séquence de ce peptide (PM 1,8 kDa) est *Lys-Arg-Arg-Glu-Ile-Leu-Ser-Arg-Arg-Pro-Ser*-Tyr-Arg*. La sérine surmontée d'un astérisque correspond à la Ser133 du facteur CREB phosphorylé par la CaMKIV. Ce peptide est trop petit que pour pouvoir être visualisé sur gel de polyacrylamide. Nous utiliserons donc un système de membrane de phosphocellulose possédant une forte affinité pour les peptides phosphorylés (SpinZyme Pierce, USA). Après une centrifugation sur une membrane de phosphocellulose qui élimine l'ATP libre, le peptide phosphorylé est élué après 2 rinçages. Le comptage de la radioactivité associée à la membrane permet donc d'estimer l'activité kinase de la CaMKIV.

1.6.2.2 Méthodes

Après le dernier rinçage dans le tampon de réaction, les immunocomplexes sont resuspendus dans 40 μl de ce même tampon contenant cette fois 200 μM de peptide synthétique CREB (New England BioLabs, USA) et 10 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (Nen, USA). Les incubations permettant la réaction sont réalisées pendant 30 min à 30°C.

Des aliquots de 25 μl sont alors prélevés et déposés sur des membranes de phosphocellulose (Pierce, USA). Une brève centrifugation (spin de 30 s à 13000 rpm) (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) permet l'entrée de l'échantillon dans la membrane. Celle-ci est ensuite rincée deux fois avec 500 μl d'acide phosphorique (75 mM) et la radioactivité associée à la membrane est alors comptée dans un compteur à scintillations

(Beckmann LS 1801, USA) en présence de 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas).

1.7 MARQUAGE DE CREB PHOSPHORYLE (pCREB) ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE

Nous avons visualisé par immunocytochimie la présence et la localisation de CREB phosphorylé sur la sérine-133 (Ser-133) dans des cellules ayant été incubées en présence des inhibiteurs de l'activité mitochondriale.

1.7.1 Principe

Après traitement, on incube les cellules fixées et perméabilisées, en présence d'un anticorps primaire, reconnaissant un épitope présent sur la protéine qu'on souhaite localiser. Ensuite, après rinçages, on ajoute un anticorps secondaire dirigé contre les fragments F_c des anticorps primaires et couplé chimiquement à un fluorochrome (FITC, TRITC,...) qui, excité par une longueur d'onde adéquate, ré-émet de la lumière et permet donc une visualisation du marquage au moyen d'un microscope à fluorescence ou confocal.

1.7.2 Méthodes

1.7.2.1 Sous-cultures et incubations

Les cellules HEK 293 et L929 sontensemencées à une densité de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits (Costar, USA), au fond desquels on a préalablement déposé des lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne) stérilisées à l'alcool. Le lendemain, les inhibiteurs de l'activité mitochondriale sont ajoutés aux cellules comme décrit au point 2.2.1.2.1, alors que les cellules stimulées par de la forskoline (Sigma, USA) à une concentration de 10 μ M (dans du milieu sans sérum) sont incubées pendant 24 h avant le marquage.

1.7.2.2 Marquage de phospho-CREB (pCREB)

Après les incubations, les cellules sont rincées une fois par 1 ml de PBS préparé fraîchement et préchauffé à 37°C, puis fixées et perméabilisées par 1 ml d'un mélange de méthanol et d'acétone (80/20 : vol/vol) pendant 15 min. Elles sont ensuite rincées 1 fois par 1 ml de PBS, puis 2 fois 30 min par 1 ml de PBS contenant 1 % BSA.

On incube ensuite les cellules, pendant 24 h à 4°C, en présence de 40 µl d'anticorps de lapin anti-pCREB (Upstate, USA) dilué 1000x dans du PBS contenant 1 % BSA.

Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les cellules sont rincées 3 fois 30 min par 1 ml de PBS contenant 1 % BSA, puis incubées 1 h, à température ambiante, avec un anticorps secondaire anti-immunoglobulines de lapin couplé à la rhodamine (Alexa 578, anti-lapin) dilué 500x dans du PBS contenant 1 % BSA.

Enfin, on rince 3 fois les cellules pendant 10 min avec 1 ml de PBS contenant 1 % BSA et le montage est réalisé en retournant la lamelle couvre-objet sur une goutte de Mowiol (Sigma-Aldrich, Angleterre) préchauffé à 60°C puis déposée sur une lame porte-objet (Vel, Knittel Glaser, Allemagne). Les lames sont alors placées à 4°C et à l'obscurité pour permettre la polymérisation, puis conservées à -20°C avant d'être observées au microscope confocal. ($\lambda_{\text{excitation}} = 568 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 603 \text{ nm}$; PMT 800).

1.8 TRANSFECTION ET SYSTEME RAPPORTEUR LUCIFERASE

Nous avons utilisé la technique de transfection afin de mettre en évidence l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription CREB dans des cellules incubées en présence des inhibiteurs de l'activité mitochondriale.

1.8.1 Principe

Cette technique permet entre autres de tester l'effet d'un traitement sur l'activation d'un système rapporteur transfecté. Ce rapporteur consiste en un plasmide codant le gène du rapporteur (la *luciférase*, la GFP, la CAT...) précédé d'un promoteur authentique si l'on veut mesurer l'induction d'un gène particulier, ou d'un promoteur synthétique contenant une ou plusieurs séquences consensus liant un facteur de transcription d'intérêt. Ainsi, dans notre cas, nous avons utilisé un plasmide codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur

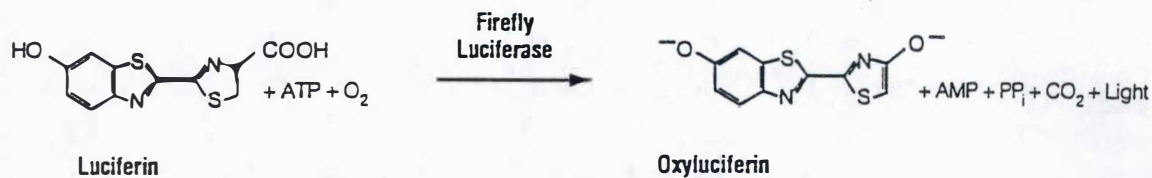


Fig. 2.5 : Réaction catalysée par la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*). En présence d'ATP et d'O₂, la luciférase oxyde une molécule de luciférine. Les produits de la réaction sont une molécule d'oxyluciférine, de l'AMP, du pyrophosphate (PP_i), du CO₂ et de la *lumière*. Cette émission de photons est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans l'échantillon. (Issu du manuel fourni avec le *Dual-Luciferase Reporter Assay System*, Promega, USA.)

authentique de l' α -inhibine contenant 4 séquences CRE (cAMP-response element) (Pei et al., 1991).

Comme l'efficacité de transfection n'est pas toujours équivalente d'un puits à l'autre, on co-transfecte un second plasmide codant pour la β -galactosidase, sous le contrôle d'un promoteur fort (SV-40) et permettant un dosage facile en multi-puits. Les valeurs de l'activité luciférase (RLU) normalisées par l'activité β -galactosidase, seront également rapportées à la quantité de protéines, afin de contrôler également la quantité de cellules dans chaque test.

1.1.1.1 Transfection au phosphate de calcium

Les transfections sont réalisées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium qui se base sur la perméabilisation des membranes plasmiques pour permettre l'entrée d'ADN dans la cellule. Après la transfection, les cellules sont stressées et c'est pourquoi on les laisse récupérer 18 h dans du DHG + 10 % de FBS avant de les incuber en présence des inhibiteurs.

1.1.1.2 Dosages de la luciférase et de la β -galactosidase

La luciférase de luciole est exprimée si le facteur de transcription étudié et se lie au promoteur qui contrôle son expression et est activé. L'activité luciférase a été dosée à l'aide du kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, USA). La luciférase peut transférer un AMP sur la luciférine en présence d'ATP pour former un intermédiaire qui, en présence d'O₂, se fait oxyder en oxyluciférine et libère alors des photons – ce qui permet une quantification de la lumière émise, au moyen d'un bioluminomètre (voir Figure 2.5).

La β -galactosidase d'*E. coli*, dont le gène (*LacZ*) est inséré dans un plasmide d'expression sous le contrôle d'un promoteur viral (SV-40). La β -galactosidase exprimée constitutivement est donc utilisée comme contrôle de transfection pour normaliser les résultats. L'activité β -galactosidase est dosée dans une mixture réactionnelle de composition pour 100 ml : 5 ml tampon phosphate¹ 200 mM pH 7,3; 50 μ l MgCl₂ 2 M; 350 μ l 2-mercaptoéthanol; 66,5 μ g de substrat ONPG (Sigma, USA) (*O*-nitrophényl-galactopyranoside). Lorsqu'il est clivé par l'enzyme, le produit de réaction présente un pic d'absorbance à 405 nm.

¹ Tampon phosphate 0,5 M pH 7,3 (1 litre): 134 g Na₂HPO₄.7 H₂O (Merck, Allemagne); 4 ml H₃PO₄ 85 % (Sigma, USA)

1.1.2 Méthodes

1.1.2.1 Sous-culture

Les cellules HEK 293 utilisées pour l'expérience sont sous-cultivées dans des boîtes de 12 puits (Costar, USA), à partir d'une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre confluente à 80 %. Elles sont diluées dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS avant d'être réparties dans les puits, à raison de 75 000 cellules dans 1 ml par puits.

1.1.2.2 Transfection

On transfecte 0,5 µg de chaque plasmide par puits. Ces plasmides sont dilués dans 40 µl/puits de CaCl₂ 0,25 M stérilisé par filtration (0,22 µm), auxquels on ajoute, goutte à goutte et sous agitation au vortex, 40 µl de tampon HEBES 2x concentré (50 mM Hepes, pH 7.05 ; 280 nM NaCl , 10 mM KCl ; 1,5 mM Na₂HPO₄ et 12 mM dextrose). On obtient donc un mélange trouble d'environ 80 µl contenant l'ADN capturé dans les microcristaux de phosphate de calcium, qui est ajouté au milieu de culture de chaque puits. La transfection dure alors 8 h à 37°C, est suivie d'un changement de milieu (1 ml de DHG contenant 10 % de FBS) permettant aux cellules de récupérer pendant 18 h.

1.1.2.3 Inhibitions

Au terme de ces 18 h, les cellules sont incubées ou non (contrôles) en présence des inhibiteurs dont on veut tester l'effet (FCCP, oligomycine, antimycine A) comme cela a déjà été détaillé au point 2.2.1.2.1. (dilutions dans DHG sans sérum, 6 h d'incubation suivies ou non de 24 h de récupération dans DHG contenant 10 % de FBS).

1.1.2.4 Dosages

1.1.2.4.1 Lyse des cellules

On rince les cellules par 1 ml de PBS, puis on lyse les cellules dans 250 μ l de tampon de lyse (*Passive Lysis Buffer*, Promega, USA), pendant 15 min à température ambiante sur agitateur rotatif. Ensuite, on centrifuge 3 min à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne) et on récupère les surnageants, sur lesquels seront réalisés les dosages des activités luciférase et β -galactosidase.

1.1.2.4.2 Dosage de la luciférase

Le *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* est préparé et conservé selon les instructions du manuel du kit de *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, USA). On mélange 20 μ l d'échantillon dans 100 μ l de *LAR II* avant de faire une lecture au bioluminomètre (Biocounter M2010, Lumac, Pays-Bas).

1.1.2.4.3 Dosage de la β -galactosidase

On effectue ce dosage dans des plaques 96-puits (Costar, USA), dans lesquels on met d'abord 40 μ l de mixture contenant le substrat de la β -galactosidase, et ensuite 40 μ l d'échantillon ou de tampon de lyse (blanc). On incube alors 10 min au minimum, à 37°C, avant de faire une mesure de l'absorbance à 405 nm grâce à un lecteur de plaques (Ultramark, BioRad, Allemagne). Le temps d'incubation est ajusté pour que les valeurs de densité optique (D.O.) soient comprises entre 0,1 et 0,5.

Ces valeurs permettent de normaliser les résultats du dosage de l'activité luciférase (RLU/ β -Gal). Ces valeurs sont ensuite rapportées à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford. Les résultats sont donc finalement exprimés en *RLU/ β -gal/ μ g protéines*.

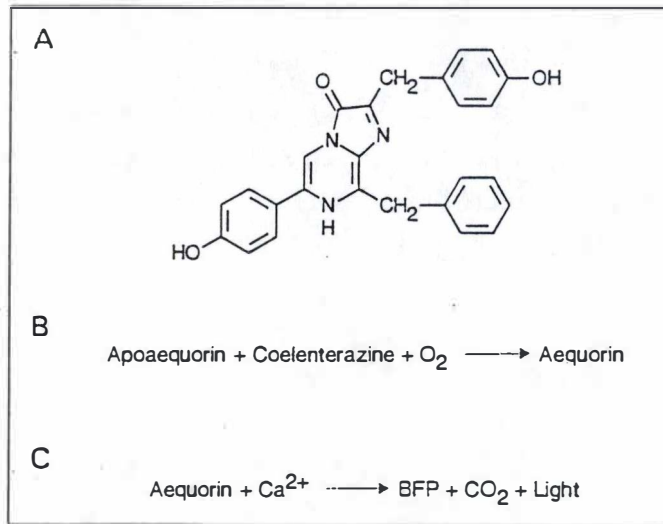


Fig. 2.6 : (A) Structure de la *coelenterazine*. (B) L'apoaequorine, protéine extraite de la méduse *Aequorea victoria*, s'associe à la coelenterazine en présence d'O₂ pour former le complexe *aequorine*. (C) Après liaison au calcium, l'apoaequorine oxyde la coelenterazine. Cette réaction s'accompagne de la formation de la *Blue Fluorescent Protein (BFP)*, de CO₂ et de l'émission de lumière bleue ($\lambda_{\text{max}} = 466 \text{ nm}$). (Issu du manuel fourni avec le kit de dosage du calcium *Mammalian Aequorin Expression Vectors*, Molecular Probes, USA.)

1.9 MESURES DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM : SYSTEMES AEQUORINE ET FURA-2

Pour voir si les inhibitions pharmacologiques mitochondriales exercent un effet sur la concentration en calcium cytoplasmique ou mitochondriale, nous avons utilisé deux systèmes : un premier utilisant une photoprotéine (apoequorine) émettant de la lumière en présence de Ca^{2+} et un second basé sur les sondes fluorescentes telles que Fura-2.

1.9.1 Système apoequorine-coelenterazine

Avec ce système, nous avons comparé les concentrations en calcium cytoplasmique et mitochondrial après 6 h d'incubation en présence ou non (contrôles) des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives.

1.9.1.1 Principe

Le système utilisé dans cette expérience provient du Cnidaire *Aequoria victoria*, et est composé d'une part d'une protéine de 22 kDa (*l'apoequorine*) et d'autre part de la coelenterazine. Ces deux molécules, en présence d'oxygène moléculaire, peuvent s'associer en un complexe (aequorine) qui émet du CO_2 et des photons ($\lambda = 466 \text{ nm}$), et ce uniquement en présence de calcium (voir figure 2.6). La quantité de photons émise est proportionnelle à la concentration en calcium. Pour permettre la formation de ce complexe dans les cellules, nous avons préalablement transfecté les cellules avec un plasmide d'expression contenant le gène de l'apoequorine. Une deuxième construction contient le gène muni d'une courte séquence codant pour un signal qui adresse l'apoequorine dans la mitochondrie (signal d'importation de la sous-unité VIII de la cytochrome oxydase), alors que les transfections réalisées avec l'apoequorine cytoplasmique conduisent à une localisation cytoplasmique de celle-ci (figure 2.7). Il faut signaler que cette protéine est exprimée comme une protéine de fusion avec un épitope d'une protéine du virus de l'influenza, l'hémagglutinine (HA). Cet *HA-epitope tag* permet une détection par Western blotting, ainsi qu'une visualisation en microscopie confocale de la localisation de l'apoequorine à l'aide d'un anticorps primaire anti-HA et d'un anticorps secondaire Alexa 495 ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 519 \text{ nm}$; PMT 800).

Il suffit alors d'incuber les cellules en présence de coelenterazine, qui traverse facilement les membranes plasmiques, de manière à reconstituer un système fonctionnel

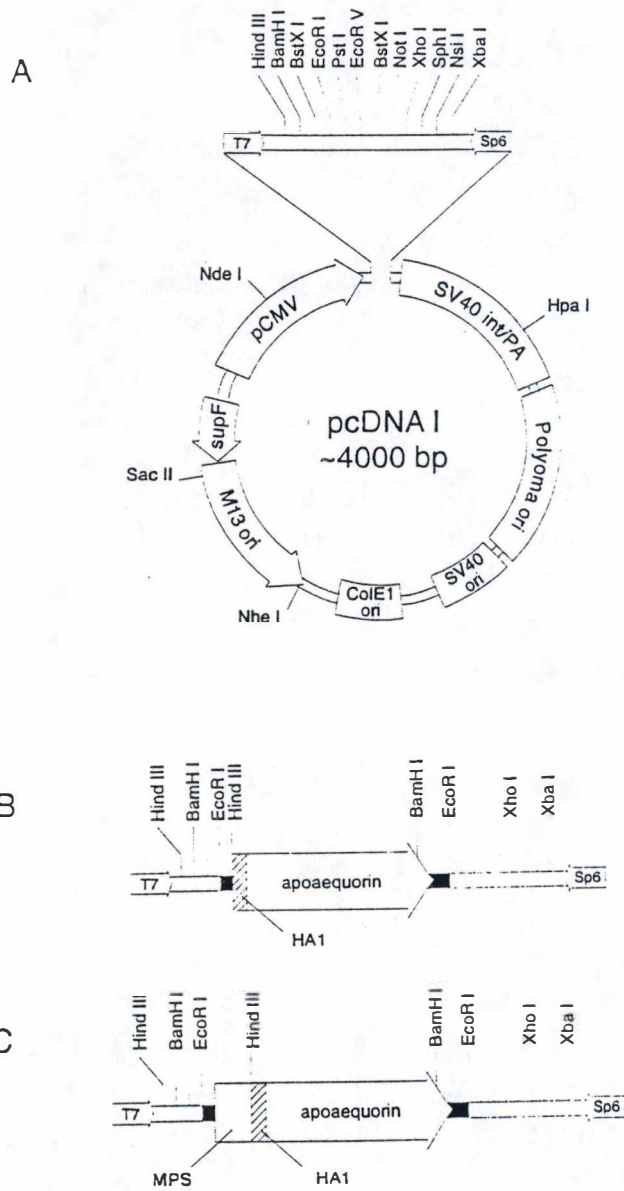


Fig. 2.7 : (A) Carte du vecteur *pcDNA1*. Ce vecteur contient un promoteur fort de type *cytomegalovirus* (*pCMV*), un signal de processing et de polyadénylation (*SV40 int/PA*), des origines de répliation (*M13*, *ColE1*, *SV40*, *Polyoma ori*) et les promoteurs T7 et Sp6. (B) *cytAEQ/pcDNA1* : insertion du gène de l'apoaequorine fusionné à une séquence codant pour un épitope de l'hémagglutinine (HA1) dans le vecteur *pcDNA1*. (C) *mtAEQ/pcDNA1* : Insertion du gène de l'apoaequorine fusionné à HA1 et à la séquence d'adressage de la sous-unité VIII de la cytochrome oxydase (*MPS* : *mitochondrial-targeting pre-sequence*). (Issu du manuel fourni avec le kit de dosage du calcium *Mammalian Aequorin Expression Vectors*, Molecular Probes, USA.)

permettant de doser les variations de concentration en calcium, soit cytoplasmique soit mitochondrial, suite à une inhibition de l'activité mitochondriale.

1.9.1.2 Méthodes

1.9.1.2.1 *Sous-culture et transfection*

Les cellules sont sous-cultivées dans du DHG contenant 10 % de FBS dans des boîtes de 12 puits (Costar, USA) à une densité de 75000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont transfectées avec 1,5 µg du plasmide d'expression *pcDNA1* codant de manière constitutive pour l'apoeaeguorine (Molecular Probe, USA), soit exprimée dans le cytosol (*cytAEQ/pcDNA1*), soit adressée dans la mitochondrie (*mtAEQ/pcDNA1*).

La méthode de transfection utilisée est la précipitation au phosphate de calcium décrite précédemment (point 6.2.2). Après 8 heures de transfection, le milieu est renouvelé par 1 ml de DHG contenant 10 % de FBS pour permettre la récupération pendant 18 h.

1.9.1.2.2 *Incubations*

Ensuite, les différents inhibiteurs sont ajoutés aux concentrations désirées. Les dilutions pour obtenir les concentrations finales de 10 µM en FCCP, 8 µM en oligomycine et 1 µM en antimycine A sont réalisées dans du DHG, et les molécules sont incubées pendant 6 heures.

Une heure après le début de l'incubation en présence des différents inhibiteurs, la coelenterazine (Molecular Probe, USA) est ajoutée pendant 5 h à une concentration de 2,5 µM, pour permettre la constitution du complexe apoeaeguorine/coelenterazine.

1.9.1.2.3 *Dosages de calcium*

Les cellules sont ensuite collectées dans le milieu de culture, puis centrifugées pendant 10 min à 1000 rpm (Labofuge 400R, Heraeus, Allemagne). Le culot de cellules obtenu est resuspendu dans 50 µl de HBSS (*Hank's balanced salt solution*) ne contenant pas de NaHCO₃ (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM MgSO₄, 0,5 mM MgCl₂, 5,5 mM Na₂HPO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 5,5 mM glucose, pH 7,4). Les mesures d'émission de photons sont réalisées au bioluminomètre (Biocounter M2010, Lumac, Pays-Bas). Des valeurs maximales sont déterminées en permettant l'accès de l'aeuorine à une solution hypotonique contenant

10 mM en CaCl_2 . Pour ce faire, les cellules sont resuspendues dans 100 μl de CaCl_2 10 mM (Merck, Allemagne) pendant 30 min avant les lectures. Pour une des expériences réalisées sur une quantité de cellules plus importantes (± 300000 cellules/test), les échantillons sont conservés après les lectures et 50 μl de tampon de lyse (40 mM Tris ; pH 7.5, 300 mM KCl, 2 mM EDTA, 1% Triton) sont ajoutés pendant 30 min à 4°C. Le taux d'expression de l'apoeaequorine dans les différents tests a alors été déterminé par Western blotting en utilisant un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-hémagglutinine (anti-HA) (Santa Cruz, USA).

1.9.2 Système de la sonde fluorescente Fura-2

Grâce à ce système, nous avons pu quantifier et étudier la cinétique des variations de concentration en calcium cytoplasmique libre survenant pendant les 30 premières min d'une inhibition au FCCP. Le système précédent est inutilisable dans ces conditions en raison de la période nécessaire pour la reconstitution du complexe aequorine en présence de coelentérazine (minimum 1 h).

1.9.2.1 Principe

Le Fura-2-AM est une sonde qui permet de mesurer semi-quantitativement la concentration en calcium cytosolique libre (Grynkiewicz et al., 1985).

Comme beaucoup de sondes de ce type, caractérisées par plusieurs groupements carboxyliques, Fura-2 doit être estérifiée avant de pouvoir franchir la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, des estérases se chargent de cliver cet ester de manière à générer la sonde qui, sous sa forme anionique, ne peut plus sortir de la cellule ou entrer dans les organites mais peut complexer le calcium libre dans une stoechiométrie de 1:1. Fura-2 peut être excitée à deux longueurs d'onde différentes (340 nm et 380 nm). Dans les deux cas, elle émet des photons ayant une longueur d'onde de 510 nm, mais l'intensité de cette émission dépendra de la concentration en calcium. En effet, quand la quantité en Ca^{2+} augmente, Fura-2 émet plus de photons suite à une excitation à 340 nm que suite à une excitation à 380 nm ; le pic d'émission (à 510 nm) de la sonde est donc déplacé vers les longueurs d'onde excitatrices de 340 nm lorsque la concentration en calcium augmente, et ceci permet de calculer, après quelques corrections, la $[\text{Ca}^{2+}]$ cytosolique sous diverses conditions.

On peut signaler que, quand la sonde est excitée à 358 nm, l'intensité de la fluorescence émise à 510 nm ne varie pas (ou peu) en fonction de la concentration en calcium.

1.9.2.2 Méthodes

1.9.2.2.1 *Sous-culture et chargement de la sonde*

On repique les cellules dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS, dans des boîtes de 35 mm de diamètre (Falcon, Grande-Bretagne) au fond desquelles on a préalablement déposé des lamelles couvre-objet stérilisées à l'alcool. Quand les cellules arrivent à confluence, le milieu de culture est remplacé par 2 ml de DHG contenant 10 % de FBS et 0,25 μM de Fura-2 estérifiée. Les cellules sont alors incubées 1 h à 37°C et à l'obscurité pour permettre l'entrée de la sonde, puis rincées 3x par 1 ml de tampon HBSS (37°C) pour éliminer l'excès de celle-ci. Les couvre-objets seront insérés dans une cuvette en quartz à quatre faces polies contenant 3 ml de tampon HBSS pour effectuer les mesures au spectrofluorimètre (Kontron, Suisse).

1.9.2.2.2 *Inhibition et dosage*

On effectue les différentes mesures après des temps d'incubation croissants (de 0 à 30 min) en présence de 10 μM en FCCP. Le dosage consiste alors à exposer successivement la monocouche cellulaire à trois longueurs d'onde d'excitation (340, 358 et 380 nm) et à mesurer les intensités d'émission du complexe Fura-2/ Ca^{2+} à 510 nm. On obtient donc trois valeurs appelées F_{340} , F_{358} et F_{380} . Le passage de 340 nm à 380 nm doit être très rapide et devrait même être simultané.

On calcule ensuite trois autres valeurs ($F_{340 \text{ max}}$, $F_{358 \text{ max}}$, $F_{380 \text{ max}}$) correspondant à la fluorescence maximale obtenue en ajoutant 300 μl de Triton X-100 (10 %) qui, en perméabilisant les membranes, expose la sonde au calcium extracellulaire (1 mM).

On ajoute encore de l'EDTA 5 mM final, dilué dans du Tris-HCl 1 M (pH 8,3), qui chélate tout le calcium et déplace le calcium de la sonde qui se retrouve donc sous forme libre. On peut alors mesurer les valeurs $F_{340 \text{ min}}$, $F_{358 \text{ min}}$ et $F_{380 \text{ min}}$ (fluorescence minimale).

Deux valeurs de corrections doivent également être introduites dans la formule finale, car il faut tenir compte de la fluorescence naturelle émise par le matériel : cellules, tampon et couvre-objet (AF : autofluorescence). Ceci est permis en ajoutant du MnCl_2 1 mM final, qui empêche la sonde d'émettre des photons, puis en mesurant l'autofluorescence à 510 nm après une excitation soit à 340 nm (AF_{340}), soit à 380 nm (AF_{380}).

Avec ces valeurs, nous pouvons maintenant calculer la concentration cytosolique en calcium ($[Ca^{2+}]_c$) en *nanomoles/litre (nM)* grâce à la formule développée par Grynkiewicz *et al.* (Grynkiewicz et al., 1985) et légèrement adaptée par Arnould *et al.* (Arnould et al., 1992):

$$[Ca^{2+}]_c = K_d \frac{(R - R_{min}) \cdot F_{380 \text{ min}}}{(R - R_{max}) \cdot F_{380 \text{ max}}}$$

$$\text{où } R = \frac{F_{340} + (500 - F_{358}) - AF_{340}}{F_{380} + (500 - F_{358}) - AF_{380}}$$

$$R_{max} = \frac{F_{340 \text{ max}}}{F_{380 \text{ max}}}$$

$$R_{min} = \frac{F_{340 \text{ min}}}{F_{380 \text{ min}}}$$

La constante de dissociation du calcium avec Fura-2 à 20°C, ou $K_{d(20^\circ C)}$, vaut 135 nM.

2.10 TEST D'INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE

Par cette technique, nous avons testé l'effet des inhibiteurs de l'activité mitochondriale sur le taux d'incorporation de thymidine dans l'ADN par les cellules. Ce test permet d'estimer la proportion des cellules en phase de synthèse d'ADN (G1/S) (Houglum et al., 1997).

2.10.1 Principe

Une cellule en division a besoin d'incorporer de nouveaux nucléotides pour dupliquer son ADN. Ainsi, en incubant des cellules avec du milieu contenant de la thymidine tritiée ($[^3\text{H}]$ -thymidine), la quantité de radioactivité associée à la population sera d'autant plus importante que l'activité mitotique des cellules est intense. Un comptage de la radioactivité permet donc (après normalisation par la quantité de protéines) d'évaluer l'activation – ou le ralentissement – des divisions cellulaires en réponse à une stimulation.

2.10.2 Méthodes

2.10.2.1 Sous-culture et incubations

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de 12 puits (Costar, USA) à faible densité (25000 cellules/puits) dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Le lendemain, les inhibiteurs (FCCP, oligomycine, antimycine A) sont incubés comme décrit au point 2.2.1.2.1 (6 h, DHG sans sérum). Un contrôle positif est réalisé en incubant 6 h des cellules en présence de 10 μM en forskoline (Sigma, USA). Au terme des 6 h d'incubation, le milieu est remplacé par 1 ml de milieu contenant 10 % de FBS. Après 18 h, les cellules sont incubées pour 4 ou 24 h en présence de 0,5 ml de $[^3\text{H}]$ -thymidine (Nen, USA), à 2 μCi par ml de milieu DHG sans sérum.

2.10.2.2 Lyse et dosages

Après trois rinçages dans 1 ml de PBS, les cellules sont lysées dans 500 μl de NaOH 0,5 N pendant 2 h. On homogénéise ensuite les lysats obtenus avant d'en prélever 200 μl , destinés à un dosage de protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Un autre aliquot de 200 μl du même échantillon sera dilué dans 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas) pour le comptage de la radioactivité grâce à un compteur à scintillations (Beckmann LS 1801, USA). Il faut de plus réaliser un blanc mesurant la $[^3\text{H}]$ -thymidine non incorporée mais éventuellement associée à la surface cellulaire. Ceci est possible en ajoutant 0,5 ml de $[^3\text{H}]$ -thymidine (2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) sur des cellules, juste avant de les rincer et de les lyser. Les valeurs obtenues pour ces blancs sont soustraites à toutes les valeurs de cpm, avant de rapporter à la quantité de protéines. Les résultats seront donc exprimés en cpm/ μg de protéines.

2.11 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont exprimés comme la moyenne ou la moyenne \pm un écart-type. Nous avons établi la validité statistique de nos résultats à chaque fois que c'était possible et que le nombre de réplicats le permettait.

L'analyse de la variance (ANOVA 1) est utilisée pour tester les différences entre plus de deux moyennes en utilisant les contrastes de Scheffé.

Inhibiteur	Concentration	Temps	Cytotoxicité
<i>FCCP</i>	10 μM	6 h	5%
<i>Antimycine A</i>	1 μM	6 h	3%
<i>Oligomycine</i>	8 μM	6 h	10%

Fig. 3.1: Quantification de la toxicité des inhibiteurs de l'activité mitochondriale pour les cellules L929, réalisée par un test de libération de la LDH. Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence de FCCP 10 μM , d'antimycine A 1 μM et d'oligomycine 8 μM . Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité.

3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Au laboratoire, T. Arnould a montré sur les cellules L929 Rho^o que la déplétion en ADNmt induit l'activation constitutive du facteur de transcription CREB par la voie de la CaMKIV (Arnould *et al.*, 2000). Le but de ce travail est de rechercher si la même voie de transduction est activée par des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives tels que le FCCP, l'oligomycine et l'antimycine A.

3.1 Mesure de la cytotoxicité des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives

Toutes les expériences décrites dans ce travail ont été réalisées suite à des inhibitions aiguës des phosphorylations oxydatives. Nous avons utilisé trois molécules capables d'inhiber ce processus *via* des mécanismes différents : l'antimycine A (qui bloque le complexe III), l'oligomycine (qui inhibe la F₀-ATP synthase) et le FCCP (qui perméabilise la membrane mitochondriale interne aux protons et dissipe le $\Delta\Psi_m$). Lorsque cela s'avère nécessaire pour la compréhension du travail, nous renverrons le lecteur à des expériences similaires et antérieures réalisées sur une lignée de cellules L929 Rho^o, un modèle d'inhibition mitochondriale chronique.

L'étude des effets de ces molécules passe d'abord par une mesure de leur cytotoxicité. En effet, nous devons contrôler qu'aucun de ces inhibiteurs n'exerce un effet délétère sur les deux souches cellulaires utilisées (HEK 293 et L929). Nous avons donc mesuré la mortalité des cellules suite à une incubation de 6 h en présence de différentes concentrations en inhibiteurs. Les incubations sont suivies ou non d'une période de 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS mais pas d'inhibiteur, que nous appellerons *récupération*. Des expériences préliminaires de *screening* sur la cytotoxicité et le contenu en ATP cellulaire nous ont permis de rechercher les conditions optimales pour les incubations (concentrations, temps d'incubation...). Nous avons choisi 6 h d'incubation et des concentrations en inhibiteurs de 10 μ M, 100 nM et 1 nM pour le FCCP, de 8 μ M, 80 nM et 0,8 nM pour l'oligomycine, et de 1 μ M, 10 nM et 0,1 nM pour l'antimycine A.

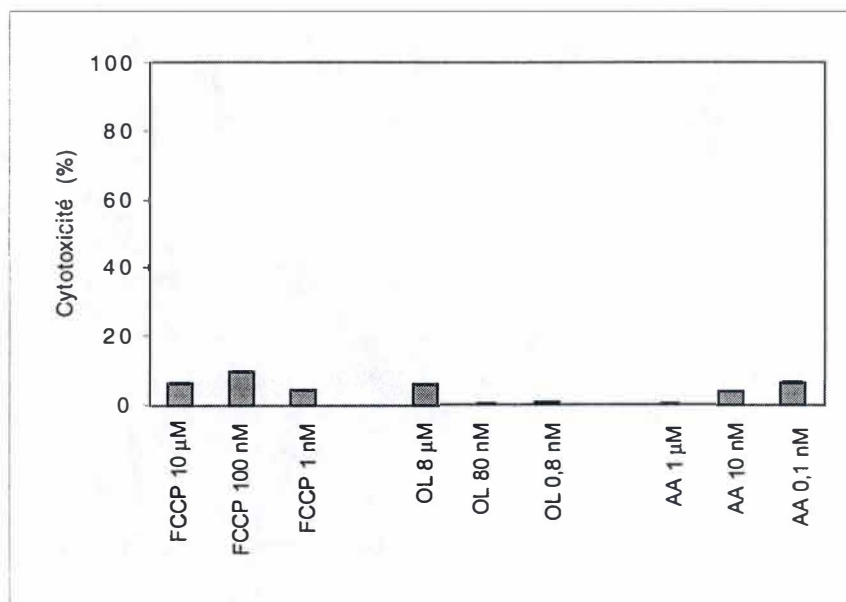


Fig. 3.2: Quantification de la toxicité des inhibiteurs de l'activité mitochondriale pour les cellules HEK 293, réalisée par un test de libération de la LDH. Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence de différentes concentrations en FCCP (10 µM, 100 nM et 1 nM), oligomycine (OL 8 µM, 80 nM et 0,8 nM) et antimycine A (AA 1 µM, 10 nM et 0,1 nM), puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % FBS. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité, et représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3).

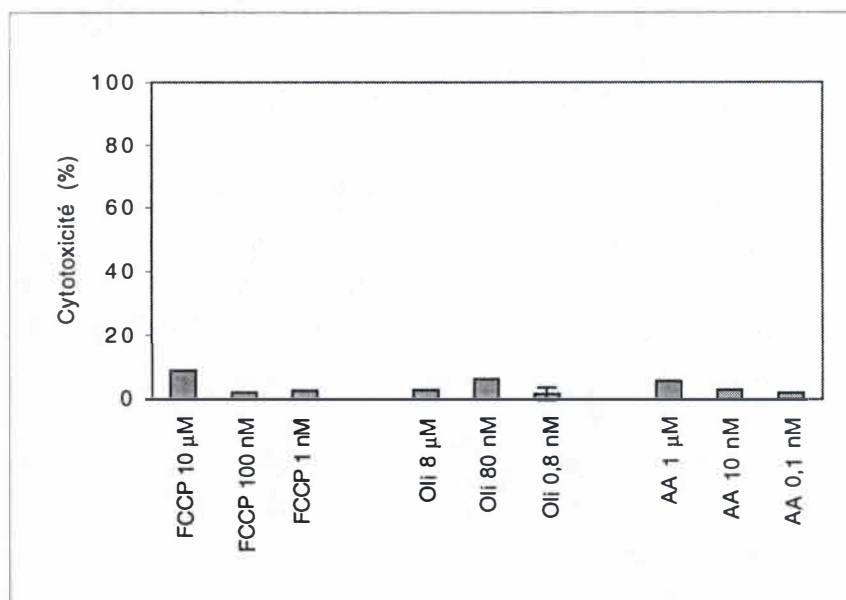


Fig. 3.3: Quantification de la toxicité des inhibiteurs de l'activité mitochondriale pour les cellules L929, réalisée par un test de libération de la LDH. Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence de différentes concentrations en FCCP (10 µM, 100 nM et 1 nM), oligomycine (Oli 8 µM, 80 nM et 0,8 nM) et antimycine A (AA 1 µM, 10 nM et 0,1 nM), puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % FBS. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité, et représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3).

3.1.1 Résultats

3.1.1.1 Tests de libération de la lactate déshydrogénase (LDH)

Les mesures de cytotoxicité ont été effectuées après 6 h d'incubation ou 6 h d'incubation suivies de 24 h de récupération, par un dosage de l'activité de la LDH libérée par des cellules mises en présence des inhibiteurs, comme décrit précédemment (point 2.2.1).

La figure 3.1 reprend les pourcentages de cytotoxicité maximum obtenus pour des cellules L929. Les cellules ont été préalablement incubées 6 h en présence de FCCP 10 μM , d'oligomycine 8 μM ou d'antimycine A 1 μM . La toxicité la plus élevée a été obtenue avec l'oligomycine 8 μM (10 %). Pour le FCCP 10 μM et l'antimycine A 1 μM , nous avons obtenu une cytotoxicité de 5 % et 3 % respectivement.

Nous verrons par la suite que les différentes expériences ont été réalisées avec un temps de récupération de 18 h ou 24 h. Nous devons donc également vérifier la toxicité après cette récupération. Ceci est justifié par le fait que des inhibiteurs comme l'oligomycine ont été décrits comme irréversibles (Weinberg et al., 2000). La figure 3.2 montre les résultats obtenus pour les cellules HEK 293 incubées pendant 6 h en présence des inhibiteurs puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. La toxicité la plus élevée est observée pour une incubation avec le FCCP, mais elle ne dépasse pas 10 % : les concentrations de 10 μM , 100 nM et 1 nM donnent respectivement des valeurs de 6,2 % ; 9,5 % et 4,2 %. Pour l'oligomycine, les pourcentages calculés sont respectivement de 5,9 % ; 0 % et 0,5 % pour des concentrations de 8 μM , 80 nM et 0,8 nM, tandis que pour l'antimycine A, on obtient respectivement des valeurs de 0 % ; 3,7 % et 6,2 % pour des concentrations de 1 μM , 10 nM et 0,1 nM.

La toxicité des différents inhibiteurs a également été mesurée sur un autre type cellulaire (L929), et ce dans les mêmes conditions (6 h d'inhibition + 24 h de récupération) (voir figure 3.3). Les valeurs obtenues pour ce type cellulaire sont comparables à celles présentées à la figure 3.2, et sont également inférieures à 10 % quels que soient l'inhibiteur et la concentration utilisés.

3.1.1.2 Tests à l'acridine orange

Afin de confirmer et de visualiser la faible cytotoxicité des inhibiteurs dans nos conditions expérimentales, nous avons utilisé un second test permettant de mettre en évidence une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique. Ce test est réalisé par des observations au microscope à fluorescence. Le comptage des cellules mortes et des cellules

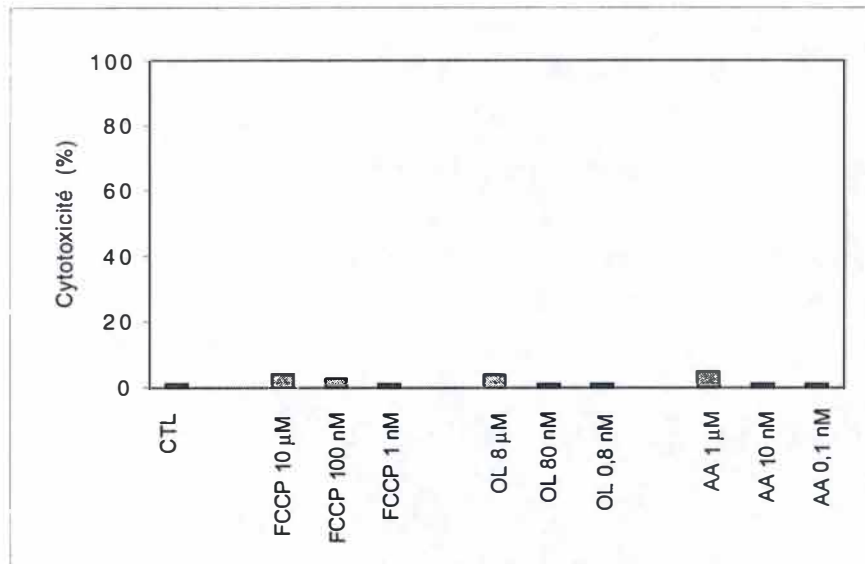


Fig. 3.4 : Quantification de la toxicité des inhibiteurs de l'activité mitochondriale pour les cellules HEK 293, réalisée par un test à l'acridine orange. Les cellules sont incubées ou non (contrôle, CTL) pendant 6 h en présence de différentes concentrations en FCCP (10 µM, 100 nM et 1 nM), oligomycine (OL 8 µM, 80 nM et 0,8 nM) et antimycine A (AA 1 µM, 10 nM et 0,1 nM), puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % FBS. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité, calculée à partir de deux comptages indépendants effectués sur une centaine de cellules (n = 1).

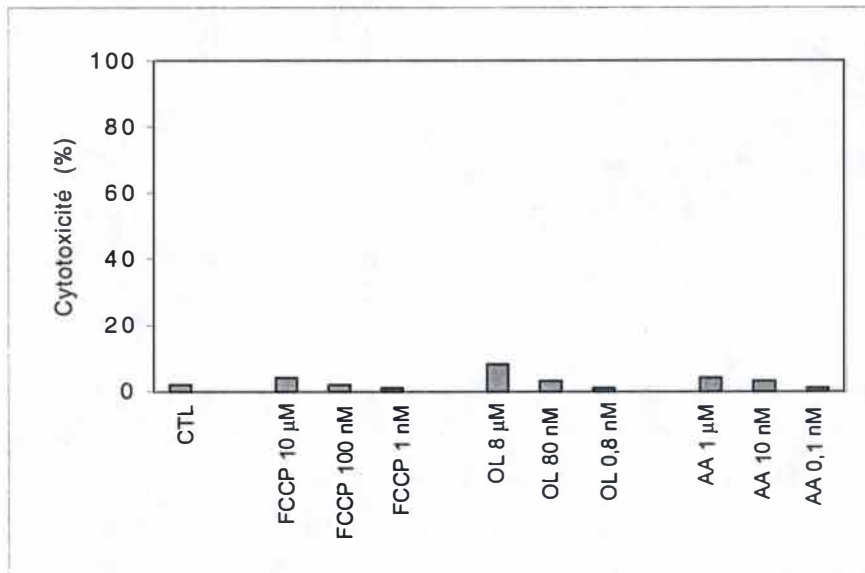


Fig. 3.5 : Quantification de la toxicité des inhibiteurs de l'activité mitochondriale pour les cellules L929, réalisée par un test à l'acridine orange. Les cellules sont incubées ou non (contrôle, CTL) pendant 6 h en présence de différentes concentrations en FCCP (10 µM, 100 nM et 1 nM), oligomycine (OL 8 µM, 80 nM et 0,8 nM) et antimycine A (AA 1 µM, 10 nM et 0,1 nM), puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % FBS. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité, calculée à partir de deux comptages indépendants effectués sur une centaine de cellules (n = 1).

vivantes, après traitement avec les molécules, récupération et ajout d'acridine orange sur les cellules, s'effectue dans un champ contenant une centaine de cellules.

La figure 3.4 présente les résultats obtenus pour le test de cytotoxicité à l'acridine orange sur les cellules HEK 293. La valeur du *contrôle* (CTL) correspond à la mortalité observée dans une population de cellules n'ayant pas subi de traitement en présence d'inhibiteur mitochondrial – ces cellules contrôles ont donc été incubées dans du milieu DHG sans sérum pendant 6 h, avant une récupération de 24 h dans du milieu DHG supplémenté de 10 % en FBS. La valeur de mortalité associée aux HEK 293 non traitées est d'environ 1 %. Les mortalités cellulaires résultant de l'incubation en présence des différents inhibiteurs sont comparables, puisqu'on observe une cytotoxicité qui varie entre 1 et 4 % pour les concentrations croissantes en FCCP, en oligomycine et en antimycine A.

Des résultats comparables ont été obtenus pour les L929. On obtient également des valeurs de toxicité très faibles, par rapport à la mortalité observée dans les L929 contrôles (CTL), qui est estimée à 2 % (voir figure 3.5). Pour l'oligomycine à la concentration la plus forte (8 μM), on observe cependant une cytotoxicité légèrement plus élevée (8 %).

Des photographies prises en microscopie à fluorescence permettent de visualiser ces résultats. Les figures 3.6 et 3.7 montrent, pour les deux types cellulaires, des photos de cellules ayant été préalablement incubées ou non (*contrôle*, CTL) en présence de FCCP (10 μM), d'oligomycine (8 μM) et d'antimycine A (1 μM) pendant 6 h, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Les flèches blanches indiquent les cellules mortes (orange).

3.1.2 Discussion

Nous avons mesuré l'effet cytotoxique éventuel des trois inhibiteurs de l'activité mitochondriale utilisés tout au long de ce travail grâce à deux méthodes, basées sur une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique.

Comme le principe de ces deux méthodes repose sur un même paramètre (l'intégrité membranaire), elles ont fourni des résultats comparables. On peut dire, d'une manière tout à fait générale, que la toxicité calculée pour ces inhibiteurs vis-à-vis des deux types cellulaires (HEK 293 et L929) et aux concentrations utilisées est toujours inférieure à 10 % (que ce soit dans le cas d'une incubation de 6 h *ou* d'une incubation de 6 h suivie d'une récupération de 24 h). De plus, la toxicité ne présente pas de profil dose-dépendant, au moins aux concentrations testées. Par ailleurs, il ne semble pas exister de sensibilité différente entre les deux souches cellulaires utilisées (HEK 293 et L929) pour ces inhibiteurs.

HEK 293

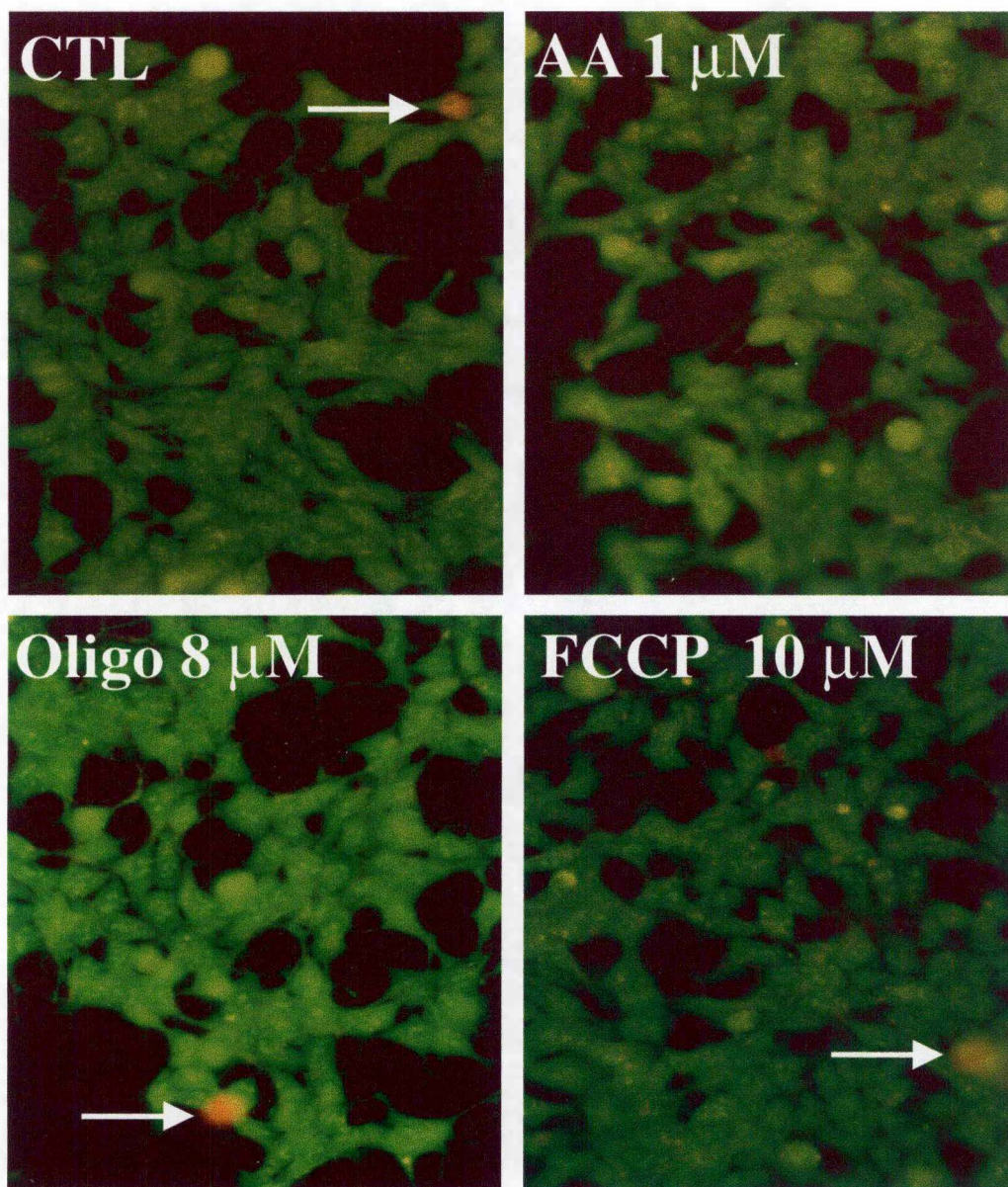


Fig. 3.6 : Photographies prises au microscope à fluorescence permettant de visualiser la toxicité des inhibiteurs de l'activité mitochondriale pour les cellules HEK 293, déterminée par un test à l'acridine orange. Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence d'antimycine A (AA) 1 μM , d'oligomycine (Oligo) 8 μM et de FCCP 10 μM , puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Le contrôle (CTL) correspond à des cellules incubées dans les mêmes conditions en absence d'inhibiteur ($G = 115 \times$). Les flèches indiquent l'emplacement de cellules mortes (orange).

L929

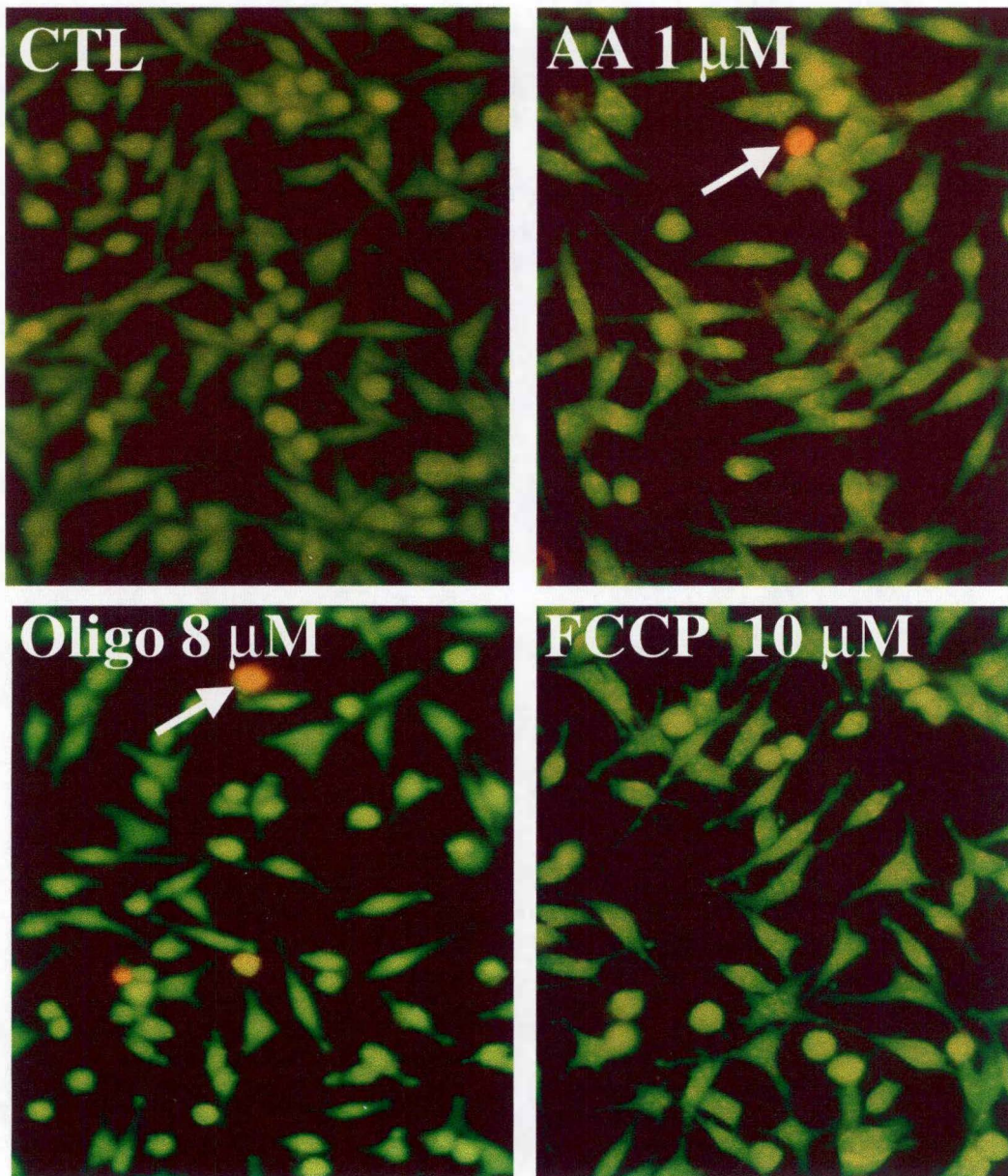


Fig. 3.7 : Photographies prises au microscope à fluorescence permettant de visualiser la toxicité des inhibiteurs de l'activité mitochondriale pour les cellules L929, déterminée par un test à l'acridine orange. Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence d'antimycine A (AA) 1 μM , d'oligomycine (Oligo) 8 μM et de FCCP 10 μM , puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Le contrôle (CTL) correspond à des cellules incubées dans les mêmes conditions en absence d'inhibiteur (G = 115 X). Les flèches indiquent l'emplacement de cellules mortes (oranges).

Nous considérons ces faibles valeurs de cytotoxicité comme acceptables, ce qui nous permet donc de travailler avec ces inhibiteurs, même aux concentrations les plus fortes (10 μM , 8 μM et 1 μM pour le FCCP, l'oligomycine et l'antimycine A respectivement). Toutefois, ceci ne vaut que dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire une incubation de 6 h (éventuellement suivie d'une récupération de 24 h) et avec les concentrations susmentionnées. En effet, il a été montré que le FCCP peut, à une concentration de 50 μM , induire l'apoptose suite à une incubation de 24 h (Dispersyn et al., 1999).

D'autre part, il faut signaler que ces différents inhibiteurs sont conservés dans l'éthanol sous forme de solution stock, ce qui signifie non seulement que toutes les incubations réalisées avec ces inhibiteurs sont réalisées en présence d'éthanol (à une concentration indirectement proportionnelle aux dilutions réalisées pour chaque inhibiteur), mais également que toutes les cellules contrôles devraient recevoir de l'éthanol dans leur milieu lors des 6 h d'incubation. Cependant, des tests de cytotoxicité et des mesures d'ATP préliminaires (données non présentées) ont montré que l'éthanol n'a pas d'effet sur les cellules jusqu'à une concentration de 0,5 %. Or, la teneur en éthanol est toujours inférieure à 0,2 % dans nos conditions expérimentales, même aux concentrations les plus fortes en inhibiteurs, ce qui nous permet d'incuber nos cellules contrôles dans du DHG seul.

Nous pouvons donc conclure de ces tests de cytotoxicité que les inhibiteurs de l'activité mitochondriale utilisés au cours de ce travail ne présentent qu'une toxicité faible (< 10 %) pour nos deux modèles cellulaires d'étude (HEK 293 et L929). Cette constatation assure donc que les effets de ces molécules, que nous mettrons en évidence dans la suite de ce travail, ne sont pas dus à une mortalité cellulaire élevée résultant de l'incubation en présence de ces inhibiteurs. Nous allons maintenant vérifier que ces inhibiteurs agissent sur la mitochondrie en mesurant le contenu en ATP dans les cellules.

3.2 Effets des inhibiteurs de l'activité mitochondriale sur le contenu cellulaire en ATP

Nous avons dosé la quantité d'ATP dans des cellules HEK 293 exposées à différentes concentrations en FCCP, en oligomycine et en antimycine A, selon le protocole détaillé au point 2.3.2. Ces dosages nous ont permis de rechercher les concentrations en molécules qui font chuter le contenu cellulaire en ATP de 40 % à 60 % sur la souche cellulaire HEK 293, le but étant de reproduire la réduction de la quantité d'ATP comparable à celle observée pour les L929 Rho°. En effet, ces cellules possèdent environ 40 % de la charge en ATP de la lignée parentale (L929), et cet ATP est d'origine exclusivement glycolytique. Par ailleurs, ces dosages nous ont également permis d'étudier l'évolution du contenu cellulaire en ATP lors de

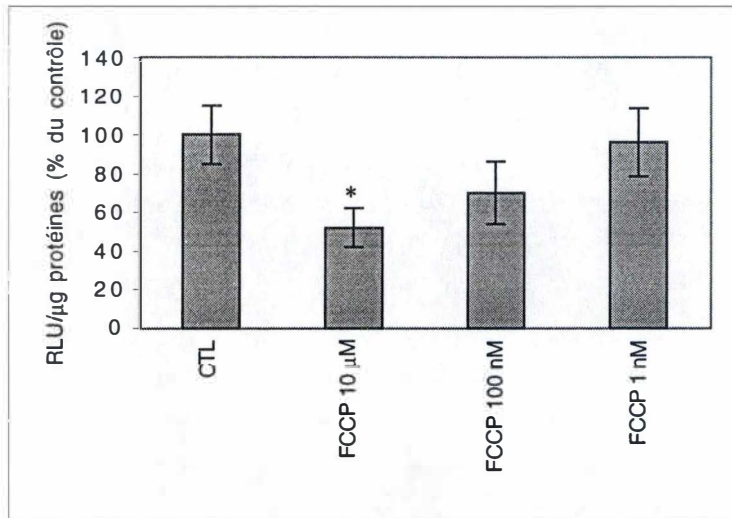


Fig. 3.8 : Effet du FCCP sur le contenu en ATP des cellules HEK 293. Les cellules sont incubées ou non (contrôle, CTL) pendant 6 h en présence de FCCP 10 µM, 100 nM et 1 nM. Les résultats sont calculés en relative light units et rapportés à la quantité de protéines (RLU/µg de protéines), puis exprimés en pourcentages du contrôle. Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 4 valeurs (n = 4). L'étoile (* représente une différence significative avec $p < 0,05$.

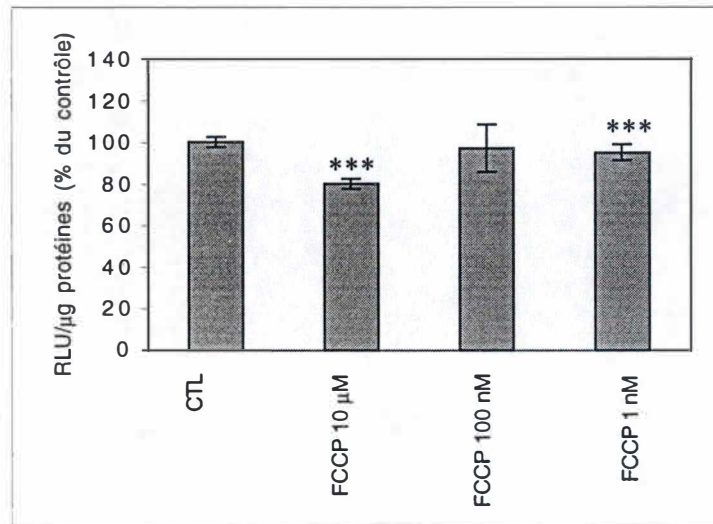


Fig. 3.9 : Effet d'une période de 24 h de récupération sur le contenu en ATP des cellules HEK 293 traitées par le FCCP. Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence ou non (contrôle, CTL) de FCCP 10 µM, 100 nM et 1 nM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % FBS. Les résultats sont calculés en relative light units et rapportés à la quantité de protéines (RLU/µg de protéines), puis exprimés en pourcentages du contrôle. Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3). Les étoiles (***) représentent une différence significative avec $p < 0,001$.

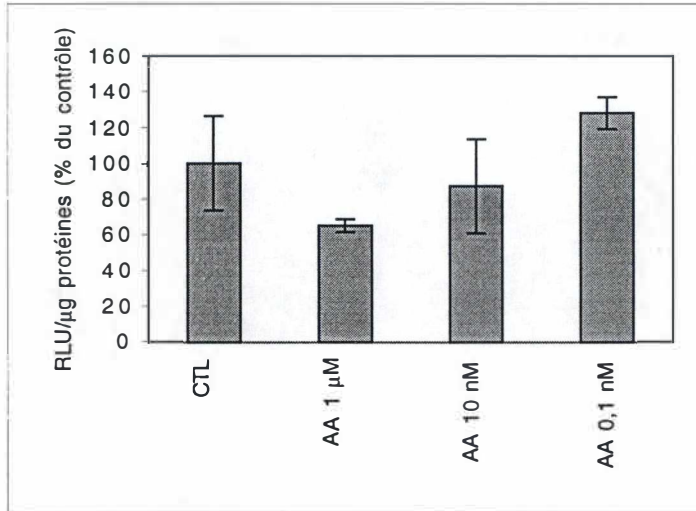


Fig. 3.10 : Effet de l'antimycine A (AA) sur le contenu en ATP des cellules HEK 293. Les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence d'antimycine A 1 μM, 10 nM et 0,1 nM. Les résultats sont calculés en relative light units et rapportés à la quantité de protéines (RLU/μg de protéines), puis exprimés en pourcentages du contrôle. Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3).

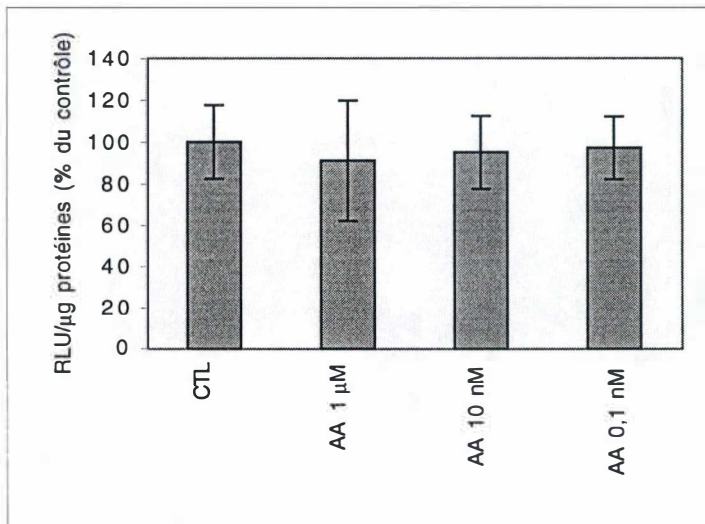


Fig. 3.11 : Effet d'une période de 24 h de récupération sur le contenu en ATP des cellules HEK 293 traitées par l'antimycine A (AA). Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence ou non (contrôle, CTL) d'antimycine A 1 μM, 10 nM et 0,1 nM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % FBS. Les résultats sont calculés en relative light units et rapportés à la quantité de protéines (RLU/μg de protéines), puis exprimés en pourcentages du contrôle. Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 4 valeurs (n = 4).

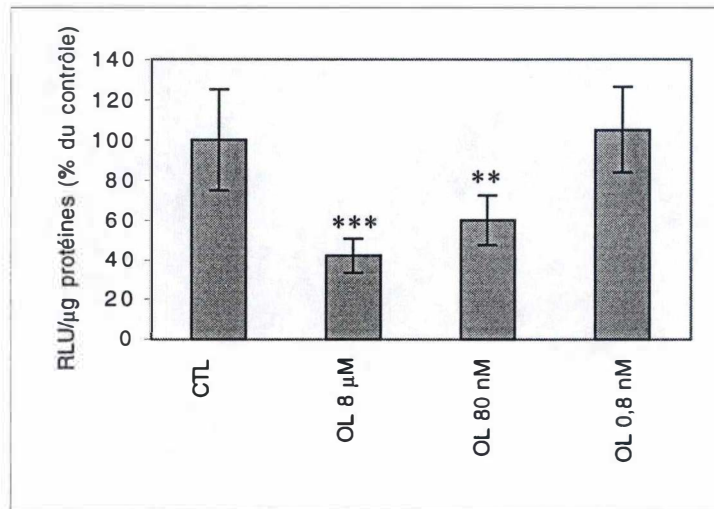


Fig. 3.12 : Effet de l'oligomycine (OL) sur le contenu en ATP des cellules HEK 293. Les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence d'oligomycine 8 µM, 80 nM et 0,8 nM. Les résultats sont calculés en relative light units et rapportés à la quantité de protéines (RLU/µg de protéines), puis exprimés en pourcentages du contrôle. Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3). Les étoiles représentent une différence significative avec $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).

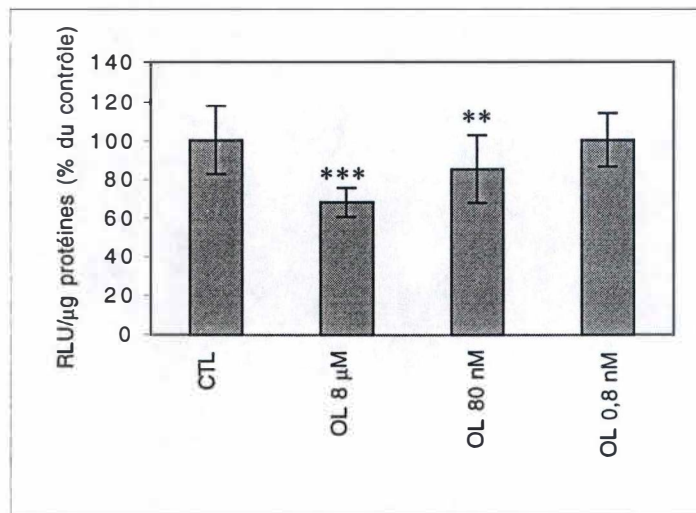


Fig. 3.13 : Effet d'une période de 24 h de récupération sur le contenu en ATP des cellules HEK 293 traitées par l'oligomycine (OL). Les cellules sont incubées pendant 6 h en présence ou non (contrôle, CTL) d'oligomycine 8 µM, 80 nM et 0,8 nM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % FBS. Les résultats sont calculés en relative light units et rapportés à la quantité de protéines (RLU/µg de protéines), puis exprimés en pourcentages du contrôle. Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3). Les étoiles représentent une différence significative avec $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).

la phase de récupération, quand les cellules sont replacées dans des conditions normales de culture (DHG + 10 % de FBS) pendant 24 h.

3.2.1 Résultats

Nous avons donc réalisé ces dosages d'ATP sur les cellules HEK 293, après 6 h d'incubation en présence des inhibiteurs *ou* après 6 h d'incubation suivies de 24 h de récupération dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Les résultats sont exprimés en RLU (*relative light unit*) rapportés à la quantité de protéines, puis exprimés en pourcentages de la valeur du *contrôle* (arbitrairement portée à 100 %) Les cellules contrôles sont incubées pendant 6 h en absence d'inhibiteur dans du milieu DHG sans sérum, suivies ou non de 24 h dans du DHG + 10 % de FBS.

Les résultats obtenus après 6 h d'inhibition en présence de FCCP sont présentés à la figure 3.8. Par rapport au contrôle porté arbitrairement à 100 %, une incubation en présence de FCCP (10 μ M) entraîne une diminution d'ATP de près de 50 %, avec une différence statistiquement significative ($p < 0,05$). L'effet d'inhibition en présence du FCCP présente un profil dépendant de la concentration en inhibiteur (10 μ M, 100 nM et 1 nM). La figure 3.9 présente les valeurs obtenues après une période de récupération de 24 h qui suit une inhibition de 6 h. On voit que la cellule peut récupérer jusqu'à 80, 100 et 95 % de son contenu initial en ATP après avoir subi une inhibition au FCCP (aux concentrations respectives de 10 μ M, 100 nM et 1 nM).

Les profils obtenus avec l'antimycine A sont comparables : la figure 3.10 montre que des concentrations de 1 μ M et 10 nM provoquent une baisse du contenu cellulaire en ATP de respectivement 33 % et 10 % après une incubation de 6 h. Cependant, l'inhibition la plus forte obtenue après 6 h d'incubation en présence d'antimycine A (1 μ M) n'est pas statistiquement significative. Suite à cette incubation, les cellules ont également la capacité de régénérer leur stock d'ATP puisqu'elles récupèrent environ 95 % de la charge en ATP après une période de 24 h dans du milieu DHG + 10 % de FBS, quelle que soit la concentration utilisée (voir figure 3.11).

L'oligomycine, quant à elle, induit aux concentrations de 8 μ M et 80 nM une diminution d'ATP de respectivement 60 % ($p < 0,001$) et 40 % ($p < 0,01$). A la concentration de 0,8 nM, la molécule n'exerce plus aucun effet inhibiteur (figure 3.12). Cependant, et contrairement aux récupérations obtenues pour le FCCP et l'antimycine A, on observe à la figure 3.13 que la récupération du contenu en ATP dans les cellules incubées en présence d'oligomycine 8 μ M est plus faible. En effet, on observe encore une diminution significative de 33 % du contenu en ATP par rapport au contrôle. La moins bonne récupération en présence d'oligomycine à la concentration la plus forte (8 μ M) est probablement liée au fait que cette

molécule a été décrite comme un inhibiteur irréversible de la F_0-F_1 -ATP synthase (Weinberg et al., 2000). Soulignons que les effets inhibiteurs obtenus en présence des trois molécules sont directement dépendants de la concentration utilisée.

3.2.2 Discussion

Ces trois molécules inhibent les phosphorylations oxydatives. On doit donc s'attendre à une diminution de la quantité cellulaire d'ATP. Etant donné que ces inhibiteurs agissent sur des cibles distinctes, les mécanismes conduisant à cette diminution du contenu en ATP sont différents. De plus, en fonction de la molécule utilisée, on peut observer des effets indirects, comme par exemple la production de ROS par l'antimycine A (Garcia-Ruiz et al., 1995), ou l'hyperpolarisation de la MMI provoquée par l'oligomycine (Budinger et al., 1998).

Ces dosages d'ATP nous ont montré l'efficacité des inhibiteurs, en particulier aux concentrations les plus fortes (FCCP 10 μ M, oligomycine 8 μ M, antimycine A 1 μ M) puisque ces concentrations induisent une réduction du contenu cellulaire en ATP allant de 30 à 60 %. A cette concentration, nous avons donc des outils moléculaires qui permettent de diminuer le contenu en ATP à des valeurs comparables à celles mesurées de manière basale dans la lignée de cellules L929 Rho^o, déplétées en génome mitochondrial. Pour la lignée HEK 293, l'effet le plus marqué a été obtenu avec l'oligomycine 8 μ M, qui diminue la quantité en ATP de 60 %. Il est raisonnable de suggérer que l'ATP résiduel est principalement d'origine glycolytique et constitue le stock énergétique réduit dont dispose la cellule pendant les 6 h en présence d'inhibiteur.

Par ailleurs, nous avons testé l'effet de ces inhibiteurs à des concentrations 100 fois moindres (FCCP 100 nM, oligomycine 80 nM, antimycine A 10 nM) et 10000 fois moindres (FCCP 1 nM, oligomycine 0,8 nM, antimycine A 0,1 nM). Nous avons choisi d'utiliser des dilutions de 100 en 100, car des expériences préliminaires ont montré que l'effet du FCCP sur le contenu cellulaire en ATP est le même aux concentrations de 10 μ M et 1 μ M (résultats non présentés). Ainsi, nous avons montré que l'effet de ces trois inhibiteurs augmente en fonction de leur concentration et suit un profil dose-dépendant. Aux concentrations les plus basses, l'effet de ces molécules est très faible ou inexistant¹. Cette dose-dépendance peut probablement s'expliquer à deux niveaux : (1) l'effet d'un inhibiteur sur une seule mitochondrie dépend de sa concentration (par exemple, une forte concentration en antimycine A bloque plus de complexes III dans une même mitochondrie qu'une concentration plus faible), mais (2) la concentration d'un inhibiteur mitochondrial influence aussi, bien entendu, le nombre de mitochondries qui seront atteintes dans une cellule donnée. On peut ainsi

¹ Notons que la valeur obtenue après 6 h d'incubation en présence d'antimycine A 0,1 nM (figure 3.10), plus élevée que la valeur du contrôle, résulte probablement d'une imprécision technique soit lors du dosage d'ATP, soit lors du dosage de protéines.

imaginer qu'aux concentrations les plus faibles que nous utilisons, seules quelques mitochondries (parmi plusieurs dizaines ou centaines) sont faiblement altérées dans la cellule – ce qui a peu (ou pas) d'impact sur le métabolisme cellulaire global.

Nous pouvons enfin tirer un dernier renseignement de ces dosages d'ATP, concernant la *durée* de l'effet de ces inhibiteurs. En effet, en comparant les graphes obtenus pour le FCCP et l'antimycine A avec récupération (figures 3.9 et 3.11), on constate que les contenus cellulaires en ATP remontent après 24 h de récupération autour des valeurs contrôles. Cependant, les grands écarts-type obtenus avec l'antimycine A ne permettent pas de dire que cet inhibiteur n'exerce plus aucun effet sur les cellules 24 h après la fin de l'incubation. Par contre, l'effet inhibiteur de l'oligomycine semble plus prolongé que celui du FCCP. En effet, les cellules incubées 6 h en présence d'oligomycine 8 μM présentent encore un contenu en ATP significativement plus bas ($p < 0,001$) que dans les contrôles après 24 h de récupération. Ceci est en accord avec (Bateson et al., 1999), qui décrit l'oligomycine comme ligand et inhibiteur irréversible de la F_0-F_1 -ATP synthase.

En conclusion, les tests réalisés juste après les 6 h d'inhibition montrent l'effet marqué de ces trois inhibiteurs aux concentrations les plus fortes, de même que la dose-dépendance de cet effet lorsqu'on dilue l'inhibiteur 100x et 10000x. D'autre part, les tests de récupération, réalisés 24 h après le terme des incubations avec les molécules, ont montré que l'effet observé après 6 h est réversible, au moins partiellement, pour le FCCP et l'antimycine A.

3.3 Mise en évidence de l'activation de CREB suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives

T. Arnould a montré qu'une altération chronique de l'activité mitochondriale (cellules L929 Rho^o) conduit à la phosphorylation et l'activation permanente du facteur de transcription CREB (Arnould *et al.*, 2000). Nous avons donc voulu vérifier l'activation éventuelle de ce facteur dans nos deux modèles cellulaires, soumis à une inhibition aiguë des phosphorylations oxydatives par le FCCP, l'oligomycine ou l'antimycine A. Dans ce but, plusieurs approches ont été utilisées. L'activation du facteur CREB a d'abord été recherchée par la technique de retard sur gel, ou EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

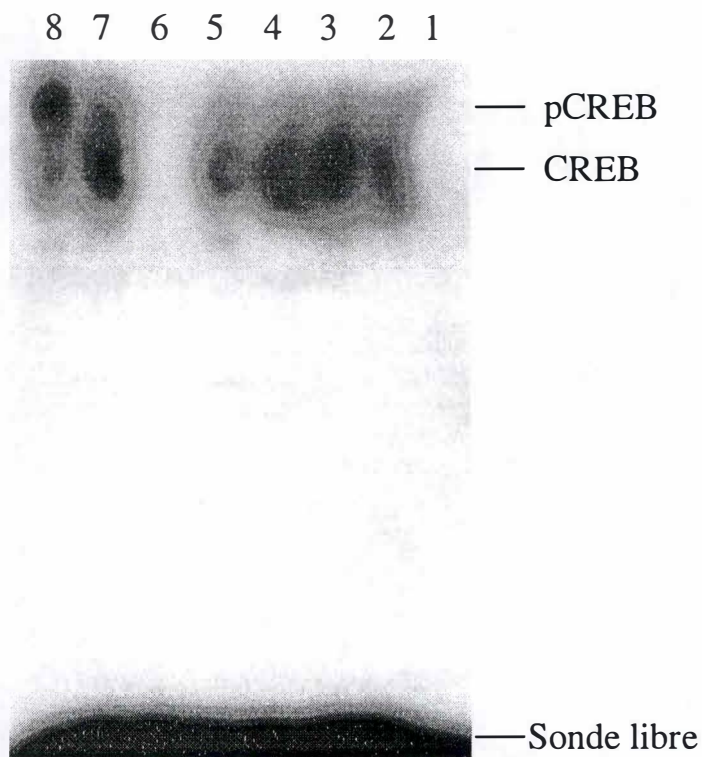
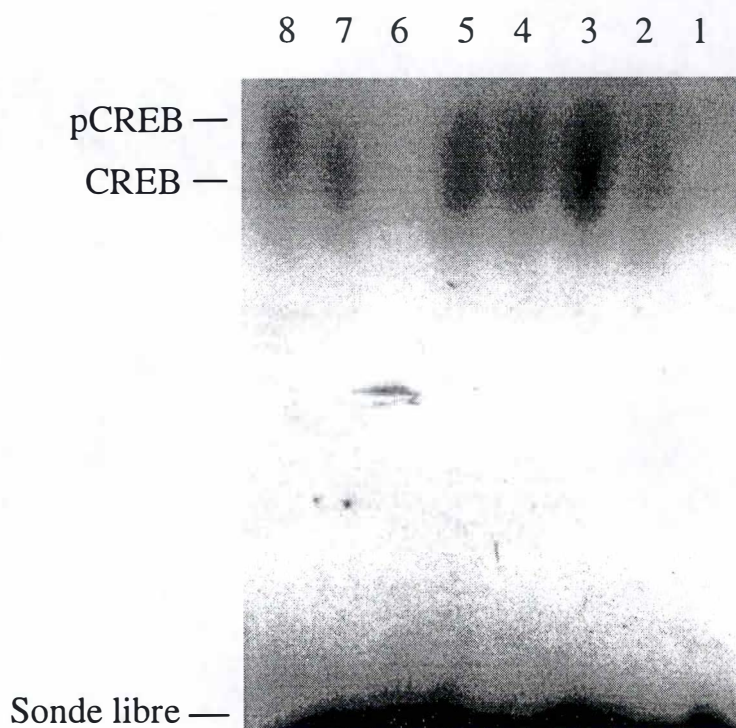


Fig. 3.14 : Mise en évidence par la technique de retard sur gel de la liaison du facteur CREB à une sonde consensus marquée, induite par le traitement de cellules HEK 293 au FCCP. Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μ M, 100 nM et 1 nM, puis laissées 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS.

(1) Sonde libre. (2) CTL. (3) FCCP 10 μ M. (4) FCCP 100 nM. (5) FCCP 1 nM. (6) FCCP 10 μ M + 100x sonde non marquée. (7) FCCP 10 μ M. (8) FCCP 10 μ M + anti-pCREB

Fig. 3.15 : Mise en évidence par la technique de retard sur gel de la liaison du facteur CREB à une sonde consensus marquée, induite par le traitement de cellules HEK 293 à l'oligomycine (OL). Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence d'oligomycine 8 μ M, 80 nM et 0,8 nM, puis laissées 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS.

(1) Sonde libre. (2) CTL. (3) OL 8 μ M. (4) OL 80 nM. (5) OL 0,8 nM. (6) OL 8 μ M + 100x sonde non marquée. (7) OL 8 μ M. (8) OL 8 μ M + anti-pCREB.



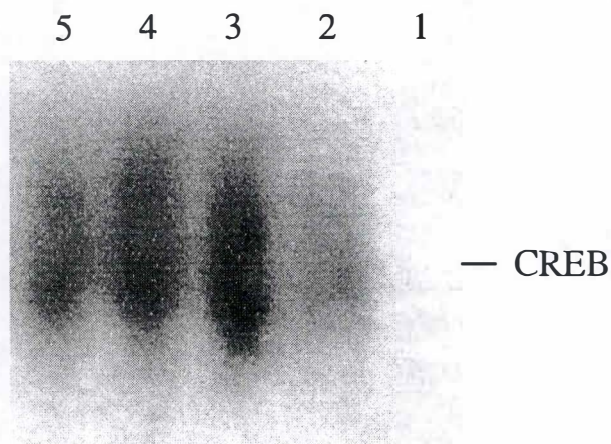


Fig. 3.16 : Mise en évidence par la technique de retard sur gel de la liaison du facteur CREB à une sonde consensus marquée, induite par le traitement de cellules HEK 293 à l'antimycine A (AA). Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence d'antimycine A 1 μ M, 10 nM et 0,1 nM, puis laissées 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS.

(1) Sonde libre. (2) CTL. (3) AA 1 μ M. (4) AA 10 nM. (5) AA 0,1 nM.

3.3.1 Etude de la liaison de CREB à une sonde ADN synthétique par la technique de retard sur gel

3.3.1.1 Résultats

Les premiers résultats ont été obtenus sur des extraits nucléaires préparés à partir de cellules HEK 293, préalablement incubées pendant 6 h en présence ou non (cellules contrôles) des inhibiteurs aux différentes concentrations. Ces incubations sont suivies par une période de 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS, avant l'extraction des protéines nucléaires. Cette période de récupération après les incubations en présence des inhibiteurs semble nécessaire pour obtenir une activation du facteur CREB. En effet, dans une expérience préliminaire, des cellules ont été transfectées avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, qui contient plusieurs sites de liaison pour le facteur CREB. Elles ont ensuite été incubées 6 h en présence des inhibiteurs de l'activité mitochondriale. En absence de récupération, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité transcriptionnelle de CREB. Les résultats de cette expérience seront présentés et discutés au point 3.3.3).

La figure 3.14 montre les résultats obtenus pour le FCCP. Le retard de la sonde oligonucléotidique marquée liant le facteur CREB est visualisé sur un gel de polyacrylamide 4 %. La piste 1 a été chargée avec de la sonde marquée libre. Le signal CREB présent dans la piste 2 correspond à la liaison de ce facteur extrait à partir de cellules contrôles, alors que les extraits chargés dans les pistes 3, 4 et 5 proviennent de cellules incubées respectivement en présence de FCCP 10 μ M, 100 nM et 1 nM. On constate que le signal obtenu pour ces conditions est plus important que le signal de la piste 2 (contrôle), du moins pour les deux concentrations les plus fortes en FCCP. Par ailleurs, la pré-incubation de l'extrait préparé à partir de cellules inhibées au FCCP 10 μ M avec un excès de sonde non radioactive (100x), inhibe complètement le signal CREB (piste 6). Enfin, en regard des pistes 3 et 7 (FCCP 10 μ M), la piste 8 montre un *super-shift* du facteur CREB en présence d'un anticorps monoclonal dirigé contre le site de phosphorylation de CREB contenant la sérine en position 133 (Ser133). Cette sérine doit donc nécessairement être phosphorylée pour être reconnue par cet anticorps, qu'on désignera par la suite par le nom d'*anticorps anti-pCREB*. La piste 8 montre que le *super-shift* du signal CREB est très important. Ceci suggère fortement qu'une grande partie du facteur CREB, dans les cellules HEK 293 incubées en présence de FCCP 10 μ M, est phosphorylée sur la Ser133. Ceci indique également que le complexe responsable du retard de la sonde est composé majoritairement du facteur CREB sous forme phosphorylée.

La liaison du facteur CREB à la sonde marquée a également été observée avec des extraits nucléaires préparés à partir de cellules ayant subi une incubation en présence d'oligomycine et d'antimycine A (figures 3.15 et 3.16). De nouveau, le signal CREB dans les

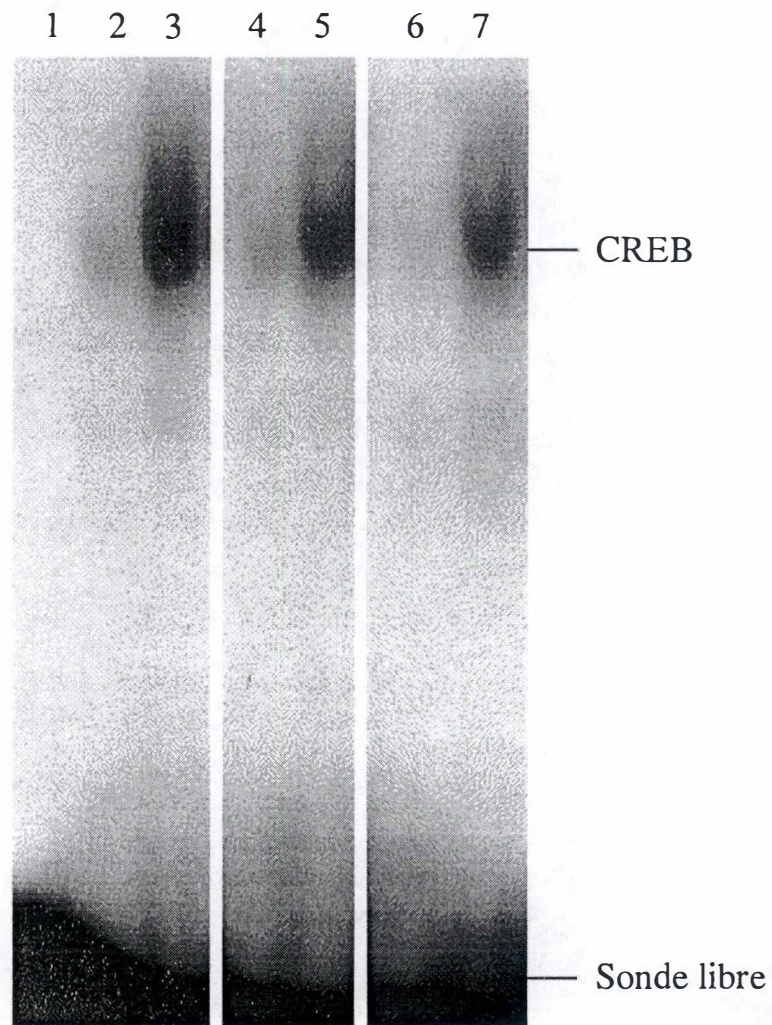


Fig. 3.17 : Mise en évidence par la technique de retard sur gel de la liaison du facteur CREB à une sonde synthétique marquée, suite à une inhibition de la phosphorylation oxydative dans les HEK 293. Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules incubées ou non (contrôles) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μM , d'oligomycine (OL) 8 μM et d'antimycine A (AA) 1 μM , puis laissées 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS.

(1) Sonde libre. (2) CTL. (3) FCCP 10 μM . (4) CTL. (5) OL 8 μM . (6) CTL. (7) AA 1 μM .

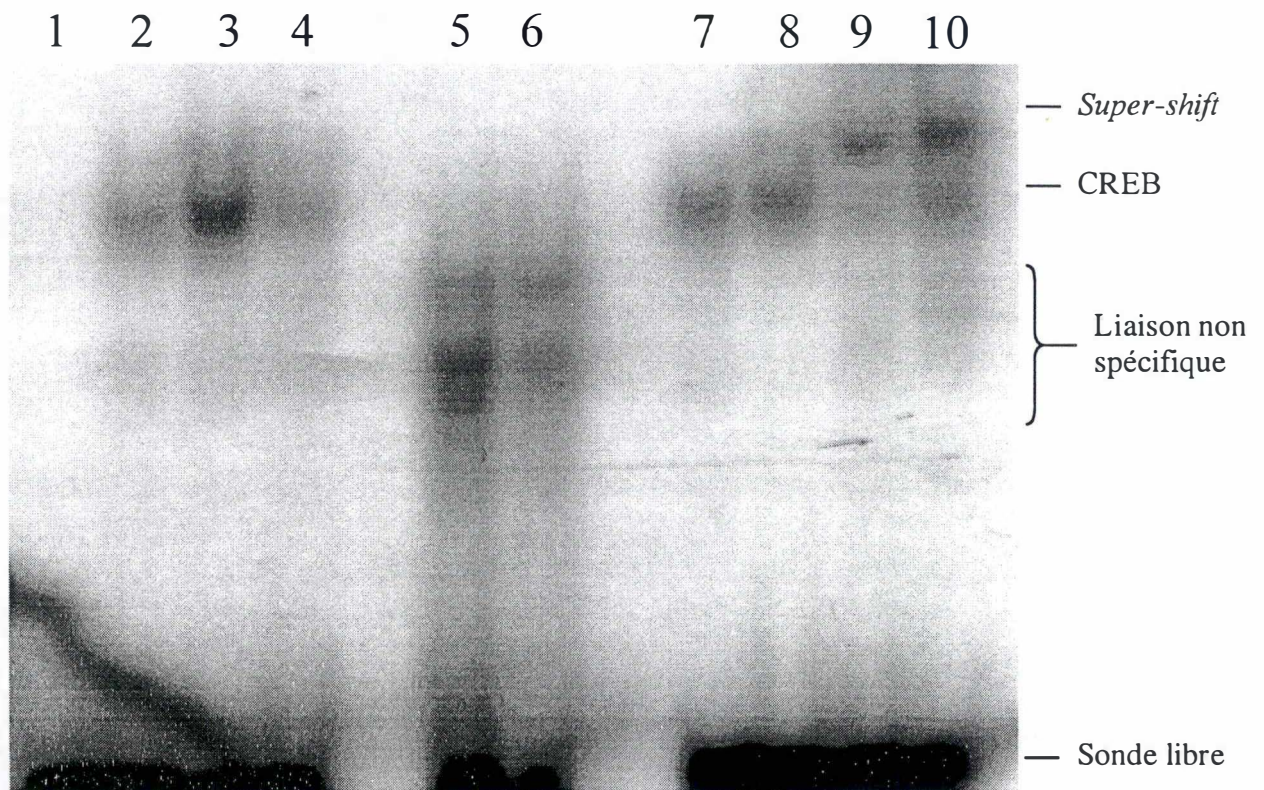


Fig. 3.18 : Identification du facteur CREB. Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules HEK 293 incubées pendant 6 h en absence (pistes 2 et 7) ou en présence de FCCP 10 μ M (pistes 3, 4, 6, 8, 9 et 10), puis laissées 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Les extraits sont incubés avec la sonde radioactive *wild-type* (pistes 2, 3, 4, 7, 8, 9 et 10) ou avec une sonde radioactive mutée (pistes 5 et 6). Pour les tests de compétition, certains extraits sont pré-incubés en présence d'un excès (10x) de sonde *wild-type* non marquée (piste 4) ou mutée (pistes 7 et 8) avant d'être incubés avec la sonde radioactive. Enfin, certains extraits sont également incubés après liaison à la sonde en présence d'un anticorps dirigé contre CREB (piste 9) ou contre pCREB (piste 10).

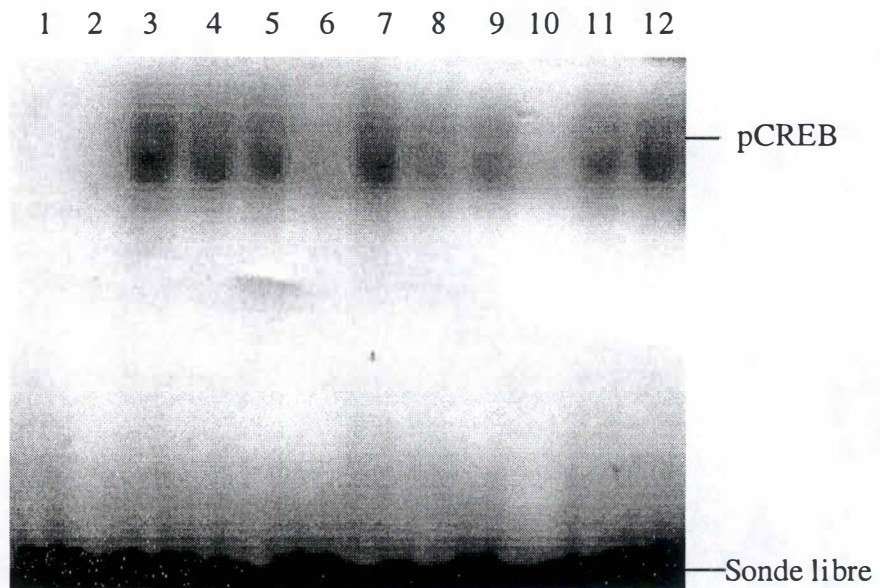


Fig. 3.19 : Mise en évidence par la technique de retard sur gel de la liaison du facteur CREB à une sonde marquée, induite par le traitement de cellules L929 en présence des inhibiteurs. Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules incubées ou non (contrôles) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μ M, 100 nM et 1 nM, d'oligomycine (OL) 8 μ M, 80 nM et 0,8 nM et d'antimycine A (AA) 1 μ M et 10 nM, puis laissées 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS.

(1) Sonde libre. (2) CTL. (3) FCCP 10 μ M. (4) FCCP 100 nM. (5) FCCP 1 nM. (6) CTL. (7) OL 8 μ M. (8) OL 80 nM. (9) OL 0,8 nM. (10) CTL. (11) AA 1 μ M. (12) AA 10 nM.

contrôles (pistes 2) est nettement plus faible que dans les pistes 3,4 et 5 (incubation avec l'oligomycine 8 μM , 80 nM et 0,8 nM, ou avec l'antimycine A 1 μM , 10 nM et 0,1 nM). Le signal est complètement inhibé par une compétition en présence d'un excès de 100x en sonde non marquée (piste 6, figure 3.15). La figure 3.15 montre également le *super-shift* de pCREB par l'anticorps décrit ci-dessus dans des extraits nucléaires préparés à partir de cellules ayant été préalablement incubées en présence d'oligomycine (8 μM).

Nous avons reproduit ces résultats dans une expérience indépendante, réalisée sur d'autres extraits nucléaires de cellules HEK 293. Seules les concentrations les plus fortes en inhibiteurs ont été testées (voir figure 3.17). Il faut signaler que les conditions utilisées dans cette expérience et qui seront suivies dans le reste de ce travail ont été optimisées pour affiner le signal. Nous détectons de nouveau un faible signal dans les pistes 2,4 et 6, chargées avec des extraits de cellules contrôles, tandis que les pistes 3, 5 et 7 correspondent à des cellules ayant été incubées respectivement en présence de FCCP 10 μM , d'oligomycine 8 μM et d'antimycine A 1 μM .

Dans une troisième expérience réalisée sur des HEK 293 (figure 3.18), nous avons confirmé l'identification du facteur CREB. On retrouve bien la liaison de CREB à la sonde marquée dans des extraits préparés à partir de cellules traitées au FCCP 10 μM (piste 2 : contrôle ; piste 3 : FCCP 10 μM) ainsi que l'extinction presque totale du signal en présence d'un excès de sonde non marquée (10x) (piste 4). Les deux pistes suivantes ont été chargées avec des extraits issus de cellules contrôles (piste 5) ou de cellules traitées au FCCP 10 μM (piste 6), pré-incubés en présence d'une sonde marquée et mutée au niveau du site de reconnaissance de CREB. On constate que le signal CREB a entièrement disparu. Cependant, la sonde mutée contient probablement un site reconnu et lié par d'autres protéines, qui génèrent un retard de la sonde dont le signal correspond à une bande de poids moléculaire inférieur à celui de CREB (liaison non spécifique). Les pistes 7 (contrôle) et 8 (FCCP 10 μM) représentent la liaison à la sonde sauvage après une compétition en présence de la sonde mutée, non marquée (10x en excès par rapport à la sonde marquée sauvage). Ces résultats montrent clairement que le signal CREB est toujours présent, à la hauteur attendue sur le gel. Enfin, les dernières pistes correspondent à des tests de *super-shift* réalisés soit avec un anticorps anti-CREB (piste 9), soit avec un anticorps anti-pCREB (piste 10). Comme on le voit dans la piste 9, l'anticorps anti-CREB entraîne le *super-shift* complet du signal obtenu dans les pistes 3 et 8. Ceci confirme que la protéine responsable du retard de la sonde est bien le facteur de transcription CREB. Par contre, l'anticorps reconnaissant spécifiquement pCREB ne provoque le *super-shift* que d'une partie du signal (piste 10). Ceci suggère et confirme donc que seule une certaine proportion du facteur CREB est phosphorylée suite à ces inhibitions de l'activité mitochondriale.

Enfin, nous avons confirmé ces résultats sur les cellules L929 (figure 3.19). Une fois encore, le signal obtenu pour les contrôles (pistes 2, 6 et 10) est nettement plus faible que dans

les extraits préparés à partir de cellules incubées en présence de FCCP 10 μ M, 100 nM et 1 nM (pistes 3, 4 et 5), d'oligomycine 8 μ M, 80 nM et 0,8 nM (pistes 7, 8 et 9) ou d'antimycine A 1 μ M et 100 nM (pistes 11 et 12). Ces résultats montrent que la liaison du facteur CREB, induite par les inhibiteurs des phosphorylations oxydatives, ne semble pas spécifique d'une seule lignée cellulaire.

3.3.1.2 Discussion

Au vu des premiers résultats, obtenus à partir d'extraits de cellules HEK 293, on peut dire qu'une inhibition transitoire de l'activité mitochondriale (6 h d'incubation avec l'inhibiteur et 18 h de récupération) résulte en une augmentation de la liaison du facteur de transcription CREB à une sonde oligonucléotidique consensus, et que cette liaison présente une certaine dose-dépendance en fonction de la concentration utilisée. Les tests de compétition entre sonde sauvage marquée et sonde sauvage non marquée en excès ont de plus montré que le signal CREB peut être complètement éteint en présence d'un excès de 100x de sonde non radioactive. Cependant, des expériences non présentées, destinées à rechercher la concentration la plus faible en sonde non marquée qui éteint le signal, nous ont montré qu'à partir d'un excès de 10x, le signal est fortement diminué. C'est pourquoi nous avons utilisé cet excès de 10x dans les tests de compétition réalisés par la suite. De plus, la liaison de CREB à sa séquence a été reproduite dans les L929, souche cellulaire différente des HEK 293, ce qui suggère que la réponse de liaison du facteur CREB suite à une inhibition mitochondriale n'est pas spécifique d'un type cellulaire donné.

Nous savons que CREB n'est pas le seul facteur de transcription capable de se lier aux *cAMP-response elements* (CRE). En effet, d'autres facteurs apparentés (appartenant à la famille de CREB, comme CREM et ATF1) pourraient être responsables du retard de la sonde radioactive suite à ces inhibitions mitochondriales. C'est pourquoi nous avons tenté d'identifier ce facteur par des expériences de *super-shift* en présence d'un anticorps anti-CREB ou anti-pCREB. Les résultats obtenus sur les HEK 293 montrent clairement que le *super-shift* du signal CREB est total avec l'anti-CREB et plus partiel avec l'anti-pCREB. Ces résultats suggèrent donc que CREB se lie à sa séquence consensus suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives, et qu'une proportion importante de ce facteur se retrouve sous forme phosphorylée sur la sérine en position 133 dans ces conditions.

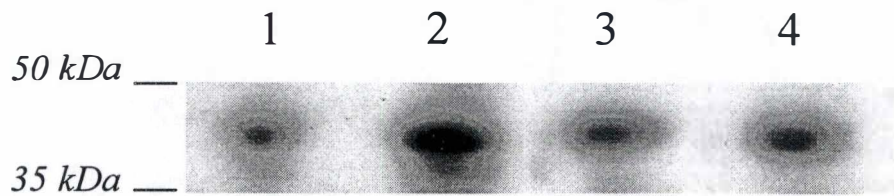


Figure 3.20 : Mise en évidence de la phosphorylation de CREB par *Western blotting* suite aux inhibitions de l'activité mitochondriale. Les cellules HEK 293 sont incubées 6 h en présence de FCCP 10 μ M, d'oligomycine 8 μ M et d'antimycine A 1 μ M, puis laissées 18 h dans du DHG contenant 10 % de FBS avant d'être lysées. 20 μ g de protéines ont été chargés dans chaque piste.

(1) CTL. (2) FCCP 10 μ M. (3) Oligomycine 8 μ M. (4) Antimycine A 1 μ M.

3.3.2 *Mise en évidence de la phosphorylation et de la localisation de CREB par Western blotting et marquage immunocytochimique*

Par des expériences complémentaires, nous avons confirmé que le facteur CREB est effectivement phosphorylé sur la Ser133 suite à une inhibition de l'activité mitochondriale, et nous avons cherché à visualiser en microscopie confocale sa localisation subcellulaire par un marquage immunocytochimique.

3.3.2.1 Résultats

3.3.2.1.1 *Western blotting*

Dans une expérience préliminaire réalisée sur des extraits totaux de cellules HEK 293, préalablement incubées ou non avec les inhibiteurs pendant 6 h puis laissées 18 h dans du DHG contenant 10 % de FBS, nous avons analysé la phosphorylation de CREB par *Western blotting*. L'anticorps utilisé reconnaît la Ser133 phosphorylée (pSer133). Cet anticorps anti-pCREB a déjà été utilisé lors des expériences de retard sur gel, où il s'est avéré capable de discriminer CREB de pCREB – permettant donc de tester la forme sous laquelle se trouve CREB dans ces extraits cellulaires.

Après migration des échantillons sur gel de polyacrylamide 10 % (20 µg de protéines pour chaque test), transfert sur membrane de PVDF, traitement avec les anticorps et révélation en chimioluminescence, une bande apparaît à un PM attendu de 43 kDa, ce qui correspond à pCREB (figure 3.20). La comparaison de l'intensité de ces bandes d'un échantillon à l'autre suggère que la quantité de CREB phosphorylé sur la Ser133 est plus élevée dans les cellules traitées par le FCCP 10 µM, l'oligomycine 8 µM ou l'antimycine A 1 µM. Ajoutons cependant que, même si des quantités équivalentes de protéines ont été utilisées dans chaque test, nous n'avons pas de contrôle de charge.

3.3.2.1.2 *Marquage immunocytochimique*

Cette technique nous a permis de visualiser la phosphorylation de CREB et de préciser sa localisation subcellulaire en utilisant l'anticorps anti-pCREB et un Alexa rouge excité à 568 nm. Ceci a été réalisé sur les deux souches cellulaires (HEK 293 et L929).

Après incubation des cellules,ensemencées sur des lames couvre-objet, avec les inhibiteurs et fixation au méthanol/acétone, les cellules sont incubées avec un anticorps

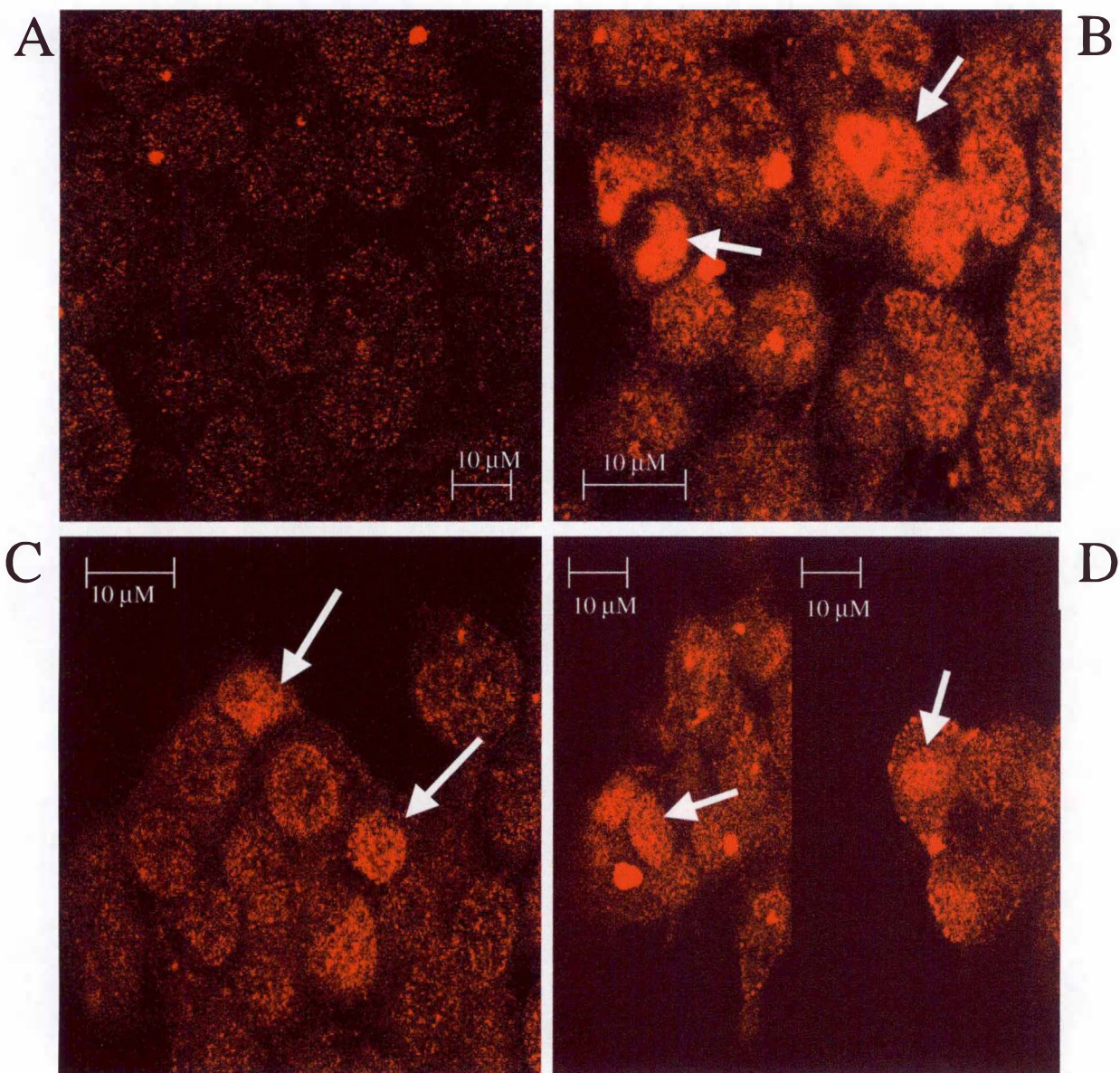


Fig. 3.21 : Marquage et localisation de la protéine CREB phosphorylée sur la sérine 133 (pCREB) dans les cellules HEK 293. Les cellules ont été incubées pendant 6 h en absence (A) ou en présence de FCCP 10 μ M (B), d'oligomycine 8 μ M (C) et d'antimycine A 1 μ M (D). Micrographies prises en microscopie confocale dont les intensités de PMT sont identiques (800). Les flèches indiquent une localisation nucléaire du facteur de transcription CREB.

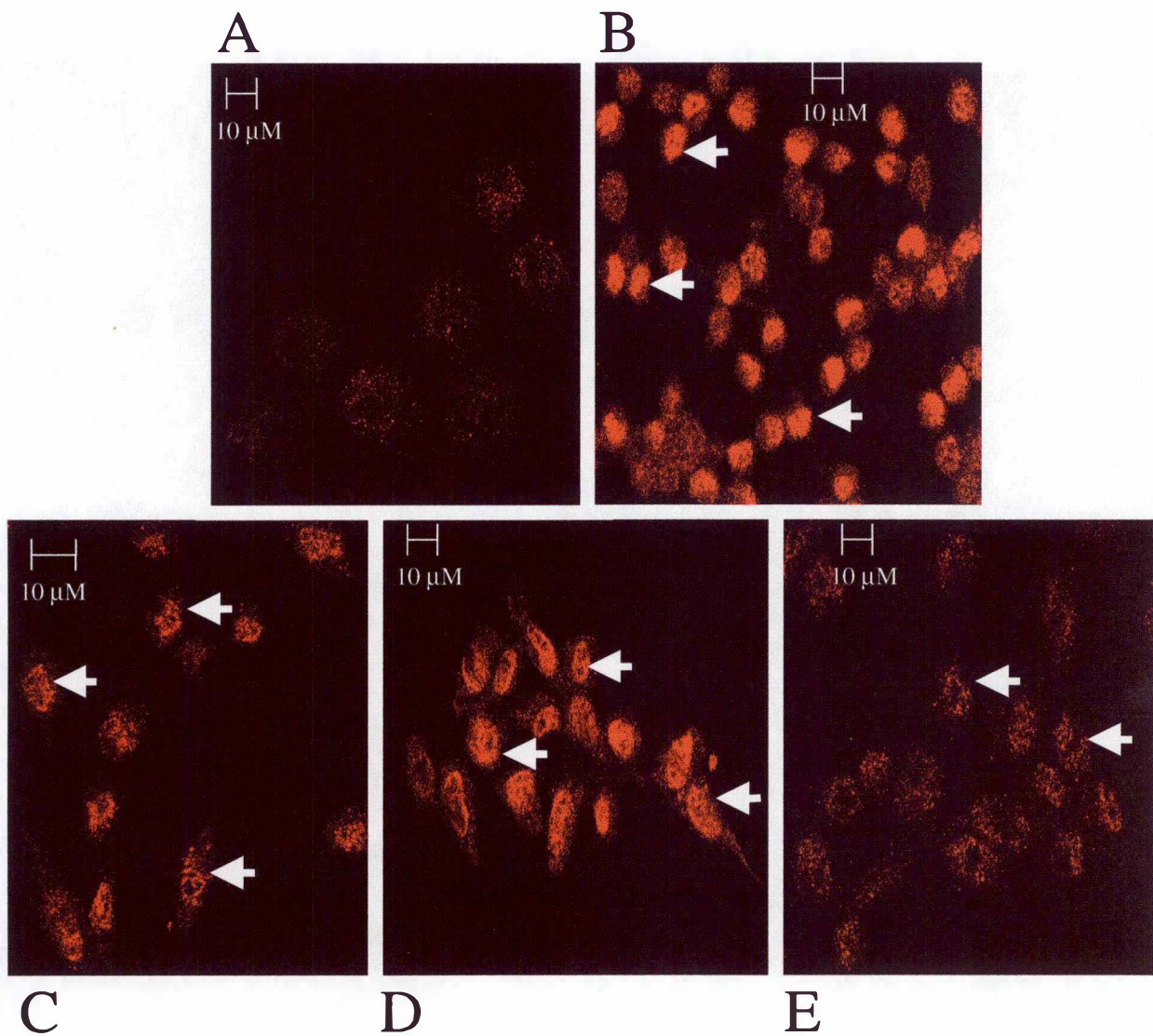


Fig. 3.22 : Marquage et localisation de la protéine CREB phosphorylée sur la sérine 133 (pCREB) dans les cellules L929. Les cellules ont été incubées pendant 6 h en absence (A) ou en présence de FCCP 10 μ M (B), d'oligomycine 8 μ M (C), d'antimycine A 1 μ M (D) et de forskoline 10 μ M (E). Micrographies prises en microscopie confocale dont les intensités de PMT sont identiques (800). Les flèches indiquent une localisation nucléaire du facteur de transcription CREB.

primaire de lapin anti-pCREB puis un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à une molécule fluorescente (Alexa 568). Un montage sur lame porte-objet réalisé au Mowiol permet une visualisation au microscope confocal.

Les figures 3.21 et 3.22 regroupent des micrographies obtenues respectivement pour les HEK 293 et les L929. On remarque que la localisation de pCREB est principalement nucléaire pour des cellules traitées par les inhibiteurs de l'activité mitochondriale. De plus, la comparaison des intensités de fluorescence entre les contrôles (A) et des cellules préalablement incubées en présence de FCCP 10 μ M (B), d'oligomycine 8 μ M (C) et d'antimycine A 1 μ M (D) montre clairement une quantité plus importante de pCREB dans le noyau des cellules dont l'activité mitochondriale a été altérée. Le faible marquage obtenu pour les cellules contrôles suggère que CREB est peu phosphorylé dans les conditions de repos. Une incubation des cellules L929 pendant 6 h avec la forskoline 10 μ M (figure 3.22.E) induit également l'activation de CREB. En effet, cette molécule active directement l'adénylate cyclase I (Tang and Hurley, 1998), qui produit de l'AMPc. Cet AMPc peut à son tour activer la protéine kinase A (PKA), qui peut phosphoryler CREB sur la Ser133. Ce test avec la forskoline est donc réalisé comme contrôle positif. Comme le montre la figure 3.22, l'intensité de fluorescence obtenue après stimulation par la forskoline est plus élevée que dans les contrôles, mais demeure inférieure au marquage obtenu pour toutes les autres conditions.

3.3.2.2 Discussion

Les résultats obtenus confirment une fois encore que le facteur CREB est phosphorylé dans des cellules ayant subi un stress mitochondrial aigu. Ceci a d'abord été montré par les *super-shift* avec l'anticorps anti-pCREB dans les expériences d'EMSA, puis vérifié par la technique de *Western blotting*. Toutefois, nous devons rester prudents quant à l'interprétation de ces derniers résultats (figure 3.20), car nous n'avons pas réalisé de contrôle de charge avec, par exemple, un anticorps anti-tubuline. Le seul contrôle que nous ayons est le dosage de protéines préalablement réalisé sur les échantillons.

Cependant, les expériences de marquage immunocytochimique nous ont permis de confirmer la phosphorylation de CREB suite à une incubation des cellules en présence d'un inhibiteur de l'activité mitochondriale. Dans de cette expérience, nous avons également utilisé un activateur de l'adénylate cyclase I, la forskoline, qui conduit à la phosphorylation de CREB par la voie de la PKA. Ceci permet de nous assurer que le marquage réalisé dans ces conditions et avec cet anticorps détecte bien du pCREB. Il faut signaler que, dans nos conditions expérimentales, le marquage de pCREB suite à la stimulation par la forskoline est plus faible que pour les inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Ajoutons cependant que les conditions de stimulation par la forskoline n'ont pas été optimisées. Il est possible que la cinétique de la forskoline soit plus rapide et qu'après 6 h de stimulation, l'intensité de la

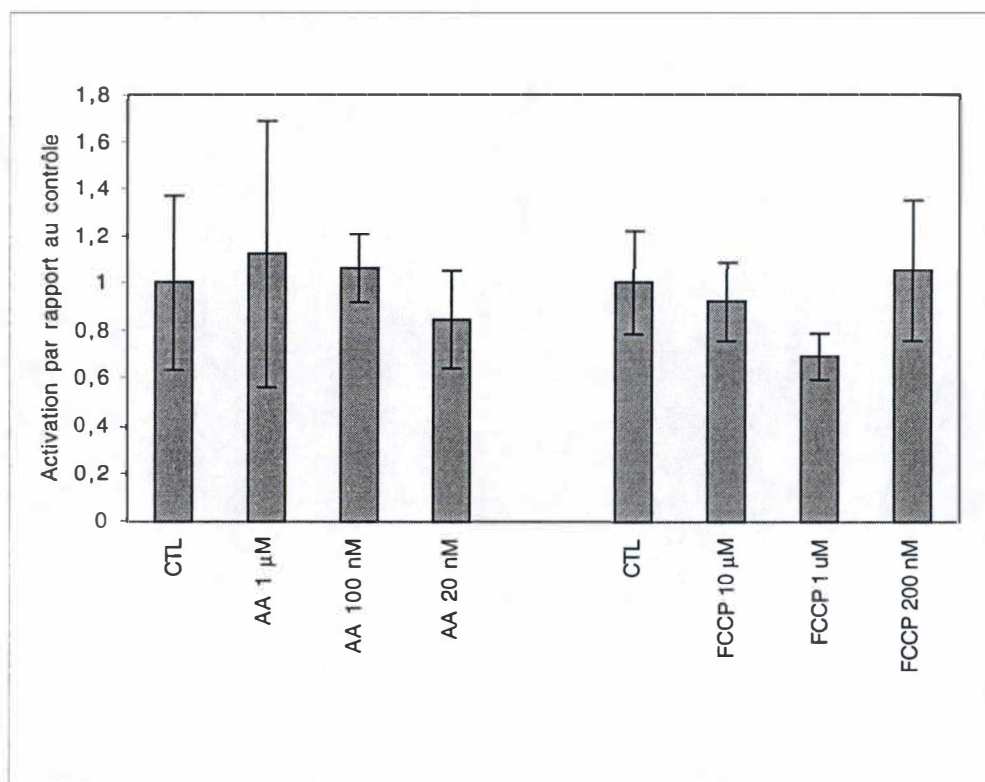


Fig. 3.23 : Mise en évidence de l'activation de CREB dans les HEK 293 par la technique du gène rapporteur. Les cellules sont co-transfectées par un plasmide contenant le gène de la luciférase (placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, qui renferme plusieurs sites CRE) et par un plasmide codant pour la β -galactosidase. 24 h après la transfection, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence d'antimycine A (AA) 1 μ M, 100 nM et 20 nM ou de FCCP 10 μ M, 1 μ M et 200 nM avant de doser l'activité luciférase et β -galactosidase dans les échantillons. Un contrôle de la quantité de cellules utilisées dans les différents tests est réalisé par un dosage de protéines. Les résultats sont exprimés en RLU/ β -Gal/ μ g de protéines puis rapportés aux valeurs contrôles ; ils représentent les moyennes \pm un écart-type pour 3 mesures ($n = 3$).

réponse ne soit plus à son maximum sur notre souche cellulaire. En effet, dans les splénocytes de souris, la phosphorylation de CREB induite par la forskoline passe par un maximum après 30 min de stimulation, même si l'activation de la PKA reste soutenue pendant plusieurs heures (Koh et al., 1997).

En conclusion de cette série d'expériences centrées sur la caractérisation de la phosphorylation du facteur CREB (retards sur gel, *Western blotting* et marquage immunocytochimique), nous pouvons souligner que c'est la première fois qu'il est montré que CREB est phosphorylé suite à une altération aiguë des processus de phosphorylation oxydative. De plus, nous avons pu montrer par différentes techniques que cette liaison s'accompagne de la phosphorylation de CREB sur la Ser133, et que la localisation cellulaire de pCREB est essentiellement nucléaire.

3.3.3 Etude de l'activité transcriptionnelle de CREB par transfection d'un système rapporteur luciférase

Ayant montré la liaison du facteur de transcription CREB à sa séquence oligonucléotidique consensus et sa phosphorylation suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives, nous avons cherché à savoir si CREB est *transcriptionnellement actif* dans ces conditions. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules HEK 293 avec un plasmide d'expression codant pour le gène de la luciférase, placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine. Ce promoteur contient plusieurs sites pouvant lier CREB (Pei et al., 1991) et permet donc de mesurer quantitativement l'activation de ce facteur en dosant l'activité de la luciférase exprimée dans ces conditions. Les taux de transfection sont normalisés par co-transfection avec un plasmide contenant le gène de la β -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur SV-40, et la quantité de cellules utilisées dans chaque test est contrôlée par un dosage de protéines ; les résultats sont donc exprimés en *RLU/ β -Gal/ μ g de protéines*, et éventuellement rapportés au contrôle (porté arbitrairement à 1) pour une comparaison aisée.

3.3.3.1 Résultats

Dans un premier temps, nous avons cherché l'activation du facteur CREB immédiatement après la période d'incubation de 6 h en présence d'inhibiteurs tels que l'antimycine A et le FCCP. La figure 3.23 représente les résultats obtenus sur les cellules HEK 293. Les cellules, sous-cultivées dans des boîtes de 12 puits, sont tout d'abord transfectées au phosphate de calcium avec 0,5 μ g de plasmide rapporteur et 0,5 μ g de plasmide codant pour la β -galactosidase. Après 8 h de transfection, les milieux sont remplacés

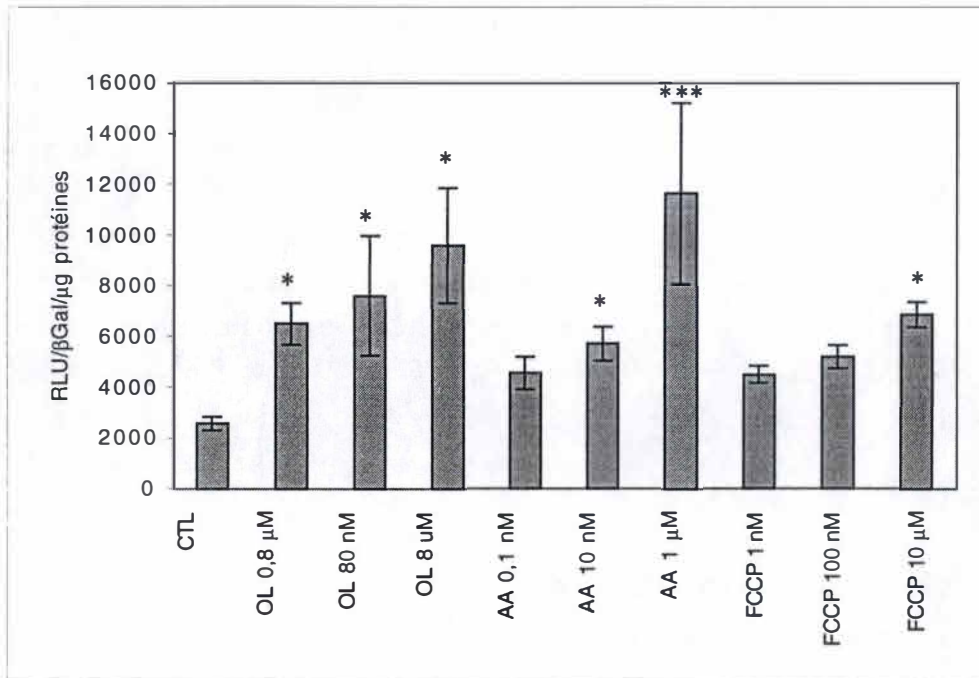


Fig. 3.24 : Mise en évidence de l'activation de CREB dans les HEK 293 par la technique du gène rapporteur. Les cellules sont co-transfectées avec un plasmide contenant le gène de la luciférase (placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, qui renferme plusieurs sites CRE) et par un plasmide codant pour la β -galactosidase. 24 h après la transfection, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μ M, 100 nM et 1 nM, d'oligomycine (OL) 8 μ M, 80 nM et 0,8 nM et d'antimycine A (AA) 1 μ M, 10 nM et 0,1 nM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Un contrôle de la quantité de cellules utilisées dans les différents tests est réalisé par un dosage de protéines ; les résultats sont exprimés en RLU/ β -Gal/ μ g de protéines et représentent les moyennes \pm un écart-type pour 3 mesures ($n = 3$). Les étoiles représentent une différence significative avec $p < 0,05$ (*) et $p < 0,001$ (**).

et les cellules peuvent récupérer pendant 18 h. Puis, les cellules sont incubées 6 h dans du DHG sans sérum en présence ou non des inhibiteurs aux différentes concentrations. Les cellules sont ensuite récoltées dans du PBS, lysées pendant 15 minutes et centrifugées 3 minutes à 13000 rpm. Avant la centrifugation, un aliquot est conservé pour le dosage de protéines. Sur le surnageant, on dose alors l'activité β -galactosidase et luciférase. Après une incubation de 6 h en présence d'antimycine A (aux concentrations de 1 μ M, 100 nM et 20 nM) ou de FCCP (10 μ M, 1 μ M et 200 nM), nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activation du facteur CREB, et ce quel que soit l'inhibiteur et la concentration utilisés.

Par contre, les tests réalisés après une période de récupération de 24 h qui fait suite aux incubations en présence d'inhibiteurs ont fourni des résultats plus intéressants (figure 3.24). En effet, on remarque que l'oligomycine induit à des concentrations allant de 0,8 nM à 8 μ M une activation de CREB de 2,5 à 4 fois par rapport au contrôle ($p < 0,05$). Une activation significative de ce facteur a également été obtenue pour l'antimycine A qui, aux concentrations de 0,1 nM, 10 nM et 1 μ M, augmente respectivement l'activité transcriptionnelle dépendante de CREB de 1,7 ; 2,2 ($p < 0,05$) et 4,5 ($p < 0,001$) fois. Le FCCP induit lui aussi une activation de CREB, aux concentrations allant de 1 nM à 10 μ M : des valeurs 2 à 2,5 ($p < 0,05$) fois la valeur du contrôle ont été obtenues. Ces profils dose-dépendants pour tous les inhibiteurs testés mettent donc bien en évidence l'activation transcriptionnelle de CREB et sa capacité à initier la transcription en réponse à une inhibition des phosphorylations oxydatives dans les cellules HEK 293.

D'autre part, une expérience préliminaire réalisée sur les cellules L929 Rho^o (résultats non présentés) nous a montré que la déficience métabolique chronique engendrée par la déplétion de l'ADNmt entraîne une activation constitutive de la CaMKIV. Or, l'un des substrats de cette kinase est justement le facteur CREB. Nous nous sommes donc demandé si l'activité de cette kinase est également augmentée dans des cellules subissant une inhibition aiguë des phosphorylations oxydatives.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé sur les cellules HEK 293 une expérience supplémentaire de transfection avec le plasmide rapporteur luciférase décrit ci-dessus. Le but de cette expérience est de déterminer, au moyen de dominants négatifs, si CREB et la CaMKIV sont réellement impliqués dans l'expression du gène rapporteur. Nous avons reproduit dans un premier temps l'activation de CREB dans les cellules incubées 6 h avec les inhibiteurs aux concentrations les plus fortes, puis laissées 24 h dans du DHG contenant 10 % de FBS (voir figure 3.25) : on obtient ainsi des valeurs 3,8 ($p < 0,001$), 4,2 ($p < 0,001$) et 2,2 fois plus élevées que le contrôle pour respectivement l'antimycine A (1 μ M), l'oligomycine (8 μ M) et le FCCP (10 μ M). Ces résultats sont comparables à ceux présentés à la figure 3.24. Par contre, l'activation de CREB induite par ces trois molécules peut être inhibée par la transfection préalable d'un plasmide codant pour un dominant négatif de CREB (CREB-M1) ou pour un dominant négatif de la CaMKIV. Le dominant négatif de la CaMKIV est obtenu

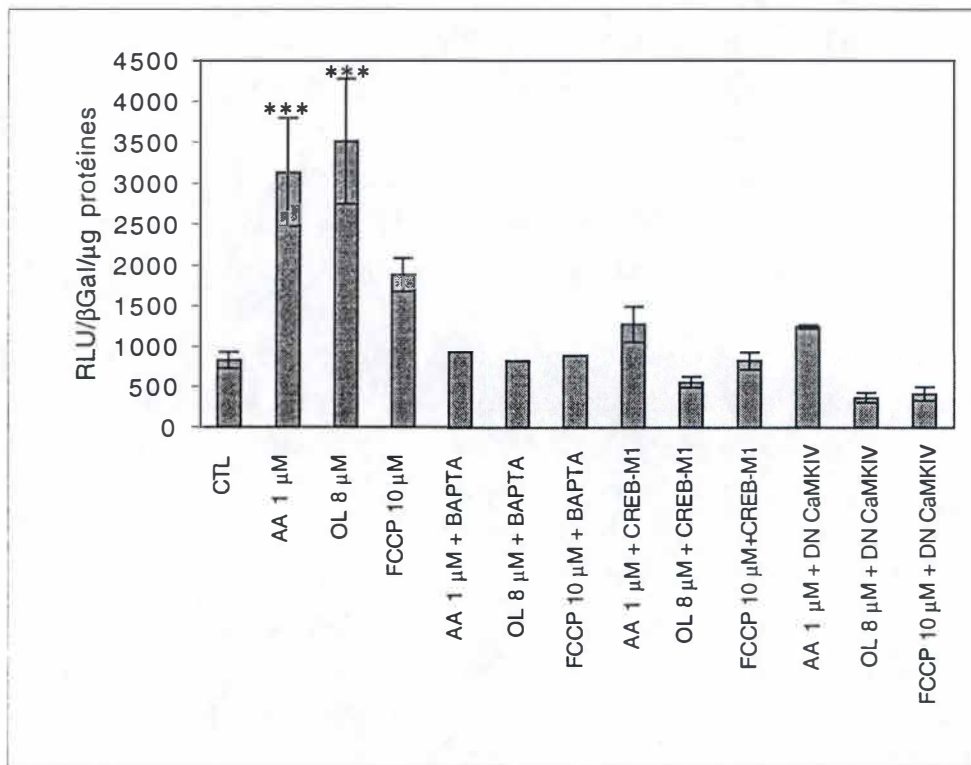


Fig. 3.25 : Effet du BAPTA, de la surexpression d'un dominant négatif (DN) de CREB (CREB-M1) ou de la CaMKIV (DN CaMKIV) sur la réponse transcriptionnelle induite par les inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Les cellules HEK 293 sont co-transfectées avec un plasmide contenant le gène de la luciférase (placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, qui renferme plusieurs sites CRE) et avec un plasmide codant pour la β -galactosidase. 24 h après la transfection, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence d'antimycine A (1 μ M), d'oligomycine (8 μ M) et de FCCP (10 μ M), puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS avant les dosages dans les échantillons (n = 3). Certains tests ont été réalisés avec une incubation en présence de BAPTA (n = 2), ou avec la transfection préalable d'un plasmide codant pour un dominant négatif de CREB (n = 3) ou de la CaMKIV (n = 3). Un contrôle de la quantité de cellules utilisées dans les différents tests est réalisé par un dosage de protéines. Les résultats sont exprimés en RLU/ β -Gal/ μ g de protéines et représentent les moyennes \pm un écart-type (pour les mesures réalisées avec n > 2). Les étoiles (***) représentent une différence significative avec p < 0,001.

par la substitution de la thréonine en position 200 par une alanine (*CaMKIV T200A*) et ne peut donc plus être phosphorylé. De plus, cet effet suppresseur sur l'activation de CREB a été obtenu par une incubation des cellules en présence de BAPTA, un agent chélateur du calcium intracellulaire, ce qui sous-tend fortement l'hypothèse selon laquelle la réponse CREB observée dans nos conditions expérimentales passe par la voie de la CaMKIV, régulée partiellement par le complexe calcium/calmoduline.

3.3.3.2 Discussion

Ces expériences de transfection nous ont apporté quelques éléments nouveaux. Premièrement, nous avons obtenu la confirmation que, suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives, la phosphorylation de CREB et la liaison à sa séquence consensus entraînent bien l'expression de gènes régulés par ce facteur. Rappelons que nous avons utilisé une construction contenant le promoteur *authentique* du gène de l' α -inhibine (Pei et al., 1991). L'expression du gène de la luciférase est, en outre, d'autant plus forte que la concentration en inhibiteur est élevée.

Le fait que CREB réponde ainsi à une altération mitochondriale semble être une conséquence commune de l'action des trois inhibiteurs utilisés ; il faut donc supposer que le *relais*, qui met en relation la mitochondrie déficiente et les voies de transduction menant à CREB, est constitué par un dénominateur commun à ces molécules. Le premier signal auquel on pense est l'ATP lui-même : en effet, la baisse des stocks en ATP est un phénomène commun résultant de l'action des trois inhibiteurs et pourrait, par un mécanisme indirect, activer certaines voies de transduction qui aboutissent à la phosphorylation de CREB.

Par ailleurs, la comparaison des figures 3.23 et 3.24 nous indique que l'activation de CREB se produit pendant les 24 h de récupération qui suivent les inhibitions. En effet, CREB ne semble pas activé au terme des incubations (6 h) en présence des inhibiteurs. Il y a donc un temps de latence entre les inhibitions et l'activation de ce facteur de transcription, mais nous devons cependant rester prudents quant à l'interprétation de ces résultats. Effectivement, nous avons utilisé la technique de transfection d'un système rapporteur luciférase, dont l'expression nécessite un certain délai. On pourrait donc imaginer que CREB soit activé après les 6 h d'inhibition, bien que la luciférase n'ait pas encore pu s'accumuler suffisamment pour permettre la détection de son activité. D'autres expériences, telles que des EMSA ou des maquages immunocytochimiques réalisés après différents temps d'incubation en présence des inhibiteurs, pourraient permettre d'étudier la cinétique de l'activation de CREB en réponse à une inhibition aiguë des phosphorylations oxydatives.

Une des questions qui se posent maintenant est d'identifier la ou les kinase(s) qui phosphoryle(nt) le résidu sérine de CREB suite à une inhibition mitochondriale, et donc

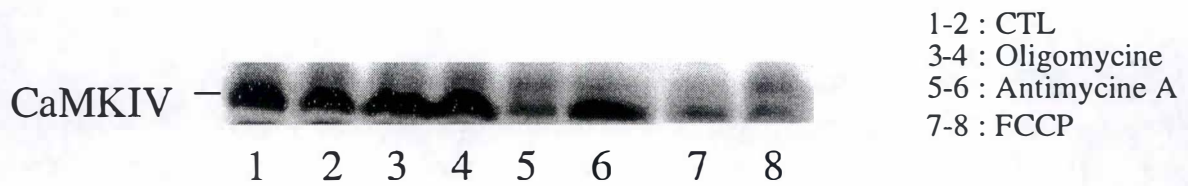
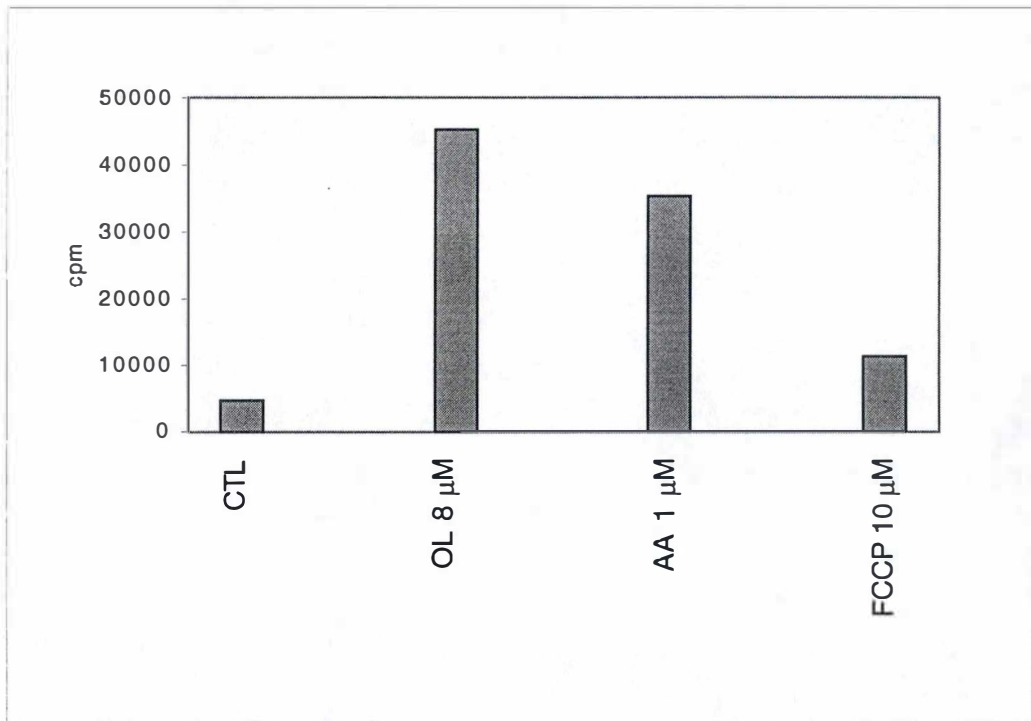


Fig. 3.26 : Mesure de l'activité kinase de la CaMKIV immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules HEK 293 ayant subi une incubation en présence des inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Les cellules sont incubées pendant 6 h en l'absence (contrôle) ou en présence d'oligomycine (OL) 8μM, d'antimycine A (AA) 1 μM et de FCCP 10 μM, puis laissées 18 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS avant l'immunoprécipitation de l'enzyme et le dosage d'activité kinase in vitro réalisé en présence d'un peptide synthétique dérivé de CREB et d'ATP radioactif. Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne de deux tests (n = 2). La quantité de CaMKIV présente dans chaque test est contrôlée par Western blotting avec un anticorps anti-CaMKIV.

d'étudier la cascade de transduction qui se situe en amont de l'activation de CREB. Une première information importante a été apportée à ce sujet lors de la co-transfection du système rapporteur luciférase et d'un plasmide codant pour un dominant négatif de la CaMKIV (figure 3.25). En effet, suite à cette transfection, l'activation de CREB normalement observée après incubation en présence des trois inhibiteurs est complètement inhibée. Ceci indique que cette kinase, qui peut effectivement phosphoryler CREB sur la Ser133, est impliquée en tout ou en partie dans cette activation. Un autre argument a été apporté, lors de la même expérience, dans un test réalisé en présence d'un agent chélateur de calcium, le BAPTA. La suppression de l'effet des inhibiteurs sur l'activation de CREB obtenue dans ces conditions expérimentales corrobore encore l'hypothèse selon laquelle la CaMKIV pourrait intervenir dans la phosphorylation de ce facteur et, donc, dans la transcription Ca^{2+} -dépendante de gènes *via* CREB, en réponse à un stress énergétique aigu. Nous allons donc maintenant décrire les études portant sur l'activité de la CaMKIV et sur les mesures de la concentration en calcium.

3.4 Immunoprécipitation et dosage *in vitro* de l'activité de la CaMKIV

Le fait que la phosphorylation permanente du facteur CREB soit couplée à une activité CaMKIV augmentée dans les cellules L929 Rho^o (Arnould *et al.*, 2000), et que la surexpression d'un dominant négatif de la CaMKIV inhibe la transcription du gène de la luciférase dépendante de CREB dans nos conditions expérimentales, nous permettent de penser que la CaMKIV est impliquée dans l'activation de CREB suite à une inhibition de l'activité mitochondriale. Afin de doser directement son activité, nous avons donc immunoprécipité cette enzyme avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-CaMKIV, à partir de lysats clairs préparés sur des cellules HEK 293 ayant subi 6 h d'inhibition et 18 h de récupération. Les immunocomplexes sont ensuite précipités par un mélange de protéines G et A et rincés trois fois, avant de doser l'activité kinase dans chacun de ces échantillons en présence d'un peptide synthétique dérivé de CREB et d'ATP radioactif. Une partie de ces échantillons est conservée pour vérifier la quantité d'enzyme immunoprécipitée par *Western blotting*.

3.4.1 Résultats

Les résultats obtenus pour le test d'activité kinase *in vitro* sont présentés à la figure 3.26. On remarque que l'activité de la CaMKIV, faible dans le contrôle (4600 cpm), est augmentée dans les échantillons issus de cellules traitées par l'oligomycine 8 μM (9,7 fois), l'antimycine A 1 μM (7,5 fois) et le FCCP 10 μM (2,5 fois).

Sur la figure 3.26, on peut voir les quantités respectives de CaMKIV immunoprécipitée à partir des différents échantillons et révélée par *Western blotting*. Ce contrôle nous permet de comparer les activités kinase à la quantité d'enzyme présente dans les tests, et de vérifier que les différences observées entre les échantillons ne sont pas la conséquence de différences dans la quantité d'enzyme utilisée pour le dosage. Les pistes 1 et 2 correspondent à la quantité de CaMKIV présente dans les cellules contrôles ; elle ne diffère pas (ou peu) de celle observée dans les pistes 3 et 4 (oligomycine 8 μM). Par contre, on peut remarquer que la quantité d'enzyme immunoprécipitée dans les tests 5, 7 et 8 sont plus faibles. Une perte de matériel lors des centrifugations et des rinçages n'est pas à exclure.

3.4.2 Discussion

Cette expérience a montré que l'activité kinase de la CaMKIV dans les cellules HEK 293 est fortement augmentée suite à une incubation en présence d'oligomycine 8 μM , d'antimycine A 1 μM ou de FCCP 10 μM . Cette augmentation d'activité pourrait expliquer la quantité accrue de pCREB observée dans les expériences précédentes, puisque la CaMKIV reconnaît CREB en tant que substrat et transfère le groupement phosphate terminal d'une molécule d'ATP vers la Ser133 de ce facteur de transcription.

Toutefois, en regard des résultats obtenus pour l'oligomycine et l'antimycineA, l'activation de la CaMKIV semble moins importante dans le cas d'une inhibition par le FCCP 10 μM (activité 2,5 fois plus élevée que dans les contrôles). Ceci est cependant compréhensible car, au vu du contrôle effectué par *Western blotting*, la quantité d'enzyme immunoprécipitée dans ces échantillons (pistes 7 et 8) est inférieure à celle obtenue dans tous les autres échantillons et ce, bien que nous soyons partis d'un nombre de cellules équivalent pour tous les tests. Nous pouvons donc supposer que, à quantité d'enzyme égale, l'augmentation d'activité kinase serait probablement du même ordre pour le FCCP que pour les deux autres molécules testées. Cependant, si on se reporte aux expériences de transfection avec le plasmide rapporteur codant pour la luciférase, les activations obtenues sont systématiquement plus faibles pour le FCCP. Il est donc également possible que l'activation de la CaMKIV induite par le FCCP soit plus faible.

Un dernier point doit être souligné à propos de l'activation de la CaMKIV. En effet, la quantité d'enzyme immunoprécipitée dans les cellules contrôles est sensiblement la même que dans les cellules traitées avec l'un de ces inhibiteurs (hormis le problème d'immunoprécipitation rencontré dans les tests *FCCP 10 μM*). Ceci signifie que la CaMKIV est présente sous forme inactive dans une cellule au repos. Son activité dépend d'une part du calcium et d'autre part d'une phosphorylation sur le résidu thréonine 200.

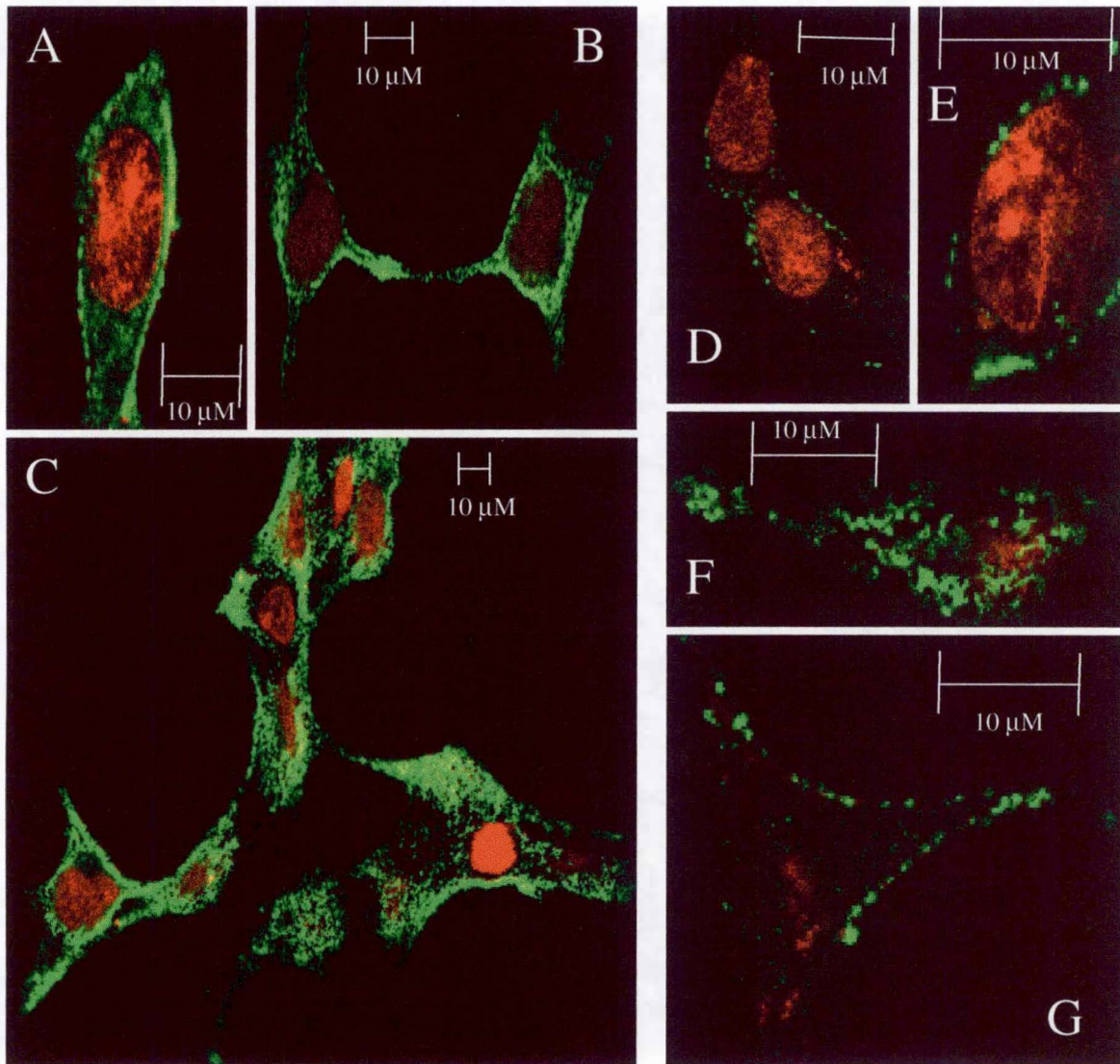


Fig. 3.27 : Marquage immunocytochimique et visualisation en microscopie confocale de l'apoaeguorine dans les cellules HEK 293 suite à la transfection avec un plasmide codant pour cette protéine. Le marquage est réalisé avec un anticorps primaire dirigé contre un épitope de l'hémagglutinine (HA), dont la séquence est fusionnée au gène de l'apoaeguorine. (A,B,C) Apoaeguorine cytoplasmique. (D,E,F,G) Apoaeguorine mitochondriale.

3.5 Mesure de la concentration en calcium libre suite aux inhibitions de l'activité mitochondriale

Suite aux résultats obtenus sur l'activation de la CaMKIV en réponse à une inhibition mitochondriale aiguë, nous avons voulu étudier les variations de concentration en calcium libre qui, en théorie, précèdent cette activation. Nous avons pour cela utilisé deux systèmes : la reconstitution de l'aequorine, un complexe émettant de la lumière en présence de calcium qui nous a permis de comparer les concentrations en calcium cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) et mitochondrial ($[Ca^{2+}]_{mt}$), ainsi que la sonde fluorescente Fura-2, avec laquelle nous avons pu déterminer la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, et obtenir quelques données sur la cinétique de ces changements.

3.5.1 Résultats

3.5.1.1 Dosage du calcium par le système aequorine

Ces expériences ont été réalisées sur des cellules HEK 293. Les cellules sont préalablement transfectées au phosphate de calcium avec un plasmide codant pour l'apoequorine, fusionnée à une séquence qui correspond à un épitope de l'hémagglutinine (HA). Ce *tag* permet de contrôler l'expression de la protéine avec un anticorps primaire anti-HA. Une seconde construction code pour l'apoequorine pourvue de la séquence signal de la sous-unité VIII de la cytochrome oxydase (*COX VIII*) qui assure son adressage dans le compartiment mitochondrial.

Afin de vérifier que la localisation de l'apoequorine est bien cytoplasmique ou mitochondriale selon la construction utilisée, nous avons réalisé un marquage immunocytochimique contre la protéine de fusion, en utilisant un anticorps primaire de lapin anti-HA, puis un anticorps secondaire de chèvre couplé à une molécule fluorescente (*FITC : fluoresceine isothiocyanate*). Ceci permet de visualiser la localisation de la protéine surexprimée en microscopie confocale. Les noyaux ont été marqués à l'iodure de propidium. La figure 3.27 (A, B, C) rassemble quelques images obtenues. Pour l'apoequorine cytoplasmique, on obtient un marquage diffus, laissant supposer une localisation cytoplasmique de cette protéine. Par contre, les photos D, E, F et G de la figure 3.27 montrent le marquage obtenu pour l'apoequorine fusionnée à une séquence d'adressage pour la mitochondrie. Dans ce cas, on remarque que le marquage présente un aspect ponctué et restreint à certains endroits, compatible avec une localisation mitochondriale de l'apoequorine. Un double marquage de l'apoequorine et d'une protéine mitochondriale

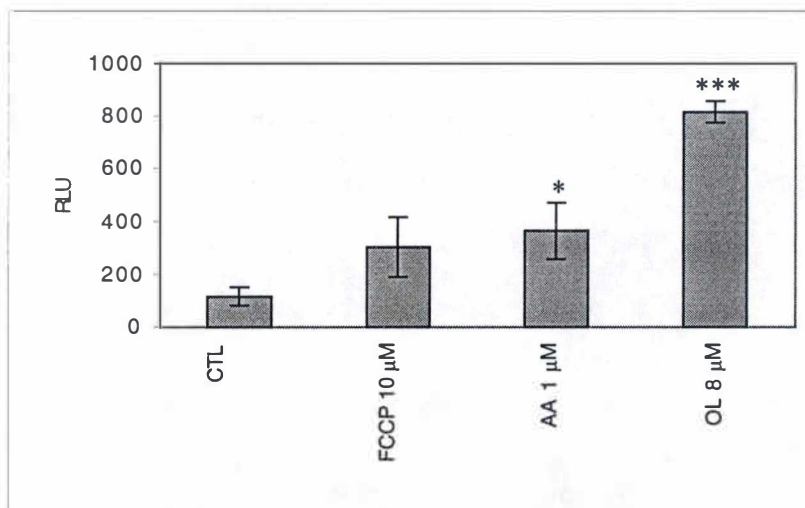


Fig. 3.28 : Mesure de la concentration cytoplasmique en calcium par le système aequorine. Les cellules HEK 293 sont transfectées au phosphate de calcium avec un plasmide codant pour l'apoequorine cytoplasmique. Après 24 h, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μ M, d'oligomycine (OL) 8 μ M et d'antimycine A (AA) 1 μ M. Une heure après le début de ces incubations, la coelenterazine est ajoutée pour permettre la reconstitution du complexe. Les résultats sont exprimés en relative light units (RLU) et représentent la moyenne \pm un écart-type pour 3 mesures ($n = 3$). Les étoiles représentent une différence significative avec $p < 0,05$ (*) et $p < 0,001$ (**).

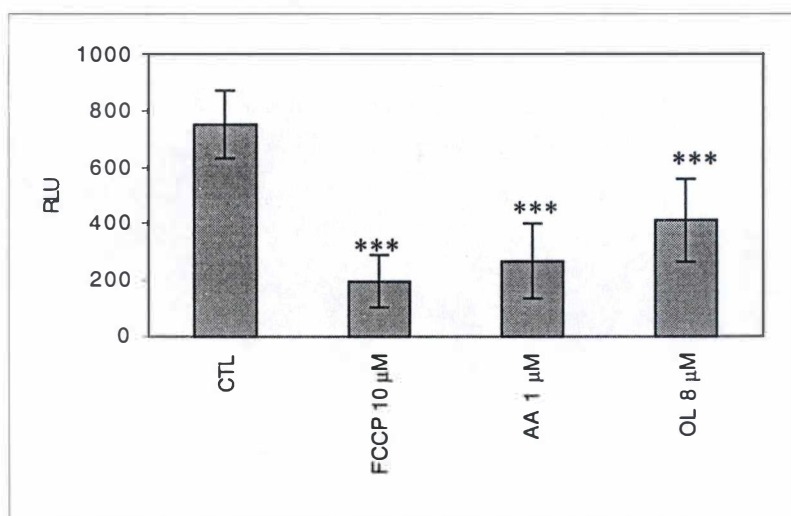


Fig. 3.29 : Mesure de la concentration mitochondriale en calcium par le système aequorine. Les cellules HEK 293 sont transfectées au phosphate de calcium avec un plasmide codant pour l'apoequorine mitochondriale. Après 24 h, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μ M, d'oligomycine (OL) 8 μ M et d'antimycine A (AA) 1 μ M. Une heure après le début de ces incubations, la coelenterazine est ajoutée pour permettre la reconstitution du complexe. Les résultats sont exprimés en relative light units (RLU) et représentent la moyenne \pm un écart-type pour 3 mesures ($n = 3$). Les étoiles représentent une différence significative avec $p < 0,001$ (**).

comme la sous-unité I de la cytochrome c oxydase (COXI) devrait confirmer la localisation de l'apoeaquorine.

Suite à la transfection, on laisse les cellules récupérer 18 h dans du DHG contenant 10 % de FBS. Ensuite, les cellules sont incubées en présence des différents inhibiteurs pendant 6 h (FCCP 10 μM , antimycine A 1 μM et oligomycine 8 μM). La coelenterazine est ajoutée une heure après le début des incubations en présence des inhibiteurs pour permettre la reconstitution du complexe apoeaquorine/coelenterazine. Les cellules sont ensuite récoltées dans le milieu, centrifugées 10 min à 1000 rpm et resuspendues dans 50 μl de HBSS contenant du CaCl_2 1 mM avant de réaliser les lectures au bioluminomètre.

Les résultats obtenus pour des cellules HEK 293 transfectées avec la construction codant pour l'apoeaquorine dans le cytoplasme (*cytAeq/pcDNA1*), sont présentés à la figure 3.28. On voit que la quantité de calcium cytoplasmique est multipliée par un facteur 3 après 6 h d'incubation en présence de FCCP 10 μM , et par un facteur 3,5 ($p < 0,05$) en présence d'antimycine A 1 μM . L'oligomycine 8 μM , quant à elle, induit une augmentation de la concentration calcique encore plus élevée ($p < 0,001$). En effet, dans ces conditions, le signal obtenu est 8 fois plus important que celui obtenu pour des cellules contrôles.

La construction codant pour l'apoeaquorine destinée à la mitochondrie (*mtAeq/pcDNA1*) a permis d'autre part de mesurer les concentrations en calcium libre dans cet organite. Les résultats sont synthétisés à la figure 3.29. On constate que l'incubation avec les inhibiteurs provoque une diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$, par rapport au contrôle, et les différences obtenues sont hautement significatives ($p < 0,001$).

Ces résultats montrent une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, couplée à une baisse de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ après 6 h d'incubation en présence des inhibiteurs. Nous pouvons donc directement penser que la mitochondrie libère une partie de ses stocks calciques dans le cytoplasme. Néanmoins, dans cette première expérience, nous n'avons pas vérifié si la quantité d'apoeaquorine exprimée dans les différents échantillons était la même. En effet, des différences dans les taux d'expression de cette protéine pourraient également conduire à des résultats similaires.

Nous avons donc répété cette expérience, en conservant un aliquot de chaque échantillon pour contrôler par *Western blotting* la quantité d'apoeaquorine exprimée. Les résultats pour la *cytAeq* sont repris à la figure 3.30. Sous les histogrammes, on a placé les bandes correspondant à la quantité d'apoeaquorine exprimée dans chaque échantillon. On voit que le profil obtenu est comparable à celui de la figure 3.28. On obtient bien une élévation des taux cytosoliques en calcium libre par rapport au contrôle, pour les trois inhibiteurs ($p < 0,001$). Les contrôles d'expression réalisés par *Western blotting* nous montrent des bandes comprises entre 15 et 25 kDa (22 kDa attendu) d'intensité comparable. Nous pouvons

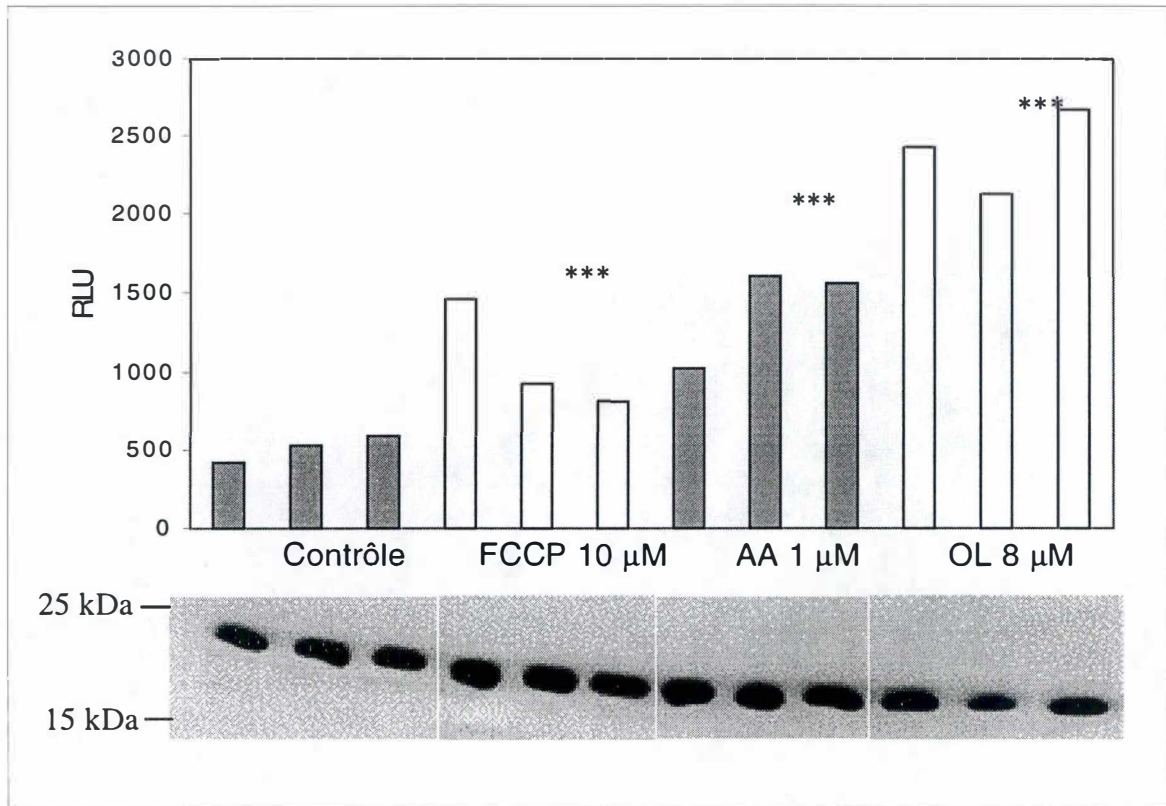


Fig. 3.30 : Mesure de la concentration cytoplasmique en calcium par le système aequorine. Les cellules HEK 293 sont transfectées au phosphate de calcium avec un plasmide codant pour l'apoequorine cytoplasmique. Après 24 h, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μM, d'oligomycine (OL) 8 μM et d'antimycine A (AA) 1 μM. Une heure après le début de ces incubations, la coelenterazine est ajoutée pour permettre la reconstitution du complexe. Les résultats sont exprimés en relative light units (RLU) et représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 mesures (n = 3). Les étoiles représentent une différence significative avec p < 0,05 (*) et p < ,001 (***). Un contrôle de la quantité d'apoequorine exprimée dans les différents tests a été réalisé par Western blotting, avec un anticorps anti-HA.

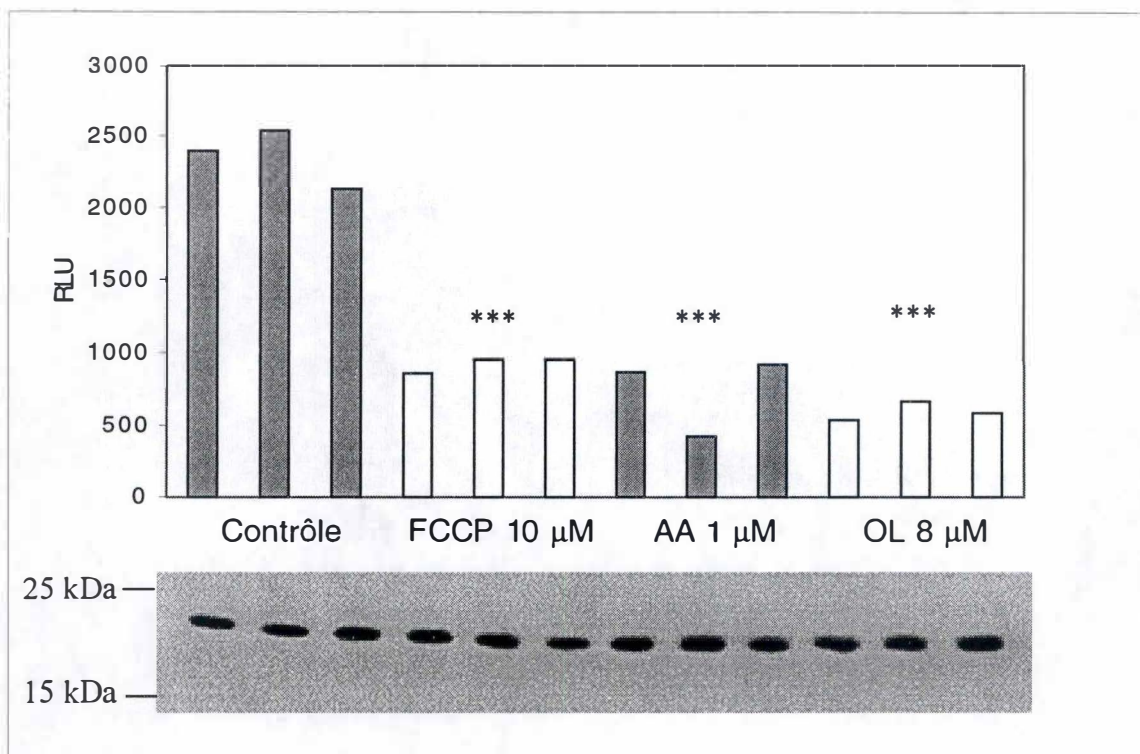


Fig. 3.31 : Mesure de la concentration mitochondriale en calcium par le système aequorine. Les cellules HEK 293 sont transfectées au phosphate de calcium avec un plasmide codant pour l'apoequorine mitochondriale. Après 24 h, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 µM, d'oligomycine (OL) 8 µM et d'antimycine A (AA) 1 µM. Une heure après le début de ces incubations, la coelenterazine est ajoutée pour permettre la reconstitution du complexe. Les résultats sont exprimés en relative light units (RLU) et représentent la moyenne \pm un écart-type pour 3 mesures ($n = 3$). Les étoiles représentent une différence significative avec $p < 0,001$ (***) . Un contrôle de la quantité d'apoequorine exprimée dans les différents tests a été réalisé par Western blotting, avec un anticorps anti-HA.

suggérer que les effets hautement significatifs observés sont réels et ne résultent pas d'une différence dans les taux d'expression de l'apoeaeguorine.

La figure 3.31 montre les résultats obtenus avec l'aequorine mitochondriale. De nouveau, ce graphe présente un profil comparable à celui de la figure 3.29, caractérisé par une nette réduction de la $[Ca^{2+}]_{mt}$ après 6 h d'incubation en présence de FCCP 10 μ M, d'antimycine A 1 μ M ou d'oligomycine 8 μ M ($p < 0,001$). Les contrôles d'expression de la photoprotéine montrent que tous les échantillons contiennent approximativement la même quantité d'aequorine et nous permettent donc de valider les mesures effectuées.

Dans le but de vérifier que les quantités de RLU obtenues correspondent bien à une mesure de *calcium*, nous avons repris des échantillons pendant 30 min dans une solution hypotonique contenant 10 mM en $CaCl_2$. La figure 3.32 montre qu'un tel traitement provoque une libération de photons accrue, probablement due au contact de l'aequorine avec la forte concentration en calcium.

3.5.1.2 Dosage du calcium par la sonde Fura-2

Pour quantifier et obtenir des renseignements sur la cinétique des variations de concentration calcique observées dans les expériences précédentes après 6 h d'inhibition, nous avons réalisé des tests en présence d'une sonde fluorescente (Fura-2), qui permet de suivre les fluctuations calciques au spectrofluorimètre, et ce au cours du temps.

Le passage aux sondes fluorescentes repose sur le fait que la reconstitution du système aequorine nécessite une incubation minimale d'une heure avec la coelenterazine, ce qui exclut la possibilité d'employer ce système pour mesurer le calcium dans les premières minutes de l'inhibition. Nous avons donc utilisé un autre système (Fura-2) permettant de doser la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ directement après l'ajout d'un inhibiteur. Ce système perd cependant l'avantage de pouvoir suivre également les variations de $[Ca^{2+}]_{mt}$.

Les cellules L929, sous-cultivées à confluence sur une lamelle couvre-objet, sont préalablement chargées en présence de Fura-2 AM pendant une heure dans l'obscurité. Après trois rinçages au HBSS, la lamelle couvre-objet est déposée dans une cuvette en quartz contenant du HBSS (1 mM $CaCl_2$) pour les lectures au spectrofluorimètre. Le FCCP (10 μ M) est ajouté dans la cuvette avant les mesures. La figure 3.33 compare les $[Ca^{2+}]_{cyt}$ de cellules au repos et de cellules incubées entre 0 et 30 min en présence de FCCP 10 μ M. On constate que la concentration en calcium cytosolique libre, plus ou moins constante dans les cellules normales, commence à augmenter entre 4 et 10 min après l'ajout de FCCP 10 μ M dans la cuvette (temps 0). Après 30 min d'incubation, la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est multipliée par 3 et est comprise entre 200 et 250 nM.

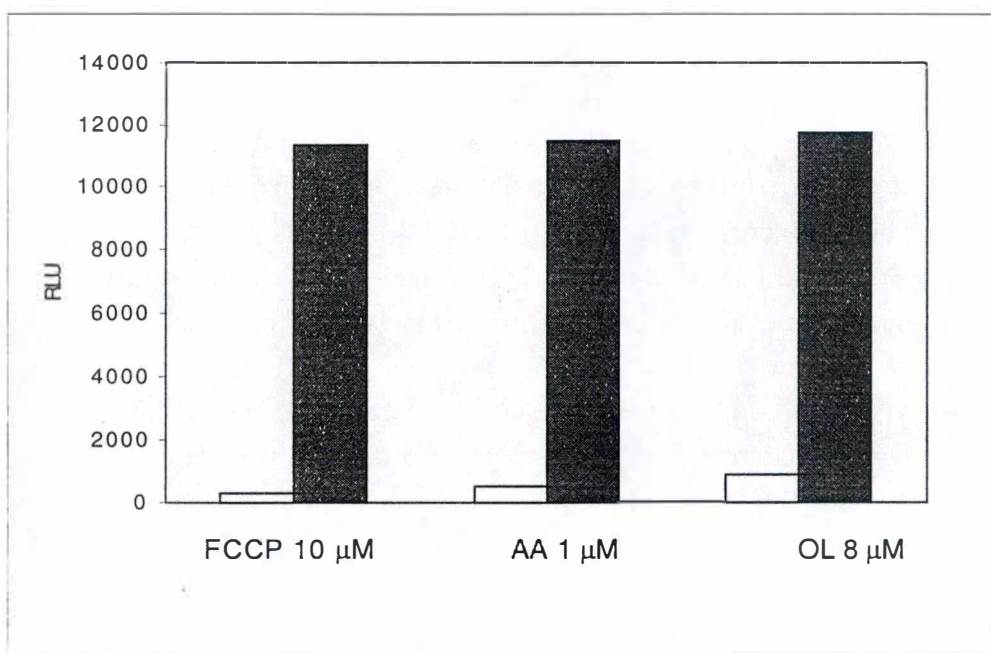


Fig. 3.32: Comparaison des signaux obtenus lorsque les cellules HEK 293 exprimant l'apoeaeguorine sont incubées en présence de FCCP 10 μM d'antimycine A (AA) 1 μM et d'oligomycine 8 μM . Elles sont ensuite resuspendues dans du HBSS-CaCl₂ 1 mM (blanc) ou reprises 30 minutes dans une solution hypotonique contenant du CaCl₂ 10 mM (noir). Les résultats sont exprimés en RLU (n = 1).

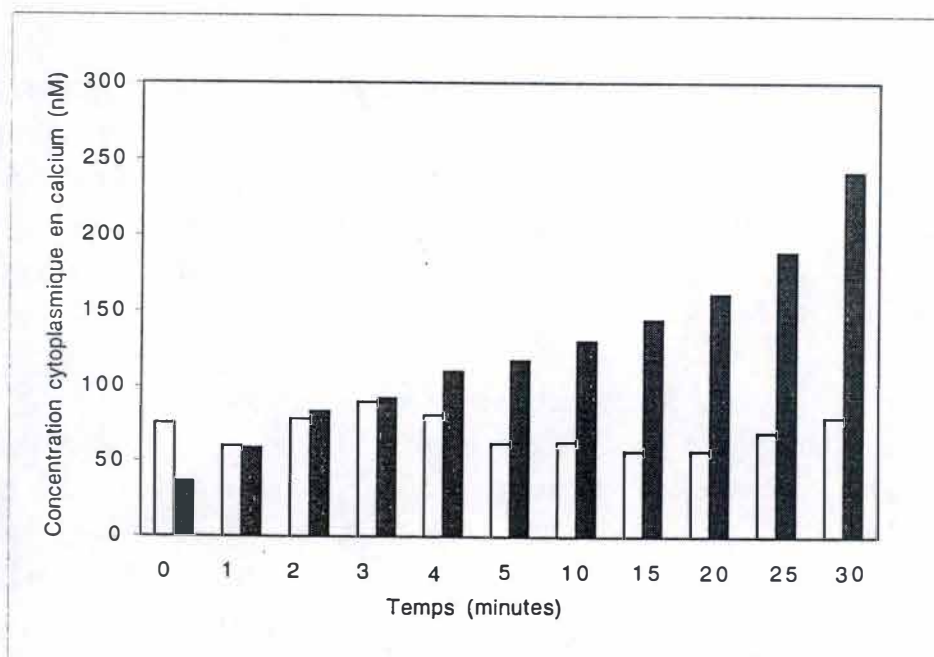


Fig. 3.33 : Mesure de la concentration cytoplasmique en calcium réalisée sur les L929 par la sonde fluorescente Fura-2 dans les 30 premières minutes suivant l'ajout de FCCP 10 μM sur les cellules (noir). Les contrôles (blanc) représentent des cellules n'ayant pas été mises en contact avec le FCCP. Les résultats sont exprimés en nM et représentent la moyenne de 2 mesures.

3.5.2 Discussion

En présence des trois inhibiteurs de l'activité mitochondriale utilisés, nous observons une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Ceci est en accord avec (Biswas et al., 1999) qui observent ces effets sur des myocytes C2C12. L'explication la plus simple serait de considérer que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est causée indirectement par une inhibition de l'efflux de calcium par les Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique suite à la diminution du contenu en ATP dans les cellules (Biswas et al., 1999).

Cependant, la concentration en calcium cytosolique libre dans une cellule est la conséquence des interactions entre des compartiments subcellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondrie) et la membrane plasmique, et de l'intégration de nombreux mécanismes de régulation assurés par de nombreuses pompes et transporteurs. Des études récentes suggèrent également que la mitochondrie participe activement au contrôle de la concentration en calcium cytoplasmique et que le calcium mitochondrial est lui-même régulé par la libération de calcium par le RE (Rutter and Rizzuto, 2000). Lors d'une élévation localisée (microdomaines) de la concentration cytosolique en calcium, les mitochondries accumulent rapidement ce calcium par l'uniport et le relarguent lentement par l'échangeur mitochondrial Na^+/Ca^{2+} .

Dans nos expériences, nous observons que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est associée à une diminution de la $[Ca^{2+}]_m$. Toutefois, même si la mitochondrie joue probablement un rôle dans l'augmentation cytosolique, des mécanismes plus fins que le simple transfert du calcium mitochondrial vers le compartiment cytosolique doivent entrer en jeu. En effet, on n'observe pas un parallélisme parfait entre la diminution mitochondriale et l'augmentation cytosolique (voir figures 3.28 et 3.29) : l'oligomycine induit la plus forte augmentation cytosolique et la plus faible diminution mitochondriale. De plus il est connu que la séquestration du calcium mitochondrial est plus faible lors de la diminution de $\Delta\Psi_m$, ce qui est induit par le FCCP et l'antimycine A. Un autre mécanisme d'efflux, décrit dans des mitochondries de spermatozoïdes, ne semble pas lié à l'échangeur Na^+/Ca^{2+} mitochondrial mais résulterait d'une stimulation de l'efflux calcique de la mitochondrie *via* l'ANT (Breitbart et al., 1996).

Des expériences en présence d'inhibiteurs devraient permettre de mettre en évidence la contribution du calcium mitochondrial dans l'augmentation de la concentration cytosolique observée lors de l'inhibition de l'activité mitochondriale par ces inhibiteurs. Nous pourrions par exemple utiliser un inhibiteur de l'uniport mitochondrial comme le rouge de ruthénium (Breitbart et al., 1996) ou de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} mitochondrial comme le CGP-37157 (Hoyt and Reynolds, 1998). Pour tester l'hypothèse selon laquelle le réticulum endoplasmique pourrait contribuer à cette élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, on pourrait également utiliser le système aequorine, mais avec une construction qui adresse l'apoequorine dans cet organelle.

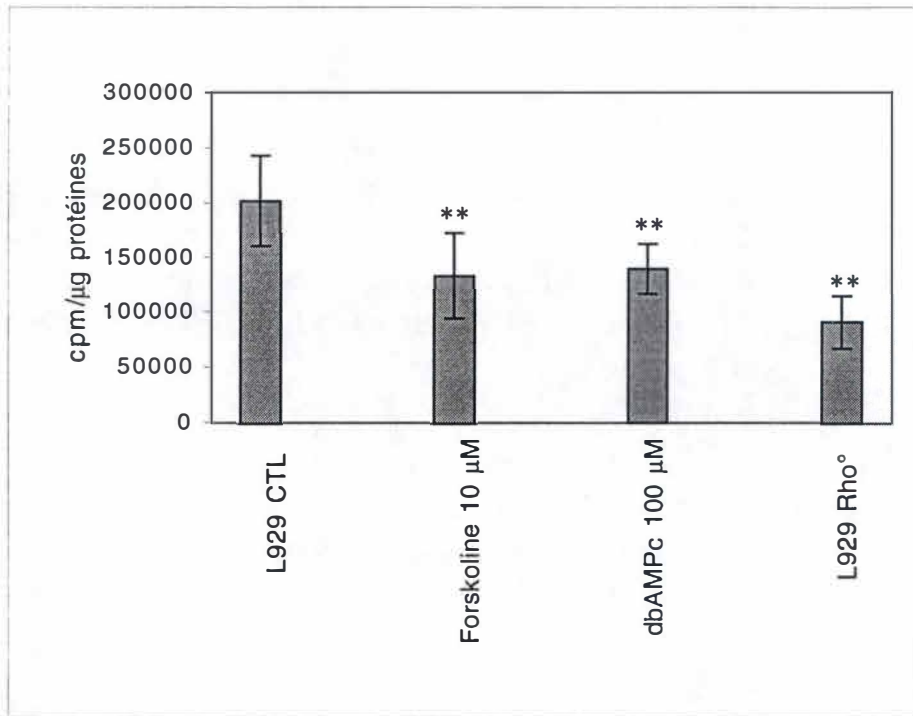


Fig. 3.34 : Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée réalisée sur les cellules L929 incubées avec la forskoline ou le dibutyryl-AMP cyclique (dbAMPc), et sur les cellules L929 Rho°. Les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de forskoline 10 μM et de dbAMPc 100 μM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Les résultats, exprimés en coups par minute, sont rapportés à la quantité de protéines (cpm/μg de protéines). Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 6 valeurs (pour L929 CTL), 3 valeurs (pour forskoline 10 μM), 6 valeurs (pour dbAMPc) et 3 valeurs (pour L929 Rho°). Les étoiles (**) représentent une différence significative avec $p < 0,01$.

3.6 Tests de prolifération suite aux inhibitions mitochondriales

Nous avons donc caractérisé, par différentes approches, l'activation de CREB dans deux souches cellulaires en conditions de stress énergétique, et apporté quelques informations quant à la voie de signalisation qui se situe en amont de ce facteur. Le rôle de CREB dans ce contexte d'inhibition mitochondriale est tout à fait nouveau et ouvre des portes pour la recherche ultérieure, notamment sur les gènes de réponse exprimés dans ces conditions, mais aussi sur les effets au niveau cellulaire de l'activation de CREB sur la physiologie cellulaire.

En effet, suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives et à la baisse inhérente du contenu cellulaire en ATP, les conséquences sur le métabolisme sont multiples, vu l'abondance des processus dépendants de l'ATP. Il a été montré que la stimulation de la voie de la PKA inhibe la prolifération de certaines lignées tumorales humaines (Yokozaki et al., 1992). De plus, une autre équipe a montré que la prolifération de cellules hépatiques est inhibée par CREB phosphorylé sur la Ser133 par la PKA ou la CaMKIV (Houglum et al., 1997). Ce facteur de transcription semble donc intervenir dans les processus de croissance cellulaire. Nous nous sommes donc demandé si l'inhibition de l'activité mitochondriale, dont nous savons maintenant qu'elle entraîne une activation de CREB, peut également résulter en un ralentissement de la phase S du cycle cellulaire. Pour aborder ceci, nous avons réalisé une mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (^3H -thymidine) par les cellules.

3.6.1 Résultats

Notre première expérience de ce type a été réalisée sur des cellules L929 (souche Rho⁺) incubées ou non 6 h dans du DHG sans sérum en présence de forskoline 10 μM et de *dibutyryl-AMP cyclique* (dbAMPc) 100 μM , puis laissées 24 h dans du DHG contenant 10 % de FBS, et sur des cellules L929 Rho^o. Les cellules sont ensuite incubées 4 h en présence de ^3H -thymidine, dans du DHG sans sérum, avant d'être rincées au PBS puis lysées en vue des dosages. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.34. Dans cette expérience, l'incubation des cellules en présence de forskoline (10 μM) ou de dbAMPc (100 μM) résulte en une baisse dans l'incorporation de la thymidine tritiée. Une diminution de 20 à 30 % par rapport au contrôle est observée. Dans cette même expérience, on observe que la déplétion chronique des cellules en ADNmt (L929 Rho^o) résulte également en une diminution de l'incorporation de thymidine, qui est même plus sévère (55 %) ($p < 0,01$), par rapport aux L929 Rho⁺. Ceci sous-tend déjà la corrélation entre l'accumulation de CREB et le ralentissement du cycle cellulaire.

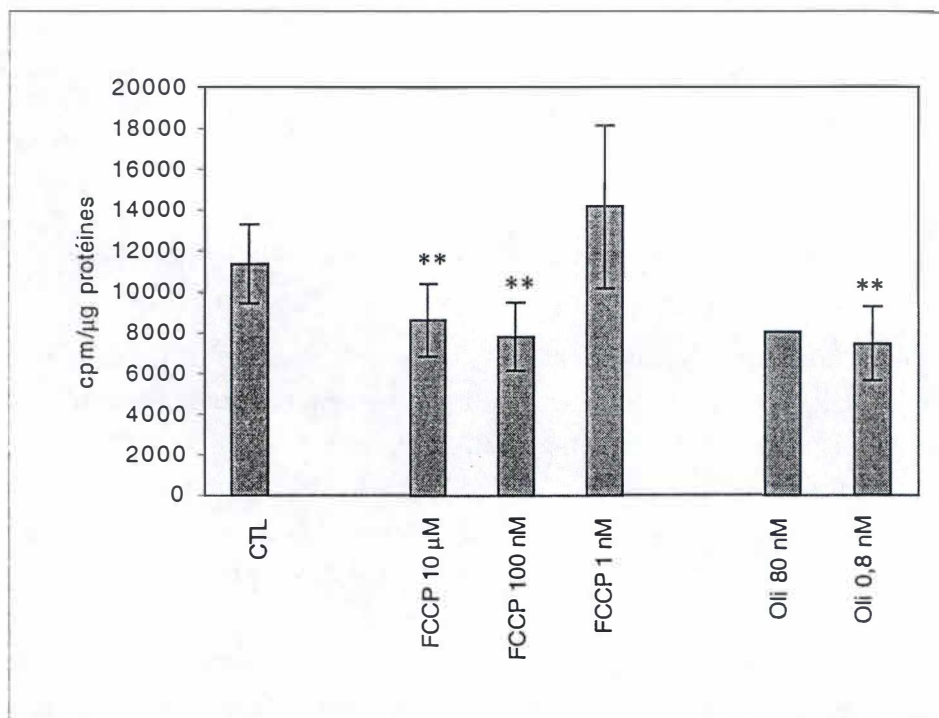


Fig. 3.35 : Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée réalisée sur les cellules HEK 293 incubées avec les inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 µM, 100 nM et 1 nM et d'oligomycine 80 nM et 0,8 nM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Les résultats, exprimés en coups par minute, sont rapportés à la quantité de protéines (cpm/µg de protéines). Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (sauf OL 80 nM: n = 2). Les étoiles (**) représentent une différence significative avec $p < 0,01$.

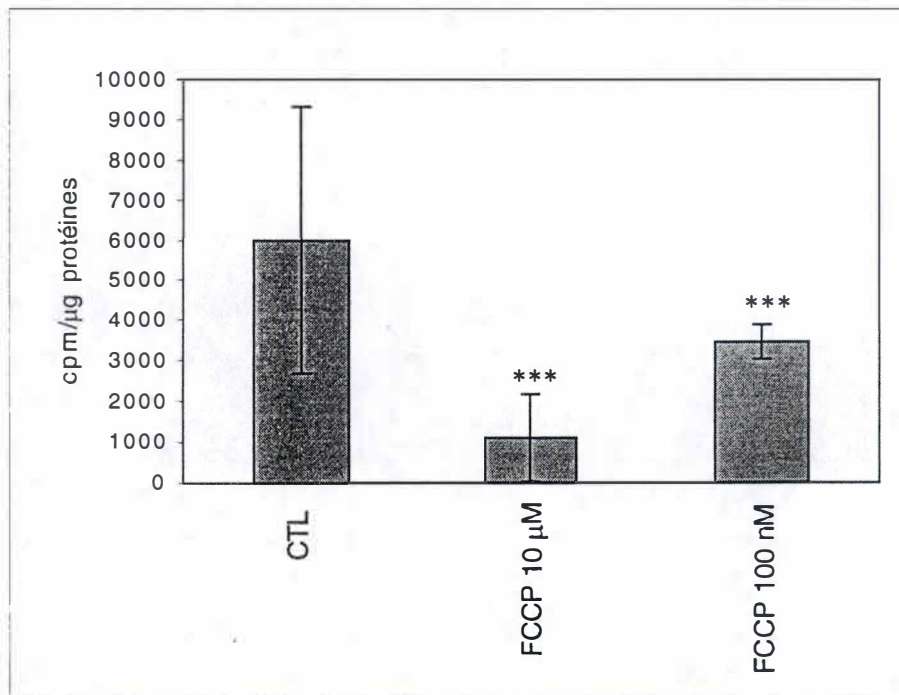


Fig. 3.36 : Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée réalisée sur les cellules HEK 293 incubées en présence de FCCP. Les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 µM et 100 nM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Les résultats, exprimés en coups par minute, sont rapportés à la quantité de protéines (cpm/µg de protéines). Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 4 valeurs (sauf pour FCCP 10 µM: n = 3). Les étoiles (***) représentent une différence significative avec $p < 0,001$.

Ayant montré la croissance ralentie de cellules subissant un stress mitochondrial chronique, nous nous sommes demandé si les inhibiteurs de la phosphorylation oxydative pouvaient également induire cet effet. Nous avons donc incubé des cellules HEK 293 en présence de FCCP (10 μ M, 100 nM et 0,1 nM) ou d'oligomycine (80 nM et 0,8 nM) pendant 6 h dans du DHG sans sérum, puis nous les avons laissées 24 h dans du DHG contenant 10 % de FBS. Ensuite, les cellules sont incubées en présence de 3 H-thymidine durant 4 h avant les rinçages et les dosages. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.35. On voit que le taux d'incorporation de thymidine diminue de manière significative d'environ 30 % après une inhibition au FCCP 10 μ M ($p < 0,01$) et 100 nM ($p < 0,01$), ou à l'oligomycine 80 nM et 0,8 nM ($p < 0,01$). Cette diminution est comparable à celle obtenue sur les L929 stimulées par la forskoline ou incubées en présence de dbAMPc (figure 3.34). D'une expérience à l'autre, nous observons une variabilité assez importante. En effet, en répétant cette expérience en présence de FCCP 10 μ M et 100 nM, nous avons obtenu des effets plus marqués (figure 3.36), soit une diminution de l'incorporation de thymidine de 80 % ($p < 0,001$) et de 60 % ($p < 0,001$) pour le FCCP 10 μ M et 100 nM respectivement.

Une expérience, réalisée cette fois sur les L929, nous a permis de confirmer les effets marqués des inhibiteurs de l'activité mitochondriale sur l'incorporation de thymidine (voir figure 3.37). En effet, le FCCP 10 μ M et l'oligomycine 8 μ M réduisent cette incorporation de 80 % ($p < 0,001$), tandis qu'une diminution de 60 % est obtenue suite à un traitement par l'antimycine A 1 μ M ($p < 0,001$). La forskoline a pour sa part un effet semblable à celui obtenu précédemment sur le même type cellulaire (figure 3.34), soit une baisse de l'incorporation de thymidine d'environ 25 %.

Nous avons enfin recherché le rôle de la phosphorylation de CREB dans la diminution de l'incorporation de la thymidine tritiée, et donc le ralentissement de la synthèse d'ADN. Dans cette expérience, réalisée sur les HEK 293, l'incubation en présence de FCCP 10 μ M est précédée de la transfection des cellules par un plasmide contrôle (pGL2) ou par un plasmide codant pour un dominant négatif de CREB (CREB-M1 ou K-CREB). Les résultats sont présentés à la figure 3.38. On constate que, par rapport au contrôle non transfecté, l'incubation de FCCP 10 μ M conduit à une baisse de 50 % de l'incorporation de la thymidine ($p < 0,001$). Les trois tests suivants sont transfectés par un plasmide contrôle (pGL2) ou surexpriment des dominants négatifs de CREB (CREB-M1 ou K-CREB). La transfection avec le plasmide contrôle pGL2 n'a pas d'effet sur l'incorporation de thymidine, pas plus que la transfection des dominants négatifs seuls. Les trois dernières conditions représentent des cellules transfectées avec le pGL2 ou un plasmide codant pour l'un des dominants négatifs, et incubées en présence de FCCP 10 μ M. L'effet du FCCP est toujours observé sur les cellules transfectées par le pGL2, alors que la surexpression d'un dominant négatif de CREB inhibe la diminution d'incorporation de la thymidine induite par le FCCP. Ces résultats suggèrent que CREB phosphorylé intervient dans ce phénomène de ralentissement de la phase S en réponse à une inhibition des phosphorylations oxydatives.

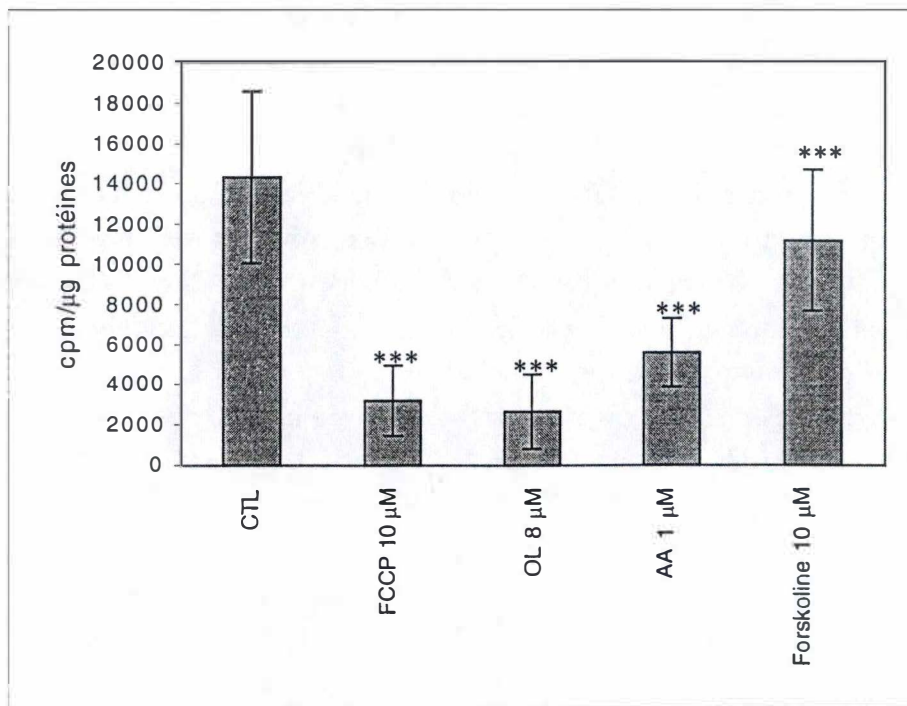


Fig. 3.37 : Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée réalisée sur les cellules L929 incubées avec les inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μM, d'oligomycine 8 μM, d'antimycine A 1 μM et de forskoline 10 μM, puis laissées 24 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS. Les résultats, exprimés en coups par minute, sont rapportés à la quantité de protéines (cpm/μg de protéines). Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 4 valeurs. Les étoiles (***) représentent une différence significative avec $p < 0,001$.

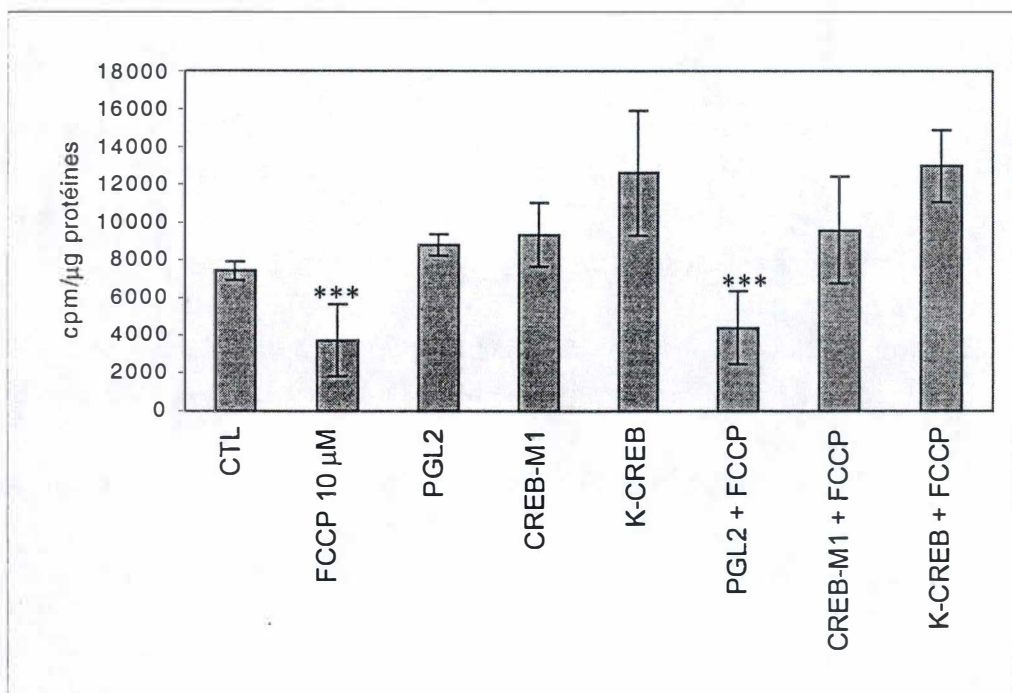


Fig. 3.38 : Effet des dominants négatifs de CREB sur la diminution d'incorporation de thymidine tritiée induite par le FCCP. Les cellules HEK 293 éventuellement transfectées avec un plasmide codant pour un dominant négatif de CREB, sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence de FCCP 10 μM, puis laissées 20 h dans du milieu DHG contenant 10 % de FBS avant l'incubation avec la thymidine tritiée (4 h). Les résultats sont exprimés en cpm/μg de protéines ; ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs.

3.6.2 Discussion

Nous avons mis en évidence dans une expérience préliminaire que les L929 Rho^o (caractérisées par une déplétion chronique en ADNmt et donc une continuelle altération fonctionnelle mitochondriale), dans lesquelles CREB est constitutivement phosphorylé, ont une croissance plus lente que les cellules parentales (L929 Rho⁺). Nous avons alors testé l'effet d'une inhibition *transitoire* des phosphorylations oxydatives sur la prolifération cellulaire, et il s'est avéré que ce modèle d'inhibition induit également un ralentissement de la synthèse d'ADN.

CREB, et plus particulièrement la voie de la PKA activée par l'AMPc conduisant à sa phosphorylation, a été associé à de nombreuses reprises comme un régulateur du cycle cellulaire (Della Fazia et al., 1997). Cependant, ces effets se manifestent soit par une induction de la prolifération (Suzuki et al., 1999) soit par une inhibition du cycle cellulaire (Seternes et al., 1999) (Houglum et al., 1997), en fonction du type cellulaire.

En effet, Johnson *et al.* (Johnson et al., 2000) montrent que CREB induit la prolifération d'oligodendrocytes suite à la surexpression de neurotrophine-3 alors que la réponse aux oestrogènes des tissus cibles serait médiée par la formation d'un hétérodimère ATF-2/c-Jun également capable de reconnaître le site CRE dans le promoteur de la cycline D1 (Sabbah et al., 1999). La présence de sites CRE dans les promoteurs des cyclines D1 et A est avancé par certains auteurs pour expliquer l'effet prolifératif des facteurs de la famille CREB comme pour le facteur ATF-2 dans les chondrocytes (Beier et al., 1999). Par contre, *in vivo*, la réponse de lymphocytes B de souris transgéniques pour un dominant négatif de CREB (CREB-M1) répondent par une hyperprolifération à des stimulations par le LPS et le PMA, ce qui suggère que CREB a un rôle négatif sur la phase G1/S (Newman, 1998)

Bien que peu d'éléments soient présents dans la littérature pour tenter d'expliquer l'action de CREB sur le cycle cellulaire, ses effets pourraient être médiés par l'interaction avec la CBP (CREB-binding protein) qui apparaît, en plus de sa fonction de pontage avec la machinerie cellulaire de transcription, jouer un rôle d'intégrateur en aval de différentes voies de signalisation (Kamei et al., 1996) (Snowden and Perkins, 1998). L'interaction physique et la séquestration de ce facteur par CREB phosphorylé entraînerait, par compétition, une diminution de son abondance pour l'interaction avec d'autres facteurs de transcription dont l'action est positive sur le cycle cellulaire comme les facteurs de la famille E2F régulant l'expression de nombreuses cyclines en phase G1/S (Fry et al., 1999) (Morris et al., 2000), les oncoprotéines c-myc (Lee et al., 1995) et c-Jun (Kamei et al., 1996) ou encore la transcription de RARs (*retinoic acid receptors*), connus pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire. Le RAR- β possède en effet plusieurs sites CRE dans son promoteur (Krutz et al., 1992).

4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De nombreuses pathologies sont associées à un dysfonctionnement mitochondrial chronique, hérité ou acquis, caractérisé par un déficit dans la production d'ATP par le métabolisme oxydatif.

Ce type de dysfonctionnement peut trouver son origine dans des situations tout à fait différentes. Ainsi, une mutation (ou une délétion) au niveau du génome mitochondrial peut engendrer ce déficit énergétique, comme c'est le cas dans de nombreuses maladies dégénératives (LHON, MERRF, CPEO...). En effet, si une mutation survient dans un gène mitochondrial codant pour une sous-unité d'un complexe respiratoire, elle empêche l'assemblage fonctionnel de celui-ci. De même, une mutation dans un gène codant pour un des 22 ARNt engendre des erreurs de traduction.

Par ailleurs, une mutation (ou une délétion) dans un gène nucléaire, dont le produit est impliqué directement ou non dans les phosphorylations oxydatives ou la biogenèse mitochondriale, peut également entraîner une déficience mitochondriale. Celle-ci peut résulter du manque d'une sous-unité respiratoire d'origine nucléaire, du déficit en une protéine importante pour l'expression et la réplication de l'ADNmt, ou encore d'un mécanisme plus subtil.

Enfin, Le dysfonctionnement mitochondrial peut aussi être la conséquence d'un mécanisme entièrement différent, comme par exemple une intoxication par une molécule exogène. Ainsi le MPTP, une fois métabolisé dans les neurones dopaminergiques, entre dans les mitochondries. Dans la matrice, il inactive alors le complexe I [Ramsay, 1986 #118] et inhibe la réplication de l'ADNmt (Miyako et al., 1999), entraînant le parkinsonisme.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition de ces pathologies sont complexes et peu connues dans la plupart des cas. En outre, le déficit énergétique chronique observé dans ces maladies comporte un autre aspect peu étudié à ce jour, à savoir la manière dont la cellule *répond* à ce dysfonctionnement, quels gènes elle induit et par l'intermédiaire de quels facteurs. En effet, l'expression sélective de certains gènes dans ces conditions implique qu'un messager, libéré par la mitochondrie, régule certaines voies de transduction cytoplasmiques qui aboutissent à l'activation de facteurs de transcription dans le noyau.

L'état actuel des connaissances dans ce domaine est limité : les seuls messagers supposés jouer un rôle dans la communication entre une mitochondrie non fonctionnelle et le reste de la cellule sont d'une part le calcium, par exemple dans le cas de myocytes déplétés

pour l'ADNmt (Rho^o) (Biswas et al., 1999) et d'autre part les ROS, probablement impliqués dans la signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription, comme cela a été décrit dans des neurones dopaminergiques de patients atteints de la maladie de Parkinson (France-Lanord et al., 1997).

Le but de notre travail était d'étudier la réponse cellulaire suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives, comme c'est le cas dans les maladies mitochondriales. L'étude de cette réponse peut s'orienter vers la recherche de facteurs de transcription impliqués et des mécanismes moléculaires de leur activation, ou sur l'étude de l'expression différentielle de certains gènes ; nous avons choisi la première approche.

Les cellules Rho^o constituent un modèle de choix pour étudier les effets d'un stress énergétique chronique. En effet, les cellules Rho^o sont caractérisées par une absence d'ADNmt, dont la réplication a été inhibée par un traitement chronique au bromure d'éthidium. Ces cellules se trouvent donc dans un état de stress énergétique continu, reposent sur un métabolisme principalement glycolytique et sont idéales pour étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans ce type de stress.

Le point de départ de ce travail est une étude réalisée sur ces cellules L929 Rho^o, dans lesquelles nous avons montré une activation constitutive du facteur CREB. Ce travail préliminaire suggérait déjà que CREB joue un rôle dans la réponse des L929 à une inhibition soutenue des phosphorylations oxydatives. Nous nous sommes alors demandé si l'activation de ce facteur pouvait également être induite après un stress énergétique aigu, réalisé sur des cellules (HEK 293 et L929) pourvues d'un métabolisme oxydatif normal.

Ces stress aigus ont été imposés aux cellules, en utilisant un inhibiteur de la respiration (antimycine A), de l'ATP synthase (oligomycine) ou un agent découplant (FCCP), qui concourent tous à diminuer le pool cellulaire d'ATP et à instaurer un régime métabolique ralenti, fortement axé sur la glycolyse. Ces conditions nous ont permis de montrer que CREB est effectivement activé suite à l'inhibition des phosphorylations oxydatives, et ce par différentes techniques de caractérisation. Ainsi, la technique de retard sur gel a permis de montrer qu'une inhibition aiguë des phosphorylations oxydatives entraîne une augmentation de la liaison de CREB à sa séquence consensus (*cAMP-response element*), et des expériences de transfection ont en plus montré qu'il est transcriptionnellement actif.

Suite à ces résultats s'ouvrent deux voies de recherche : on peut d'une part étudier la cascade de signalisation en amont de CREB, et d'autre part rechercher quels sont les gènes dont l'expression, sous le contrôle de ce facteur, est induite. Nous avons privilégié l'étude des voies de transduction qui mènent à CREB, de manière à identifier celle qui est responsable de sa phosphorylation dans le cas particulier d'une inhibition de l'activité mitochondriale.

Rappelons qu'en fait, CREB se situe en aval de plusieurs cascades de signalisation, activables par différents stimuli, et que ces voies exercent une régulation réciproque entre elles (voies de la PKA, des CaMK, des MAPK...).

Nos résultats indiquent clairement que la voie impliquée dans l'activation de CREB suite à une inhibition aiguë du métabolisme oxydatif est celle de la CaMKIV (voir figure 4.1). En effet, des expériences de transfection avec un plasmide codant pour un dominant négatif de la CaMKIV et des tests réalisés en présence de BAPTA ont montré que la transcription d'un gène sous le contrôle de CREB dans ces conditions dépend de la présence de calcium et de CaMKIV. Ceci est corroboré par des mesures de calcium qui ont montré qu'un inhibiteur de l'activité mitochondriale provoque une élévation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} dans un délai de quelques minutes, et que celle-ci est maintenue pendant 6 h au moins.

Par ailleurs, cette augmentation de la $[Ca^{2+}]$ est couplée à une diminution de la $[Ca^{2+}]$ dans la mitochondrie, ce qui suggère directement que la mitochondrie participe activement à l'activation de CREB en régulant les taux calciques cytoplasmiques. Ceci pourrait résulter partiellement d'un contrôle de la mitochondrie sur les flux de calcium à travers sa membrane interne, par exemple un blocage du système d'import ou une activation des systèmes d'export. Le dysfonctionnement mitochondrial aigu entraîne donc une réponse cellulaire, probablement enclenchée par la mitochondrie elle-même grâce à une régulation des taux calciques dans la cellule. Les voies dépendantes du Ca^{2+} sont donc activées dans ces conditions, et celle de la CaMKIV, en particulier, aboutit à la phosphorylation de CREB et à l'expression de certains gènes.

Nous n'avons pas cherché quels sont les gènes dont l'expression est induite dans ces conditions, mais la littérature fournit des informations intéressantes à ce sujet. Ainsi, différentes équipes ont montré la présence de CRE dans les promoteurs de gènes codant pour des protéines à destination mitochondriale, comme la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA (HMG CoA) synthase (Eggers et al., 2000), la 5-aminolévulinate synthase (Varone et al., 1999) et la carnitine palmitoyltransférase (Brady et al., 1992). Ceci signifie donc que la mitochondrie, suite à son dysfonctionnement, stimulerait par l'intermédiaire du calcium la transcription de gènes codant pour des protéines mitochondriales dépendante de CREB. Ce mécanisme complexe peut être vu comme une *adaptation* de la cellule au stress énergétique mitochondrial, et ce à l'instigation de la mitochondrie elle-même. Cette communication entre cet organe et le noyau circule donc dans les deux sens, et entre pleinement dans le contexte de la *communication rétrograde*.

Enfin, nous nous sommes penchés sur un aspect particulier de cette réponse cellulaire *via* le facteur CREB. En effet, l'activation de ce facteur de transcription résulte sans doute en une multitude de conséquences au niveau cellulaire, de manière à adapter le métabolisme aux conditions. Ayant recoupé nos résultats avec ceux de Houghlum *et al.* (Houghlum et al., 1997) qui ont montré dans des hépatocytes que la phosphorylation de CREB est responsable d'un

CREB : un facteur de transcription impliqué dans la communication rétrograde ?

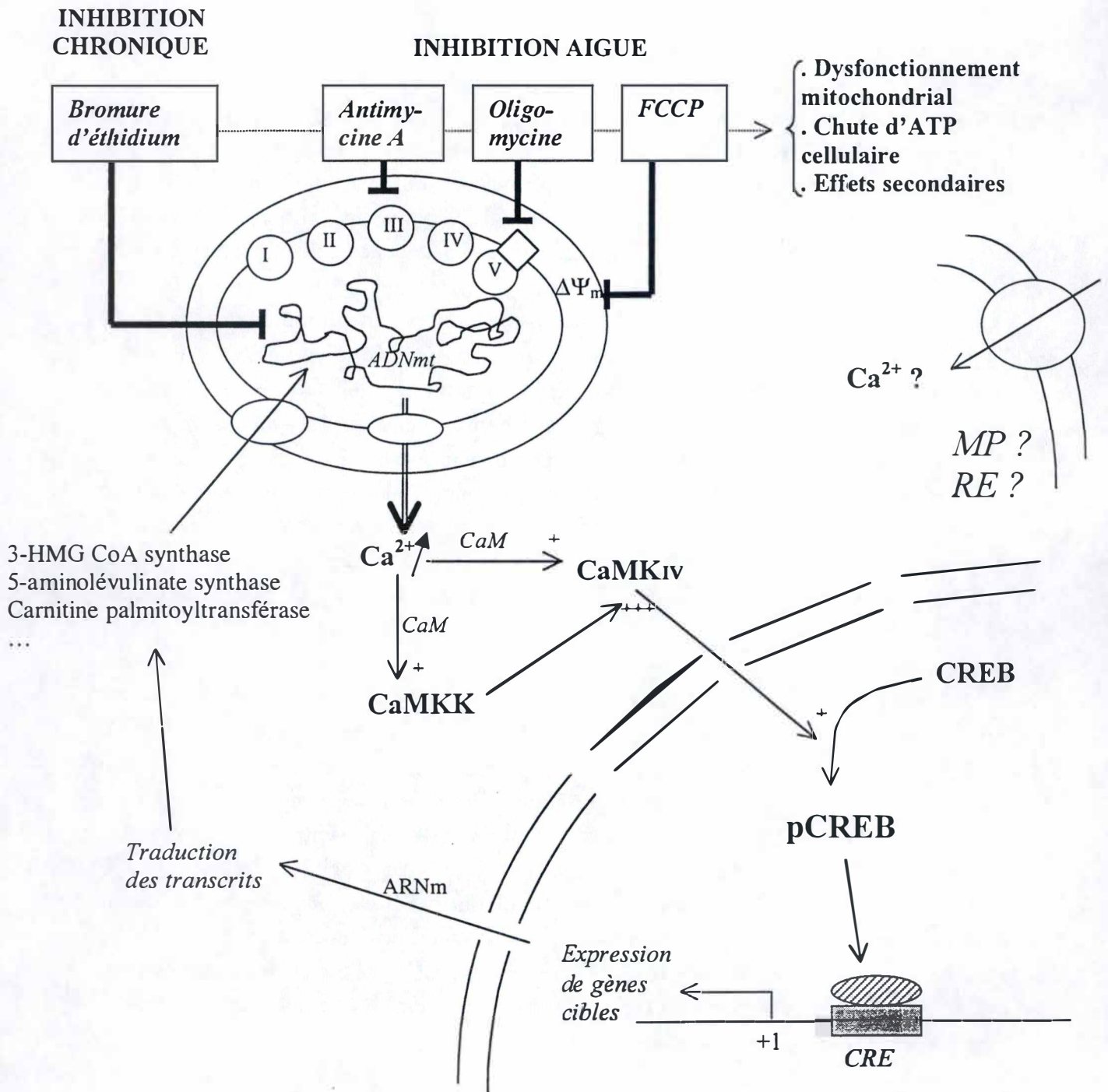


Fig. 4.1 : Schéma présentant la voie conduisant à l'activation du facteur CREB induite par une inhibition chronique ou aiguë de l'activité mitochondriale.

ralentissement de la prolifération de cellules hépatiques, nous avons testé l'effet d'une inhibition de l'activité mitochondriale (dont nous savons qu'elle active CREB) sur la prolifération dans nos deux modèles cellulaires.

Ces expériences de prolifération, réalisées par une mesure de l'incorporation de la thymidine, ont effectivement montré que CREB joue un rôle dans le ralentissement de la synthèse d'ADN dans des cellules ayant subi une inhibition aiguë des phosphorylations oxydatives.

Nous voyons donc que le facteur CREB pourrait être impliqué dans l'expression de gènes codant pour des protéines (mitochondriales ou non) qui permettent la réponse intégrée d'une cellule à un stress énergétique comparable à celui observé dans les cellules de patients souffrant d'une pathologie mitochondriale. A ce jour, peu de facteurs de transcription intervenant dans ce contexte sont connus : citons la famille des NRFs, impliqués dans l'expression des gènes des phosphorylations oxydatives, et le mtTFA, qui contrôle la transcription et la réplication de l'ADNmt. Ces facteurs de transcription sont induits dans des cellules déplétées pour l'ADNmt (Miranda et al., 1999). La figure 4.1 synthétise la cascade d'activation menant à CREB.

Ce travail ouvre des portes multiples pour la recherche future. Un premier aspect qui mérite d'être approfondi est le contrôle positif que semble exercer la mitochondrie sur la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en période de stress énergétique. Des études portant sur la cinétique et l'utilisation d'inhibiteurs des systèmes d'import et d'export calciques mitochondriaux pourraient permettre d'élucider le mécanisme précis par lequel la mitochondrie peut augmenter la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ suffisamment pour activer la voie de la CaMKIV. D'autres études pourraient être entreprises sur l'expression de gènes dépendante de CREB dans ces conditions de stress énergétique et, enfin, les résultats obtenus pour les tests d'incorporation de thymidine tritiée ouvrent le champ à des études portant sur les mécanismes moléculaires responsables de cette inhibition de la prolifération induite par CREB et le rôle de ce facteur dans le cycle cellulaire.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Allen, R. G., and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28, 463-99.
- Arnould, T., Michiels, C., Alexandre, I., and Remacle, J. (1992). Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells. *J Cell Physiol* 152, 215-21.
- Arnould, T., Renard, P., Parmentier, B., Houbion, A., Raes, M., Remacle, J. (2000). Adaptation to mtDNA depletion triggers the phosphorylation of CREB in L929 (RHO-) treated with ethidium bromide. Abstract de conférence, Signal Transduction Pathways and Regulation of Gene Expression as Therapeutic Targets.
- Ausubel, L. J., Kwan, C. K., Sette, A., Kuchroo, V., and Hafler, D. A. (1996). Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15317-22.
- Barath, Z., and Kuntzel, H. (1972). Induction of mitochondrial RNA polymerase in *Neurospora crassa*. *Nat New Biol* 240, 195-7.
- Bateson, M., Devenish, R. J., Nagley, P., and Prescott, M. (1999). Single copies of subunits d, oligomycin-sensitivity conferring protein, and b are present in the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ATP synthase. *J Biol Chem* 274, 7462-6.
- Beier, F., Lee, R. J., Taylor, A. C., Pestell, R. G., and LuValle, P. (1999). Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1433-8.
- Bevilaqua, L. R., Cammarota, M., Paratcha, G., de Stein, M. L., Izquierdo, I., and Medina, J. H. (1999). Experience-dependent increase in cAMP-responsive element binding protein in synaptic and nonsynaptic mitochondria of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 11, 3753-6.
- Biswas, G., Adebajo, O. A., Freedman, B. D., Anandatheerthavarada, H. K., Vijayarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M., and Avadhani, N. G. (1999). Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter- organelle crosstalk. *Embo J* 18, 522-33.
- Bito, H., Deisseroth, K., and Tsien, R. W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87, 1203-14.
- Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S., and Pon, L. A. (1998). Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J Cell Biol* 141, 1371-81.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brady, P. S., Park, E. A., Liu, J. S., Hanson, R. W., and Brady, L. J. (1992). Isolation and characterization of the promoter for the gene coding for the 68 kDa carnitine palmitoyltransferase from the rat [see comments]. *Biochem J* 286, 779-83.

- Brambilla, L., Cairo, G., Sestili, P., O'Donnel, V., Azzi, A., and Cantoni, O. (1997). Mitochondrial respiratory chain deficiency leads to overexpression of antioxidant enzymes. *FEBS Lett* 418, 247-50.
- Breitbart, H., Rubinstein, S., and Gruberger, M. (1996). Calcium efflux mechanism in sperm mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1312, 79-84.
- Buchet, K., and Godinot, C. (1998). Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem* 273, 22983-9.
- Budinger, G. R., Duranteau, J., Chandel, N. S., and Schumacker, P. T. (1998). Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes. Role of mitochondria as the O₂ sensor. *J Biol Chem* 273, 3320-6.
- Cammarota, M., Paratcha, G., Bevilaqua, L. R., Levi de Stein, M., Lopez, M., Pellegrino de Iraldi, A., Izquierdo, I., and Medina, J. H. (1999). Cyclic AMP-responsive element binding protein in brain mitochondria. *J Neurochem* 72, 2272-7.
- Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56, 395-433.
- Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., and Schumacker, P. T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize HIF-1- α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*.
- Cohen, H. T., Bossone, S. A., Zhu, G., McDonald, G. A., and Sukhatme, V. P. (1997). Sp1 is a critical regulator of the Wilms' tumor-1 gene. *J Biol Chem* 272, 2901-13.
- Crompton, M., and Costi, A. (1990). A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-dependent pore of possible relevance to reperfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J* 266, 33-9.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-41.
- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., and Kroemer, G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 14, 729-39.
- De Cesare, D., Fimia, G. M., and Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 24, 281-5.
- Della Fazia, M. A., Servillo, G., and Sassone-Corsi, P. (1997). Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett* 410, 22-4.
- Diffley, J. F., and Stillman, B. (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMGI in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7864-8.
- Dimroth, P., Kaim, G., and Matthey, U. (2000). Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J Exp Biol* 203 Pt 1, 51-9.

- Dispersyn, G., Nuydens, R., Connors, R., Borgers, M., and Geerts, H. (1999). Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1428, 357-71.
- Eggers, A., Caudevilla, C., Asins, G., Hegardt, F. G., and Serra, D. (2000). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase promoter contains a CREB binding site that regulates cAMP action in Caco-2 cells. *Biochem J* 345 Pt 2, 201-6.
- Enslin, H., Tokumitsu, H., Stork, P. J., Davis, R. J., and Soderling, T. R. (1996). Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10803-8.
- Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V., and Attardi, G. (1997). The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *Embo J* 16, 1066-79.
- Fiek, C., Benz, R., Roos, N., and Brdiczka, D. (1982). Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 688, 429-40.
- France-Lanord, V., Brugg, B., Michel, P. P., Agid, Y., and Ruberg, M. (1997). Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem* 69, 1612-21.
- Fry, C. J., Pearson, A., Malinowski, E., Bartley, S. M., Greenblatt, J., and Farnham, P. J. (1999). Activation of the murine dihydrofolate reductase promoter by E2F1. A requirement for CBP recruitment. *J Biol Chem* 274, 15883-91.
- Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Kaplowitz, N., and Fernandez-Checa, J. C. (1995). Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 48, 825-34.
- Gerbitz, K. D., Gempel, K., and Brdiczka, D. (1996). Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 45, 113-26.
- Giraud, S., Bonod-Bidaud, C., Wesolowski-Louvel, M., and Stepien, G. (1998). Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J Mol Biol* 281, 409-18.
- Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-81.
- Gray, M. W., Lang, B. F., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T. G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y., and Burger, G. (1998). Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res* 26, 865-78.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-50.

- Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258, C755-86.
- Han, J., Cheng, F. C., Yang, Z., and Dryhurst, G. (1999). Inhibitors of mitochondrial respiration, iron (II), and hydroxyl radical evoke release and extracellular hydrolysis of glutathione in rat striatum and substantia nigra: potential implications to Parkinson's disease. *J Neurochem* 73, 1683-95.
- Hayakawa, T., Noda, M., Yasuda, K., Yorifuji, H., Taniguchi, S., Miwa, I., Sakura, H., Terauchi, Y., Hayashi, J., Sharp, G. W., Kanazawa, Y., Akanuma, Y., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1998). Ethidium bromide-induced inhibition of mitochondrial gene transcription suppresses glucose-stimulated insulin release in the mouse pancreatic beta-cell line betaHC9. *J Biol Chem* 273, 20300-7.
- Heddi, A., Lestienne, P., Wallace, D. C., and Stepien, G. (1993). Mitochondrial DNA expression in mitochondrial myopathies and coordinated expression of nuclear genes involved in ATP production. *J Biol Chem* 268, 12156-63.
- Holt, I. J., Harding, A. E., and Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717-9.
- Houglum, K., Lee, K. S., and Chojkier, M. (1997). Proliferation of hepatic stellate cells is inhibited by phosphorylation of CREB on serine 133. *J Clin Invest* 99, 1322-8.
- Hoyt, K. R., and Reynolds, I. J. (1998). Alkalinization prolongs recovery from glutamate-induced increases in intracellular Ca²⁺ concentration by enhancing Ca²⁺ efflux through the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cultured rat forebrain neurons. *J Neurochem* 71, 1051-8.
- Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., and Butow, R. A. (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol* 17, 1110-7.
- Johnson, J. R., Chu, A. K., and Sato-Bigbee, C. (2000). Possible role of CREB in the stimulation of oligodendrocyte precursor cell proliferation by neurotrophin-3. *J Neurochem* 74, 1409-17.
- Jun, A. S., Brown, M. D., and Wallace, D. C. (1994). A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6206-10.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-14.
- Koehler, C. M., Merchant, S., and Schatz, G. (1999). How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* 24, 428-32.
- Koh, W. S., Jeon, Y. J., Herring, A. C., and Kaminski, N. E. (1997). Transient CRE- and kappa B site-binding is cross-regulated by cAMP- dependent protein kinase and a protein phosphatase in mouse splenocytes. *Life Sci* 60, 425-32.
- Kohler, C., Gahm, A., Noma, T., Nakazawa, A., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (1999). Release of adenylate kinase 2 from the mitochondrial intermembrane space during apoptosis. *FEBS Lett* 447, 10-2.

- Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-9.
- Kruyt, F. A., Folkers, G., van den Brink, C. E., and van der Saag, P. T. (1992). A cyclic AMP response element is involved in retinoic acid-dependent RAR beta 2 promoter activation. *Nucleic Acids Res* 20, 6393-9.
- Lee, K. S., Buck, M., Houglum, K., and Chojkier, M. (1995). Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 96, 2461-8.
- Li, K., Neuffer, P. D., and Williams, R. S. (1995). Nuclear responses to depletion of mitochondrial DNA in human cells. *Am J Physiol* 269, C1265-70.
- Li, R., Hodny, Z., Luciakova, K., Barath, P., and Nelson, B. D. (1996). Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) gene. *J Biol Chem* 271, 18925-30.
- Li, R., Hodny, Z., Zaid, A., Barath, P., and Nelson, B. D. (1999). AP-2 enhances Sp1-dependent activation of the growth-regulated human ATP/ADP translocator. *J Biochem (Tokyo)* 126, 130-6.
- Liao, X., and Butow, R. A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72, 61-71.
- Linden, M., Gellerfors, P., and Nelson, B. D. (1982). Pore protein and the hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical. *FEBS Lett* 141, 189-92.
- Liu, V. W., Zhang, C., and Nagley, P. (1998). Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res* 26, 1268-75.
- Martinus, R. D., Garth, G. P., Webster, T. L., Cartwright, P., Naylor, D. J., Hoj, P. B., and Hoogenraad, N. J. (1996). Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur J Biochem* 240, 98-103.
- Miller, S. W., Trimmer, P. A., Parker, W. D., Jr., and Davis, R. E. (1996). Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties. *J Neurochem* 67, 1897-907.
- Miranda, S., Foncea, R., Guerrero, J., and Leighton, F. (1999). Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 44-9.
- Miyako, K., Irie, T., Muta, T., Umeda, S., Kai, Y., Fujiwara, T., Takeshige, K., and Kang, D. (1999). 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) selectively inhibits the replication of mitochondrial DNA. *Eur J Biochem* 259, 412-8.
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J., and Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion [see comments]. *Nat Cell Biol* 2, 57-61.
- Morris, L., Allen, K. E., and La Thangue, N. B. (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol* 2, 232-9.

- Nass, M. M. (1972). Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis *in vivo* in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 72, 211-22.
- Newman, J. (1999). The role of CREB in B Cells *in vivo*. Abstract de conférence, Midwinter Conference of Immunologists.
- Novotny, E. J., Jr., Singh, G., Wallace, D. C., Dorfman, L. J., Louis, A., Sogg, R. L., and Steinman, L. (1986). Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease. *Neurology* 36, 1053-60.
- Packer, C. S. (1994). Changes in arterial smooth muscle contractility, contractile proteins, and arterial wall structure in spontaneous hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 207, 148-74.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., and Ruggiero, F. M. (2000). The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* 466, 323-6.
- Parisi, M. A., and Clayton, D. A. (1991). Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252, 965-9.
- Pei, L., Dodson, R., Schoderbek, W. E., Maurer, R. A., and Mayo, K. E. (1991). Regulation of the alpha inhibin gene by cyclic adenosine 3',5'- monophosphate after transfection into rat granulosa cells. *Mol Endocrinol* 5, 521-34.
- Pitkanen, S., and Robinson, B. H. (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 98, 345-51.
- Reichman, N., Porteous, C. M., and Murphy, M. P. (1994). Cyclosporin A blocks 6-hydroxydopamine-induced efflux of Ca²⁺ from mitochondria without inactivating the mitochondrial inner-membrane pore. *Biochem J* 297, 151-5.
- Rial, E., Gonzalez-Barroso, M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jimenez-Jimenez, J., Ricquier, D., Gubern, M., and Bouillaud, F. (1999). Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Embo J* 18, 5827-33.
- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17, 215-7.
- Rutter, G. A., and Rizzuto, R. (2000). Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection [In Process Citation]. *Trends Biochem Sci* 25, 215-21.
- Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., and Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11217-22.
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D. P., and Orrenius, S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* 18, 2040-8.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283, 1488-93.

- Seternes, O. M., Sorensen, R., Johansen, B., and Moens, U. (1999). Activation of protein kinase A by dibutyryl cAMP treatment of NIH 3T3 cells inhibits proliferation but fails to induce Ser-133 phosphorylation and transcriptional activation of CREB. *Cell Signal* 11, 211-9.
- Shinohara, Y., Bandou, S., Kora, S., Kitamura, S., Inazumi, S., and Terada, H. (1998). Cationic uncouplers of oxidative phosphorylation are inducers of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 428, 89-92.
- Shoffner, J. M., Brown, M. D., Stugard, C., Jun, A. S., Pollock, S., Haas, R. H., Kaufman, A., Koontz, D., Kim, Y., Graham, J. R., and et al. (1995). Leber's hereditary optic neuropathy plus dystonia is caused by a mitochondrial DNA point mutation. *Ann Neurol* 38, 163-9.
- Snowden, A. W., and Perkins, N. D. (1998). Cell cycle regulation of the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *Biochem Pharmacol* 55, 1947-54.
- Suzuki, H., Kumagai, T., Goto, A., and Sugiura, T. (1998). Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 542-5.
- Suzuki, S., Yamamoto, I., and Arita, J. (1999). Mitogen-activated protein kinase-dependent stimulation of proliferation of rat lactotrophs in culture by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* 140, 2850-8.
- Tang, W. J., and Hurley, J. H. (1998). Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol Pharmacol* 54, 231-40.
- Teruel, M. N., Chen, W., Persechini, A., and Meyer, T. (2000). Differential codes for free Ca(2+)-calmodulin signals in nucleus and cytosol. *Curr Biol* 10, 86-94.
- Vander Heiden, M. G., and Thompson, C. B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1, E209-E216.
- Varone, C. L., Giono, L. E., Ochoa, A., Zakin, M. M., and Canepa, E. T. (1999). Transcriptional regulation of 5-aminolevulinic acid synthase by phenobarbital and cAMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys* 372, 261-70.
- Venugopal, R., and Jaiswal, A. K. (1998). Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145-56.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-8.
- Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J. d., and Nikoskelainen, E. K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427-30.
- Wayman, G. A., Wei, J., Wong, S., and Storm, D. R. (1996). Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Mol Cell Biol* 16, 6075-82.
- Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A., Roeser, N. F., and Nissim, I. (2000). Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2826-31.

Westphal, R. S., Anderson, K. A., Means, A. R., and Wadzinski, B. E. (1998). A signaling complex of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A [see comments]. *Science* 280, 1258-61.

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., and Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-24.

Yaffe, M. P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283, 1493-7.

Yano, S., Tokumitsu, H., and Soderling, T. R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396, 584-7.

Yokozaki, H., Tortora, G., Pepe, S., Maronde, E., Genieser, H. G., Jastorff, B., and Cho-Chung, Y. S. (1992). Unhydrolyzable analogues of adenosine 3':5'-monophosphate demonstrating growth inhibition and differentiation in human cancer cells. *Cancer Res* 52, 2504-8.

Zaid, A., Li, R., Luciakova, K., Barath, P., Nery, S., and Nelson, B. D. (1999). On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr* 31, 129-35.