

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche de margueurs moléculaires et de voies de signalisation conduisant à la biogenèse mitochondriale dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial

Lambert, Sylviane

Award date: 2004

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

Recherche de marqueurs moléculaires et de voies de signalisation conduisant à la biogenèse mitochondriale dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial

> Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en Sciences biologiques Sylviane LAMBERT Juin 2004

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

Recherche de marqueurs moléculaires et de voies de signalisation conduisant à la biogenèse mitochondriale dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial

LAMBERT Sylviane

Résumé

Les cellules déplétées en ADN mitochondrial (ADNmt) ou cellules rho0 sont utilisées comme modèle d'étude du dysfonctionnement mitochondrial. Dans ces cellules, la structure mitochondriale et un certain potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta \psi m$) sont toujours observés. Ces caractéristiques surprenantes suggèrent que la mitobiogenèse est toujours active dans ces cellules. Cependant, les mécanismes de la biogenèse de la mitochondrie sont encore mal compris et ce, même dans les cellules eucaryotes de mammifères dont les mitochondries sont couplées et fonctionnelles. La mitochondrie non fonctionnelle pourrait donc renseigner le noyau sur son état d'activité à travers l'activation de facteurs de transcription capables de modifier l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

Dans un premier temps, nous avons abordé l'étude, dans des cellules déplétées en ADNmt, de deux grandes voies connues pour induire la mitobiogenèse dans les cellules musculaires : les voies de l'oxyde nitrique (NO) et de la calcium-CaMKIV-CREB. Nous avons montré que NRF-1 et PGC-1 α , respectivement un facteur de transcription et un co-activateur impliqués dans la mitobiogenèse sont moins abondants et/ou moins actifs dans les cellules déplétées en ADNmt. Par contre les facteurs HNF-1 α et HNF-4 α semblent plus actifs dans ces cellules. Parmi les kinases régulatrices de NRF-1 et HNF-4 α comme l'AMPK et la CKII, seule l'AMPK est activée dans les cellules déficientes pour l'activité mitochondriale. Nous montrons également que la production de NO semble moins importante dans les cellules déplétées en ADNmt.

Dans un deuxième temps, nous avons visualisé l'importation de protéines mitochondriales matricielles dans des cellules déplétées en ADNmt. Ce test, basé sur la surexpression dans les cellules de la HA-apoaequorine et adressée à la mitochondrie, montre et confirme que l'importation de protéines matricielles est plus faible dans les mitochondries de cellules L929 rho. Nous avons également tenté de mettre en évidence l'importance de la voie calcium-CaMKIV-CREB dans la mitobiogenèse en mesurant l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules par un marquage au NAO. Si la surexpression de dominants négatifs de CREB (M1-CREB et K-CREB) est sans effet, le BAPTA-AM, un chélateur du calcium intracellulaire, semble effectivement capable, après 3 jours d'incubation, de diminuer le signal de fluorescence NAO et donc probablement la population mitochondriale dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial.

Nous avons donc contribué à mieux comprendre certains mécanismes impliqués dans la mitobiogenèse de cellules dépourvues d'ADN mitochondrial et de phosphorylation oxydative.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques Juin 2004 **Promoteur :** T. Arnould Le mémoire est l'aboutissement de quatre années d'étude, il finalise un long apprentissage et en débute un autre. C'est également un parcours peuplé de personnages, souvent essentiels :

Mercí au Professeur Remacle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ;

Merci à Thierry Arnould pour m'avoir accepté au sein de l'équipe ainsi que pour ses corrections minutieuses en essayant de m'apprendre deux choses indispensables : la structure et la synthèse. Merci également pour la profusion de documentation mise à ma disposition ;

Merci à Ludo pour m'avoir appris à me débrouiller dans un labo (m'apprendre à repiquer les cellules ne fut pas une mince affaire...), merci également pour son aide lors de la rédaction ;

Mercí également à toutes mes petites compagnes d'équipée, pour leur appui moral, leur aide et pour tous les bons moments passés en leur compagnie. Ce fut dur, mais on s'en est quand même sorties.

Mercí donc (par ordre alphabétíque, ça ne fera pas de jaloux) à Audrey, Aurélia, Aurore, Conny, Hélène, Níhale, Sophie,... et certainement beaucoup d'autres tout au long de ces quatre ans.

En arrivant à Namur, jamais je ne me serais doutée arriver au bout d'une pareille aventure...Beaucoup d'autres non plus d'ailleurs...

Le soutien continuel et sans faille permet souvent l'impossible. Merci donc Papa et Maman pour m'avoir supportée et soutenue dans tous les moments de doute, de stress...et surtout, merci pour avoir cru en moi et en l'impossible. (Merci également pour avoir relu patiemment, et parfois sans trop comprendre, mon mémoire...mon orthographe a toujours été laborieuse concernant les accords)

Cecí n'est pas un roman, mais c'est tout de même un chapitre de mon aventure...

Bonne lecture et mercí.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Antimycine A
ACC	Acetyl-Coenzyme A Carboxylase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine Diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside
AID	Auto-Inhibiting Domain
AIF	Apoptosis Initiating Factor
δALAS	δ Amino Levulinate Synthase
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
AMPKK	AMP-activated Protein Kinase Kinase
ANT	Adénine Nucléotide Translocase
ARN r	Acide RiboNucléique ribosomal
ARN t	Acide RiboNucléique de transfert
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATF	Activated-Transcription Factor
ATP	Adénosine Triphosphate
BAPTA-AM	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N'N'-tetraacetic acid
BER	Base excision repair
BSA	Bovine Serum Albumine
С	Cytosine
CaM	Calmodulin
CaMK	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase
CaMKK	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase
CaMKP	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase Phosphatase
CBD	Calmodulin Binding Domain
CBP	CREB Binding Protein
CK II	Casein Kinase II
cpm	coups par minute
CMV	CytoMégaloVirus
CoA	Coenzyme A
COX	Cytochrome Oxydase
CPT	Carnitine Palmitoyl Transférase
CRE	cAMP-Responsive Element
CREB	cAMP-Responsive Element-Binding protein
CREM	cAMP-Responsive Element Modulator
DBD	DNA Binding Domain
DHG	Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DO	Densité Optique

DR	Direct Repeat
Drp	Dynamin-related protein
D-loop	Displacement loop
Δψm	Potentiel de membrane mitochondriale
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetra Acetic acid
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMSA	Electrophoresis Mobility Shift Assay
Ets	E26-transformation specific
FADH ₂	Flavine Adenine Dinucleotide réduit
FCCP	Carbonyl Cyanide p-triFluoro-methoxyPhenylhydrazone
Fis1p	Fission 1 protein
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GABP	GA-Binding Protein
GIP	General Insertion Pore
GMP	Guanosine Monophosphate
GR	Glucocorticoïd Receptor
GRU	Glucocorticoïd Response Unit
GTP	Guanosine Triphosphate
H^+	Proton
HA	Hémaglutinine
HAT	Histone Acetyl Transferase
HB	Hypotonic Buffer
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HDAC	Histone Deacetylases
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HRP	Horse Radish Peroxydase
HS	Heavy Strand
HSP	Heavy Strand Promoter
Hsp	Heat shock protein
IF	Immuno-Fluorescence
IP3	Inositol 1,4,5 -triphosphate
JNK	cJun NH ₂ -terminal Kinase
KID	Kinase-Inducing Domain
KIX	KID Interaction domain
LBD	Ligand Binding Domain
LDH	Lactate dehydrogenase
LHON	Leber's Hereditary Optic Neuropathy
LS	Light Strand
LSP	Light Strand Promoter

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase			
Mdv1p	Mitochondrial division 1 protein			
MEF-2C	Myocyte Enhancer Factor-2C			
MERRF	Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers			
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes			
MME	Membrane Mitochondriale Externe			
MMI	Membrane Mitochondriale Interne			
MnSOD	Manganese SuperOxide Dismutase			
mNTH1-EGFP	Endonucléase III-EGFP			
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid			
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young			
MPP	Mitochondrial Processing Peptidase			
MRP	Mitochondrial RNA-Processing			
mtCLIC	mitochondrial Chloride Intracellular Channel			
mTERF	Mitochondrial Transcription Terminal Factor			
mtTFA	Mitochondrial Transcription Factor A			
mtTFB	Mitochondrial Transcription Factor B			
MTP	Mitochondrial Transition Pore			
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit			
NAO	Nonyl Acridine Orange			
NARP	Neuropathy, Ataxia and Retinis Pigmentosa			
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells			
NLS	Nuclear Localisation Sequence			
NO	Nitric Oxide			
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase			
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase			
mtNOS	mitochondrial Nitric Oxide Synthase			
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase			
NRF	Nuclear Respiratory Factor			
ONPG	O-NitroPhenylGalactopyranoside			
PBS	Phosphate Buffer Saline			
PEPCK	PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase			
PFA	Paraformaldéhyde			
PGC-1a	PPAR γ Co-activator α			
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer			
PIC .	Protease Inhibitor Cocktail			
PKA	Protein Kinase A			
PKC	Protein Kinase C			
PNPP	p-Nitrophenyl Phosphate			
PP2C	Protein Phosphatase 2C			
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ			
PRC	PGC-1-related co-activator			
PTP	Permeability Transition Pore			
	2012년 1월 2019년 1월 201 1월 2019년 1월 2			

PVDF	Polyvinylidène fluoride
RE	Réticulum Endoplasmique
RLU	Relative Light Units
ROS	Reactive Oxygen Species
RyR	Ryanodine Receptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
	Second mitochondrial activator of caspases/Direct Inhibitor of
Smac/DIABLO	Apoptosis proteins Binding protein with Low pI
SNAP	S-nitrosoacetyl penicillamine
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
Sp1	Specificity protein 1
SREBP	Steroïd Responsive Element Binding Protein
SVF	Sérum de Veau Foetal
T3	Triiodo-L-thyronine
TBP	TATA Binding Protein
TBS	Tris Buffer Saline
TIM	Translocase Inner Membrane
TMB	TétraMéthylBenzidine
TOM	Translocase Outer Membrane
UCP	UnCoupling Protein
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
YY1	YingYang1

TABLE DES MATIERES

1	Introduction	1
	1.1 La mitochondrie	1
	1.1.1 Origine	1
	1.1.2 Génome mitochondrial	1
	1.1.2.1 Réplication, transcription et traduction	2
	1.1.3 Structure	3
	1.1.3.1 Membrane mitochondriale externe (MME)	3
	1.1.3.2 Espace inter-membranaire	3
	1.1.3.3 Membrane mitochondriale interne (MMI)	3
	1.1.3.4 Matrice	4
	1.1.4 Phénomène de fusion-fission	4
	1.1.5 Fonctions de la mitochondrie	5
	1.1.5.1 Les phosphorylations oxydatives et la production d'ATP	5
	1.1.5.2 Homéostasie calcique	5
	1.2 Dysfonctionnement mitochondrial	5
	1.2 Mutations et pathologies mitochondriales associées	0
	1.2.7 Mutations et pathologies intécnonartales associées	ire
	7	ne
	123 Mutations affectant les APNt	7
	1.2.5 Mutations arectait les ARIV	/
	1.3 Centres depictes en ADMilt	/
	1.5.1 Obtention et calacteristiques	0
	1.4 La mitologenese	ð
	1.4.1 Synthese, transport et assemblage des phospholipides	8
	1.4.2 Regulation de l'expression des genes nucleaires codant des proteines	0
	1.4.2.1 Extense de transmistion et constituent autor	9
	1.4.2.1 Facteurs de transcription et co-activateurs	9
	1.4.2.1.1 Les régulateurs ubiquistes de la transcription	9
	1.4.2.1.1.1 Sp1	9
	1.4.2.1.1.2 YYI	9
	1.4.2.1.2 Les régulateurs spécifiques de la transcription	10
	1.4.2.1.2.1 NRF-1	10
	1.4.2.1.2.2 NRF-2	10
	1.4.2.1.2.3 CREB	10
	1.4.2.1.3 Les récepteurs nucléaires	11
	1.4.2.1.3.1 HNF-4 α	11
	1.4.2.1.3.2 HNF-1 α	12
	1.4.2.1.3.2.1 AMPK	12
	1.4.2.1.3.2.2 CKII	13
	1.4.2.1.4 Le co-activateur PGC-1α	13
	1.4.2.2 Hormones glucocorticoïdes et thyroïdiennes	14
	1.4.3 Importation des protéines mitochondriales	14
	1.4.4 Voie CaMKIV-CREB dans la mitobiogenèse	15
	1.4.5 Rôle du NO dans la mitobiogenèse	16
	1.5 La communication rétrograde initiée par la mitochondrie non fonctionnelle	17
С	ontexte de la recherche et objectifs de ce mémoire	19
2	Matériel et Méthodes	21
	2.1 Culture cellulaire	21
	2.1.1 Sous-cultures.	21
	2.2 Dosage des protéines par la méthode de Bradford	22
	2.3 Western blotting	22
	2.3.1 Principe	22
	2.3.2 Préparation des lysats cellulaires	23

2.3	2.1 Lysats clairs	23
2.3	2.2 Extraits nucléaires	23
2.3	2.3 Immunoprécipitats	23
2.3.3	Préparation des échantillons	23
2.3.4	Migration sur gel	23
2.3.5	Transfert des protéines sur une membrane de PVDF	23
2.3.6	Incubation de la membrane de PVDF avec les anticorps et révélation	24
2.4	ransfection transitoire	24
2.4.1	Plasmides utilisés au cours de ce travail	25
2.4.2	Principe	26
2.4.3	Méthode	26
2.4	3.1 Recherche de l'expression du gène de la luciférase placée sous le contró	òle
d'	n fragment du promoteur de PGC-1α (-170/+68)	26
2.4	3.2 Effet de la surexpression du co-activateur PGC-1α sur l'activité de la	
lue	férase régulée par le promoteur authentique du mtTFA	27
	.4.3.2.1 Lyse des cellules	27
	.4.3.2.2 Dosage de l'activité luciférase	27
	.4.3.2.3 Dosage de l'activité β-galactosidase	27
2.4	3.3 Surexpression et importation mitochondriale des protéines traceurs mN	TH1-
EC	FP et mtHA-Apoaequorine	28
2.4	3.4 Effet de la surexpression des dominants négatifs de CREB sur l'abonda	nce
de	a population mitochondriale	28
2.5	lesure de l'activité de liaison de facteurs de transcription à l'ADN	28
2.5.1	Principe	29
2.5.2	Méthode	29
2.	2.1 Etat de l'activité de liaison des facteurs HNF-1 α et HNF-4 α dans des	
ce	ules 143B rho0	29
2.5	2.2 Etat de l'activité de liaison du facteur de transcription HNF-4 α dans des	5
ce	ules 143B incubées ou non en présence d'inhibiteurs mitochondriaux	29
2.5	2.3 Préparation des extraits nucléaires	29
2.5	2.4 Fixation des trappeurs de HNF-1 α et HNF-4 α dans les puits d'une plaq	ue de
96	puits tapissés de streptavidine	29
2.5	2.5 Liaison des facteurs de transcription HNF-1 α et HNF-4 α	30
2.4	2.6 Incubation en présence des anticorps primaires, secondaires et révélation	on.30
2.6	larquage en immunofluorescence et observations en microscopie confocale	30
2.6.1	Principe	30
2.6.2	Méthode	31
2.0	2.1 Abondance et localisation des proteines HNF-1 α et HNF-4 α	31
2.0	2.2 Abondance et localisation de la proteine AMPK phosphorylée sur la	21
thi	onine $1/2$	
2.0	2.3 Estimation de l'importation de proteines mitochondriales ou non dans d	es
ce	(2.2.1)	
	NTUL ECEP	21
	INTHI-EGFP apres un marquage des cellules avec la sonde Mitol racker Red	
2.4	.0.2.3.2 Localisation des proteines mtHA-Apoaequorine et cytochrome c	
2.0	2.4 Kingages, fixation et permeabilisation	
2.0	2.5 Incudation avec les anticorps primaires et secondaires	
2.0	2.0 Montage des fames	
2.1	Effete des dominants négetife de CDED augle regulation mitechendrich	
2.7.1	Effets du DADTA AM sur le population mitochondriale.	
2.1.2	Méthodo	
2.1.3	INICUIOUC	

	2.8 Immunoprécipitation et dosage de l'activité de l'AMPK et de la CKII	3
	2.8.1 Principe de l'immunoprécipitation et du dosage d'activité kinase in vitro33	3
	2.8.2 Méthode	3
	2.8.2.1 Préparation des lysats cellulaires	3
	2.8.2.2 Immunoprécipitation	1
	2.9 Mesure de l'incorporation de 2-déoxy-(1,2- ³ H) D-glucose tritié	1
	2.9.1 Principe	1
	2.9.2 Méthode	5
	2.9.2.1 Incorporation du 2-déoxy-(1,2- ³ H)-D-glucose	5
	2.10 Mesure de la production d'oxyde nitrique	5
	2.10.1 Principe	5
	2.10.2 Méthode	5
	2.10.2.1 Homogénat et filtrage	5
	2.10.2.2 Dosage des nitrates et des nitrites	5
3	Résultats et discussion	7
	3.1 Recherche du niveau d'expression de PGC-1α dans les cellules L929, L929 rho,	
	143B et 143B rho0	7
	3.2 Recherche de la production d'oxyde nitrique par les cellules L929 et L929 rho ⁻ 39)
	3.3 Recherche de l'abondance et de l'activité de NRF-140)
	3.4 Recherche de l'expression de mtTFA	L
	3.5 Etude de l'état d'activité du facteur de transcription HNF-4 α dans les cellules 143E	3
	et 143B rho0	2
	3.6 Recherche de l'état d'activité de l'AMPK et de la CASEINE KINASE II46	5
	3.7 Etude de l'incorporation de 2-deoxy-(1,2- ³ H) D-glucose tritié	3
	3.8 Visualisation en microscopie confocale de l'importation de protéines adressées à la	
	mitochondrie)
4	Conclusions et perspectives	3
5	Bibliographie)



Figure 1.1 : Schéma reprenant les différentes origines possibles de la mitochondrie. La première hypothèse propose que la symbiose entre l'archébactérie hôte et une protéobactérie forme une cellule eucaryote pourvue d'un noyau (mais pas de mitochondrie) qui acquiert une α -protéobactérie par la suite. La seconde hypothèse mécanistique décrit l'acquisition simultanée du noyau et de la mitochondrie pour former une cellule eucaryote pourvue d'un suite.

1 INTRODUCTION

Depuis son identification et la description de son rôle essentiel dans la production d'ATP dans les cellules pourvues de respiration aérobie, le dysfonctionnement mitochondrial induit par des mutations dans le génome mitochondrial a été associé ou rendu responsable de plusieurs syndromes et pathologies humaines (plus d'une centaine actuellement). De plus, les actions et répercussions du dysfonctionnement mitochondrial dans le vieillissement, la mort cellulaire par apoptose, le développement de carcinomes....ont largement contribués à faire de la mitochondrie un sujet d'étude très important actuellement. Cependant, des aspects fascinants de cet organite comme les mécanismes impliqués dans la biogenèse (ou mitobiogenèse), l'identification des voies de communication moléculaire intracellulaire existant entre la mitochondrie non fonctionnelle et les autres organites dont le noyau de la cellule eucaryote de mammifère, les acteurs assurant la coordination de l'expression des deux génomes et la mécanistique de l'importation de protéines mitochondriales...sont encore peu connus. Au laboratoire, nous nous intéressons aux voies de signalisation et à l'expression de gènes nucléaires modifiées par un dysfonctionnement de l'activité bioénergétique de la mitochondrie observée notamment dans des cellules ne possédant plus d'ADN mitochondrial. Plus précisément, dans ce travail, nous allons tenter de rechercher des voies d'activation et de caractériser l'état d'activité de facteurs de transcription ou de co-activateurs susceptibles de jouer un rôle dans le maintien de la structure mitochondriale toujours observée dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial. Dans cette introduction, nous allons passer en revue quelques aspects de la structure, des fonctions, et des dysfonctionnements de l'activité mitochondriale en nous focalisant sur les aspects de la signalisation moléculaire intracellulaire reliant le dysfonctionnement mitochondrial et la biogenèse de la mitochondrie.

1.1 LA MITOCHONDRIE

1.1.1 ORIGINE

Longtemps controversée, l'origine de la mitochondrie semble bien établie à l'heure actuelle. En effet, il paraît clair pour l'ensemble de la communauté scientifique qu'elle dérive de l'endosymbiose, il y a environ 2 milliards d'années, d'une bactérie de la classe des α -protéobactéries, probablement du genre *Rickettsia*, dans une cellule précurseur (Gray et al., 2001). Un schéma illustrant les origines possibles de la mitochondrie est présenté à la figure 1.1. De cette origine endosymbiotique, la mitochondrie a conservé une double membrane lipidique et un génome (Gray et al., 1999). Après l'endosymbiose initiale, la protomitochondrie a subi une évolution simplificatrice s'accompagnant d'une perte de nombreux gènes et/ou d'un transfert d'un certain nombre de ses gènes dans le génome nucléaire (Berg and Kurland, 2000).

1.1.2 GENOME MITOCHONDRIAL

Même s'il est difficile de dénombrer les mitochondries dans une cellule à un moment donné en raison de leur existence sous forme d'un réseau dynamique résultant de nombreux phénomènes de fusion-fission (développés au point 1.1.4), on considère que presque toutes les cellules humaines renferment plusieurs centaines ou milliers de mitochondries, à l'intérieur desquelles coexistent entre 2 et 10 copies d'ADN mitochondrial circulaire (ADNmt). L'ADNmt humain, considéré comme modèle des ADNmt de mammifères et le plus étudié, est composé de 16569 paires de bases et contient 37 gènes. Parmi ceux-ci, 13 codent des peptides impliqués dans les phosphorylations oxydatives, 2 gènes codent des ARN ribosomiaux (ARNr 12S et 16S) et 22 gènes génèrent les ARN de transfert (ARNt) nécessaires à l'expression des

Protein encoded	Designation for animal mtDNA	Synonym
Cytochrome oxidase subunit I, II, III	COI, COII, COIII	cox1, cox2, cox3
Cytochromeb apoenzyme	Cytb	cob
NADH dehydrogenase subunits 1-6, 4L	ND1-6, 4L	nad1-6, 4L
ATP synthase subunits 6, 8	A6, A8 or ATP6, ATP8	atp6, atp8
Large ribosomal subunit RNA	IrRNA	rnl
Small ribosomal subunit RNA	srRNA	rns
18 Transfer RNAs each specifying a single amino acid	Corresponding one-letter amino acid code	trnX
Two transfer RNAs specifying leucine	Differentiated by codon recognized, L(CUN) and L(UUR)	Differentiated by subscript
Two transfer RNAs specifying serine	Differentiated by codon recognized, S(AGN) and S(UCN)	Differentiated by subscript

Figure 1.2 : Liste reprenant les différentes sous-unités protéiques, les ARN de transfert et les ARN ribosomiaux codés par le génome mitochondrial humain (D'après Boore, 1999).

gènes mitochondriaux (Boore, 1999). Un tableau reprenant les différents produits codés par le génome mitochondrial humain est présenté à la figure 1.2.

L'ADNmt est un ADN double brin circulaire comportant un brin lourd (HS pour heavy strand) et un brin léger (LS pour light strand) faisant référence au nombre de produits géniques codés par ceux-ci ou à leur abondance différente en G+C les rendant séparables en fonction de leur densité (Fernandez-Silva et al., 2003). La transmission de ce génome mitochondrial est exclusivement maternelle étant donné que les quelques mitochondries provenant du spermatozoïde qui pourraient entrer dans l'oocyte lors de la fécondation sont activement éliminées par un processus dépendant de l'ubiquitine (Sutovsky et al., 1999). Etant donné qu'au cours de son évolution, le génome mitochondrial a subi le transfert d'un grand nombre de ses gènes dans le génome nucléaire (Berg and Kurland, 2000), 99 % des protéines mitochondriales (estimées actuellement à 1200-1500) sont codées par le génome nucléaire et nécessitent une importation mitochondriale post-synthèse (Mootha et al., 2003). Contrairement au génome nucléaire, le génome mitochondrial n'est pas structuré par des protéines histones mais par des protéines « knobs », ne contient pas d'intron et est très sensible aux radicaux libres dérivés de l'oxygène produits par la chaîne de respiration mitochondriale. Cette sensibilité accrue de l'ADNmt aux ROS (Reactive Oxygen Species) peut s'expliquer en raison de la moindre protection par les protéines qui structurent l'ADNmt en nucléoïdes (« protéines knob ») et de la plus faible efficacité des mécanismes de réparation de l'ADNmt comparé aux systèmes nucléaires (Wallace, 1999). Les gènes sont contigus et peuvent même être chevauchants dans certaines espèces (Fernandez-Silva et al., 2003). Cette structure permet une organisation compacte de l'ADNmt, à l'exception d'une région appelée D-loop (boucle de déplacement) dans laquelle la transcription et la réplication de l'ADNmt sont initiées.

1.1.2.1 REPLICATION, TRANSCRIPTION ET TRADUCTION

La réplication du génome mitochondrial ne s'effectue pas de façon synchronisée avec celle du génome nucléaire et les mécanismes qui l'activent et la régulent sont encore peu connus. Elle débute par la transcription d'une amorce d'ARN à l'origine de réplication du brin lourd (O_H) située dans la D-loop. Cette amorce est clivée par la MRP (*Mitochondrial RNA Processing enzyme*) et est reconnue par l'ADN polymérase γ pour entamer la réplication du brin lourd. Celle-ci s'effectue de façon unidirectionnelle jusqu'à l'origine de réplication du brin léger (O_L) où le brin lourd sera déplacé afin de permettre la synthèse de l'amorce nécessaire à la réplication du brin léger (Fernandez-Silva et al., 2003). Un schéma représentant la localisation des différents gènes codés par le génome mitochondrial est présenté à la figure 1.3.

La transcription de l'ADNmt humain se fait à partir de deux promoteurs majeurs situés dans la D-loop et désignés par LSP (*Light Strand Promoter*) et HSP (*Heavy Strand Promoteur*) en référence au brin matrice de la transcription. Elle est activée par deux facteurs de transcription identifiés à ce jour : mtTFA (*mitochondrial Transcription Factor A*) (Shadel and Clayton, 1993) (Falkenberg et al., 2002). Ces facteurs, codés par le génome nucléaire, sont synthétisés dans le cytosol et importés dans la mitochondrie par la machinerie d'importation décrite au point 1.4.3. La transcription implique également une ARN polymérase spécifique de la mitochondrie et un facteur de terminaison appelé mTERF (*mitochondrial Termination Factor*). Les transcrits produits sont polycistroniques et seront clivés au niveau des séquences codant les ARNt par des ARNases spécifiques, libérant ainsi les différents ARNm, ARNr et ARNt (Fernandez-Silva et al., 2003).

La traduction des ARNm est effectuée par des mitoribosomes localisés dans la matrice mitochondriale dont la taille est inférieure à celle de leurs homologues cytoplasmiques (O'Brien and Kalf, 1967). Précisons que le code génétique utilisé par la mitochondrie est



Figure 1.3 : Carte reprenant les différents gènes codés par le génome mitochondrial humain.

Les deux cercles intérieurs représentent les deux brins d'ADNmt contenant leurs gènes respectifs. Les cercles externes représentent les transcrits d'ARN du brin lourd (en noir) et du brin léger (en blanc). Les emplacements des ARNt sont indiqués par les trois lettres du code des acides aminés.

 H_1 , H_2 et L indiquent les points d'initiation de la transcription respectivement pour les brins lourd et léger. O_H et O_L indiquent les origines de réplication tandis que les flèches montrent les sens de transcription et de réplication. Notons également l'organisation des ARNt régulièrement distribués parmi les autres gènes et jouant un rôle clé dans le « processing » des transcrits (D'après Fernandez-Silva et al., 2003).

différent de celui utilisé par le génome nucléaire. Par exemple, le codon de terminaison nucléaire UGA

code pour le tryptophane dans la mitochondrie...AGA et AGG sont des codons de terminaison mitochondriaux alors qu'ils codent pour l'arginine dans le code nucléaire (Barrell et al., 1979).

1.1.3 STRUCTURE

La mitochondrie est constituée de quatre compartiments assurant des fonctions très différentes : la membrane mitochondriale externe (MME), l'espace inter-membranaire, la membrane mitochondriale interne (MMI) et la matrice représentés à la figure 1.4.

1.1.3.1 Membrane mitochondriale externe (MME)

La membrane mitochondriale externe contient 40 % de lipides (essentiellement du phosphatidylcholine, du phosphatidylinositol cholestérol. de la et du phosphatidyléthanolamine) et 60 % de protéines. Elle possède une grande perméabilité aux ions (calcium, potassium, sodium,...) ainsi qu'aux petites molécules assurée par la présence de nombreuses porines (aussi appelée VDAC: Voltage-Dependent Anion Channel). Ces protéines formant des canaux possèdent aussi des domaines d'interaction protéine-protéine pour plusieurs protéines du cytosol comme l'hexokinase et la créatine kinase, de l'espace inter-membranaire ou de la MMI comme l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase) (Delbart, 2000). La perméabilisation de la MME par une ouverture du mtPTP (mitochondrial Permeability Tansition Pore) permet la translocation du cytochrome c dans le cytosol, une composante important dans de nombreux processus apoptotiques (Garesse and Vallejo, 2001). L'ouverture de ce pore est modulée par de nombreux facteurs tels que le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta \psi m$) et la concentration en phosphates inorganiques (Halestrap et al., 2002).

C'est également dans la MME qu'on retrouve les complexes d'importation des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol (voir point 1.4.3) et la CPT-1 (*Carnitine Palmitoyl Transferase-1*) permettant l'entrée des acyls-CoA dans l'espace inter-membranaire, première étape de leur utilisation dans la β -oxydation (Bartlett and Eaton, 2004).

1.1.3.2 ESPACE INTER-MEMBRANAIRE

L'espace inter-membranaire possède un rôle important dans la production d'ATP par la mitochondrie dans le sens où les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire y expulsent des protons (H⁺) provenant de la matrice, formant ainsi un gradient de pH (Δ pH) et un Δ Ψm. Il en résulte une force électromotrice dans les mitochondries couplées comprise entre -180 et -220 mV. La production d'ATP se fait par le retour des H⁺ vers la matrice par la F0-F1 ATPsynthase (Cross, 2004) représentée à la figure 1.5.

L'espace inter-membranaire renferme également de nombreuses protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c, l'AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), l'endonucléase G et la procaspase 9 qui, une fois délocalisées dans le cytosol, entraîneront la mort cellulaire par apoptose. Un schéma reprenant très succinctement les rôles de la mitochondrie dans les processus apoptotiques est présenté à la figure 1.6.

Les mécanismes de participation de la mitochondrie aux processus apoptotiques pourraient faire l'objet d'une introduction entièrement dédiée à ce sujet (pour une revue voir Gulbins, 2003 #213). Etant assez éloigné de notre étude portant sur le dysfonctionnement mitochondrial, ce thème ne sera pas détaillé davantage dans le cadre de cette introduction.

1.1.3.3 MEMBRANE MITOCHONDRIALE INTERNE (MMI)

La membrane mitochondriale interne peut être accolée à la MME, ou s'invaginer à l'intérieur de la matrice en lamelles ou en tubules. C'est dans cette partie de la MMI qu'on



Figure 1.4 : Micrographie prise en microscopie électronique à transmission et schéma montrant l'ultra-structure de différents compartiments de la mitochondrie (http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/mito.htm).



Figure 1.5: Schéma représentant la F0-F1 ATPsynthase.

A) Vue des changements conformationnels des trois sous-unités catalytiques de la partie F1.

La rotation de la sous-unité γ entraîne un changement conformationnel des hétérodimères α/β qui passent des conformations O (open), T (tight) à L (loose).

B) Vue de la F0-F1 ATPsynthase.

Le retour des protons dans la matrice entraîne la rotation des sous-unités c de la partie rotor F0 par répulsion hydrophile/hydrophobe. L'énergie de la rotation est transmise à la sous-unité γ de la partie F1 et sert à la phosphorylation de l'ADP en ATP (D'après Cross, 2004).



Figure 1. 6 : Rôle de la mitochondrie dans les processus apoptotiques.

Dans certaines conditions, la mitochondrie peut libérer divers facteurs proapoptotiques dans le cytosol comme :

- le cytochrome c (menant à la formation du complexe pro-apoptotique ou apoptosome qui active des caspases effectrices comme la caspase 3).
- Smac/DIABLO (inhibant les IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), des protéines inhibitrices du complexe pro-apoptotique).
- AIF (*Apoptosis-Induced Factor*) et l'endonucléase G menant directement à la fragmentation de l'ADN nucléaire.

(D'après Gulbins et al., 2003).

retrouve 94 % des complexes de la chaîne respiratoire et de la F0-F1 ATPsynthase, formant ainsi le principal site des phosphorylations oxydatives (Gilkerson et al., 2003).

La MMI possède une composition particulière et différente de la MME dans le sens où son rapport protéines/lipides est très élevé en raison de la présence des protéines de la chaîne respiratoire. La partie lipidique de la MMI est riche en cardiolipines, ce qui la rend relativement peu fluide et permet l'assemblage et la stabilisation des complexes multiprotéiques impliqués dans les phosphorylations oxydatives (Schlame et al., 2000).

La MMI contient également les protéines formant les complexes TIM (*Translocase of the Inner Membrane*) permettant le passage des protéines synthétisées dans le cytosol et ciblées vers la matrice, ainsi que la CPT-II permettant le passage des acyls-CoA dans la matrice (Bartlett and Eaton, 2004).

C'est également dans la MMI qu'on retrouve les protéines UCPs (*UnCoupling Proteins*), protéines dont l'activité régulable permet d'ajuster le « proton leak » à la demande énergétique (Klingenspor, 2003). L'UCP-1 intervient notamment dans les phénomènes de thermogenèse adaptative en effectuant un découplage de la mitochondrie. Ce qui dissipe le $\Delta\psi$ m et libère de l'énergie sous forme de chaleur (Jezek and Garlid, 1998). Il est à noter que des agents comme le FCCP (Carbonyl Cyanide p-triFluoro-methoxyPhenyl-hydrazone) ont le même effet.

1.1.3.4 MATRICE

Homogène et de densité comparable à celle du cytoplasme, la matrice contient des ions calcium et magnésium s'accumulant au sein de granules ainsi que des mitoribosomes associés à la MMI (Delbart, 2000). Elle est le siège de nombreuses réactions métaboliques comme le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras, certaines étapes de la synthèse des stérols...et doit donc contenir les enzymes qui catalysent les réactions de ces voies métaboliques. La matrice contient également les copies de l'ADNmt localisées dans des régions particulières appelées nucléoïdes (Kanki et al., 2004).

1.1.4 PHENOMENE DE FUSION-FISSION

Les cellules eucaryotes de mammifères peuvent réguler leur production d'ATP par plusieurs mécanismes : en modifiant l'architecture et la structure des mitochondries, en changeant l'amplitude du « proton leak » ou découplage, ou encore si les besoins énergétiques sont importants et soutenus, en augmentant la biogenèse mitochondriale (Moyes, 2003). Les mitochondries présentent donc une étonnante plasticité tant au niveau de leur morphologie que de leur répartition cellulaire. Leur nombre au sein d'une même cellule peut varier fortement en fonction des besoins énergétiques (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Des études portant sur l'ultrastructure des mitochondries en microscopie électronique montrent un réseau stable composé de tubules branchés (Frey et al., 2002). En réalité, on observe un cycle continuel de fusion-fission impliquant de nombreuses GTPases assurant la dynamique du réseau mitochondrial (Legesse-Miller et al., 2003). De plus, de nombreuses interactions des protéines de la MME avec les microtubules et les filaments d'actine du cytosquelette permettent le maintien de la morphologie et la modification de la distribution des mitochondries dans la cellule (Boldogh et al., 1998).

La fusion des mitochondries joue un rôle important dans l'apport de l'énergie sous forme d'ATP aux différentes régions cellulaires ainsi que dans la régulation du pool intracellulaire de calcium (Rizzuto et al., 1998).

Il a été montré que le phénomène de fusion est indépendant de l'état d'activité de la chaîne respiratoire, mais que la dissipation du potentiel de membrane mitochondriale par des molécules comme le FCCP qui découplent la mitochondrie provoquent une fragmentation du réseau mitochondrial médiée par Drp 1 (*Dynamin-related protein 1*) (Legros et al., 2002).

La fission des mitochondries est mieux comprise que la fusion. Elle semble être due à une constriction de la MME induite par la formation d'un anneau protéique constitué



Figure 1.7 : A) Représentation de la structure des protéines Dnm1p, Mdv1p et Fis1p ainsi que leur localisation sur la MME.

B) Modèle mécanistique de la fission mitochondriale médiée par la protéine

Dnm1p.

Tout d'abord, Dnm1p s'assemble autour de la MME côté cytosolique en liant la protéine Fis1p, un récepteur de la MME (1). Ensuite son activité GTPase lui permet d'opérer une constriction de la MME (2) amenant la fission (3). Fis1p régulerait donc la distribution et l'abondance de Dmn1p sur la MME et Mdv1p permet l'assemblage du complexe (D'après Shaw, 2002).

essentiellement de Dnm1p, une GTPase dont l'homologue chez les eucaryotes mammifères est Drp1, une GTPase décrite pour réguler le clivage des puits tapissés de clathrine dans les processus d'endocytose (Gammie et al., 1995; Otsuga et al., 1998). La contraction de cet anneau engendre la formation d'organites isolés (Shaw and Nunnari, 2002). D'autres partenaires de Dnm1p ont également été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae*, par exemple Mdv1p (*Mitochondrial division 1 protein*) (Tieu and Nunnari, 2000), une protéine adaptatrice entre Dnm1p et Fis1p (*Fission 1 protein*), un récepteur présent dans la MME. Un modèle reprenant les acteurs moléculaires et le mécanisme proposé pour expliquer la fission mitochondrial est proposé à la figure 1.7.

1.1.5 FONCTIONS DE LA MITOCHONDRIE

Depuis leur première description dans des fibres musculaires cardiaques en 1857 par Kölliker, les mitochondries se sont peu à peu imposées comme étant des organites essentiels dans le métabolisme et de nombreuses réponses cellulaires (Delbart, 2000). En effet, on les retrouve impliquées dans des processus tels que la β -oxydation des acides gras, l'apoptose, la thermogenèse adaptative, l'homéostasie du calcium, la génération d'ATP, la production de ROS ...

Nous ne présenterons ici que les fonctions ayant un rapport direct avec notre recherche, à savoir l'étude des voies de signalisation induites par un dysfonctionnement mitochondrial qui pourraient être impliquées dans la mitobiogenèse. Dans ce cadre, nous ne passerons en revue que la production d'ATP par les phosphorylations oxidatives pour comprendre le dysfonctionnement mitochondrial et l'homéostasie du calcium. En effet, ce messager secondaire dont l'homéostasie est perturbée lors du dysfonctionnement mitochondrial joue un rôle très important dans l'activation de nombreuses voies de signalisation. Nous sommes conscients d'ignorer la production de ROS et des dérivés de l'oxygène ainsi que leur rôle de messager secondaire .

1.1.5.1 Les phosphorylations oxydatives et la production d'ATP

La cellule eucaryote de mammifères aérobie produit l'énergie nécessaire à ses processus métaboliques sous forme d'ATP dans la mitochondrie à partir de l'oxydation de différents substrats comme le glucose et les acides gras, générant ainsi des cofacteurs réduits tels que le NADH et le FADH₂ qui donneront leurs électrons respectivement aux complexes I et II de la chaîne respiratoire. Un schéma illustrant la chaîne de transfert des électrons et sa connexion au fonctionnement de la F0-F1 ATPsynthase est représenté à la figure 1.8.

Dans la glycolyse, le pyruvate, entrant dans le cycle de Krebs se déroulant dans la matrice mitochondriale, sera oxydé jusqu'au stade terminal (CO_2) et permettra la récupération de l'énergie générée sous forme de NADH et de FADH₂. L'énergie libérée au cours du transport des électrons servira à expulser des protons dans l'espace inter-membranaire. Leur retour vers la matrice, lorsqu'il se fait par la F0-F1 ATPsynthase, permettra la phosphorylation d'ADP en ATP.

Dans le cas d'une activation des UCPs par la liaison d'acides gras, les H⁺ rentreront dans la matrice sans passer par la F0-F1 ATPsynthase, provoquant ainsi une dissipation du $\Delta \psi m$ et donc un découplage des mitochondries (Jezek and Garlid, 1998).

La production d'ATP peut de plus être inhibée par la présence de molécules telles que l'antimycine A et l'oligomycine inhibant respectivement les complexes III et V, ou encore le FCCP, une molécule qui découple les mitochondries.

1.1.5.2 Homeostasie calcique

Le calcium intracellulaire est un messager secondaire capable de réguler de nombreuses voies de transduction du signal après s'être fixé sur la calmoduline (CaM). Il permet l'activation de nombreuses kinases telles que les PKC (*Protein Kinase C*) et les CaMK



Figure 1.8 : Schéma reprenant l'organisation des différents complexes de la chaîne de transport d'électrons

La chaîne de transport des électrons peut être découpée en quatre complexes.

Le complexe I ou NADH- coenzyme Q réductase. Ce complexe opère le transfert des électrons du NADH vers le coenzyme Q (ou Ubiquinone(UQ)), un transporteur mobile d'électron.

L'oxydation du NADH et la réduction du coenzyme Q conduit à l'expulsion de deux protons dans l'espace inter-membranaire.

Le complexe II, aussi appelé Succinate-coenzyme Q réductase. L'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs est concomitant à la réduction de FAD en $FADH_2$, lequel transfèrera ses électrons aux centres Fe-S de l'enzyme qui les transmettra à l'ubiquinone. Le cycle de l'ubiquinone dans la membrane permet le transport des électrons des complexes I et II vers le complexe III.

Le complexe III est constitué par la coenzyme Q-cytochrome c réductase. Le coenzyme Q, réduit au niveau du complexe I, cède ses électrons au cytochrome c, un transporteur mobile hydrosoluble, permettant l'extrusion de deux protons supplémentaires dans l'espace inter-membranaire. Le cytochrome c va donc effectuer la navette entre les complexes III et IV.

Le complexe IV, également appelé cytochrome c oxydase catalysera la réduction de l'oxygène moléculaire (O_2) par quatre électrons pour former de l'eau et expulser deux protons dans l'espace inter-membranaire.

Le complexe V des phosphorylations oxydatives est constitué d'un rotor moléculaire, la F0-F1 ATPsynthase, permettant la formation d'ATP suite à la rentrée des protons dans la matrice mitochondriale.

(http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00190.html)



Figure 1.9 : Schéma représentant les différentes voies d'entrée et de sortie du calcium dans la mitochondrie.

Le calcium entre dans la mitochondrie par un transporteur de type uniport hautement spécifique et dépendant du $\Delta\psi$ m. Il peut éventuellement ressortir dans le cytosol par le PTP ou par un transporteur de type uniport échangeant deux ions sodiums ou deux protons. A l'intérieur de la mitochondrie, le calcium joue un rôle dans l'activation d'enzymes du cycle de Krebs comme la NAD⁺-isocitrate déshydrogénase (NAD-IDH) ou l' α -cétoglutarate déshydrogènase (KGDH) (D'après Carafoli, 2003).



Figure 1.10 : Illustration des échanges calciques entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique.

A) Cas d'une mitochondrie active et couplée. La mitochondrie récupère le calcium libéré par le réticulum endoplasmique suite à une fixation de l'IP3 sur son récepteur et tamponne la concentration en calcium cytosolique.

B) Cas d'une mitochondrie dont le $\Delta \psi$ m est dissipé. La mitochondrie est incapable d'incorporer le calcium et donc la concentration en calcium cytosolique augmente. Le mécanisme implique une sensibilisation du récepteur à l'IP3 (D'après Duchen, 2000).

B

(*calcium/calmoduline-dependent protein Kinases*), et de phosphatases telles que la Calcineurine A.

La concentration cytosolique en calcium ($[Ca^{2+}]_c$) est maintenue dans les cellules au repos entre 20 et 100 nM dans le but d'éviter tout effet cytotoxique. Elle peut augmenter sous forme de pics calciques résultant de la coordination de canaux ioniques situés dans la membrane plasmique, dans des sites de stockage comme le réticulum endoplasmique grâce aux récepteurs ryanodine et aux récepteurs à l'inositol tri-phosphates (IP3R) (Berridge, 1997).

La mitochondrie joue un rôle important dans le stockage et l'homéostasie du calcium, (et ce même en conditions basales) grâce à l'existence d'un transporteur de type uniport hautement spécifique dépendant du $\Delta \psi m$ (Kirichok et al., 2004). Les différents systèmes de transport du calcium au sein de la mitochondrie sont représentés à la figure 1.9. La sortie du calcium peut se faire par deux transporteurs de type antiport : le premier échange deux ions sodium extra-mitochondriaux par un ion calcium (le sodium retourne dans le cytosol par un système d'échange avec un proton) tandis que le second échange deux protons contre un ion calcium intra-mitochondrial. Ce dernier type de transporteur est essentiellement caractérisé dans les tissus hépatiques et rénaux (Fiskum and Lehninger, 1979).

Une troisième voie de sortie du calcium de la mitochondrie est constituée par le mtPTP qui permet l'efflux de calcium ainsi que d'autres molécules comme le cytochrome c, lorsque le $\Delta \psi m$ est dissipé (Carafoli, 2003).

A l'intérieur de la matrice mitochondriale, le calcium active différentes enzymes telles que la NAD⁺-isocitrate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase (agissant toutes deux dans le cycle de Krebs) ou encore la pyruvate déshydrogénase (Carafoli, 2003).

Ajoutons que l'incorporation du calcium par la mitochondrie est facilitée par la proximité des sites de libération du calcium par le RE, soutenant l'hypothèse de microdomaines à haute $[Ca^{2+}]_c$ proches des canaux aux récepteurs à l'IP3 du RE (Rizzuto et al., 1998).

La dissipation du $\Delta \psi m$ en réponse à un état pathologique (anoxie, problème au niveau de la chaîne de respiration mitochondriale,...) provoque la réduction du flux de calcium dans la mitochondrie (Duchen, 2000). La figure 1.10 présente la communication entre la mitochondrie et le RE dans le cadre de l'homéostasie du calcium.

1.2 Dysfonctionnement mitochondrial

Même si la contribution du génome mitochondrial peut paraître minime de par le petit nombre de gènes qu'il code (37), un défaut dans la synthèse d'un ou plusieurs peptides conduit à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire identifié dans de nombreuses conditions pathologiques telles que les syndromes MERRF, LHON,...que nous décrirons cidessous.

Les mutations ou délétions touchant les fonctions de la mitochondrie peuvent être d'origine variable. En effet, on trouve des mutations touchant des gènes nucléaires codant pour des enzymes impliquées dans les phosphorylations oxydatives, pour des enzymes assurant la réplication du génome mitochondrial ou encore des récepteurs impliqués dans le système d'importation des protéines mitochondriales (DiMauro and Moraes, 1993). Mais la plupart des pathologies mitochondriales sont le résultat de mutations qui apparaissent dans le génome mitochondrial et touchent des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire, des ARNt ou les ARNr. Les différentes mutations dans le génome mitochondrial conduisant à des situations pathologiques sont reprises sur la carte présentée à la figure 1.11.

1.2.1 MUTATIONS ET PATHOLOGIES MITOCHONDRIALES ASSOCIEES

Le génome mitochondrial se trouve à proximité des sites de formation des radicaux libres dérivés de l'oxygène (McLennan and Degli Esposti, 2000) et possède des systèmes de réparation de l'ADN moins efficace (Wallace, 1999). Il est donc plus sensible aux mutations que le génome nucléaire.



Figure 1.11 : Carte reprenant la localisation de différentes mutations ponctuelles dans l'ADNmt humain responsables de différents syndromes

Les mutations dans les ARNt qui fixent la lysine, la leucine ou la glutamine sont responsables respectivement des syndromes MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers), MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) et ADPD (late-onset Alzheimer's disease)

Le syndrome LHON (*Leber's Hereditary Optic Neuropathy*) est dû à des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités 4 et 6 de la NADH déshydrogénase (complexe I) tandis que la NARP (*Neuropathy,Ataxia and Retinis Pigmentosa*) est provoquée par la mutation de la sous-unité 6 de l'ATPase (D'après Wallace, 1999).

Etant donné qu'une cellule contient plusieurs centaines voire milliers de copies du génome mitochondrial, on peut distinguer des états d'homoplasmie et des états d'hétéroplasmie selon que la cellule contient des copies identiques du génome mitochondrial ou qu'elle contient un mélange de copies d'ADNmt mutés et de copies sauvages (Wallace, 1999). Lors de l'apparition d'une mutation dans le génome mitochondrial, la répartition des différentes copies de ce génome dans les cellules filles se fera de façon inégale au cours des divisions cellulaires et peut amener à un état d'homoplasmie pour les copies mutées ou les copies sauvages. Lorsque la proportion d'ADNmt mutés augmente au-delà de 90-95 %, les capacités énergétiques de la cellule diminuent et peuvent tomber sous un seuil à partir duquel les phénotypes cliniques apparaissent. C'est le cas notamment dans le syndrome de Leigh qui apparaît lorsque plus de 95 % des copies du génome de la mitochondrie possèdent la mutation T8993G (Graeber and Muller, 1998).

1.2.2 MUTATIONS AFFECTANT LES GENES CODANT POUR LES PROTEINES DE LA CHAINE RESPIRATOIRE

L'atrophie optique de Leber (LHON : *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*) est la première pathologie mitochondriale à avoir été comprise au niveau moléculaire. Elle est causée par une mutation de type "missense" et 95 % des mutations (G3460A, G11778A et T14484C) apparaissent dans des gènes codant pour des sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire (Man et al., 2002). Les symptômes sont essentiellement une perte de la vision centrale, des troubles cardiaques, de l'ataxie ainsi que de la dystonie (Graeber and Muller, 1998).

Un autre syndrome résultant d'une mutation dans un gène qui code pour une protéine participant aux phosphorylations oxydatives est la NARP (*Neuropathy,Ataxia and Retinis Pigmentosa*) ou syndrome de Leigh lorsque plus de 95 % des génomes mitochondriaux sont touchés. La mutation dans l'ADNmt (T8993G) responsable touche le gène codant la sousunité 6 de l'ATPase, ayant pour effet de réduire la production d'ATP par la mitochondrie. Le phénotype de ces patients est caractérisé par des retards du développement, une pigmentation de la rétine, de la démence et une faiblesse musculaire.

1.2.3 MUTATIONS AFFECTANT LES ARNt

Les mutations apparaissant dans les ARNt causent des aberrations dans la traduction de toutes les protéines mitochondriales. La pathologie la plus étudiée causée par la mutation d'un ARNt est la pathologie MERRF (*Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers*) (Chomyn, 1998). Ce syndrome est occasionné par le remplacement d'une adénine par une guanine (A8344G) dans l'ARNt fixant la lysine et est caractérisé par de l'ataxie cérébrale, de l'épilepsie myoclonique et une dégénérescence musculaire. Une coloration des fibres musculaires de ces patients au trichrome de Gomori révèle la présence d'une accumulation subsarcolemmique de mitochondries, reflet d'une augmentation de la mitobiogenèse.

Enfin, mentionnons encore la pathologie causée par une mutation dans un ARNt fixant la leucine (A3243G) qui conduit au syndrome MELAS (*Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*). Ce syndrome est caractérisé cliniquement par une acidose lactique, de la démence et des troubles cardiaques (Graeber and Muller, 1998).

1.3 CELLULES DEPLETEES EN ADNMt

Le développement de lignées cellulaires déplétées partiellement (rho⁻) ou complètement (rho0) en ADNmt a fourni des modèles d'étude intéressants pour étudier le dysfonctionnement mitochondrial et les voies de signalisation moléculaires induites lors d'une inhibition chronique de l'activité mitochondriale. Les différentes étapes nécessaires à l'obtention de ces cellules sont représentées à la figure 1.12.



Figure 1.12 : Schéma représentant les différentes étapes nécessaires à l'obtention de cellules déplétées en ADNmt.

Une lignée cellulaire possédant un haut potentiel glycolytique est incubée avec du bromure d'éthidium pendant plusieurs passages en cultures. Cette molécule inhibe la réplication du génome mitochondrial. On obtient ainsi une population non-clonale de cellules déplétées rho⁻ à partir de laquelle il est possible de générer par sélection une population clonale de cellules déplétées rho0 ne nécessitant plus la présence de bromure d'éthidium dans le milieu de culture.

1.3.1 OBTENTION ET CARACTERISTIQUES

L'obtention de cellules déplétées en ADNmt se fait par un traitement chronique au bromure d'éthidium de cellules ayant un haut pouvoir glycolytique (King and Attardi, 1996). Cette molécule aromatique, en plus de sa capacité à s'intercaler dans les ADN et ARN doubles brins, inhibe la réplication du génome mitochondrial par son action inhibitrice sur l'hélicase et la polymérase γ mitochondriale (Radsak et al., 1971). Le contenu en ADNmt de chaque cellule sera donc dilué progressivement au cours des divisions cellulaires. Après 30 ou 50 passages en culture, une incubation des cellules en présence d'inhibiteurs métaboliques comme l'oligomycine (un inhibiteur de la F0-F1 ATPsynthase) permet de sélectionner les cellules qui ne sont plus dépendantes de la mitochondrie pour leur production d'ATP. Remarquons que dans le cas d'une population cellulaire non clonale, lorsque le traitement au bromure d'éthidium est arrêté, on observe un repeuplement de la culture par des cellules répliquant leur ADNmt conduisant à une réversion de phénotype (King and Attardi, 1996).

La culture des cellules déplétées en ADNmt requiert l'ajout d'uridine dans le milieu de culture. En effet, la disruption de la chaîne de transport d'électrons inhibe la dihydroorotate déshydrogénase, enzyme localisée dans la membrane mitochondriale interne et intervenant dans la synthèse des bases pyrimidiques (Morais, 1996). De plus, le cycle de Krebs étant non fonctionnel, les cellules déplétées produisent plus d'acide lactique en raison de l'activation de la glycolyse (Desjardins et al., 1985).

D'un point de vue morphologique, la déplétion en ADNmt dans les cellules de mammifères provoque des changements dans la structure du « réticulum mitochondrial ». En effet, on observe des organites mieux individualisés résultant probablement d'une augmentation de la fission mitochondriale. De plus, on note dans ces cellules une réduction du nombre de crêtes mitochondriales ainsi que leur désorganisation (Gilkerson et al., 2000).

Une des caractéristiques surprenantes des cellules déplétées en ADNmt est le maintien d'une structure mitochondriale (Herzberg et al., 1993). De plus, les mitochondries de ces cellules possèdent toujours un certain potentiel de membrane mitochondrial. L'explication la plus admise de ce phénomène est qu'en cas de déplétion en ADNmt, la F0-F1 ATPsynthase se dissocie et la partie F1 joue alors le rôle d'une ATPase. L'échange d'ADP³⁻ contre de l'ATP⁴⁻ cytosolique permet la formation d'un $\Delta \psi m$ plus faible mais suffisant pour permettre l'importation des protéines mitochondriales (Buchet and Godinot, 1998). Au laboratoire, nous avons récemment montré que ce mécanisme n'est peut-être pas le seul et avons proposé l'implication du canal à chlore mtCLIC (*mitochondrial ChLoride Intracellular Channel*), une protéine surexprimée dans les cellules déplétées en ADNmt, dans le maintien d'un $\Delta \psi m$ (Arnould et al., 2003).

1.4 LA MITOBIOGENESE

La mitobiogenèse est un processus encore peu compris mettant en jeu trois processus majeurs bien distincts. Tout d'abord, la synthèse, le transport et l'assemblage des phospholipides composant les membranes mitochondriales. La mitobiogenèse nécessite également la synthèse coordonnée des différentes protéines codées par des gènes présents dans les génomes nucléaire et mitochondrial. Enfin, pour acheminer les protéines codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol dans les différents compartiments mitochondriaux, une étape d'importation est nécessaire.

1.4.1 Synthese, transport et assemblage des phospholipides

La mitochondrie n'est pas capable de synthétiser la totalité de ses lipides membranaires, un système d'importation doit donc être mis en place. Ces mécanismes sont cependant peu connus. La majorité des phospholipides composant les MME et MMI de la mitochondrie est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique lisse (REL). Comme ces molécules diffusent mal dans le cytosol, le transport des phospholipides du REL vers la mitochondrie se



Figure 1.13 : Représentation des facteurs de transcription et co-activateurs participant à la régulation de l'expression de gènes de la chaîne respiratoire présents dans le génome nucléaire.

Les gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire se trouvent dans le génome nucléaire et sont dépourvus de la boîte TATA. Leur expression constitutive est souvent médiée par le facteur de transcription Sp1. Le promoteur de ces gènes contient également des sites pour les facteurs CREB, PPAR qui dimérisent avec les RxR (*Retinoid-x Receptors*), NRF-1 et NRF-2. Ces facteurs sont souvent responsables des activations induites par différents stimuli comme le froid et leurs actions sont coordonnées par des co-activateurs comme PGC-1 α (D'après Moyes, 2003).

fait soit par un système de transporteurs protéiques, soit directement par des échanges entre les deux organites. En effet, on a pu observer qu'il existait des relations privilégiées entre ces deux compartiments subcellulaires et que le REL peut former des structures en « cage » autour des mitochondries (Frey and Mannella, 2000).

1.4.2 REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES NUCLEAIRES CODANT DES PROTEINES MITOCHONDRIALES

1.4.2.1 FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET CO-ACTIVATEURS

La mitobiogenèse requiert l'expression de plus d'un millier de gènes répartis entre les génomes nucléaires (99 %) et mitochondriaux (1 %). Cette répartition exige donc une coordination et une régulation contrôlée de l'expression des gènes impliqués.

Cette régulation de l'expression génique s'effectue essentiellement au niveau des mécanismes transcriptionnels par des facteurs de transcription généraux, ubiquistes, et spécifiques (voir figure 1.13). La coordination de l'expression est essentiellement assurée, non par les facteurs de transcription (souvent différents dans le promoteur des différents gènes), mais par des co-activateurs comme PGC-1 α (*PPARY Coactivator-\alpha*).

Dans le paragraphe suivant, nous parlerons des facteurs ubiquistes et spécifiques et du coactivateur PGC-1 α .

1.4.2.1.1 Les régulateurs ubiquistes de la transcription

1.4.2.1.1.1 Sp1

Appartenant à la famille des protéines à doigts de zinc, la protéine Sp1 (Specificity protein 1) reconnaît des séquences riches en GC localisées dans le promoteur des gènes du cytochrome c (Li et al., 1996b), de l'ANT-2 (Li et al., 1996a) et de nombreux gènes de maintenance (housekeeping genes). Certains gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales comme la MnSOD (Manganese SuperOxide Dismutase), ou les enzymes de la chaîne respiratoire sont également régulés par le facteur Sp1. Sa liaison à l'ADN est souvent nécessaire pour obtenir un taux de transcription basal et son action transactivatrice est modulée par de nombreux éléments post-traductionnels faisant intervenir des glycosylations ou des phosphorylations souvent inhibitrices, par des enzymes comme la CKII (Casein Kinase II) ou la PKA (Protein Kinase A) (Jackson et al., 1990).

Sp1 se lie souvent de manière coopérative à d'autres facteurs de transcription tels que SREBP (*Steroid Responsive Element Binding Protein*) et NRF-1 (*Nuclear Respiratory Factor-1*) sur le promoteur des gènes qu'il régule.

Son rôle positif dans la mitobiogenèse de cellules musculaires, dont la contraction est stimulée, a été démontré dans des myoblastes C2C12 (Connor et al., 2001). Cependant, dans nos modèles de cellules déplétées en ADNmt (L929 rho⁻ et 143B rho0), la liaison de ce facteur à une séquence d'ADN consensus ainsi que l'activité de ce facteur mesurée à l'aide d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique possédant 3 sites Sp1, sont diminuées (Ludovic Mercy, thèse en cours) (voir figure 1.28).

1.4.2.1.1.2 YY1

Ying Yang 1 (YY1) est également un facteur de transcription ubiquiste de 65 kDa appartenant à la famille des protéines à doigts de zinc possédant quatre motifs reconnaissant une séquence consensus CG<u>CCAT</u>nTT (Hyde-DeRuyscher et al., 1995). Son action d'activation ou de répression de la transcription de gènes cibles comme les gènes codant les sous-unités de la cytochrome c oxydase {Basu, 1997 #116} dépend essentiellement d'interactions protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription comme CREB (*Cyclic-AMP Responsive Element Binding protein*) et Sp1, ou avec des co-activateurs ne liant pas l'ADN comme des histones acétyl transférases (HAT), CBP/p300 (*CREB-Binding Protein*) ou

and the second	NRF-1ª	NRF-2ª		NRF-1ª	NRF-24
Oxidative phosphorylation:			mtDNA transcription and	replication	1:
rat cytochrome c	+		human Tfam	+	+
human cytochrome c	-		mouse Tfam		+
			rat Tfam		+
Complex I:			mouse MRP RNA	+	
human NADH dehydroge-	+		human MRP RNA	+	
nase subunit 8 (TYKY)					
			human mtTFB	+	+
Complex II:					
human succinate dehydro-	+	+	HEME biosynthesis:		
genase subunit B					
human succinate dehydro-	+	+	rat 5-aminolivulinate svn-	+	
genase subunit C			thase		
human succinate dehydro-	+	+	mouse uroporphyrinogen	+	+
genase subunit D			III synthase		
0					
Complex III:			Protein import and assemb	dy:	
human ubiquinone binding	+		human TOM 20	+	+
protein					
human core protein I	+		mouse chaperonin 10	+	
1			human SURF-1		+
Complex IV:					
rat cytochrome oxidase		+	Ion channels:		
subunit IV					
mouse cytochrome oxidase		+	human VDAC3	+	
subunit IV					
mouse cytochrome oxidase	+	+	mouse VDAC3	+	
subunit Vb					
rat cytochrome oxidase	+	+	human VDAC1		+
subunit Vb					
human/primate cy-	+	+			
tochrome oxidase subunit					
Vb					
rat cytochrome oxidase	+		Shuttles:		
subunit VIc					
human cytochrome oxidase	+	+	human glycerol phosphate		+
subunit VIaL			dehydrogenase		
bovine cytochrome oxidase	-	+			
subunit VIIaL					
human cytochrome oxidase		+	Translation:		
subunit VIIaL					
bovine cytochrome oxidase		+	human mitochondrial ribo-	+	+
subunit VIIc			somal S12		
Complex V:					
bovine ATP synthase y sub-	+				The second
unit					
human ATP synthase c sub-					
unit					
human ATP synthase β		+			
subunit					

Figure 1.14 : Liste de différents gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et pour lesquels une régulation de l'expression par les facteurs de transcription NRF-1 et/ou NRF-2 a été mise en évidence (D'après Scarpulla, 2002).
des co-répresseurs comme les histones déacétylases (HDAC) qui participent au remodelage de la chromatine et assurent un contrôle de la transcription (Yao et al., 2001).

1.4.2.1.2 Les régulateurs spécifiques de la transcription

1.4.2.1.2.1 NRF-1

NRF-1 (*Nuclear Respiratory Factor-1*) est le premier facteur de transcription identifié par Evans et Scarpulla comme étant un activateur du promoteur du cytochrome c chez le rat (Evans and Scarpulla, 1989). Par la suite, il a également été décrit comme intervenant dans la transcription de très nombreux gènes codant pour des protéines mitochondriales. Un tableau reprenant la liste des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et régulés par les facteurs NRF-1 et/ou NRF-2 est présenté à la figure 1.14. La séquence consensus d'ADN reconnue par NRF-1 est un palindrome riche en guanines suggérant la liaison du facteur sous la forme d'homodimères. La figure 1.15 est une représentation schématique de la liaison des facteurs NRF-1 et NRF-2 à l'ADN.

L'activation de NRF-1 est essentiellement due à la phosphorylation des résidus sérine 39, 44, 46, 47 et 52. Actuellement, deux kinases ont été décrites comme étant capables d'activer NRF-1. En effet, il a d'abord été démontré que la CKII est capable de phosphoryler NRF-1, ce qui a pour effet d'augmenter la capacité de liaison du facteur à l'ADN (Gugneja and Scarpulla, 1997). Plus récemment, l'AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) a également été décrite comme une kinase capable d'activer NRF-1. L'augmentation de la liaison du facteur NRF-1 sur le promoteur de gènes cibles conduit à une augmentation de la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines mitochondriales (Bergeron et al., 2001).

En conclusion, NRF-1 est un facteur essentiel impliqué dans le contrôle de l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules et donc de la mitobiogenèse.

1.4.2.1.2.2 NRF-2

NRF-2 a été identifié comme un activateur de la transcription du gène codant pour COX IV (sous-unité IV de la cytochrome c oxydase) (Virbasius and Scarpulla, 1991), et régule également l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines mitochondriales dont beaucoup sont également régulées par NRF-1 (voir figure 1.14). Le site de reconnaissance de NRF-2 contient un motif GGAA caractéristique de la famille des protéines «Ets» (Thompson et al., 1991). NRF-2 est composé de 5 sous-unités chez l'humain, (α , β 1, β 2, γ 1 et γ 2). Les sous-unités β ou γ interagissent avec la sous-unité α qui lie l'ADN et contribuent à la formation du domaine de transactivation et du domaine de dimérisation du facteur de transcription actif. L'activation de NRF-2 serait essentiellement régulée par l'abondance des différentes sous-unités et par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Scarpulla, 2002).

1.4.2.1.2.3 CREB

La protéine CREB, une protéine de 43 kDa, est un des facteurs de transcription les mieux caractérisés. Ce facteur est activé en réponse à différents stimuli comme des facteurs de croissance ou des hormones qui, après liaison à un récepteur membranaire, modifient le taux d'AMPc dans la cellule. Tous ces signaux conduisent à une activation de CREB par une phosphorylation de la sérine 133 (Ser133). A côté de la PKA, de nombreuses kinases comme les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et les CaMK sont capables de phosphoryler CREB lorsqu'elles sont actives (Mayr and Montminy, 2001). CREB fait partie de la superfamille des protéines *basic domain leucine-zipper (bZIP)*, dont font également partie les facteurs de transcription ATF-1 (*Activated-Transcription Factor*) et CREM (*cAMP-Responsive Element Modulator*). Il se lie sous une forme homodimérique ou hétérodimérique avec ATF-1 ou CREM à la séquence consensus TGACGTCA appelée CRE (*cAM-Responsive Element*) (Yamamoto et al., 1988). CREB est formé de deux domaines riches en glutamine (Q1 et Q2) entourant le domaine KID (*Kinase Inducible Domain*) dans lequel se trouve le



Figure 1.15 : Schéma illustrant la liaison des facteurs NRF-1 et NRF-2 à leur séquence nucléotidique consensus dans le promoteur de gènes cibles.

A) NRF-1 se trouve sous forme phosphorylée dans les cellules en croissance et lie, sous la forme d'homodimères, un site palindromique riche en GC.

B) NRF-2 est constitué d'une sous-unité α contenant un domaine de liaison à l'ADN et de sous-unités β ou γ . Ces dernières ne se lient pas à l'ADN mais s'associent à la sous-unité α (D'après Scarpulla, 2002).

résidu sérine phosphorylable ainsi que de multiples sites potentiels de phosphorylation pour diverses kinases. L'activité de CREB pourrait donc être modulée par des phosphorylations additionnelles sur d'autres résidus que la Ser133, mais cette hypothèse n'est pas démontrée à l'heure actuelle. Des études ont montré que la formation des dimères était indépendante de l'état de phosphorylation de la ser133 mais qu'elle était fortement induite par la présence de séquence CRE (Wu et al., 1998). La phosphorylation de la Ser133 dans le domaine KID conduit à une augmentation de l'action transactivatrice de CREB par le recrutement de la protéine CBP. Ce co-facteur s'associe à CREB phosphorylé (Chrivia et al., 1993) et sert de pont moléculaire permettant au facteur de transcription de recruter et de stabiliser le complexe ARN polymérase II sur la boîte TATA comme représenté à la figure 1.16 (Montminy, 1997).

1.4.2.1.3 Les récepteurs nucléaires

On a longtemps pensé que les facteurs HNF (*Hepatocyte Nuclear Factor*) étaient exclusivement et spécifiquement exprimés dans le foie et participaient au contrôle de l'expression de gènes codant pour des apolipoprotéines, les cytochromes P450,... (Wang et al., 2000). Très récemment, l'expression ubiquiste de ces facteurs et leur rôle clé dans la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des acides gras ainsi que l'effet de la surexpression de dominants négatifs de ces facteurs sur la production d'ATP mitochondriale ont été rapportés dans la littérature (Leclerc et al., 2001; Taylor et al., 1996). Ces données ont suscité un intérêt pour l'étude des facteurs HNF dans le contrôle de l'expression de gènes codant pour des enzymes mitochondriales (Wang et al., 2000).

Le promoteur de nombreux gènes codant pour des protéines mitochondriales ou non est régulé par des GRU (*Glucocorticoïd Response Unit*). En effet, pour rendre compte de la difficulté de la régulation de la transcription de gènes, les auteurs parlent maintenant très souvent d'unité de réponse dans les promoteurs que l'on peut définir comme étant un ensemble de sites reconnus par des facteurs de transcription différents et ayant parfois des actions coordonnées (Hood, 2001). C'est notamment le cas du gène de la PEPCK (*PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase*) codant une enzyme de la néoglucogenèse qui contient des sites consensus pour les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) ainsi que des sites pour des facteurs nucléaires comme HNF-4 α et HNF-3 (Herzig et al., 2001). On retrouve également des sites de liaison possible pour les facteurs HNF, en plus des sites CRE, dans le CRU (*cAMP-Responsive Unit*) du gène codant la CPT-1 (Louet et al., 2002). Nous nous sommes donc intéressés à l'abondance et à la liaison à l'ADN de certains facteurs HNF dans le cadre de ce travail sur la mitobiogenèse dans les cellules déplétées en ADNmt.

1.4.2.1.3.1 HNF-4α

Le facteur de transcription HNF-4 α (*Hepatocyte Nuclear Factor-4\alpha*) (54 kDa) fait partie de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes à laquelle appartiennent également les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux acides rétinoïques. Ce facteur possède un domaine de liaison à l'ADN en doigts de zinc (Sladek et al., 1990). HNF-4 α se lie à l'ADN exclusivement sous la forme d'homodimères (Jiang et al., 1997) au niveau d'une séquence de reconnaissance composée d'une répétition directe de six nucléotides séparés par un nucléotide et appelée DR1 pour *Direct Repeat 1* (RG(G/T)TCAnRG(G/T)TCA) (Louet et al., 2001).

Les facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires, présentés à la figure 1.17 pour HNF-4 α , possèdent une structure contenant six domaines (A-F). Les deux domaines de dimérisation sont localisés dans les régions A/B et E/F. Le premier domaine de dimérisation est indépendant de ligands comme les acides gras contrairement à la seconde. Il semble également que la région E (aussi appelée LBD : *Ligand-Binding Domain*) empêche la formation d'hétérodimères et stabilise la liaison à l'ADN (Jiang et al., 1997). La région C contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD : *DNA-Binding Domain*) composé de deux



Figure 1.16: Schéma de l'interaction entre le facteur CREB phosphorylé et la machinerie de transcription médiée par le co-activateur CBP.

CREB se lie à l'ADN sur un site CRE et interagit par son domaine riche en glutamine (Q) avec TFIID (ou TBP). La sérine 133 est alors phosphorylée (P) par une kinase et CREB-P recrute le co-activateur CBP. Ce dernier interagissant également avec l'ARN polymérase II pour activer la transcription (D'après Montminy, 1997).



Figure 1.17: Représentation de la structure la protéine HNF-4α.

La protéine contient six domaines (A-F) : la région A/B N-terminale contient la fonction de trans-activation AF-1 indépendante de la présence de ligands. La région C contient un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé et composé de deux motifs en doigt de zinc. La région E contient le LBD, le domaine de dimérisation, et le domaine de trans-activation AF-2. Les fonctions précises des domaines D et F ne sont pas encore connues, on sait cependant que le domaine D peut interagir avec des co-répresseurs (D'après Hadzopoulou-Cladaras, 1997).

motifs en doigts de zinc. Les fonctions des régions D et F restent encore inconnues à ce jour (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997).

En 1998, Hertz *et al.* ont proposé comme hypothèse que l'activité transactivatrice de HNF-4 α pourrait être modulée par sa liaison à des acides gras et donc que l'activité de ce facteur serait régulée par des ligands (Hertz et al., 1998). Selon des études de cristallographie récentes, il semble, en effet, que HNF-4 α se lie à des acyls-CoA de façon constitutive (Wisely et al., 2002) et que la structure secondaire de HNF-4 α , et donc son action transactivatrice, est altérée par la nature saturée ou poly-insaturée de l'acide gras lié (Petrescu et al., 2002).

Ajoutons encore que la présence d'oxide nitrique (NO), dont nous montrerons l'importance dans la mitobiogenèse au point 1.4.5, diminue la liaison de HNF-4 α à l'ADN en modifiant son domaine de liaison à l'ADN par la nitrosylation des cystéines (Vossen and Erard, 2002).

Les modes de régulation complexes de l'activité transactivatrice de HNF-4 α font l'objet de nombreuses recherches. Ainsi, il a été démontré que HNF-4 α pouvait être phosphorylé par la PKA (Viollet et al., 1997) et par l'AMPK (Leclerc et al., 2001). La phosphorylation de HNF-4 α par l'AMPK sur la sérine 304 entraîne une déstabilisation du dimère et donc une diminution de la liaison à l'ADN ainsi qu'une augmentation du taux de dégradation du facteur de transcription (Hong et al., 2003).

Il a également été montré que HNF-4 α est impliqué dans l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du glucose et la sécrétion de l'insuline dans les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques (Wang et al., 2000). Des mutations de ce facteur sont donc responsables de MODY 1 (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), une forme monogénique de diabètes de type II caractérisée par un déficit de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. Dans ces cellules, il a été montré que HNF-4 α était également nécessaire pour activer la transcription de gènes impliqués dans la néoglucogenèse comme la PEPCK ou la glucose-6-phosphatase (G6Pase) (Rhee et al., 2003). L'importance d'HNF-4 α vient aussi du fait qu'il régule l'expression d'un autre facteur de transcription impliqué dans le métabolisme du glucose : HNF-1 α (Yamagata et al., 1996).

1.4.2.1.3.2 HNF-1α

Le facteur de transcription HNF-1 α (*Hepatocyte Nuclear Factor-1* α) a été nommé ainsi en raison de son apparente spécificité d'expression dans les hépatocytes. En effet, il est capable de se lier au promoteur de nombreux gènes exprimés spécifiquement dans les hépatocytes comme les gènes codant l'aldolase B, l' α anti-trypsine ou l'albumine (Mendel and Crabtree, 1991). Ce facteur de transcription a cependant été trouvé dans un certain nombre de tissus non-hépatocytaires comme les reins, l'estomac et les intestins (Baumhueter et al., 1990). Sa séquence consensus de liaison à l'ADN est de type palindromique (GTTAATnATTAAC) (Mendel and Crabtree, 1991), mais HNF-1 α peut former des hétérodimères avec des facteurs de transcription comme MyoD ou Fos/Jun.

HNF-1 α a été montré comme participant à la régulation de gènes impliqués dans la néoglucogenèse comme la PEPCK (Cassuto et al., 2003) ou l'insuline (Wang et al., 1998).

En raison du rôle important des kinases CKII et AMPK dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription NRF-1 et HNF-4 α (deux facteurs étudiés dans ce travail) et de leur rôle de « senseur » du niveau énergétique de la cellule, les activités de ces deux kinases dans les cellules déplétées en ADNmt ont été dosées *in vitro* après immunoprécipitation. Nous allons maintenant décrire très brièvement ces deux enzymes.

1.4.2.1.3.2.1 AMPK

L'AMPK est un membre de la famille des sérine/thréonine kinases et est formée d'une sous-unité α (63 kDa) catalysant, lorsqu'elle est activée par une phosphorylation sur la thréonine 172, le transfert d'un phosphate de l'ATP vers une protéine cible. L'AMPK est



Figure 1.18 : Implication de l'AMPK dans le maintien de l'équilibre énergétique de la cellule.

Lorsque la concentration en AMP augmente et/ou que la concentration en créatine phosphate (CP) diminue, l'AMPK est activée par l'AMPKK (ou par l'utilisation d'AICAR métabolisé en ZMP) et phosphoryle différentes protéines afin d'inactiver les processus métaboliques consommant de l'énergie et d'activer les processus produisant de l'énergie (D'après Winder, 2000).

également composée de deux sous-unités régulatrices β (38 kDa) et γ (35 kDa) {Davies, 1994 #253}. Notons que la sous-unité β peut être modifiée post-traductionnellement par des phosphorylations et des myristylations lui permettant de réguler l'activité catalytique de l'AMPK tandis que l'AMP, un activateur allostérique de l'AMPK, se fixerait au niveau de la sous-unité γ (Aschenbach et al., 2004).

L'AMPK est un senseur de l'état énergétique de la cellule et est activée suite à une hausse du rapport AMP/ATP dans la cellule (Moore et al., 1991). La figure 1.18 présente les différents rôles de l'AMPK. Cette activation déclenche des réponses cellulaires ayant pour but d'augmenter la production d'ATP par la β -oxydation et la glycolyse et de diminuer la consommation d'ATP par les voies consommatrices comme synthèse d'acides gras qui est inhibée. In vitro, la liaison de l'AMP à l'AMPK déclenche l'activation allostérique de cette dernière et en fait un meilleur substrat pour l'AMPKK (AMPK Kinase) tout en diminuant son affinité pour les phosphatases comme PP-2C (Protein Phosphatase-2C). L'activation de l'AMPK est encore augmentée par la phosphorylation sur sa thréonine 172. L'AMPK activée phosphoryle alors de nombreuses enzymes comme l'ACC (Acetyl CoA Carboxylase), l'enzyme formant le malonyl CoA, un inhibiteur de la CPT-1. L'AMPK peut également être activée artificiellement par l'utilisation d'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside), qui, une fois métabolisé en ZMP, un analogue de l'AMP, peut activer l'enzyme. Winder et al. ont montré que la stimulation de l'activité de l'AMPK par l'AICAR avait pour conséquence une augmentation de l'expression des protéines mitochondriales telles que le cytochrome c et la δ -ALAS (δ Amino-Levulinate Synthase) (Winder et al., 2000).

1.4.2.1.3.2.2 CKII

La CKII est formée de 2 sous-unités catalytiques (α et/ou α ') et de deux sous-unités régulatrices (β) contenant un domaine d'autophosphorylation. La partie régulatrice semblerait avoir un rôle essentiel dans l'assemblage du tétramère ainsi que dans l'activité catalytique du complexe (Litchfield, 2003). Elle fait partie de la famille des sérine/thréonine kinases et est activée par des composés chargés positivement comme les polyamines. La CKII a été localisée dans le noyau et le cytosol, ou en association avec des structures comme la membrane plasmique, le RE, les ribosomes,... Elle est essentielle pour la viabilité cellulaire et son activité est pléiotropique étant donné qu'on a recensé à l'heure actuelle près de 160 substrats de cette kinase, parmi lesquels le facteur de transcription NRF-1 (Gugneja and Scarpulla, 1997).

1.4.2.1.4 Le co-activateur PGC-1α

La protéine PGC-1 α (*PPAR* γ coactivator-1 α) a été impliquée dans de nombreuses réponses biologiques comme l'homéostasie de l'énergie cellulaire, la thermogenèse adaptative et le métabolisme du glucose. Ce co-activateur fait partie d'une famille comportant également PGC-1 β et PRC (*PGC-1-Related Coactivator*). Toutes ces protéines possèdent un haut degré d'homologie à leurs extrémités N- et C-terminales dans lesquelles on trouve respectivement le motif d'interaction (LXXLL) pour différents facteurs de transcription et la séquence de liaison à l'ARN (Puigserver and Spiegelman, 2003).

Découvert initialement dans le cadre de la thermogenèse adaptative, le co-activateur PGC-1 α est décrit comme étant fortement surexprimé dans les tissus musculaires et adipeux bruns en cas d'expositions prolongées au froid (Wu et al., 1999). La surexpression de PGC-1 α et son interaction avec le facteur de transcription PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* γ) ont pour conséquence l'activation de l'expression d'UCP-1 ainsi que la surexpression de gènes codant pour des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Mootha et al., 2003; Moyes, 2003; Puigserver et al., 1998).

Le rôle essentiel du co-activateur PGC-1 α dans la mitobiogenèse a alors pu être élargi. En effet, il a été démontré que PGC-1 α interagit également avec de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la mitobiogenèse et notamment le facteur de transcription NRF-1



Figure 1.19 : Régulation de l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales impliquées dans la mitobiogenèse par le co-activateur PGC-1 α .

L'activation de récepteurs membranaires, comme le récepteur β -adrénergique, déclenche des cascades de signaux impliquant la PKA et la p38-MAPK. La PKA activée permettra l'activation de CREB, permettant l'induction de l'expression du gène PGC-1 α , tandis que p38-MAPK phosphorylera PGC-1 α . Ce dernier peut alors participer à l'activation de l'expression du gène codant mtTFA et de nombreux peptides de la chaîne respiratoire par sa liaison à et l'activation du facteur NRF-1. mtTFA pourra alors être transloqué dans la mitochondrie où il contrôlera la transcription et la réplication du génome mitochondrial (Puigserver, 2003 #226).

participant au contrôle de l'expression du gène mtTFA (Wu et al., 1999). Ces auteurs démontrent également que la surexpression de PGC-1 α dans des cellules musculaires a pour effet d'induire la mitobiogenèse et donc d'augmenter la capacité respiratoire de ces cellules (voir figure 1.19). PGC-1 α est également impliqué dans la régulation de l'expression de gènes nucléaires qui codent pour des protéines mitochondriales assurant d'autres fonctions que la respiration. Par exemple, Louet *et al.* ont mis en évidence un rôle de PGC-1 α dans la régulation de l'expression de la CPT-1, l'enzyme catalysant l'étape limitante de l'entrée des acyls-CoA dans la mitochondrie. Mécanistiquement, son effet est expliqué par son interaction avec le facteur de transcription HNF-4 α pour lequel un site de fixation est présent dans la CRU du promoteur de la CPT-1 (Louet et al., 2001).

L'expression de PGC-1 α est donc induite tant dans le mécanisme de thermogenèse adaptative qu'en réponse à un exercice musculaire prolongé, stimulant les capacités respiratoires et la biogenèse des mitochondries de la cellule musculaire (Goto et al., 2000). Dans ce contexte, il a récemment été mis en évidence que l'expression de PGC-1 α dans les muscles squelettiques était liée à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et à l'activation subséquente de kinases comme la CaMKIV et de phosphatases comme la Calcineurine A (Handschin et al., 2003). Ces deux enzymes modulent l'activité de facteurs de transcription comme CREB et MEF-2C qui contrôlent, avec NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), la transcription du gène PGC-1 α . Ces mécanismes, ainsi que la boucle auto-régulatrice de PGC-1 α sur sa propre expression, sont présentés à la figure 1.20.

PRC ,une protéine homologue de PGC-1 α , est également capable d'interagir avec NRF-1 et NRF-2 mais cette protéine ne possède pas la même répartition d'expression tissulaire que PGC-1 α . Il semblerait que PRC coordonne l'activité de multiples facteurs de transcription engagés dans la croissance cellulaire (Scarpulla, 2002).

Finalement, *in vivo*, le processus complexe de la mitobiogenèse est également soumis à des contrôles par les hormones

1.4.2.2 Hormones glucocorticoïdes et thyroïdiennes

Dans les cellules musculaires C2C12, un effet important des glucocorticoïdes est d'activer l'expression de gènes nucléaires codant pour la cytochrome c oxydase, ayant comme conséquence d'augmenter la population et la respiration mitochondriale dans ces cellules (Weber et al., 2002).

De plus, l'abondance de la population mitochondriale est également contrôlée par les hormones thyroïdiennes, principalement la triiodo-L-thyronine (T3) (Goglia et al., 1999).

1.4.3 IMPORTATION DES PROTEINES MITOCHONDRIALES

Comme nous l'avons vu, le processus de biogenèse mitochondriale assurant le maintien ou l'ajustement de l'abondance de la population mitochondriale est complexe et nécessite l'expression coordonnée de plusieurs centaines de gènes répartis dans les génomes nucléaires et mitochondriaux. Les abondances et rapports stoechiométriques entre les protéines mitochondriales codées par les deux génomes doivent également être finement régulés au niveau transcriptionnel et traductionnel (Moyes, 2003). Une fois la synthèse des protéines effectuée, le processus d'importation des protéines précurseurs dans la mitochondrie doit faire face à deux problèmes majeurs. Tout d'abord, les protéines codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol doivent être dirigées de façon spécifique vers la mitochondrie et adressées au bon compartiment mitochondrial. Deuxièmement, les protéines matricielles déjà repliées doivent traverser les deux barrières hydrophobes constituées par les deux membranes mitochondriales (Roise and Schatz, 1988).

On distingue en fait quatre types de pré-protéines mitochondriales : les pré-protéines destinées à la MME, celles affectées à l'espace inter-membranaire, celles qui s'insèrent dans



Figure 1.20: Modèle des voies de signalisation reliant l'exercice musculaire à la stimulation de la mitobiogenèse et boucle de régulation positive de PGC-1 α sur le contrôle de sa propre expression.

L'exercice musculaire induit l'augmentation intracellulaire de calcium qui active la CaMKIV et la CnA (Calcineurine A). La CaMKIV activée peut alors activer le facteur CREB lié au promoteur de PGC-1 α . Elle peut également, en coopération avec CnA, activer le facteur MEF-2 en dissociant les inhibiteurs HDAC et Cabin 1. PGC-1 α néo-synthétisé peut alors coactiver MEF-2 et donc réguler sa propre transcription en entrant en compétition avec HDAC et Cabin 1 pour lier MEF-2 (D'après Handschin et al., 2003).



Figure 1.21 : Schéma illustrant les effecteurs de l'importation des protéines matricielles dans la mitochondrie.

La séquence NH2-terminale chargée positivement est reconnue par des récepteurs membranaires du complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane) (Tom 20 et Tom 70) et la protéine précurseur est transloquée dans l'espace inter-membranaire par les protéines Tom 40- 5-6-7 formant le GIP (General Import Pore). Le canal étant formé par la protéine transmembranaire Tom 40. Le passage vers la matrice se fera ensuite par le complexe TIM (Translocase of the Inner Membrane) constitué par les protéines Tim 23 et 17. Le transport à travers la MMI nécessite la présence d'un $\Delta\psi$ m et de la mtHsp70 dont l'activité nécessite de l'ATP. La pré-séquence sera alors clivée par la MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) et la protéine prendra sa conformation fonctionnelle grâce à la co-chaperonne Mge1 (D'après Matouschek et al. 2000).

la MMI et enfin, les pré-protéines importées dans la matrice. En fonction de la localisation finale de la protéine à importer, deux types de signaux différents portés par les pré-protéines permettent d'assurer l'importation et l'adressage correct des pré-protéines. Il s'agit, pour la plupart des protéines à destination matricielle, de pré-séquences hydrophobes et chargées positivement localisées au niveau de l'extrémité NH₂-terminale qui sont composées d'acides aminés basiques et hydroxylés. Par contre, la plupart des protéines distribuées dans les membranes mitochondriales possèdent, quant à elles, des séquences de reconnaissance internes présentent dans la séquence primaire de la protéine et correspondant aux domaines transmembranaires de la protéine (Brix et al., 1997). Nous ne développerons ici que les mécanismes d'importation des protéines mitochondriales matricielles qui sont présentés à la figure 1.21.

La pré-séquence des protéines matricielles, pour lesquelles on ne retrouve pas de séquence en acides aminés consensus strictement conservée, est reconnue par des récepteurs de la MME (TOM 22, TOM 70) (Endo and Kohda, 2002; Roise and Schatz, 1988). Les récepteurs et le GIP (General Import Pore) s'assemblent alors en un grand complexe appelé TOM (Translocase of the Outer Membrane) avant que la pré-protéine ne soit transloquée à travers la MME par le GIP (ou Tom 40). Les complexes TOM déplieront les protéines précurseurs repliées et les transfèreront dans l'espace inter-membranaire où elles seront prises en charge par les complexes TIM (Translocase of the Inner Membrane) (Schwartz et al., 1999). Une fois dans l'espace inter-membranaire, les pré-protéines seront importées dans la matrice mitochondriale via le complexe TIM 23 où elles sont prises en charge par la mtHsp70 (mitochondrial Heat shock protein 70), ce qui permettra l'introduction complète de la préprotéine dans la matrice mitochondriale. Ce processus est dépendant de l'ATP. L'importation dans la matrice des pré-protéines mitochondriales dont l'extrémité NH2-terminale est chargée positivement est donc dépendante de deux forces motrices : l'existence d'un Aym qui facilite l'importation et l'ATP utilisé par la mtHsp70 pour la progression des pré-protéines dans la matrice.

C'est donc au niveau des complexes TIM regroupés dans la MMI que les protéines à destination matricielle ou membranaire seront ségrégées. La translocation de la protéine par TIM 23 assure l'adressage matriciel alors que TIM 22 permet l'insertion de la protéine dans la MMI (Milenkovic et al., 2004). Finalement, la protéine sera maturée par l'action de différents complexes matriciels: la MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*) qui clivera la préséquence d'adressage, et les Hsp60 ainsi que des prolyl-isomérases qui aideront la protéine à prendre sa conformation fonctionnelle (Hong et al., 2003; Pfanner and Chacinska, 2002).

Récemment deux voies moléculaires essentielles ont été décrites pour expliquer par exemple la biogenése mitochondriale induite dans les cellules musculaires squelettiques par la contraction. Ces deux voies passent par la surexpression du co-activateur PGC-1 α : il s'agit des voies de la CaMKIV-CREB (Wu et al., 2002) et du NO (Nisoli et al., 2003).

1.4.4 VOIE CAMKIV-CREB DANS LA MITOBIOGENESE

Une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium correspond à un signal régulant diverses réponses cellulaires passant souvent par le complexe formé par la calmoduline et le calcium (Ca²⁺/CaM). Ces complexes peuvent moduler la fonction de nombreuses sérine/thréonine kinases comme les MAPK et les CaMK. La famille des CaMK est composée de plusieurs membres dont la CaMKII et la CaMKIV et leur kinase activatrice, la CaMKK (*calcium/calmoduline-dependent protein Kinase Kinase*). Tous les membres de cette famille sont des enzymes constituées d'un domaine catalytique adjacent à une région régulatrice contenant un domaine d'auto-inhibition (AID) et un domaine liant la calmoduline (CBD). C'est la liaison du complexe Ca²⁺/CaM au CBD qui, en changeant la conformation du domaine AID, permet l'activation de la kinase. Un schéma représentant la structure de la CaMKIV est présenté à la figure 1.22 (Soderling, 1999). L'activation des CaMK nécessite



Figure 1. 22 : Schéma illustrant les différents domaines des CaMK.

Les membres de la famille des CaMK sont constitués d'un domaine catalytique couplé à une région régulatrice contenant un domaine auto-inhibiteur (AID) et un domaine liant la calmoduline (CBD) [D'après Soderling, 1999]

donc trois évènements distincts. Premièrement la liaison du complexe Ca²⁺/CaM, suivie de la phosphorylation du résidu Thr200 par la CaMKK et finalement l'auto-phosphorylation des résidus Ser12 et Ser13 (Chatila et al., 1996).

L'activité de la CaMKIV est également régulée par l'action de la PP2A (Protein Phosphatase 2A) ou la CaMKP (calcium/calmoduline dependent protein Kinase Phosphatase), deux phosphatases qui diminuent l'activité de l'enzyme (Ishida et al., 2003). La CaMKIV est capable de réguler la transcription de nombreux gènes de par son action activatrice sur les facteurs de transcription CREB, CREMT, SRF (Serum Responsive Factor) ou encore ATF-1 (Chatila et al., 1996) et est impliquée dans de nombreux phénomènes tels que la régulation de l'apoptose, l'homéostasie du calcium, ...(Anderson et al., 1997). De plus, très récemment, un rôle essentiel de cette enzyme dans l'activation de la mitobiogenèse dans des cellules du muscle squelettique soumises à l'exercice de contraction ou à des stimulations électriques qui augmentent la [Ca²⁺], a été démontré (Wu et al., 2002). En effet, ces auteurs ont montré, par des analyses utilisant des damiers à ADN, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la mitobiogenèse ainsi que dans la réplication de l'ADNmt dans des cellules de muscles squelettiques de souris transgéniques qui surexpriment spécifiquement une forme constitutivement active de la CaMKIV dans ces cellules. Cette activation de gènes est régulée par l'expression du co-activateur PGC-1a et induite par la phosphorylation activatrice de CREB ou MEF-2 par la CaMKIV. La forme constitutivement active de la CaMKIV utilisée dans cette étude est une version tronquée de l'enzyme ne possédant plus le domaine COOH-terminal auto-inhibiteur (AID) et rendant donc l'activité de l'enzyme indépendante des complexes Ca2+/CaM.

1.4.5 ROLE DU NO DANS LA MITOBIOGENESE

Le NO joue un rôle important dans la transduction du signal. Le NO ou EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*) est produit dans la cellule par une réaction d'oxydation de la L-arginine en L-citrulline catalysée par une NO synthase (NOS) (Palmer et al., 1988). Le NO est un activateur de la guanylate cyclase, enzyme catalysant la conversion de GTP en cGMP.

On distingue trois isoformes de NOS selon qu'elles sont inductibles (iNOS) ou non (formes endothéliale et neuronale de NOS : eNOS et nNOS) ou que leur activité est dépendante (eNOS et nNOS) ou non (iNOS) du calcium (Alderton et al., 2001).

L'équipe de Giuvili a démontré que la mitochondrie était également une source potentielle de NO, et cela suite à la présence d'une isoforme mitochondriale de la NOS (mtNOS) (Giulivi, 1998). Celle-ci serait une forme modifiée post-traductionnellement de la nNOS et est localisée à proximité de la cytochrome c oxydase. Cette localisation a son intérêt puisqu'il a été démontré que le NO entre en compétition avec l'oxygène pour la liaison au complexe IV de la chaîne respiratoire et que l'inhibition de ce complexe, et donc de la respiration mitochondriale, produit de nombreux radicaux libres dérivés de l'oxygène (Cleeter et al., 1994; Elfering et al., 2002).

Récemment, l'équipe de Nisoli utilisant des molécules donneuses de NO comme le S-NitrosoAcetyl Penicillamine (SNAP) a montré que le NO joue un rôle dans la biogenèse de la mitochondrie dans des adipocytes bruns via l'activation d'une cascade dépendante de la guanylate-cyclase soluble (Nisoli et al., 2003). Celle-ci induit également, par un mécanisme encore inconnu, l'expression du gène codant pour le co-activateur PGC-1 α , dont les effets notamment sur NRF-1 et mtTFA ont été décrits au point 1.4.2.1.4. La figure 1.23 montre le rôle potentiel du NO dans la mitobiogenèse et l'activité mitochondriale.



Figure 1.23 : Rôle du NO dans la mitobiogenèse et sur l'activité mitochondriale.

L'activation des récepteurs β -adrénergiques à pour conséquence une production de messagers secondaires comme l'AMPc et une agmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Cette augmentation induit la production de NO par la eNOS. Le NO active alors la production de GMPc. L'expression du co-activateur PGC-1 α est déclenchée par le GMPc. Il en résulte une augmentation des facteurs NRF-1 et mtTFA qui stimulent la mitobiogenèse et la respiration mitochondriale.

Dans le cas d'une activation de la iNOS, le NO produit aura pour effet d'inhiber la respiration ainsi que la production d'énergie (D'après Brown, 2003).

Nous terminerons cette introduction en insistant sur le fait que les organites communiquent entre eux au niveau moléculaire. C'est particulièrement vrai pour les mitochondries non fonctionnelles. En effet, nous savons maintenant que le dysfonctionnement mitochondrial active des voies de signalisation intracellulaire capables de conduire *in fine* à la modification de l'expression de nombreux gènes.

1.5 LA COMMUNICATION RETROGRADE INITIEE PAR LA MITOCHONDRIE NON FONCTIONNELLE

La communication moléculaire rétrograde est un processus par lequel les cellules répondent aux altérations de l'activité mitochondriale, comme l'absence d'ADNmt, par des changements dans l'expression de gènes nucléaires suite à l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Butow and Avadhani, 2004). Ces protéines sont ensuite synthétisées dans le cytosol des cellules déficientes pour la respiration et sont acheminées dans la mitochondrie. Ces données suggèrent donc que la mitobiogenèse est toujours active dans les cellules déplétées en ADNmt.

L'identification d'une voie rétrograde de communication moléculaire entre la mitochondrie non fonctionnelle a d'abord été mise en évidence dans les levures *Saccharomyces cerevisiae rho0* (déplétées en ADNmt). La voie de transduction impliquée dans cette communication intergénomique dépend de trois acteurs : Rtg-1 et Rtg-3, codant pour des facteurs de transcription de la famille bHLH et Rtg-2, un membre de la famille des heat-shock protéines impliqué dans la translocation de Rtg-1 et Rtg-3 dans le noyau (Sekito et al., 2000). Dans le noyau, ces facteurs activent plusieurs gènes, dont *CIT2*, l'isoforme peroxisomale de la citrate synthase {Liao, 1993 #146}.

Dans les cellules de mammifères ayant une production d'ATP compromise suite à une dépolarisation de la membrane mitochondriale (dissipation du potentiel $\Delta \psi m$) induite par la déplétion partielle en ADNmt ou un traitement des cellules avec des molécules découplantes (FCCP ou CCCP), on observe également une réponse rétrograde. En effet, dans les cellules dont l'activité mitochondriale est altérée, on observe une augmentation de la concentration en calcium cytosolique [Ca²⁺]c capable de réguler l'expression de nombreux gènes nucléaires par des voies dépendantes de kinases et de phosphatases comme la calcineurine (Figure 1.24). Parmi les gènes surexprimés en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial, on citera dans les cellules myoblastiques C2C12, des gènes codant des transporteurs au calcium du réticulum endoplasmique comme le récepteur ryanodine (RyR1) par une voie dépendante de la JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) ou de gènes codant des protéines stockant le calcium intracellulaire comme la calsequestrine (Amuthan et al., 2001; Biswas et al., 1999). Au laboratoire, nous avons également montré sur des cellules L929 rho, 143B rho0 et des cellules MERRF que l'augmentation de la [Ca²⁺]_c conduit à activer la CaMKIV responsable de la phosphorylation de CREB sur la Ser133 (Arnould et al., 2002). On le voit, en fonction des types cellulaires, l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique peut conduire à l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaires passant par des kinases (PKC, JNK, CaMKIV...) et des phosphatases comme la calcineurine qui modifieront l'état d'activation de nombreux facteurs de transcription (Figure 1.25).

Le NO est également considéré comme une molécule de signalisation importante intramitochondriale puisqu'elle inhibe la cytochrome c oxydase (Cleeter et al., 1994). Cette action indépendante de la voie cGMP est connue pour modifier le $\Delta \psi m$ et induire la production de radicaux superoxides (O₂⁻), H₂O₂ et autres ROS capables d'agir comme des messagers intracellulaires. En effet, les ROS jouent également un rôle dans la communication moléculaire rétrograde mitochondrie-noyau. En effet, la production accrue de ROS par la mitochondrie peut induire l'expression de certains gènes comme la glutathione peroxydase (Brambilla et al., 1997) ou le cytochrome c1 (Suzuki et al., 1998). L'expression de ces gènes



Figure 1. 24 : Communication moléculaire rétrograde entre la mitochondrie et le noyau.

La dissipation du potentiel de membrane, induite par différents stimuli tels que les ROS, la déplétion en ADNmt ou les ionophores, provoque une accumulation de calcium dans le cytosol des cellules qui activera diverses kinases et phosphatases capables d'induire l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales [D'après Butow, 2004].

est probablement sous le contrôle de facteurs de transcription dont l'activité est fonction de l'état redox de la cellule.

En conclusion, il semble donc que les voies de signalisation activées par un dysfonctionnement mitochondrial puissent conduire à modifier l'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines dont certaines participent à la mitobiogenèse comme les protéines des phosphorylations oxydatives (Marusich et al., 1997). Il a cependant été décrit, à de nombreuses reprises, que la surexpression de certains gènes codant des protéines de la chaîne respiratoire induite par la déplétion en ADNmt, pourrait résulter d'une augmentation de la stabilité des ARNm et ne nécessiterait pas un épisode d'activation de la transcription à un autre taux que le niveau basal (Hood, 2001).

Enfin, il est intéressant de constater que des voies de signalisation activées par un dyfonctionnement mitochondrial comme la voie calcium/calmodulin kinase IV et la voie du NO sont également, comme nous l'avons vu aux points 1.4.4 et 1.4.5, des mécanismes décrits pour rendre compte de la biogenèse mitochondriale dans de nombreux types cellulaires comme les cellules musculaires et les adipocytes bruns . Dans ce travail, nous allons nous intéresser à caractériser l'importance de ces voies en vue de rechercher leur rôle éventuel dans l'apparition et le maintien d'une structure mitochondriale dans des cellules déplétées en ADNmt présentant un dysfonctionnement mitochondrial.



Figure 1.25 :

L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique induite par un stress mitochondrial peut conduire à l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaires passant par des kinases (PKC, JNK, CaMKIV...) et des phosphatases comme la calcineurine qui modifieront l'état d'activation de nombreux facteurs de transcription (D'après Butow, 2004).

Contexte de la recherche et objectifs de ce mémoire

Recherches antérieures à ce mémoire

Un sujet de recherche portant sur la « communication moléculaire rétrograde » entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau a été lancé au sein de l'URBC. Ce projet vise à étudier les effets d'une inhibition mitochondriale sur l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales dans des cellules de mammifères, et à caractériser les effecteurs moléculaires (messagers secondaires, kinases, facteurs de transcription) capables de renseigner le noyau sur l'état d'activité de la mitochondrie. Les cellules déplétées totalement (rho0) ou partiellement (rho⁻) en ADNmt constituent un modèle d'étude couramment utilisé afin de mieux comprendre les implications moléculaires et cellulaires du dysfonctionnement mitochondrial (Chandel and Schumacker, 1999). Au laboratoire, nous travaillons sur des cellules L929 rho⁻ (issues d'un fibrosarcome murin) et des cellules 143B rho0 (provenant d'un ostéosarcome humain).

De manière surprenante, ces cellules maintiennent une biogenèse mitochondriale active. En effet, des structures mitochondriales sont toujours présentes et maintenues au cours des divisions cellulaires comme l'attestent les micrographies prisent en microscopie électronique à transmission et en microscopie confocale après un marquage des cellules avec la sonde fluorescente Mitotracker Red (Herzberg et al., 1993) (figure 1.26 A et B). De plus, les mitochondries des cellules déplétées en ADN mitochondrial possèdent toujours un certain potentiel de membrane plus faible que dans des mitochondries couplées et ce, malgré l'absence d'une chaîne de transporteurs d'électrons fonctionnelle. Une hypothèse présentée par Buchet *et al.* en 1998 propose que ce potentiel résiduel serait maintenu grâce à l'activité de l'ANT dans la MMI et d'une forme incomplète et dissociée de la Fo-F1 ATPsynthase (Buchet and Godinot, 1998). Dans ce modèle, la partie F1 de la Fo-F1 ATPsynthase exercerait une activité ATPasique qui pourrait générer de l'ADP³⁻, qui serait ensuite échangé contre de l'ATP⁴⁻ cytosolique, générant ainsi un partage de charges au niveau de la membrane mitochondriale interne et assurant un $\Delta \psi m$ (Appelby et al., 1999).

Récemment, nous avons pu mettre en évidence que le maintien du $\Delta \psi m$ des cellules déplétées en ADN mitochondrial était également dépendant du niveau d'expression d'un canal à chlore, mtCLIC, localisé au niveau de la MMI. La surexpression de ce canal à chlore dans les cellules déplétées en ADNmt est dépendante à la fois du facteur de transcription CREB et de p53, en aval d'une voie de signalisation induite par une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Arnould et al., 2003).

Cette voie de signalisation dépendante de la concentration élevée en calcium cytosolique dans les cellules déplétées en ADNmt a été décrite au laboratoire (Arnould et al., 2002). Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'activation constitutive de CREB suite à sa phosphorylation sur la Ser133 par la CaMKIV dans les cellules déplétées en ADNmt. On peut observer l'accumulation de CREB phosphorylé dans le noyau des cellules 143B rho0 après un marquage en immunofluorescence à la figure 1.27.



Figure 1.26

A) Microphotographies de mitochondries prises en microscopie électronique à transmission (MET) dans des cellules L929 et L929 rho- (flèches noires).

B) Microphotographies prises en microscopie confocale de cellules 143B et 143B rho0 marquées pour les mitochondries par une incorporation de la sonde fluorescente MitoTracker Red.



Figure 1.27 : Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la forme phosphorylée du facteur de transcription CREB (Ser133) dans des cellules 143B et 143B rho0.

Objectifs de ce mémoire

Ce mémoire entre dans le cadre de la thèse de Ludovic Mercy, qui a pour but de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans le maintien de la biogenèse mitochondriale dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial. Pour étudier ces voies et les mécanismes impliqués, nous nous intéressons à caractériser, par diverses techniques (Western blot, Tests de liaison à l'ADN TransAM, microscopie confocale et systèmes rapporteurs), l'état d'activation de facteurs de transcription pouvant jouer un rôle dans la biogenèse mitochondriale comme Sp1, PPAR γ , NRF-2, YY1, MEF-2 α , MyoD et CREB. La figure 1.28 présente une synthèse des résultats obtenus pour les différents facteurs de transcription déjà étudiés.

Le premier but de ce travail était donc de caractériser, dans les cellules déplétées en ADNmt, le niveau d'expression et l'état d'activité de nouveaux acteurs moléculaires connus pour ou suspectés jouer un rôle dans la biogenèse mitochondriale. Nous avons étudié le co-activateur PGC-1 α et les facteurs de transcription mtTFA, NRF-1, HNF-1 α et HNF-4 α ..

Dans un deuxième temps, nous avons également recherché l'état d'activation de kinases comme l'AMPK et la CKII. Ces deux kinases sont en effet décrites pour être capables d'interagir et de modifier l'activité de certains de ces facteurs comme NRF-1 et HNF-4 α .

De plus, l'activation du facteur de transcription CREB, connu pour réguler l'expression de plusieurs gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales et l'importance du calcium dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial ayant déja été démontrées (Arnould et al., 2002), nous avons tenté de rechercher un rôle éventuel de ce facteur dans le maintien de la biogenèse mitochondriale dans ces cellules.

Enfin, et sur base des résultats obtenus l'année dernière dans le cadre du mémoire de Cindy Gilquin (2003), qui portait sur la mise au point d'un test d'importation *in vitro* de protéines recombinantes marquées radioactivement dans des mitochondries isolées à partir de cellules parentales et déplétées en ADNmt, nous avons voulu comparer, dans ces cellules, l'importation *in vivo* (dans la cellule) de protéines mitochondriales recombinantes surexprimées adressées à la mitochondrie et visualisables en microscopie confocale.

	Western Blot	Immunofluorescence	Liaison à l'ADN	Système rapporteur
NRF-2		->		
Sp1	-			-
YY1	-	-	NR	\rightarrow
CREB	-	1	- -	*
ΡΡΑRγ	-	-		
МуоD	-	-		-
MEF-2α	_			_

Figure 1.28 : Représentation synthétique des résultats obtenus pour les études visant à caractériser l'état d'activation de différents facteurs de transcription connus pour ou suspectés jouer un rôle dans la mitobiogenèse (- : non test;, le sens des flèches indique une baisse, une équivalence ou une augmentation de l'effet observé dans des cellules L929 rho- par rapport à des cellules L929).

MATERIEL ET METHODES

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 CULTURE CELLULAIRE

Au cours de ce travail, nous avons utilisé différentes lignées de cellules sauvages contenant de l'ADN mitochondrial (L929 et 143B) et de cellules dérivées déplétées partiellement (L929 rho⁻) ou totalement (143B rho0) en ADN mitochondrial. Nous avons également utilisé des cellules cybrides issues de 143B rho0 repeuplées en mitochondries provenant de personnes saines (cybrides sauvages) ou atteint d'une mutation dans l'ADN mitochondrial (A8344G) affectant le gène codant pour l'ARNt^{Lys} et responsable de la pathologie MERRF (cybrides mutées).

Les cellules L929 et L929 rho⁻, provenant d'un fibrosarcome murin, nous ont été fournies par le professeur J. Grooten (Université de Gand, Belgique). La lignée L929 rho⁻ a été obtenue par un traitement chronique au bromure d'éthidium. En effet, cet agent intercalant inhibe l'hélicase et la polymérase γ mitochondriales (Radsak et al., 1971). Le génome des mitochondries n'étant plus répliqué, les copies restantes sont diluées au fur et à mesure des mitoses. Cette population de cellules non clonale contient donc des cellules possédant un degré de déplétion en ADNmt variable et est maintenue en permanence dans un milieu de sélection contenant du bromure d'éthidium (400 ng/ml) et de l'uridine (50 µg/ml). L'uridine est nécessaire à la cellule en raison du fait que la dihydroorotate déshydrogénase n'est plus active (voir introduction point 1.3.1).

Les cellules 143B et les cellules cybrides dérivées proviennent d'un ostéosarcome humain et nous ont été données par le professeur G. Attardi (California Institute of Technology, USA). La lignée de cellules déplétées en ADN mitochondrial qui en dérive (143B rho0) est clonale. La présence du bromure d'éthidium dans le milieu de culture n'est donc plus nécessaire. En raison de leur auxotrophie pour l'uridine, ces cellules nécessitent néanmoins toujours un apport d'uridine (50 μ g/ml).

La figure 2.1 présente des micrographies prises en microscopie à contraste de phase des différentes lignées cellulaires utilisées.

Les cellules sont maintenues en culture dans des boîtes de 75 cm² (Costar, USA) contenant 15 ml de milieu DHG (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose* : 4,5 g/l) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco BRL, Grande Bretagne). Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37 °C dont l'atmosphère contient 5 % de CO_2 et 95 % d'air humide (Heraus, Allemagne).

Les lignées cellulaires sont sous-cultivées 2 fois par semaine et, en raison du temps de doublement plus long pour les lignées déplétées en ADNmt ou mutées, sont ensemencées à une dilution de 1 : 8 pour les lignées parentales (L929, 143B et cybrides sauvages) et 1 : 6 pour les lignées déplétées ou mutées (L929 rho⁻, 143B rho0 et cybrides mutées).

2.1.1 SOUS-CULTURES.

Le milieu de culture est décanté. Les cellules sont ensuite rincées avec 10 ml de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) stérile préchauffé à 37 °C de composition : NaCl 0,9%, K_2HPO_4/KH_2PO_4 10 mM ; pH 7,4. Les cellules sont alors détachées de leur support avec 1 ml de trypsine (0,5 g/l dans une solution de Puck, Gibco, Grande Bretagne) et l'avancement de la trypsinisation est suivie au microscope à contraste de phase. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume adéquat de DHG contenant 10 % de SVF. Dans le cas des cellules L929 rho⁻, on ajoute 400 ng/ml de bromure d'éthidium et 50 µg/ml d'uridine dans le milieu de culture. Les cellules 143B rho0 et les cellules cybrides mutées nécessitent uniquement l'addition d'uridine à 50 µg/ml.

A





С

D



E



Figure 2.1: Microphotographies des différentes lignées cellulaires utilisées dans ce travail prises en microscopie à contraste de phase : L929 (A), L929 rho- (B), 143B (C), 143B rho0 (D), cybrides sauvages (E) et cybrides mutées (F).

MATERIEL ET METHODES

2.2 DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD.

Cette méthode permet de doser la concentration en protéines d'un échantillon par comparaison avec un étalon protéique dont la concentration est connue. Il se base sur une réaction entre le bleu de Coomassie G250 et les protéines de l'échantillon. En milieu acide, le colorant s'adsorbe sur les protéines et son pic maximal d'absorbance passe de 465 à 595 nm (Bradford, 1976).

En pratique, un volume de 2 μ l d'échantillon à tester est ajouté à 1 ml de colorant Bradford (BioRad, Allemagne) dilué 5 fois dans de l'eau désionisée puis filtré sur un papier Whatman 2 V (Whatman, Grande Bretagne). Un étalon BSA (*Bovin Serum Albumin*, Pierce, USA) de concentration connue (2 μ g/ μ l) et un blanc réalisé à partir d'un volume équivalent de tampon de lyse, sont également inclus dans le dosage. Les échantillons sont vortexés et leur absorbance à 595 nm est mesurée après des temps d'incubation de 5 à 15 min à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultraspec 2100 proUV/visible spectrophotometer).

La concentration en protéines des échantillons est déterminée grâce à l'étalon BSA par la formule suivante:

Concentration en protéines dans l'échantillon = $\left(\frac{Abs_{\acute{e}chantillon} - Abs_{blanc}}{Abs_{\acute{e}talon} - Abs_{blanc}}\right) \times 5 \,\mu g \,/ \,volume \,d'échantillon$

remarque: les 5 µg correspondent aux 2,5 µl d'étalon.

2.3 WESTERN BLOTTING.

Dans ce travail, la technique du Western blotting a été utilisée afin de rechercher l'abondance des protéines PGC-1 α , NRF-1, mtTFA, la forme phosphorylée de l'ACC (Ser79) et l' α -tubuline dans des lysats clairs préparés à partir de cellules L929, L929 rho⁻, 143B ou 143B rho0.

La technique du Western blotting a également été utilisée afin de rechercher l'abondance des protéines HNF-1 α , HNF-4 α et TBP (*TATA box Binding Protein*) dans des extraits de protéines nucléaires préparés à partir de cellules 143B et 143B rho0.

Cette technique a également été utilisée afin de contrôler les quantités de protéines AMPK et CKII immunoprécipitées au cours des tests d'activité kinase *in vitro* décrits au point 2.8.

2.3.1 PRINCIPE

Les cellules sont récupérées dans un tampon de lyse afin d'obtenir un lysat cellulaire et les échantillons sont chargés dans un gel de polyacrylamide. La migration des protéines dans le gel en une dimension et en présence de SDS se fait en fonction de leurs poids moléculaire (PM) dans un champs électrique. Le poids moléculaire de la protéine d'intérêt sera estimé par comparaison avec un étalon comportant un ensemble de protéines différentes de poids moléculaire connu.

Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène fluoride). Cette membrane est ensuite mise à bloquer dans une solution de lait afin de masquer tous les sites d'interactions non spécifiques avec les anticorps utilisés par la suite. La détection de la protéine d'intérêt se fait en utilisant un anticorps primaire dirigé contre un ou plusieurs de ses épitopes. Cet anticorps se fixe de façon proportionnelle à l'abondance de la protéine d'intérêt. Dans un deuxième temps, l'anticorps primaire est détecté par un anticorps secondaire reconnaissant son fragment Fc. L'anticorps secondaire est couplé à un système enzymatique permettant la révélation comme la peroxydase de raifort (HRP: *Horse Radish Peroxydase*).



Figure 2.2 : Réaction d'oxydation du luminol par la peroxydase. L'HRP (Horse radish peroxydase) oxyde le luminol en 3-aminophtalate en présence d' H_2O_2 . Les photons produits par la réaction iront imprimer un film autoradiographique.

MATERIEL ET METHODES

La révélation est faite en présence d'un substrat de l'enzyme et de luminol. Les photons libérés par la réaction imprimeront un film autoradiographique. Comme l'anticorps primaire se fixe de façon proportionnelle à l'abondance de la protéine, le signal, se trouvant dans la zone de linéarité d'exposition et avant saturation, sera lui aussi proportionnel à la quantité de la protéine d'intérêt présente sur la membrane.

2.3.2 PREPARATION DES LYSATS CELLULAIRES.

2.3.2.1 LYSATS CLAIRS

Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées 2 fois avec 10 ml de PBS à 4 °C. Les cellules sont ensuite récoltées dans un volume de tampon de lyse (40 mM Tris: pH 7,5, 300 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100) adapté à la boîte de culture (800 μ l par boîte de 75 cm²). Après une incubation de 30 min sur glace, les lysats sont centrifugés 15 min à 15000 rpm (4 °C) dans le but de sédimenter le matériel cellulaire non soluble dans le tampon de lyse. Le surnageant est récupéré et la concentration en protéines dans les lysats clairs ainsi obtenus est déterminée par la méthode Bradford décrite au point 2.2

2.3.2.2 EXTRAITS NUCLEAIRES

Pour les Western blot réalisés à partir d'extraits de protéines nucléaires, la méthode traitant de la préparation des échantillons est décrite au point 2.5.2.3.

2.3.2.3 IMMUNOPRECIPITATS

Pour les Western blot réalisés à partir des lysats obtenus après immunoprécipitation de l'AMPK ou de la CKII, la méthode traitant de la préparation des échantillons est décrite au point 2.8.2.2.

2.3.3 PREPARATION DES ECHANTILLONS

Au terme des différentes incubations ou transfections, un volume de lysat cellulaire clair correspondant à 20 μ g de protéines est prélevé et porté à 36 μ l avec du tampon de lyse et 7 μ l de *Laemmli Sample Buffer* (0,5M Tris, pH 6,8, 20 % SDS, 20 % glycérol, 1 % bleu de bromophénol, 20% bromo-mercaptoéthanol) (Laemmli, 1970) ou 9 μ l de *Sample Buffer* NuPAGE (Invitrogen, USA). Les échantillons sont ensuite portés à 70 °C pendant 15 min et centrifugés 3 min à 13000 rpm avant d'être chargés dans les puits d'un gel NuPAGE 4-12% (Invitrogen, USA).

Dans un des puits, on charge 10 µl d'étalon de poids moléculaire See Blue plus 2 (Invitrogen, USA) afin d'estimer le poids moléculaire des protéines d'intérêt.

2.3.4 MIGRATION SUR GEL

Les gels utilisés sont des "mini-gels" précoulés NuPage 4-12 % ou 10 % (Invitrogen, USA). Le tampon de migration, fourni dans le kit (*Running Buffer*, Invitrogen, USA) est dilué 20 fois dans de l'eau désionisée. On y ajoutera 0,25 % d'antioxydants (Invitrogen, USA). La migration s'effectue pendant 50 min sous une différence de potentiel constante de 200 V.

2.3.5 TRANSFERT DES PROTEINES SUR UNE MEMBRANE DE PVDF

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et un montage dit "en sandwich" est réalisé dans une cuve de transfert Novex (Mini Cell, Invitrogen, USA). Le montage est constitué d'éponges, de papier Whatman, d'une membrane de PVDF (polyvinylidène fluoride, Amersham, Grande Bretagne) et du gel. L'assemblage est placé pendant 2 h sous une différence de potentiel de 30 V et est immergé dans un tampon de transfert (*Transfer Buffer*, Invitrogen, USA) contenant 20 % de méthanol (Acros organics, Belgique) et 0,1 % d'antioxydants (Invitrogen, USA).

Anticorps	Mono/polyclonal	Origine	Dilution
Anticorps de lapin anti-pACC (Ser79)	polyclonal	Upstate	1000 X
Anticorps de singe anti-IgG de lapin	polyclonal	Amersham	2000 X
Anticorps de lapin anti-cytochrome c	polyclonal	Santa Cruz	2000 X
Anticorps de singe anti-IgG de lapin	polyclonal	Amersham	100 000 X
Anticorps de lapin anti-HNF-1a	polyclonal	Santa Cruz	1000 X
Anticorps de singe anti-IgG de lapin	polyclonal	Amersham	2000 X
Anticorps de lapin anti-HNF-4 α	polyclonal	Santa Cruz	1000 X
Anticorps de singe anti-IgG de lapin	polyclonal	Amersham	2 000 X
Anticorps de lapin anti-PGC-1α	polyclonal	Prof. D. Kelly (Washington University School, Washington, USA)	1000 X
Anticorps de singe anti-IgG de lapin	polyclonal	Amersham	2000 X
Anticorps de lapin anti-mtTFA	polyclonal	Prof. R.Wiesner (Institute of Vegetative Physiology, University of Köln, Allemagne)	1000X
Anticorps de singe anti-IgG de lapin	polyclonal	Amersham	2000 X
Anticorps de chèvre anti-NRF-1	polyclonal	Prof. R. Scarpulla (Northwestern University, Medical School, Chicago, USA)	2000 X
Anticorps de mouton anti-IgG de chèvre	polyclonal	Amersham	2000 X
Anticorps de souris anti-a-tubuline	monoclonal	Sigma	5000 X
Anticorps de chèvre anti-IgG de souris	polyclonal	Amersham	100 000 X
Anticorps de lapin anti-TBP	polyclonal	Santa Cruz	200 X
Anticorps de singe anti-IgG de lapin	polyclonal	Amersham	2000 X

Tableau 2.1: Liste des différents anticorps primaires et secondaires et de leur dilution utilisés dans ce travail pour les Western blot.

MATERIEL ET METHODES

2.3.6 INCUBATION DE LA MEMBRANE DE PVDF AVEC LES ANTICORPS ET REVELATION

Après le transfert, la membrane est mise à bloquer 2 h dans du TBS-T (*Tris Buffer Saline-Tween-20*) contenant 5 % de lait Gloria en poudre (Nestlé, Belgique). Le TBS-T est composé de 2,4 g/l de Tris-HCl: pH 7,4 ; 8 g/l de NaCl et 0,1 % de Tween-20 (Sigma Chemical, USA).

Au cours de ce mémoire, dans le but de rechercher l'abondance de facteurs de transcription ou de co-activateur impliqués dans la mitobiogenèse, nous avons utilisé des anticorps anti-NRF-1, anti-mtTFA, anti-PGC-1 α , anti-pACC, anti-AMPK, anti-CKII, anti- α -tubuline, anti-HNF-1 α , anti-HNF-4 α et anti-TBP dont les caractéristiques et dilutions sont présentées dans le tableau 2.1. Après une incubation de 2 h à température ambiante ou 16 h à 4 °C avec l'anticorps primaire, la membrane est rincée 3 fois 5 min dans du TBS-T contenant . 5 % de lait Gloria. Elle sera ensuite incubée 45 min avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (voir tableau 2.1). La membrane est alors rincée 3 fois 20 min avec du TBS-T.

La révélation est réalisée par une incubation de 5 min en présence de « SuperSignal Westpico Chemoluminescent Substrat », Pierce (USA) ou « ECL » (Enhanced ChemiLuminescence) Western blot kit (Amersham, Grande Bretagne). La réaction catalysée par la peroxydase est illustrée à la figure 2.2. La membrane est exposée à un film autoradiographique (Hyperfim, Amersham, Grande Bretagne). Le film sera ensuite passé successivement dans des bains de révélation (ILFORD imaging, Grande Bretagne), de rinçage et de fixation (ILFORD imaging, Grande Bretagne) puis sera rincé, séché, scanné et les densités optiques sont déterminées avec le programme TotalLab (Amersham Pharmacia Biotech).

Dans le cas de protéines cibles phosphorylées comme l'ACC (*Acetyl CoA Carboxylase*) phosphorylée sur la Ser79, les rinçages sont effectués dans du TBS-T à 0,07 % contenant 5 % de lait Gloria (Nestlé, Belgique) et 5 % de BSA (Sigma Chemical, USA).

2.4 TRANSFECTION TRANSITOIRE

Au cours de ce travail, la transfection transitoire a été utilisée dans le but de :

- 1. rechercher dans des cellules L929, L929 rho⁻, 143B et 143B rho0 l'état d'activité d'un gène rapporteur luciférase dont l'expression est placée sous le contrôle d'un fragment du promoteur de PGC-1.
- surexprimer dans des cellules L929 et L929 rho⁻ des dominants négatifs de CREB (K-CREB et M1-CREB) dont les modes d'action sont présentés à la figure 2.3.
- 3. surexprimer les protéines de fusion mNTH1-EGFP et mtHA-Apoaequorine (représentées à la figure 2.4) dans des cellules L929, L929 rho⁻, 143B 143B rho0 dans le but d'observer l'importation *in vivo* de protéines adressées à la mitochondrie.
- 4. rechercher l'état d'activité d'un gène rapporteur luciférase dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur authentique du mtTFA dans des cellules L929 surexprimant ou non le co-activateur PGC-1α.

Une liste des différents plasmides et constructions utilisés dans ce travail est présentée cidessous.





Figure 2.3: Représentation schématique des modes d'action des mutants dominants négatifs (M1-CREB, K-CREB, CaMKIV T200A) et actif (VP16-CREB).

M1-CREB dimérise avec lui-même et bloque le site de liaison à l'ADN afin que CREB endogène ne puisse se lier à l'ADN. M1-CREB n'est pas phosphorylable sur la Ser133. K-CREB réagit avec CREB endogène le rendant incapable de se fixer à sa séquence de liaison.

VP16-CREB est une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de CREB et le domaine de transactivation d'une protéine virale : VP16. Une fois lié à l'ADN, VP16-CREB est constitutivement actif.

2.4.1 Plasmides utilises au cours de ce travail

Dans ce travail, nous avons utilisé différentes constructions rapporteur-luciférase pour tenter de mettre en évidence une activation de certains facteurs de transcription dans les cellules déplétées en ADNmt. Les cellules ont donc été transfectées transitoirement avec ces plasmides rapporteurs codant pour le gène de la luciférase placé sous le contrôle de différents promoteurs authentiques ou synthétiques dont voici la liste:

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 *(CMV)* et nous a été fournie par le Prof. C. Cepko *(Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA)*;

Un vecteur pGL2 est également utilisé comme contrôle de transfection.

Un plasmide rapporteur pGL3-mPGC-Luc contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur tronqué de PGC-1 α murin, contenant un fragment de 230 paires de bases parmi lesquelles 170 se trouvent dans la région 5' qui flanque le site d'initiation de la transcription et 68 du 1^{er} exon du gène PGC-1 α . Cette construction nous a été donnée par le Dr Herzig (Peptide Biology Laboratories, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California);

Un plasmide codant pour des dominants négatifs de CREB : K-CREB présente une substitution d'une arginine par une leucine (Arg287Leu) et M1-CREB est une protéine mutée sur la sérine133 et ne peut donc plus être phosphorylée. Ces constructions nous ont été gracieusement données par le Prof. E.Greenberg (Children's Hospital, Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, 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 vecteur d'expression codant pour PGC-1α (PGC-1/pSV-SPORT) et une construction rapporteur luciférase dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur de mtTFA (mtTFA-RC4/pGL3). Ces deux constructions nous ont été données par le Prof. R. Scarpulla (Department of Cell and Molecular Biology, Northwestern University Medical School, Chicago, USA) et sont décrites dans : « Wu et al., Cell 1999, 98, 115-124 ».

Pour les tests d'importation de protéines mitochondriales, nous avons utilisé des vecteurs d'expression codant pour la pré-protéine Apoaequorine ou la protéine de fusion mNTH1-EGFP dont voici les descriptions :

Un plasmide (mtAEQ/pcDNAI) contenant le gène de l'apoaequorine, fusionné à une séquence *tag* constituée d'un épitope présent sur l'hémaglutinine (HA) et possédant une séquence d'adressage à la mitochondrie, issue du gène COX VIII (qui code pour la sousunité VIII de la cytochrome oxydase) (Molecular Probes);

Un plasmide pEGFP-N2 (Clontech) d'expression codant la mNTH1-EGFP : une protéine de fusion entre une forme mammalienne d'un orthologue de l'endonucléase III de *E. coli* de la famille des ADN glycosylase impliquée dans la première étape de l'excision de bases et la réparation de l'ADN (BER : base excision repair) et la







С

mNTH1-EGFP

NLS EGFP ∆

Figure 2.4 : A) Carte du vecteur pcDNAI. Ce vecteur contient un promoteur fort de type cytomégalovirus (pCMV) et les promoteurs T7 et Sp6. Il contient également un signal de processing et de polyadénylation (SV40 int/PA).

B) Représentation schématique de la strucure de la protéine de fusion mtAEQ : Insertion de l'apoaequorine portant une étiquette hémaglutinine (HA) fusionnée à la séquence d'adressage de la sous-unité VIII de la cytochrome c oxydase (MPS : *mitochondrial targeting pre-sequence*). (Molecular Probes, USA).

C) Représentation schématique de la structure de la protéine de fusion mNTH1-EGFP : La protéine de fusion mNTH1-EGFP comporte une séquence NLS ainsi qu'un site putatif d'importation mitochondrial (flèche). Elle est fusionnée à l'EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*).

A
Enhanced Green Fluorescence Protein. Cette protéine possède un NLS et une séquence d'adressage mitochondriale. Cette construction nous a été généreusement donnée par le Prof Seki (Department of Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama, Japon).

Ces différentes constructions ont été amplifiées dans la souche bactérienne *E. coli SURE* (*Stratagene, USA*), dont les membranes sont perméabilisées au CaCl₂ (bactéries « CaCl₂compétentes ») avant une transformation par choc thermique. Le plasmide codant pour la mNTH1-EGFP a été amplifié dans la souche bactérienne *E. coli* DH10B (*Invitrogen, USA*). La purification des constructions amplifiées par un kit « maxi prep » (Qiagen) permet de récupérer les plasmides qui, après mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 260 nm (Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne) et détermination de leur concentration seront utilisés dans les expériences de transfection au Superfect. Les techniques de transformation, d'amplification et de purification plasmidiques étant des techniques classiques de la biologie moléculaire, elles ne seront pas décrites ici.

2.4.2 PRINCIPE

La transfection est une technique qui consiste à faire incorporer de l'ADN exogène à des cellules eucaryotes. L'agent transfectant utilisé dans ce travail est le Superfect (Qiagen, Allemagne), un dendrimère polycationique de structure sphérique représenté à la figure 2.5. Cette molécule chargée positivement va lier les groupements phosphates de l'ADN, permettant la formation de complexes Superfect-ADN compacts possédant une charge nette positive.

2.4.3 METHODE

Les cellules L929, L929 rho⁻, 143B ou 143B rho0 sont ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits (Costar, USA). Les quantités totales d'ADN plasmidique utilisées sont de 1 μ g (ou 1,25 μ g) par puits. On y ajoutera 75 μ l de milieu DHG sans sérum. Le Superfect sera ajouté dans un rapport de 5 μ l d'agent transfectant pour 1 μ g d'ADN. La formation des complexes Superfect-ADN s'effectue pendant 15 min à température ambiante. Le DHG contenant 10 % de SVF sera ajouté après formation des complexes et le mélange sera réparti sur les cellules à raison de 1 ml par puits. La transfection est arrêtée après 6 h d'incubation dans une étuve à 37 °C dont l'atmosphère contient 5 % de CO₂ et 95 % d'air humide. Le milieu de transfection est finalement remplacé par 2 ml de DHG contenant 10 % de SVF. Le protocole de transfection utilisé est présenté à la figure 2.6.

2.4.3.1 RECHERCHE DE L'EXPRESSION DU GENE DE LA LUCIFERASE PLACEE SOUS LE CONTROLE D'UN FRAGMENT DU PROMOTEUR DE PGC-1α(-170/+68)

Afin de rechercher le niveau de la transcription du gène PGC-1 α dans les cellules déplétées en ADNmt, nous avons co-transfectés des cellules L929, L929 rho⁻, 143B ou 143B rho0 avec 0,5 µg d'un plasmide rapporteur codant pour le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur de PGC-1 α dont la structure est présentée à la figure 2.7 et 0,5 µg d'un plasmide codant pour une forme constitutivement active de CREB (VP16-CREB) ou d'un plasmide vide pGL2. Les cellules ont également été co-transfectées avec 0,25 µg d'un plasmide codant pour le gène de la β -galactosidase. Le gène de la luciférase sera exprimé en fonction de l'activité transactivatrice de facteurs se liant au promoteur tronqué de PGC-1 α .



Figure 2.5 : Représentation schématique de la structure du dendrimère polycationique utilisé comme vecteur de transfection (A) et de son interaction avec l'ADN (B). L'agent SuperFect (représenté par les billes) interagit avec l'ADN afin de former une structure circulaire compacte chargée positivement lui permettant de rentrer dans la cellule.

2.4.3.2 EFFET DE LA SUREXPRESSION DU CO-ACTIVATEUR PGC-1α SUR L'ACTIVITE DE LA LUCIFERASE REGULEE PAR LE PROMOTEUR AUTHENTIQUE DU mtTFA

Afin de mettre en évidence une implication de PGC-1 α dans l'expression du mtTFA, nous avons co-transfecté des cellules L929 avec un plasmide rapporteur codant pour le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique du mtTFA et un vecteur d'expression codant pour le co-activateur PGC-1 α ou un vecteur vide pGL2.

Dans le but de normaliser les résultats et pour tenir compte de l'efficacité de transfection, nous avons également co-transfectés les cellules avec un plasmide codant pour le gène de la β -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur fort CMV (cytomégalovirus). Ce gène sera donc exprimé constitutivement dans les cellules transfectées et son expression sera fonction du nombre de cellules transfectées et donc de l'efficacité de transfection. Les cellules sont ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec un plasmide rapporteur mtTFA-RC4/pGL3 (0,5 μ g), un plasmide codant pour la β-galactosidase (0,25 μ g) et 0,5 μ g d'un vecteur pSV-SPORT (contrôle) ou d'un plasmide codant pour la forme sauvage de PGC-1 α . Les dosages des activités luciférase et β-galactosidase sont réalisés 24 h post-transfection.

2.4.3.2.1 Lyse des cellules

Après 16 h de récupération dans du DHG contenant 10 % de SVF, les cellules sont rincées une fois avec 1 ml de PBS puis lysées 15 min sous agitation à température ambiante dans 150 μ l de tampon de lyse (*Passive Lysis Buffer*, Promega, USA).

Les lysats obtenus sont récupérés dans des microtubes et centrifugés 3 min à 13000 rpm. Les dosages des activités luciférase et β -galactosidase sont réalisés sur les surnageants.

2.4.3.2.2 Dosage de l'activité luciférase

L'activité luciférase est révélée à l'aide du kit « *Luciferase Reporter Assay System* » (Promega, USA). Un volume de 20 μ l de lysat cellulaire est ajouté à 100 μ l de tampon de réaction contenant le substrat de l'enzyme: la luciférine. La réaction catalysée par la luciférase « firefly » produit des photons qui seront quantifiés dans un bioluminomètre (Biocounter M 2010 Lumac, Pays-Bas) (voir figure 2.8). Les valeurs obtenues sont exprimées en RLU (Relative Light Unit).

2.4.3.2.3 Dosage de l'activité β -galactosidase

Le dosage se réalise dans une plaque 96 puits. On mélange 40 μ l de lysat cellulaire et 40 μ l de tampon de réaction contenant le substrat de l'enzyme ONPG (O-nitrophényl-galactopyranoside) (Promega, USA). Ce tampon de réaction est composé (pour 50 ml) de : 5 ml de NaHPO₄ 2 M ; pH 7,3; 50 μ l de MgCl₂ 2M; 350 μ l de β -mercapto-éthanol et 66,5 mg d'ONPG. L'absorbance du produit de réaction est lue à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultramarck, Biorad, Allemagne) après un temps d'incubation à 37 °C qui permet d'obtenir des valeurs d'absorbance comprises entre 0,2 et 0,4.

Les résultats obtenus sont ensuite normalisés afin de tenir compte de l'efficacité de transfection en divisant les valeurs obtenues pour l'activité luciférase (RLU) par les valeurs obtenues pour l'activité β -galactosidase (D.O.). Ils sont donc calculés en RLU/D.O. et exprimés en pourcentages d'activité des contrôles correspondants et sont exprimés comme la moyenne \pm un écart-type pour des triples de transfection.

Transfection Procedure for SuperFect Transfection Reagent



Figure 2.6 : Protocole utilisé pour la transfection transitoire de cellules eucaryotes avec le SuperFect (Qiagen).



Figure 2.7: Représentation schématique du système rapporteur PGC-1 α -luciférase. Le système rapporteur est constitué d'un fragment de 238 paires de bases du promoteur murin du gène de PGC-1 α comprenant 170 paires de bases en amont de la région 5' et 68 paires de bases du premier exon du gène PGC-1 α fusionné au gène luciférase (D'après Herzig et al, 2001).



Figure 2.8 : Réaction d'oxydation catalysée par la luciférase firefly.

La luciférine est oxydée en présence de magnésium, d'ATP, d'oxygène et de la luciférase en oxyluciférine. Cette réaction génère également de l'AMP, du phosphate inorganique, du CO_2 et des photons.

2.4.3.3 SUREXPRESSION ET IMPORTATION MITOCHONDRIALE DES PROTEINES TRACEURS MNTH1-EGFP ET mtHA-APOAEQUORINE

Dans le but d'étudier l'importation de protéines mitochondriales *in vivo* dans des cellules L929 et L929 rho, nous avons utilisé une approche expérimentale visant à surexprimer des protéines de fusion comme traceurs. Ces protéines sont codées par des gènes présents dans des vecteurs d'expression. Les cellules sont ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits contenant des lamelles couvre-objets stérilisées à la flamme. Elles sont ensuite transfectées transitoirement au Superfect avec 1 µg de plasmide d'expression codant pour la protéine mNTH1-EGFP (*Endonuclease III - Enhanced Green Fluorescent Protein*) ou la mtHA-Apoaequorine dont les structures sont schématisées à la figure 2.4.

La protéine de fusion mNTH1-EGFP est composée d'une EGFP couplée à l'orthologue mammifère de l'endonucléase III d'*Escherichia coli*. Cette protéine est une glycosylase qui intervient dans le processus de réparation des dommages à l'ADN (BER: *Base excision repair*) et possède une séquence NLS (*Nuclear Localisation Sequence*) ainsi qu'une séquence d'importation mitochondriales putative (Ikeda et al., 2002).

La mtHA-Apoaequorine est une protéine composée d'une séquence peptidique d'importation dans la mitochondrie (séquence d'importation de la sous-unité VIII de la cytochrome c oxydase) adressant l'apoaequorine dans la mitochondrie. Cette protéine possède également une séquence provenant d'un épitope d'une protéine du virus de l'influenza : l'hémaglutinine (HA). La visualisation de l'expression et de la localisation de ces protéines sera réalisée par des observations au microscope confocal 24 h post-transfection.

2.4.3.4 EFFET DE LA SUREXPRESSION DES DOMINANTS NEGATIFS DE CREB SUR L'ABONDANCE DE LA POPULATION MITOCHONDRIALE

Les cellules L929 et L929 rho⁻ sont ensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans une boîte de 24 puits. Le lendemain elles sont transfectées transitoirement au Superfect avec 1 μ g de plasmide codant pour M1-CREB ou K-CREB. Les cellules contrôles sont transfectée avec 1 μ g de vecteur vide pGL2. Après une incubation de 48 ou 72 h, les cellules sont incubées avec la sonde NAO (Nonyl-Acridine Orange) selon la méthode décrite au point 2.7.3.

2.5 MESURE DE L'ACTIVITE DE LIAISON DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION A L'ADN

Nous avons effectué des tests de liaison à l'ADN pour des facteurs de transcription connus ou suspectés pour intervenir dans le contrôle de la transcription de gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales comme HNF-1 α et HNF-4 α . Ces tests sont réalisés sur des extraits nucléaires préparés à partir de cellules 143B et 143B rho0. Dans certaines conditions, les cellules 143B sont incubées ou non pendant 6 h en présence d'antimycine A (1 μ M), de FCCP (Carbonyle Cyanide p-triFluoro-métoxyPhénylhydrazone, 10 μ M) ou d'oligomycine (8 μ M). Cette méthode colorimétrique basée sur la technique ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) permet la détection de la protéine liée à une sonde de capture ADN et remplace de façon avantageuse la technique de l'EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*). En effet, elle est très sensible, spécifique et permet d'éviter l'usage de la radioactivité. Les tests TransAM ont été développés au laboratoire URBC pour le facteur de transcription NF- κ B (Renard et al., 2001) et sont actuellement commercialisés pour une quarantaine de facteurs par la firme Active Motif (Belgique). **STEP 1 :** Fixation of a biotinylated double strand probe containing the NFkB consensus binding sequence on streptavidin-coated plates. + Washing

Y Y Y Y

STEP 2 : Incubation with cell lysates + Washing

STEP 3 : Incubation with rabbit anti-NFκB antibodies. + Washing

STEP 4 : Incubation with peroxidaseconjugated anti-rabbit antibodies. + Washing

STEP 5 : Colorimetric reaction

Figure 2.9 : Schéma reprenant les différentes étapes du dosage en multipuits de la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN.

Les extraits de protéines nucléaires sont d'abord incubés 1 h en présence de la sonde biotinylée comportant la séquence de liaison du facteur de transcription d'intérêt. Les incubations avec les anticorps primaire puis secondaire sont suivies d'une réaction colorimétrique. L'exemple est présenté pour NF- κ B (D'après Renard et al., 2001).

2.5.1 PRINCIPE

Dans chaque puits d'une plaque 96 puits tapissés de streptavidine sont fixés des fragments d'ADN double-brins biotinylés contenant la séquence consensus du facteur de transcription à étudier liguée à un fragment « spacer ».

Les extraits de protéines nucléaires sont mis en contact avec la séquence consensus du facteur d'intérêt. Après plusieurs rinçages, la liaison du facteur d'intérêt à sa séquence consensus est détectée grâce à un anticorps primaire dirigé contre un ou plusieurs de ses épitopes. Une incubation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase sera ensuite réalisée après une nouvelle série de rinçages. La révélation se fera en présence d'un substrat de l'enzyme et l'absorbance du produit de la réaction colorimétrique sera mesurée à 450 nm (référence 655 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultramarck, Biorad, Allemagne).

Les différentes étapes de ce test sont présentées à la figure 2.9.

2.5.2 METHODE

2.5.2.1 ETAT DE L'ACTIVITE DE LIAISON DES FACTEURS HNF-1α ET HNF-4α DANS DES CELLULES 143B RH00

Les cellules 143B et 143B rho0 sont ensemencées à des dilutions respectives de 1 : 8 et 1 : 6 dans des boîtes de 75 cm² et dans 15 ml de DHG + 10 % de SVF. L'extraction des protéines nucléaires est réalisée selon la méthode décrite au point 2.5.2.3.

2.5.2.2 ETAT DE L'ACTIVITE DE LIAISON DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HNF-4\alpha dans des cellules 143B incubees ou non en presence d'inhibiteurs mitochondriaux

Les cellules 143B sont ensemencées à une dilution de 1 : 8 dans des boîtes de 75 cm² et dans 15 ml de DHG + 10 % de SVF. Le lendemain, les cellules sont incubées ou non en présence d'antimycine A (1 μ M), de FCCP (10 μ M) ou d'oligomycine (8 μ M) pendant 6 h. L'extraction des protéines nucléaires est réalisée après 16 h de récupération dans 15 ml de DHG + 10 % de SVF.

2.5.2.3 PREPARATION DES EXTRAITS NUCLEAIRES

Toutes les étapes sont réalisées à 4 °C et les solutions et tampons utilisés sont décrits dans le tableau 2.2.

Au terme des incubations, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS froid. Elles sont ensuite rincées avec 10 ml de PBS contenant 1 mM de Na₂MoO₄ et 5 mM de NaF puis incubées 5 min dans 10 ml de tampon hypotonique. Elles sont ensuite lysées dans 500 μ l de tampon de lyse. Les lysats sont alors raclés, récupérés dans des microtubes puis incubés 5 min sur glace avant d'être centrifugés pendant 30 s à 13000 rpm.

Le surnageant est éliminé et le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 50 μ l de tampon de resuspension (RE) contenant 2 μ l d'inhibiteurs de protéases et 2 μ l d'inhibiteurs de phosphatases. On ajoutera alors un volume équivalent de tampon salin (SA) contenant également 2 μ l d'inhibiteurs de protéases et 2 μ l d'inhibiteurs de phosphatases. Les échantillons sont placés à 4 °C pendant 30 min sur un agitateur rotatif avant d'être centrifugés 10 min à 13000 rpm. Les protéines nucléaires contenues dans les surnageants sont dosées par la méthode de Bradford et les extraits protéiques sont aliquotés et congelés à -70 °C.

2.5.2.4 FIXATION DES TRAPPEURS DE HNF-1α ET HNF-4α DANS LES PUITS D'UNE PLAQUE DE 96 PUITS TAPISSES DE STREPTAVIDINE

L'ADN trappeur biotinylé est dilué à une concentration finale de 4 pmoles/50 μ l dans du PBS et est ajouté dans chacun des puits d'une plaque de 96 puits. Ceux-ci sont ensuite

PBS contenant	- 1 mM Na ₂ MoO ₄ (Sigma Chemical.
	USA)
	- 5 mM NaF (Merck, Allemagne)
PBS 50	- 50 mM NaCl
	- 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ :pH 7,5
HB 2X (tampon hypotonique)	- 20 mM Hepes (ACROS organics, USA)
	- 5 mM NaF
v	- 1 mM Na ₂ MoO ₄
	- 0,1 mM EDTA (Ethylenedinitrilo tetra acetic acid, Merck Allemagne)
Tampon de lyse	- 10 ml de HB 2X
	- 400 μl NP-40 10 %
	- 9,6 ml H_2O
Tampon de resuspension (RE)	- 10 ml HB 2X
	- 25 % Glycérol
	- $6 \text{ ml H}_2\text{O}$
Tampon salin (SA)	- 10 ml HB 2X
	- 25 % Glycérol
	- 4 ml NaCl 4 M
	$-2 \text{ ml H}_2\text{O}$
Cocktail d'inhibiteur de phosphatases (PIB)	- 100 μl NaVO ₃ 1 M
	- 1 ml PNPP (p-nitrophenylphosphate, Sigma Chemical USA) 1M
	- 1ml B-glycérophosphate
	- 0.5 ml NaF
	- 1,4 ml H_2O
Cocktail d'inhibiteur de protéases (PIC)	- 1 tablette dans 2 ml d'H ₂ O
(Roche, Allemagne)	
Tampon de liaison	- Tris-HCl 100 mM: pH 7,5
	- 10 mM MgCl ₂
	- 5 mM EDTA
	- 500 mM NaCl
	- 40 % Glycérol

Tableau 2.2 : Liste reprenant les différents tampons et solutions utilisés pour la préparation des extraits nucléaires et les tests de liaison de facteurs de transcription à l'ADN décrits respectivement aux points 2.5.2.3 et 2.5.2.4.

incubés 60 min à 37 °C. Les puits sont ensuite lavés 2 fois avec 100 μ l de PBS50 contenant 0,1% de Tween-20 et 1 fois avec 200 μ l d'eau désionisée. La dernière étape de la fixation des trappeurs est un séchage de 30 min à 37 °C.

2.5.2.5 LIAISON DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HNF-1 a ET HNF-4 a

Dans chaque puits d'une plaque 96 puits tapissés des sondes trappeurs biotinylées, 30 μ l de tampon de liaison sont mélangés à 20 μ l d'échantillons dilués à une concentration de 5 μ g/20 μ l dans un tampon composé d'équivolumes de RE et de SA auxquels sont ajoutés des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. La plaque multipuits est placée pendant 1 h sur un vortex avec une agitation douce (150 rpm) et à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés 3 fois avec 200 μ l de PBS50 contenant 0,1 % de Tween-20.

2.5.2.6 INCUBATION EN PRESENCE DES ANTICORPS PRIMAIRES, SECONDAIRES ET REVELATION

Des anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêts HNF-1 α et HNF-4 α ont été utilisés. Leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau 2.1 La fixation de l'anticorps primaire dilué 500 X dans du PBS50 contenant 0,1 % de BSA se fait pendant une incubation d'une heure à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés 3 fois avec 200 μ l de PBS 50 contenant 0,1 % de Tween-20. L'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase sera effectuée pendant 1 h à température ambiante. Les puits seront ensuite rincés 4 fois avec 200 μ l de PBS50 Tween-20 à 0,1 %. Enfin, l'étape de révélation est réalisée en ajoutant 100 μ l de TMB (TétraMéthylBenzidine, Biozine, Belgique) par puits. Après une incubation de 10 min à l'abri de la lumière, la réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout de 100 μ l d'une solution diluée d'H₂SO₄. L'absorbance du produit de réaction est mesurée à 450 nm (référence 655 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultramarck, Biorad, Allemagne).

2.6 MARQUAGE EN IMMUNOFLUORESCENCE ET OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE CONFOCALE

Des marquages en immunofluorescence (IF) ont été réalisés afin de mettre en évidence l'abondance et la localisation des protéines HNF-1 α , HNF-4 α , la forme phosphorylée de l'AMPK (Thr172) ainsi que la protéine mtHA-Apoaequorine. L'utilisation de la microscopie confocale a également permis de visualiser l'expression et la localisation de la protéine de fusion mNTH1-EGFP.

2.6.1 PRINCIPE

Le marquage en IF suivi de l'observation en microscopie confocale permet de visualiser des protéines d'intérêt et de les localiser à l'intérieur de la cellule. Les cellules sont fixées puis perméabilisées avant d'être mises en contact, lorsque nécessaire, avec l'anticorps primaire puis l'anticorps secondaire couplé à une sonde fluorescente de type ALEXA.

Un des problèmes majeurs de la microscopie classique est la présence d'un important bruit de fond dû principalement à l'épaisseur de l'objet observé et à la réémission de la fluorescence à partir d'autres plans que le plan focal. La microscopie confocale permet de collecter les informations à partir d'une section optique plutôt qu'à partir de l'échantillon entier comme c'est le cas des microscopes à épifluorescence. Le microscope confocal permet de focaliser un faisceau laser (Argon et Hélium/Néon) de longueur d'onde déterminée en un point de l'échantillon. Les signaux de fluorescence réémis par ce point sont amplifiés dans un photomultiplicateur puis numérisés. L'image de l'échantillon est reconstruite point par point par un balayage suivant les axes X et Y. Trois longueurs d'onde d'excitation disponibles (488 nm, 514-543 nm et 633 nm) nous permettent de réaliser des marquages multiples pour différentes protéines en utilisant des anticorps couplés à des fluorochromes différents.

Anticorps primaire	Mono/Polyclonal	Origine	Dilution
Anticorps de lapin anti-HNF-1a	polyclonal	Santa Cruz	100 X
Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin Alexa Fluor 488		Molecular Probes	500 X
Anticorps de lapin anti-HNF-4α	polyclonal	Santa Cruz	100 X
Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin Alexa Fluor 488		Molecular Probes	500 X
Anticorps de souris anti-HA	monoclonal	Roche	100 X
Anticorps de chèvre anti-IgG de souris Alexa Fluor488		Molecular Probes	500 X
Anticorps de lapin anti-Cytochrome c	polyclonal	Santa Cruz	100 X
Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin Alexa Fluor 568		Molecular Probes	500 X
Anticorps de lapin anti-pAMPK (Thr172)	polyclonal	Cell Signaling	100 X
Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin Alexa Fluor 488		Molecular Probes	500 X

Tableau 2.3 : Tableau reprenant les différents anticorps utilisés en immunofluorescence ainsi que leur dilution.

2.6.2 METHODE

2.6.2.1 Abondance et localisation des proteines HNF-1 α et HNF-4 α

Dans le but de visualiser l'abondance et de rechercher la localisation des protéines HNF-1 α et HNF-4 α dans les cellules 143B et 143B rho0, nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines HNF-1 α et HNF-4 α dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.3.

2.6.2.2 Abondance et localisation de la proteine AMPK phosphorylee sur la threonine 172

Dans le but de visualiser l'abondance et de rechercher la localisation de la protéine AMPK phosphorylée sur la Thr172 (pAMPK) dans les cellules 143B et 143B rho0, nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la Thr172 de la protéine AMPK dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.3.

2.6.2.3 ESTIMATION DE L'IMPORTATION DE PROTEINES MITOCHONDRIALES OU NON DANS DES CELLULES DEPLETEES EN ADNmt

Afin d'estimer l'importance de l'importation de protéines mitochondriales dans des cellules déplétées partiellement ou totalement en ADNmt, nous avons transfecté les cellules L929, L929 rho⁻, 143B ou 143B rho0 préalablement ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits dans une boîte de 24 puits, avec 1 μ g/puits d'un vecteur d'expression codant pour la protéine mtHA-Apoaequorine, une protéine de fusion adressée à la mitochondrie ou une construction codant pour la mNTH1-EGFP.

2.6.2.3.1 Abondance et localisation mitochondriale de la protéine de fusion mNTH1-EGFP après un marquage des cellules avec la sonde MitoTracker Red

Dans le but de vérifier l'expression et la localisation de la protéine de fusion mNTH1-EGFP, nous utiliserons la fluorescence intrinsèque de l'EGFP après excitation à 488 nm (Ex : 488 nm, Em : 509 nm). La mise en évidence de la localisation mitochondriale de la protéine mNTH1-EGFP est réalisée par un marquage des mitochondries suite à l'incorporation de la sonde MitoTracker Red (CM-H2XROS) (Molecular Probes, USA). Le MitoTracker Red est une sonde spécifique de la mitochondrie. Elle diffuse passivement à travers la membrane plasmique et s'accumule dans les mitochondries en réagissant avec les groupements thiols des résidus cystéine des protéines.

Le lendemain de la transfection, le milieu est enlevé et remplacé par 300 μ l de DHG contenant la sonde à une concentration de 250 nM. Après une incubation de 15 min à 37 °C, les cellules sont rincées 2 fois avec du DHG sans sérum préchauffé à 37 °C avant d'être fixées pendant 10 min avec 1 ml de tampon cacodylate de sodium 0,1M ; pH 7,4 contenant 0,5 % de glutaraldéhyde. Deux rinçages au tampon cacodylate de sodium précéderont le montage sur lame (décrit au point 2.6.2.6)

2.6.2.3.2 Localisation des protéines mtHA-Apoaequorine et cytochrome c

Pour les cellules surexprimant l'apoaequorine, nous avons ensuite réalisé un double marquage en immunofluorescence pour le cytochrome c et pour la protéine mtHA-Apoaequorine. C'est la reconnaissance de l'épitope HA- par un anticorps primaire anti-HA suivi d'un anticorps secondaire couplé à une sonde ALEXA qui permettra la visualisation de la protéine adressée à la mitochondrie au microscope confocal.

2.6.2.4 RINÇAGES, FIXATION ET PERMEABILISATION

Le jour du marquage, le milieu est décanté et les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS préchauffé à 37 °C. Les cellules sont ensuite fixées pendant 10 min à température ambiante dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % (Merck, Allemagne). Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois avec 1 ml de PBS puis perméabilisées pendant 5 min avec 1 ml de PBS contenant 1 % de Triton X-100 (Merck, Allemagne).

2.6.2.5 Incubation avec les anticorps primaires et secondaires

Deux rinçages avec 1 ml de PBS contenant 1 % de BSA précéderont l'incubation avec les anticorps primaires dont les dilutions sont présentées dans le tableau 2.3. Cette incubation se fait dans une chambre humide pendant 2 h à température ambiante ou pendant 16 h à 4 °C en retournant la lamelle couvre-objet sur 30 μ l d'anticorps dilués dans du PBS contenant 1 % de BSA. L'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la sonde fluorescente s'effectue dans les mêmes conditions que l'anticorps primaire durant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière afin de ne pas exciter les fluorochromes. Les différents types d'anticorps secondaires utilisés sont repris dans le tableau 2.3.

2.6.2.6 MONTAGE DES LAMES

Une goutte de Mowiol (Sigma Aldrich, Angleterre) préchauffé à 56 °C est déposée sur une lame porte-objet (Superfrost, Vel, Allemagne) préalablement dégraissée à l'alcool. La lamelle couvre-objet (Vel, Knittel Glaser, Allemagne) est retournée sur la goutte de Mowiol en évitant les bulles d'air. Les lames sont laissées à sécher à l'abri de la lumière une nuit à 4 °C pour permettre la polymérisation de la solution de montage avant les observations au microscope confocal.

2.7 MARQUAGE AU NONYL ACRIDINE ORANGE

Afin de quantifier la population mitochondriale dans les cellules déplétées en ADNmt et de rechercher les éventuelles fluctuations de cette population suite à un traitement des cellules L929 rho⁻ et 143B rho0 au BAPTA-AM ou à la surexpression transitoire de dominants négatifs de CREB dans des cellules L929 et L929 rho-, nous avons effectué des marquages au Nonyl-Acridine Orange sur des cellules L929, L929 rho⁻, 143B ou 143B rho0. Cette sonde possède une affinité pour la cardiolipine, composant essentiel et abondant de la membrane mitochondriale interne (Mileykovskaya et al., 2001).

2.7.1 EFFETS DES DOMINANTS NEGATIFS DE CREB SUR LA POPULATION MITOCHONDRIALE

Dans le but d'observer l'effet éventuel de la surexpression des dominants négatifs M1-CREB et K-CREB sur la population mitochondriale, nous avons effectué un marquage au NAO (Molecular Probes, USA) sur des cellules L929 et L929 rho⁻ préalablement transfectées avec les dominants négatifs suivant la méthode décrite au point 2.4.3.4.

Les cellules sont ensemencées à raison de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits et transfectées transitoirement pendant 6 h avec 1 μ g/puits de plasmide codant pour les dominants négatifs M1-CREB ou K-CREB. Le marquage au NAO est réalisé 48 h et 72 h post-transfection.

2.7.2 EFFETS DU BAPTA-AM SUR LA POPULATION MITOCHONDRIALE

Afin de rechercher l'implication d'une voie dépendant du calcium dans le maintien de la mitobiogenèse dans les cellules L929 rho et 143B rho0, nous avons testé l'effet d'un chélateur de calcium intracellulaire, le BAPTA-AM, sur l'abondance de la population mitochondriale, quantifiée par un marquage au NAO.



Figure 2.10 : Schéma reprenant les différentes étapes de l'immunoprécipitation de kinases. Les cellules sont lysées et les lysats sont incubés avec un anticorps reconnaissant un ou plusieurs des épitopes de la protéine. Les lysats sont ensuite incubés avec des billes d'agarose couvertes de protéines A et G ayant une forte affinité pour le fragment Fc des anticorps. La kinase ainsi immunoprécipitée est récupérée afin de réaliser un test d'activité *in vitro* et un Western blot.

Les cellules L929 rho⁻ et 143B rho0 sont ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 12 puits. Le lendemain, elles sont incubées ou non pendant 72 h en présence de BAPTA-AM (10 μ M) dilué dans du DHG contenant 10 % de SVF (2 ml par puits).

2.7.3 METHODE

Le jour du marquage, le milieu est décanté et les cellules sont incubées 30 min à 37 °C avec 500 μ l de HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) (dont la composition est de: 8 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 60 mg/L de KH₂PO₄, 60 mg/L de NaH₂PO₄, pH: 7.4, 100 mg/L de MgSO₄, 1 g/L de glucose, 100 mg/L de MgCl₂, 350 mg/L de NaHCO₃, 140 mg/L de CaCl₂), contenant la sonde à une concentration de 10 μ M. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec 1 ml de HBSS. Elles sont ensuite incubées 15 min sous agitation avec 200 μ l de tampon de lyse (*Passive Lysis Buffer*, Promega, USA). Les lysats sont récupérés et centrifugés à 13000 rpm pendant 15 min. Des aliquotes de 100 μ l sont déposées dans une plaque 96 puits et les intensités de fluorescence sont déterminées dans un spectrophotomètre FLUOstar (BMG lab technologie, Allemagne) (Ex : 494 nm, Em : 519 nm). Un prélèvement est également effectué afin de doser les protéines suivant la méthode de Bradford. Les résultats sont calculés en intensité de fluorescence par μ g de protéines et exprimés en pourcentages des cellules contrôles.

2.8 Immunoprecipitation et dosage de l'activite de l'AMPK et de la CKII

Afin de doser les activités de l'AMPK et de la CKII, nous avons isolé ces deux kinases à partir de lysats cellulaires clairs par une immunoprécipitation. Nous avons ensuite effectué des tests d'activité kinase *in vitro* de ces deux enzymes en présence d'un substrat synthétique et de $[\gamma^{32}P]$ -ATP.

2.8.1 PRINCIPE DE L'IMMUNOPRECIPITATION ET DU DOSAGE D'ACTIVITE KINASE IN VITRO

Les protéines d'intérêt présentes dans un lysat de cellules peuvent être purifiées et/ou concentrées par la technique d'immunoprécipitation en incubant les lysats avec un anticorps primaire dirigé contre un ou plusieurs de leurs épitopes. Le fragment Fc de ces anticorps peut ensuite se fixer sur des billes d'agarose couvertes de protéines A et/ou G possédant une forte affinité pour les fragments Fc des anticorps. La sédimentation de ces billes suivie de plusieurs rinçages permet la récupération des protéines d'intérêt. Le principe de l'immunoprécipitation est présenté à la figure 2.10.

Le test d'activité kinase *in vitro* permet de mesurer l'activité des kinases immunoprécipitées. Il est réalisé en présence d'un peptide synthétique contenant un site phosphorylable par la kinase d'intérêt et d'ATP radioactif. Après un temps de réaction, le peptide phosphorylé est récupéré sur une membrane de phosphocellulose. Après élimination de l'ATP libre par plusieurs rinçages en présence d'acide phosphorique, le comptage de la radioactivité associée à la membrane permet donc de quantifier l'activité de la kinase *in vitro*.

Un Western blot sera également réalisé sur une aliquote de l'immunocomplexe pour visualiser l'abondance des kinases engagées dans le test d'activité.

2.8.2 METHODE

2.8.2.1 PREPARATION DES LYSATS CELLULAIRES

Les cellules L929 et L929 rho⁻ ensemencées à une dilution de 1 : 8 et 1 : 6 dans des boîtes de 75 cm² sont rincées avec 10 ml de PBS froid puis lysées dans 1 ml de tampon de lyse dont la composition est décrite dans le tableau 2.4. Après une incubation de 30 min sur

Tampon de lyse	 100 mM Tris-HCl: pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton X-100 PIB PIC
Tampon de réaction pour l'AMPK	 20 mM Hepes-NaOH pH7,0 5 mM MgCl₂ 0,4 mM DTT 25 μM peptide substrat (SAMS: LKKLTRRPSFSAQ (peptide synthétique), Campro Scientific, Allemagne 20 μM ATP 50 μCi [γ-³²P]- ATP 424 μl H₂O
Tampon de réaction pour la CK II	 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM Mg Cl₂ 10 μM peptide substrat RRRDDDSDDD (peptide synthétique), Cell Signalling, USA 20 μM ATP contenant 10 μCi de [γ- ³²P]ATP)

Tableau 2.4 : Composition des différents tampons et solutions utilisés lors de l'immunoprécipitation des kinases AMPK et CKII et des dosages d'activité *in vitro* décrits au point 2.8.

glace, les lysats sont centrifugés pendant 15 min à 13000 rpm et les surnageants sont prélevés. Des volumes de 10 μ l et 50 μ l seront prélevés afin de doser les protéines suivant la méthode de Bradford et d'engager une quantité de protéine équivalente pour l'immunoprécipitation.

2.8.2.2 IMMUNOPRECIPITATION

A partir d'une boîte de 75 cm², nous engageons 850 µg de protéines pour le dosage de la CKII et 900 µg de protéines pour l'AMPK. Aux échantillons contenant une quantité équivalente de protéines, on ajoute 2,5 µg d'anticorps anti-AMPK ou anti-CKII par test qui sont alors placés sur un agitateur rotatif à 4 °C pendant 1 h avant l'ajout de 60 µl de billes d'agarose couvertes de protéines A et G (Billes protein G PLUS/protein A-Agarose,OncogenTM Research, USA). Les échantillons sont incubés pendant 2 h sur un agitateur rotatif avant d'être rincés 2 fois 10 min avec 800 µl de tampon de lyse. Lors du deuxième rinçage, 200 µl de suspension sont prélevés afin de réaliser une analyse en Western blot de l'abondance des kinases immunoprécipitées. Les 600 µl de complexes immuns restant sont sédimentés par une centrifugation de 2 min à 3000 rpm et rincés pendant 10 min avec 500 µl de tampon de réaction ne contenant ni ATP, ni $[\gamma^{32}P]$ -ATP, ni substrat avant d'être centrifugés 1 min à 13000 rpm.

Le surnageant est enlevé et les complexes sont resuspendus dans 60 μ l de tampon de réaction contenant 20 μ M d'ATP froid et radioactif (10 μ Ci/réaction) ainsi que 25 μ M du substrat synthétique de l'AMPK ou 10 μ M de substrat synthétique de la CKII. Les séquences de ces deux substrats sont reprises dans le tableau 2.4. Les échantillons sont incubés pendant 30 min à 30 °C. Au terme de ces incubations, les échantillons sont placés sur glace afin d'arrêter la réaction. La révélation est effectuée en prélevant 2 fois 25 μ l des échantillons sur une colonne contenant une membrane de Phosphocellulose (Pierce, USA) pendant 2 min. Les colonnes sont alors centrifugées 30 s à 3000 rpm afin de permettre l'entrée de l'échantillon dans la membrane. Celle-ci est ensuite rincée 2 fois avec 250 μ l d'acide phosphorique 75 mM.

Un blanc est réalisé en incubant des lysats sans anticorps anti-AMPK ou anti-CKII. La suite du test est réalisée comme décrit ci dessus. La radioactivité associée à la membrane est mesurée dans un compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden,USA) après avoir placé la membrane dans une fiole de comptage contenant 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas).

2.9 MESURE DE L'INCORPORATION DE 2-DEOXY-(1,2-³H) D-GLUCOSE TRITIE

Cette technique a été utilisée dans le but de quantifier l'incorporation de glucose par des cellules L929, L929 rho⁻, 143B, 143B rho0, des cellules cybrides sauvages et cybrides mutées.

2.9.1 PRINCIPE

Il est possible de déterminer le taux d'incorporation de glucose par des cellules en suivant la prise d'un traceur radioactif non métabolisable tel que le 2-déoxy- $(1,2-^{3}H)$ -D-glucose par la cellule.

A la fin d'une période d'incubation des cellules en présence du traceur et de multiples rinçages, la radioactivité associée à la population cellulaire est comptée et après une normalisation par la quantité de protéines, cette incorporation reflète l'incorporation du glucose par les cellules.



B









Le NO se trouve sous forme de nitrates ou de nitrites dans la cellule. L'ajout de la nitrate réductase et des cofacteurs permet la conversion des nitrates en nitrites. La réaction colorimétrique permettra la quantification des nitrates et nitrites et donc du NO total produit par les cellules.

2.9.2 METHODE

2.9.2.1 INCORPORATION DU 2-DEOXY-(1,2-³H)-D-GLUCOSE

Les cellules L929, L929 rho⁻, 143B, 143B rho0, cybrides sauvages et cybrides mutées sont ensemencées dans une plaque de 24 puits à une densité de 50000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules sont incubées pendant 30 min à 37 °C en présence de 500 µl de PBS contenant 1µCi/ml de 2-déoxy-(1,2-3H)-D-glucose. Des blancs sont réalisés en mesurant la quantité de glucose radioactif contaminant et non incorporé qui reste liée à la surface des cellules. Dans ces conditions, on ajoute 500 µl de PBS contenant 1 µCi/ml de 2- déoxy-(1,2-³H)-D-glucose sur les cellules sans laisser de période d'incubation. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec 1 ml de PBS puis lysées dans 200 µl de NaOH 0,5 N pendant 45 min sous agitation à température ambiante. Après homogénéisation, des volumes de 25 µl sont prélevés pour réaliser un dosage des protéines par la méthode de Bradford. La lyse alcaline est alors neutralisée par l'utilisation d'un équivolume d'HCl 0,5 N (175 µl). Après mélange, 300 µl de lysat sont transférés dans une fiole de comptage contenant 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas). La radioactivité incorporée par les cellules est enfin comptée dans un compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, USA). Les résultats, normalisés par la quantité de protéines, sont donc exprimés en cpm/µg de protéines.

2.10 MESURE DE LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE

Les enzymes NO synthase (nNOS, eNOS, mtNOS et iNOS) catalysent l'oxydation de la Larginine en L-citrulline en produisant du NO (oxyde nitrique) (Palmer et al., 1988). Le dosage du NO dans des homogénats de cellules a été réalisé à l'aide du kit colorimétrique « nitric oxide quantitation kit » (Active Motif, Belgique) dans le but de quantifier la production de NO par des cellules L929 et L929 rho⁻.

2.10.1 PRINCIPE

Dans la cellule, l'oxyde nitrique participe à une série de réactions avant d'être transformé en nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-). Un schéma de ces réactions est présenté à la figure 2.11.

Au cours de ce test, nous avons quantifié les quantités de nitrates et de nitrites produites par des cellules L929 et L929 rho⁻ comme le reflet de la production totale de NO par les cellules. La première étape du test consiste à effectuer, à partir d'homogénats cellulaires, une conversion des nitrates en nitrites par l'action de la nitrate réductase dépendante du NADPH. Cette réaction est catalysée par l'addition du *Griess Reagent* fourni par le kit. Ce réactif convertit les nitrites en un composé chromogène qui absorbe à 570 nm qui peut donc être quantifié. En effet, le dosage intègre une réaction catalysée par la LDH (lactate déshydrogénase) faisant suite à l'action de la réductase et qui dégrade l'excès de NADPH généré susceptible d'interférer avec le dosage.

2.10.2 METHODE

2.10.2.1 HOMOGENAT ET FILTRAGE

Les cellules L929 et L929 rho⁻ sont ensemencées à une dilution de 1 : 8 et 1 : 6 dans des boîtes de 75 cm² avec 15 ml de DHG + 10 % de SVF. Le lendemain, les cellules de 5 boîtes par test sont raclées dans 500 μ l de PBS froid.

Des homogénats cellulaires sont réalisés par quarante passages dans l'homogénéisateur de Dounce. Les protéines sont donc récupérées de façon mécanique dans un homogénat cellulaire. Un dosage des protéines sera réalisé sur un volume de 10 µl d'homogénat suivant la méthode de Bradford. Les homogénats sont ensuite filtrés par une centrifugation de 15 min

à 4 °C et 4500 g sur des tubes Ambicon Ultra (Milliport, USA) ayant un "cut off" de 10 kDa. Les homogénats filtrés, et donc dépourvus de protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 10 kDa, sont ensuite récupérés dans des microtubes pour les dosages.

2.10.2.2 DOSAGE DES NITRATES ET DES NITRITES

Une droite d'étalonnage permettant de quantifier la production de NO dans les échantillons est effectuée en même temps que les tests par la dilution d'un standard dont la concentration en nitrates est connue. Un exemple de droite d'étalonnage est présenté à la figure 2.11. Les étapes du dosage sont suivies comme recommandé dans le manuel du « kit ». Brièvement, dans chaque puits d'une plaque 96 puits, les échantillons filtrés et les standards sont portés à un volume final de 70 μ l avec un tampon de réaction auquel on ajoute 20 μ l de la solution contenant les cofacteurs permettant l'activité de la nitrate réductase. La solution contenant la nitrate réductase est ensuite ajoutée (10 μ l/puits). Un blanc est réalisé en ajoutant 70 μ l de PBS à 20 μ l de solution contenant les cofacteurs puis 10 μ l de la solution contenant la nitrate réductase. Les composés sont mélangés par une agitation de 1 min à 150 rpm. Les tests sont ensuite mis à incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La révélation se fait en ajoutant 50 μ l de *Griess Reagent A* puis 50 μ l de *Griess Reagent B* dans chaque puits.

La coloration apparaît après une incubation de 20 min à température ambiante. L'absorbance du produit de réaction est alors mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm (référence 690 nm). Après soustraction de la valeur d'absorbance des blancs de chacune des valeurs tests, la concentration en NO est déterminée à l'aide de l'équation établie pour la courbe d'étalonnage réalisée à partir des standards. Les résultats sont calculés en picomoles de NO par microgrammes de protéines et exprimés arbitrairement en pourcentages des cellules contrôles.



Rappelons, comme nous l'avons vu dans l'introduction, que la biogenèse mitochondriale est un processus complexe nécessitant la coordination des génomes nucléaires et mitochondriaux (Goffart and Wiesner, 2003). Bien que le génome mitochondrial humain ne code que pour environ un pourcent du protéome mitochondrial, celui-ci est essentiel au bon fonctionnement de la chaîne de transporteurs d'électrons et donc à la production d'ATP par la mitochondrie. Nous avons également vu l'intérêt d'étudier les voies de signalisation intracellulaires activées lors d'un dysfonctionnement mitochondrial, qui peuvent avoir pour origine des mutations ou des délétions dans les deux génomes (DiMauro and Schon, 2001). C'est probablement pour ces raisons que les nombreuses implications moléculaires et cellulaires du dysfonctionnement mitochondrial font l'objet de nombreuses recherches (pour une revue : Butow, 2004).

Au laboratoire, nous étudions la réponse cellulaire induite par un dysfonctionnement mitochondrial, dans un contexte de communication moléculaire rétrograde entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau à l'aide de cellules partiellement ou totalement déplétées en ADN mitochondrial. Dans ces cellules, il apparaît que le processus de biogenèse mitochondriale est maintenu. En effet, les structures mitochondriales, bien que morphologiquement modifiées, sont toujours présentes et maintenues au cours des divisions cellulaires (Gilkerson et al., 2000; Herzberg et al., 1993), et un potentiel de membrane mitochondrial est toujours mesurable dans ces cellules (Appelby et al., 1999; Arnould et al., 2003).

Récemment, deux voies de signalisation ont été décrites comme intervenant dans la biogenèse mitochondriale des cellules de mammifères : une dépendante du calcium et impliquant la calmoduline kinase IV (CaMKIV), (Wu et al., 2002), une voie que l'on retrouve également activée dans les cellules déplétées en ADNmt (Arnould et al., 2002), et l'autre impliquant l'oxyde nitrique (NO) comme messager secondaire (Nisoli et al., 2003). Ces deux voies ont en point commun l'activation du co-activateur PGC-1 α , un régulateur important de la biogenèse mitochondriale permettant une coordination de l'expression de nombreux gènes codant des protéines mitochondriales régulés par des facteurs de transcription souvent nombreux et différents (Wu et al., 1999). Sachant que l'expression de PGC-1 α peut, dans le cadre notamment de la gluconéogenèse, être dépendante de l'activité du facteur de transcription CREB (Herzig et al., 2001) et sachant que ce facteur de transcription est constitutivement activé dans les cellules déplétées en ADNmt, nous avons recherché le niveau d'expression de ce facteur PGC-1 α dans ces cellules.

3.1 RECHERCHE DU NIVEAU D'EXPRESSION DE PGC-1α DANS LES CELLULES L929, L929 RHO⁻, 143B et 143B RHO0

Dans la première partie, afin de rechercher le niveau d'expression du co-activateur PGCl α dans les cellules L929, L929 rho⁻, 143B et 143B rho0, nous avons utilisé deux approches. Nous avons utilisé un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur composé d'un fragment de 238 paires de bases du promoteur authentique de PGC-1 α . La deuxième approche visant à caractériser l'abondance de ce co-activateur dans les cellules déplétées en ADNmt se fera par une analyse classique en Western blot de l'abondance de la protéine endogène.

Pour mettre en évidence le niveau de la transcription du gène codant PGC-1 α dans les cellules déficientes pour l'activité mitochondriale, des cellules L929, L929 rho⁻, 143B ou



Figure 3.1 : Estimation de la transcription du gène PGC-1α dans des cellules L929 et L929 rho (A) ou 143B et 143B rho0 (B) à l'aide d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur authentique du co-activateur PGC-1a. Les cellules L929, L929 rho⁻, 143B et 143B rho0, ensemencées à raison de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits, sont co-transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec un plasmide codant pour la β-galactosidase (0,25 µg), 0,5 µg d'un plasmide contenant le gène luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur tronqué de PGC-1a et 0,5 µg d'un vecteur pGL2 ou 0,5 µg d'un plasmide codant pour VP16-CREB. Les dosages des activités luciférase et galactosidase sont réalisés après 18 h de récupération dans du DHG + 10 % de SVF. Les résultats des activités luciférase, normalisés par l'activité β-galactosidase, sont exprimés en pourcentages par rapport aux cellules contrôles L929 ou 143B, et représentent la moyenne \pm un écart-type pour n=3.

143B rho0

143B VP16-CREB

B

100

50

0

143B

A

143B rho0 ont été ensemencées, à raison de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits et co-transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec 0,5 μ g de plasmide contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur authentique de PGC-1 α , et 0,25 μ g d'un plasmide codant pour la β -galactosidase. Selon les conditions, elles ont également été co-transfectées avec 0,5 μ g de plasmide codant pour VP16-CREB et les quantités d'ADN plasmidique ont été ajustées à 1,25 μ g d'ADN/puits avec 0,5 μ g d'un vecteur vide pGL2. Les dosages des activités luciférase et β -galactosidase sont effectués après 16 h de récupération dans du DHG contenant 10 % de SVF. Les résultats sont présentés à la figure 3.1. De manière surprenante, malgré l'activation constitutive de CREB dans les cellules déplétées en ADNmt, on constate une diminution de l'activité luciférase dans les cellules L929 rho⁻ et plus encore dans les cellules 143B rho0. Ce résultat suggère une diminution de l'expression de PGC-1 α dans les cellules déplétées en ADNmt. Le gène rapporteur est cependant légèrement activé par la surexpression de VP16-CREB dans les cellules L929 et 143B, ce qui confirme la réponse du promoteur de la construction au facteur CREB activé.

En effet, le fragment du promoteur de PGC-1 α utilisé dans notre système rapporteur contient un site putatif CRE pour le facteur CREB, à la position –130 en amont du site d'initiation de la transcription. La forme VP16-CREB est une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de CREB et le domaine de transactivation d'une protéine virale : VP16. Une fois lié à l'ADN, VP16-CREB est constitutivement actif.

Si nous n'avons pas d'explication précise pour rendre compte de l'absence d'activation du gène rapporteur dans les cellules déplétées en ADNmt, remarquons que même la surexpression de VP16-CREB n'active le rapporteur que deux fois ou moins. Il est possible que l'état d'activation de CREB soit insuffisant pour activer le rapporteur. Il est également possible que le promoteur tronqué ne possède plus les éléments permettant la fixation de régulateurs nécessaires pour permettre l'activation CREB-dépendante du promoteur de PGC-1 α . Des expériences complémentaires utilisant un rapporteur contenant le promoteur complet du gène ou délété du site CRE et la quantification du taux de transcrits du gène de PGC-1 α endogène en « real-time PCR » devraient être réalisées pour s'assurer de la validité de ces premiers résultats.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de confirmer, au niveau protéique, la diminution de l'expression de PGC-1 α dans les cellules déplétées en ADNmt. Nous avons donc réalisé une analyse en Western blotting de l'abondance de cette protéine dans les cellules L929, L929 rho⁻, 143B et 143B rho0. L'anticorps dirigé contre PGC-1 α reconnaissant plusieurs bandes, nous avons ajouté un contrôle positif dans lequel des cellules 143B ont été transitoirement transfectées au Superfect avec une construction qui code pour la forme sauvage de PGC-1 α . A la figure 3.2, nous observons que l'abondance de la protéine PGC-1 α est plus faible dans les cellules L929 que dans les cellules 143B mais surtout que l'expression de PGC-1 α est moindre dans les cellules déplétées en ADNmt. Sur base de la détermination de la densité optique des différents signaux, nous avons pu calculer une diminution de 40 % de l'abondance de PGC-1 α dans les cellules L929 rho⁻ et 143B rho0 par rapport aux contrôles correspondants. La bande d'intérêt aux alentours de 90 kDa est confirmée par la présence de la surexpression de la protéine dans les cellules 143B.

Il semble donc que la diminution d'activité observée pour le système rapporteur luciférase dans les cellules déplétées en ADNmt soit bien corrélée à une diminution de l'abondance de la protéine endogène dans ces cellules.

Le co-activateur PGC-1 α est décrit pour être surexprimé dans des conditions nécessitant une stimulation du processus de mitobiogenèse, comme dans les cellules musculaires répondant à une stimulation électrique simulant l'exercice musculaire (Baar et al., 2002) ou



A

Figure 3.2 : Analyse de l'abondance de la protéine PGC-1α par une analyse en Western blot sur des lysats clairs préparés à partir de cellules L929 (piste 1), L929 rho⁻ (piste 2), 143B (piste 3) et 143B rho0 (piste 4). Un contrôle positif est réalisé en surexprimant la protéine PGC-1α dans des cellules 143B (piste 5).

A) Des lysats cellulaires clairs ont été réalisés à partir de cellules confluentes et 20 μ g de protéines de lysats clairs ont été chargés dans un gel NuPAGE 4-12 %. La protéine PGC-1 α est révélée en présence d'un anticorps anti-PGC-1 α . Un contrôle de charge est effectué par la détection de l' α -tubuline. Le film a ensuite été scanné pour obtenir les densités optiques (D.O.) de chacune des bandes.

B) Résultats présentant les rapports de D.O. entre les signaux des bandes d'intérêts (PGC-1 α) et de contrôle de charge (α -tubuline) exprimés en pourcentages des cellules contrôles L929 ou 143B.



Figure 3.3 : Mesure de la concentration en NO dans des cellules L929 et L929 rho⁻.

Les cellules, ensemencées dans des boîtes de 75 cm², sont râclées après 24 h dans 500 μ l de PBS et passées 40 fois au Dounce pour homogénéisation. Les homogénats sont ensuite centrifugés 15 min dans des tubes Milliport. Le dosage est réalisé sur 70 μ l de filtrat comme décrit dans le matériel et méthode. Les résultats sont calculés en picomoles de NO par microgramme de protéines puis exprimés en pourcentages des cellules contrôles L929 comme la moyenne de deux échantillons (n=2) pour deux expériences différentes.

bien encore dans le cadre de la thermogenèse adaptative au froid dans les adipocytes bruns (Lowell and Spiegelman, 2000). Notons que dans certaines conditions pathologiques, comme le diabètes de type 2, il semble au contraire que l'expression de ce co-activateur soit diminuée, ce qui semble s'accompagner d'une diminution du taux d'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines des phosphorylations oxydatives, (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003). Ces données sont controversées car Herzig *et al.*, 2001 rapportent qu'en cas de diabètes, PGC-1 α est induit et participe à la néoglucogenèse et que l'expression de ce co-facteur est réprimée par une stimulation des cellules HepG2 à l'insuline (Herzig et al., 2001). L'accumulation de glucose dans la cellule semble donc réprimer l'expression de PGC-1 α , une hypothèse dont nous reparlerons au point 3.7.

Une étude récente a montré, quant à elle, que l'abondance de PGC-1 α dans des cellules C2C12 rho⁻ ne semblait pas varier par rapport aux cellules parentales, tandis qu'une diminution de 8 % est observable dans des cellules rho0 repeuplées par des mitochondries issues de patients présentant la pathologie MELAS (Joseph et al., 2004). Les multiples conditions pour lesquelles on peut observer une modification de l'expression de PGC-1 α semblent donc suggérer un mode de régulation assez complexe de l'expression de cette protéine incontournable dans le processus de mitobiogenèse. Néanmoins, il semble que dans les cellules déplétées en ADNmt, la surexpression de ce co-activateur ne soit pas nécessaire pour observer un maintien de la structure mitochondriale.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction au point 1.4.5, en plus de CREB, un autre mécanisme semble pouvoir réguler l'expression de PGC-1 α : la production de NO (Nisoli et al., 2003). Même si les mécanismes par lesquels le NO active l'expression de PGC-1 α sont totalement inconnus, nous avons voulu quantifier et comparer la production de NO par les cellules L929 et L929 rho⁻.

3.2 Recherche de la production d'oxyde nitrique par les cellules L929 et L929 rho⁻

Le NO généré par de nombreuses NOS (eNOS, nNOS, iNOS et mtNOS) au cours de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline peut rapidement réagir dans les cellules et être transformé en nitrates et nitrites. Afin de quantifier la production de NO par les cellules déplétées en ADNmt, nous avons dosé les dérivés métaboliques du NO dans des cellules L929 et L929 rho-, en utilisant un kit colorimétrique « nitric oxide quantitation kit » (Active Motif, Belgique). Ce test demande beaucoup de matériel cellulaire. Des cellules L929 et L929 rho (équivalent à 5 boîtes de 75 cm² pour chaque lignée) ont été homogénéisées dans 500 µl de PBS par 40 passages au Dounce. Les homogénats ont ensuite été filtrés afin d'éliminer toutes les protéines de PM supérieur à 10 kDa pouvant interférer avec le dosage. Le test est réalisé suivant la méthode décrite au point 1.10.2. Nous observons, à la figure 3.3, une diminution de la production de NO dans les cellules L929 rho⁻. La concentration en NO déterminée dans les cellules L929 et L929 rho⁻ sur base de la courbe d'étalonnage standard établie est respectivement de 3,22 picomoles de NO/µg de protéines et 1,55 picomoles de NO/µg de protéines. Dans deux expériences différentes, la diminution de la concentration en NO dans les cellules L929 rho⁻ est de 51 % et 80 % (voir figure 3.3).

Il semble donc que la production de NO soit moins active dans les cellules déplétées en ADNmt. Des investigations supplémentaires seraient nécessaires pour tenter d'identifier l'enzyme responsable de la production de NO dans ces cellules. Nous penchons pour une forme de NOS indépendante du calcium. En effet, rappelons que la concentration cytosolique est élevée dans le cytosol des cellules L929 rho⁻ (Arnould et al., 2002). Il serait également intéressant de rechercher le lien éventuel existant entre la diminution de la quantité de NO dans les cellules déplétées en ADNmt et la diminution de l'abondance observée pour PGC-1 α



Figure 3.4 : Analyse de l'abondance de la protéine NRF-1 en Western blot sur des extraits préparés à partir de 143B (piste 1), 143B rho0 (piste 2), L929 (piste 3) et L929 rho⁻ (piste 4)

A) Des lysats cellulaires ont été réalisés avec un tampon de lyse contenant 1% de Triton X-100 et 20 μ g de protéines de lysats clairs ont été chargés dans un gel NuPAGE 4-12 %. La protéine NRF-1 est révélée en présence d'un anticorps anti-NRF-1. Un contrôle de charge est effectué par la détection de l' α -tubuline sur la même membrane. Le film a ensuite été scanné pour obtenir les densités optiques (D.O.) de chacune des bandes.

B) Résultats présentant les rapports de D.O. entre les bandes d'intérêts (NRF-1) et de contrôles de charge (α -tubuline) exprimés en pourcentages des cellules contrôles L929 ou 143B.

et la mitobiogenèse. Ceci pourrait être fait assez aisément en incubant des cellules déplétées en ADNmt en présence d'une molécule donneuse de NO comme le S-nitrosoacetyl penicillamine (SNAP), ou en utilisant de l'oxyhémoglobine, un « scavenger » de NO, ou en testant le L-NAME, un inhibiteur des isoformes de NOS sur les cellules parentales et en recherchant l'abondance de la protéine PGC-1 α dans les cellules après ces différentes incubations. Des marqueurs de la mitochondrie comme l'abondance du cytochrome c, de COXIV et la quantification de la population mitochondriale à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques de la mitochondrie comme le NAO et le Mitotracker Red pourraient de plus nous indiquer si la modification de l'abondance de PGC-1 α dans ces conditions et la modification de la production de NO ont un effet sur la biogenèse de la mitochondrie dans nos lignées cellulaires.

Le lien entre la production de NO et la mitobiogenèse est récent (Brown, 2003; Nisoli et al., 2003). A l'heure actuelle bon nombre de questions restent posées comme le fait de savoir si le NO induit la biogenèse mitochondriale dans tous les types cellulaires ou comment relier l'activation du NO/cGMP à la régulation de l'expression de PGC-1 α .

PGC-1 α est un co-activateur qui ne lie pas l'ADN mais est présenté comme un excellent candidat pour coordonner l'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales placés sous le contrôle de nombreux facteurs de transcription différents. En effet, cette protéine interagit et lie de nombreux facteurs de transcription et pourrait donc participer à coordonner l'expression de nombreux gènes. Parmi les facteurs de transcription avec lesquels PGC-1 α interagit, le mieux décrit est NRF-1. La régulation de l'activation de la transcription dépendante de NRF-1 par PGC-1 α a été mise en évidence par Wu *et al.* dans le cadre de la mitobiogenèse dans des cellules COS (Wu et al., 1999). Nous avons donc recherché l'état d'abondance et l'état d'activation de NRF-1 dans les cellules déplétées en ADNmt.

3.3 RECHERCHE DE L'ABONDANCE ET DE L'ACTIVITE DE NRF-1

Dans un premier temps, nous avons voulu rechercher l'abondance de la protéine NRF-1 dans les cellules déplétées en ADNmt et comparer le niveau d'expression de ce facteur de transcription essentiel dans le processus de mitobiogenèse. L'analyse en Western blotting de l'abondance de NRF-1 réalisée sur 20 µg de lysats clairs préparés à partir de cellules L929, L929 rho⁻, 143B et 143B rho0 est présentée à la figure 3.4. On peut observer sur cette figure que NRF-1 est moins abondant dans les cellules 143B rho0 et L929 rho⁻. Si ces différences n'apparaissent pas immédiatement sur le Western blot, une analyse de la densité optique des différentes bandes d'intérêt rapportée à la densité optique des contrôles de charge nous a permis de calculer 46 % et 32 % de diminution pour, respectivement les cellules 143B rho0 et L929 rho⁻. Or nous avons montré à la figure 3.2 que l'abondance de PGC-1 a est diminuée de 41 % dans les cellules L929 rho⁻ et 143B rho0. Nous observons donc une bonne corrélation entre les diminutions de l'expression de PGC-1a et de NRF-1. Si nous n'avons pas d'argument direct permettant de lier l'abondance de PGC-1 a à l'abondance de NRF-1, Patti et al. montrent que PGC-1a est capable de contrôler l'expression de NRF-1 (Patti et al., 2003). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la diminution de PGC-1a pourrait causer la diminution de l'expression du facteur de transcription NRF-1 dans les cellules déplétées en ADNmt.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché si la diminution de l'abondance de NRF-1 se traduisait bien par une diminution de l'action transactivatrice du facteur de transcription. Pour cela, nous avons utilisé une approche en système rapporteur luciférase dans des cellules 143B et 143B rho0. Les résultats obtenus par Ludovic Mercy montrent une diminution d'environ 20 % de l'activité luciférase normalisée dans les cellules 143B rho0.





Figure 3.5 : A) Effet de la surexpression du co-activateur PGC-1α sur l'activité d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique du mtTFA dans des cellules L929.

Les cellules L929, ensemencées à raison de 25000 cellules/puits dans une boîte de 24 puits sont transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec un plasmide rapporteur mtTFA-RC4/pGL3 (0,5 μ g), un plasmide codant pour la β -galactosidase (0,25 μ g) et 0,5 μ g d'un vecteur pSV-SPORT (contrôle) ou avec un plasmide codant pour la forme sauvage de PGC-1 α . Les résultats sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles L929 et représentent la moyenne \pm un écart-type pour n=3.

B) Etude de l'abondance de la protéine mtTFA en Western blot dans des lysats clairs préparés à partir de cellules L929 et L929 rho. La lyse cellulaire est réalisée avec un tampon de lyse contenant 1 % de Triton-X100 et 20 μ g de protéines de lysats clairs ont été chargés dans un gel NuPAGE 4-12 %. La protéine mtTFA est révélée en présence d'un anticorps anti-mtTFA. Un contôle de charge est effectué par la détection de l' α -tubuline.

B

A

Puisque nous montrons qu'à la fois PGC-1 α et NRF-1 sont moins exprimés dans les cellules déplétées en ADNmt, nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression du gène codant le mtTFA, dont l'expression est régulée par ces deux facteurs (Virbasius and Scarpulla, 1994). Ce facteur de transcription codé par le génome nucléaire est un facteur de transcription essentiel impliqué dans la transcription et la réplication du génome mitochondrial dans les cellules pourvues d'ADNmt (Choi et al., 2001). Ces expériences devraient permettre de savoir si les diminutions de l'abondance de PGC-1 α et de NRF-1, deux protéines essentielles dans le processus de mitobiogenèse de cellules possédant un génome mitochondrial, a effectivement un effet sur l'expression d'un gène cible.

3.4 RECHERCHE DE L'EXPRESSION DE MTTFA

Afin de mettre en évidence le niveau d'expression de mtTFA dans les cellules déplétées en ADNmt, nous avons voulu vérifier que le promoteur du mtTFA répond bien à la protéine PGC-1 α . Pour cela, nous avons d'abord testé l'effet d'une surexpression du co-activateur PGC-1 α sur l'activation d'un gène rapporteur luciférase contrôlé par le promoteur authentique du mtTFA.

Des cellules L929 sont ensemencées à raison de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits. Elles sont ensuite co-transfectées transitoirement pendant 6 h avec 0,5 µg d'une construction rapporteur luciférase, 0,25 µg d'un plasmide codant la β-galactosidase et 0,5 µg d'un vecteur pSV-SPORT (contrôle) ou d'un plasmide codant pour la forme sauvage de PGC-1α. Les dosages des activités luciférase et β-galactosidase sont réalisés 24 h post transfection. Les résultats, présentés à figure 3.5A montrent une induction de l'expression et donc de l'activité de la luciférase suite à la surexpression de PGC-1 a dans les cellules L929 rho⁻. Ces résultats confirment bien l'implication de ce co-activateur dans la régulation de l'expression du mtTFA. Les cellules L929 et L929 rho⁻ ont été choisies dans cette expérience car si la transfectabilité des cellules 143 B (efficience de transfection ± 10 %) est compatible avec la sensibilité des systèmes rapporteurs luciférase, pour les expériences de surexpression, nous devons utiliser la lignée L929 pour laquelle nous obtenons des efficiences de transfection de 60 à 70 %. Nous avons donc ensuite voulu rechercher l'abondance de la protéine mtTFA endogène dans des cellules L929 et L929 rho⁻ par une analyse en Western blotting. A la figure 3.5B, nous présentons les résultats du Western blotting effectué sur 20 µg de lysats clairs préparés à partir de ces cellules. Nous pouvons voir que l'abondance de la protéine mtTFA est beaucoup plus faible dans les cellules L929 rho⁻ (\pm 55 %) que dans les cellules parentales L929. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus pour les diminutions d'abondance des protéines NRF-1 et PGC-1 a dans ces cellules.

Il semble que l'abondance de la protéine mtTFA dans les cellules déplétées en ADNmt soit variable en fonction du type cellulaire considéré. En effet, certains auteurs montrent que les taux de transcrits des gènes mtTFA et NRF-1 sont augmentés dans des cellules HeLa rho0 (Miranda et al., 1999) suggérant soit des différences entre les types cellulaires soit une régulation importante au niveau traductionnel pour réprimer la synthèse de la protéine. Rappelons qu'une étude plus récente réalisée par Joseph *et al.* montre également que, dans des cellules C2C12 déplétées en ADNmt, les abondances des protéines endogènes NRF-1 et mtTFA diminuent respectivement de 33 et 54 % (Joseph et al., 2004). La diminution d'expression, mais pas l'absence totale de ce facteur observée lors d'une déplétion en ADNmt, pourrait donc permettre, dans des populations de cellules déplétées en ADNmt hétérogènes ou non clonales, de maintenir un certain nombre de copies du génome mitochondrial au cours de la culture (Seidel-Rogol and Shadel, 2002).

En conclusion de cette première partie, tous les acteurs moléculaires étudiés et décrits pour participer activement à la mitobiogenèse (PGC-1 α , NRF-1 et mtTFA) semblent moins exprimés dans les cellules déplétées en ADNmt que dans les cellules parentales contrôles.

Leur activation ou surexpression pour tenter d'expliquer la présence de structures mitochondriales dans ces cellules semble donc peu probable.

Parmi les facteurs de transcription principalement décrits pour participer à la biogenèse mitochondriale (Scarpulla, 2002) et étudiés au laboratoire dans le cadre de la thèse de Ludovic Mercy (voir figure 1.28), seul CREB est activé dans les cellules déplétées en ADNmt. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à d'autres facteurs de transcription susceptibles de jouer un rôle dans la biogenèse mitochondriale, comme la protéine HNF-4 α .

Le facteur de transcription HNF-4a a essentiellement été décrit dans les hépatocytes pour son rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides (Hayhurst et al., 2001). HNF-4α peut également interagir in vitro avec le coactivateur PGC-1a (Hayhurst et al., 2001). De manière intéressante, Louet et al. ont pu récemment mettre en évidence une coopération moléculaire existant entre HNF-4α et CREB dans la régulation de l'expression du gène codant la Liver Carnitine Palmitoyltransferase-1 (L-CPT-1) (Louet et al., 2002). Cette enzyme constitue la première étape de l'entrée des acyls-CoA dans la mitochondrie et constitue une étape limitante de la β-oxydation mitochondriale des acides gras. Des données récentes obtenues au laboratoire montrent que la β-oxydation des acides gras est augmentée dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt. Cette augmentation de la β-oxydation pourrait être liée à une augmentation de l'importation par une augmentation de l'expression de la L-CPT-1. Cette hypothèse est à confirmer par l'analyse de l'expression de la CPT-1 (Ludovic Mercy, thèse en cours). Dans le contexte de la régulation de l'expression de cette enzyme, il semble donc que CREB, HNF-4a et PGC-1α forment un complexe interactif et que l'action de PGC-1α comme co-activateur s'exerce par une interaction préférentielle avec HNF-4a. Sur base de ces informations, nous avons recherché l'état d'activité du facteur de transcription HNF-4α dans les cellules déplétées en ADNmt.

3.5 ETUDE DE L'ETAT D'ACTIVITE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HNF-4α DANS LES CELLULES 143B ET 143B RH00

Ne possédant pas de système rapporteur pour mesurer l'activité du facteur HNF-4 α , nous nous sommes tournés vers un test permettant de déterminer l'importance de la liaison de ce facteur à l'ADN. Pour mettre en évidence un éventuel effet d'un dysfonctionnement mitochondrial sur la liaison de ce facteur à une séquence consensus d'ADN, nous avons effectué un test colorimétrique TransAM. Brièvement, des extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules 143B et 143B rho0. Les extraits nucléaires ont été mis en présence d'un fragment d'ADN biotinylé fixé au fond des puits d'une plaque de 96 puits tapissés de streptavidine. Cet ADN contient une fois la séquence consensus de HNF-4 α (RG(G/T)TCAnRG(G/T)TCA). Après plusieurs rinçages, l'abondance du facteur de transcription fixé à sa séquence consensus est déterminée en utilisant un anticorps anti-HNF-4 α , lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à la HRP. L'absorbance du produit de la réaction colorimétrique est finalement mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats présentés à la figure 3.6A montrent une augmentation de l'activité de liaison de HNF-4 α à l'ADN (± 3 fois) dans les cellules 143B rho0. Ces résultats semblent suggérer une activation de ce facteur dans les cellules 143B rho0. Cette augmentation de la liaison à une sonde d'ADN de capture double brins peut résulter au moins de deux phénomènes : une augmentation de l'abondance totale du facteur HNF-4 α dans le noyau des cellules 143B rho0 ou une réelle modification de l'activité de liaison pour une abondance non modifiée dans le noyau de ces cellules. Afin de tenter de répondre à ces questions, nous avons, dans un premier temps, réalisé un Western blotting à partir d'extraits nucléaires préparés à partir de cellules 143B rho0. Ces extraits sont les mêmes que ceux qui ont servi au test de liaison à l'ADN. A la figure 3.6B, on peut observer une légère augmentation



Figure 3.6 : A) Mesure de l'activité de liaison du facteur de transcription HNF-4α à sa séquence consensus réalisée à partir d'extraits nucléaires issus de cellules 143B et 143B rho0.

Les extraits nucléaires sont incubés en présence de la séquence consensus de HNF-4 α fixée dans les puits d'une plaque de 96 puits. Le facteur lié est détecté au moyen d'un anticorps polyclonal de lapin, puis d'un anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase). La révélation est effectuée en présence du substrat de l'enzyme. Les résultats sont exprimés en pourcentages de l'activité de liaison de HNF-4 α dans les cellules 143B contrôles et représentent la moyenne \pm un écart-type pour n=3.

B) Analyse, en Western blot, de l'abondance du facteur de transcription HNF-4α dans des extraits nucléaires préparés à partir de cellules 143B et 143B rho0.

Une quantité de 20 μ g de protéines nucléaires a été chargée dans un gel NuPAGE 4-12 %. La protéine HNF-4 α est révélée en présence d'un anticorps anti-HNF-4 α . Un contrôle de charge est effectué par la détection de la protéine TBP (TFIID) sur la même membrane.

C) Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription HNF-4 α dans des cellules 143B et 143B rho0.

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles couvre-objets à une densité de 25000 cellules par puits dans une plaque de 24 puits. Le lendemain, elles sont fixées à la PFA 4 % puis perméabilisées au Triton X-100. Le marquage est ensuite effectué par une incubation avec un anticorps anti-HNF-4 α suivi d'un anticorps secondaire couplé à une sonde ALEXA. Les flèches indiquent la localisation essentiellement nucléaire du facteur HNF-4 α dans les cellules 143B rho0.

de l'abondance de la protéine HNF-4 α dans les extraits nucléaires de cellules 143B rho0. Le calcul du rapport des densités optiques des bandes d'intérêt et des signaux de contrôles de charge montre une légère augmentation de 30 % pour l'abondance de HNF-4 α dans les extraits de cellules 143 B rho0. Il semble donc que l'augmentation de la liaison de ce facteur à l'ADN soit due, mais en partie seulement, à une augmentation de son expression et/ou de sa translocation nucléaire dans les cellules rho0.

Dans le but de rechercher l'abondance et la localisation de la protéine HNF-4 α dans les cellules 143B rho0, nous avons donc ensuite réalisé des marquages en immunofluorescence pour ce facteur et des observations en microscopie confocale. Les cellules 143B et 143B rho0 ont été ensemencées sur des lamelles couvre-objets dans des boîtes de 24 puits et fixées à la paraformaldéhyde puis perméabilisées au Triton X-100. Les cellules fixées sont ensuite incubées avec un anticorps anti-HNF-4 α puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. A la figure 3.6C, on peut constater que l'abondance globale du facteur de transcription est beaucoup plus importante dans les cellules 143B rho0. On constate également que la protéine HNF-4 α est très abondante dans le noyau de ces cellules bien que la localisation du facteur ne soit pas uniquement limitée au noyau. La signification biologique de cette accumulation péri-nucléaire est inconnue et amène certaines questions. HNF-4 α possède-t-il une fonction cytosolique ? Son activation passe-t-elle par une régulation hors du noyau ? Le marquage atypique est-il le résultat d'une accumulation dans le réticulum endoplasmique attestant de la surexpression du facteur?

Bien que la régulation de l'expression de HNF-4 α soit encore mal connue, des gènes cibles, autres que ceux décrits dans le cadre de la gluconéogenèse hépatique, ont été identifiés. Parmi ceux-ci, une étude récente a mis en évidence une relation entre l'abondance de HNF-4 α et la transcription du gène PGC-1 α . En effet, dans des hépatocytes (HNF-4 $\alpha^{-1/2}$) issus de souris knock out (KO) pour le gène HNF-4a, le niveau d'ARNm codant pour PGC-1a est augmenté (Rhee et al., 2003). HNF-4a pourrait donc agir comme un répresseur de l'expression du coactivateur PGC-1a. Il serait dès lors intéressant de rechercher le rôle de HNF-4a dans le contrôle de l'expression de PGC-1a dans les cellules rho0 et de mettre en évidence un rôle éventuel de l'activité de HNF-4a dans la diminution de la transcription du gène PGC-1a observée dans les cellules 143B rho0. Pour ce faire, il nous faudrait d'abord montrer que HNF-4α possède une action transactivatrice dans les cellules rho0 à l'aide d'un système rapporteur. Il nous faudrait alors rechercher le rôle de ce facteur dans le contrôle de l'expression de PGC-1 dans des cellules 143B rho0. Ceci pourrait être réalisé en étudiant l'abondance des transcrits du gène et de la protéine PGC-1 a dans des cellules 143B rho0 qui surexpriment un dominant négatif de HNF-4a. Nous disposons en effet de cet outil moléculaire au laboratoire. Cependant, l'efficacité de transfection dans ces cellules étant faible, nous devrions probablement utiliser une stratégie de type ARN interférent en transfectant des siRNA pour HNF-4a dans les cellules rho0. On pourrait également refaire ces expériences dans les cellules L929 rho⁻, ou comme prévu dans le cadre de la thèse de Ludovic Mercy, établir des lignées stables inductibles de lignées 143B rho0 pour le dominant négatif HNF-4 α .

Ayant montré une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN et de l'abondance de HNF-4 α , nous avons voulu savoir si cette activation était bien induite par l'inhibition de l'activité mitochondriale. Pour cela, nous avons inhibé l'activité mitochondriale de cellules parentales par des inhibiteurs métaboliques de la mitochondrie. Nous avons donc testé cette hypothèse en recherchant l'activité de liaison du facteur HNF-4 α à sa séquence consensus à partir d'extraits de cellules parentales 143B préalablement incubées pendant 6 h en présence de différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Les inhibiteurs pharmacologiques utilisés sont l'antimycine A, le FCCP et l'oligomycine.

L'antimycine A est une molécule qui inhibie le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'oligomycine inhibe la partie F0 du complexe F0-F1 ATP synthase et le


Figure 3.7 : Mesure de l'activité de liaison du facteur de transcription HNF-4 α à sa séquence consensus réalisée à partir d'extraits nucléaires issus de cellules 143B incubées 6 h avec des inhibiteurs métaboliques des phosphorylations oxydatives mitochondriales.

Les cellules sont ensemencées à une dilution de 1 : 8 dans des boîtes de 75 cm². Le lendemain, elles sont incubées pendant 6 h en présence d'antimycine A (AA) 1 μ M, de FCCP 10 μ M ou d'oligomycine 8 μ M. Après 16 h de récupération dans du DHG contenant 10 % de SVF, des extraits nucléaires sont préparés et un test de liaison à l'ADN pour le facteur HNF-4 α est effectué. Les résultats sont exprimés en pourcentages de l'activité de liaison du facteur HNF-4 α dans les cellules contrôles 143B et représentent la moyenne ± un écart-type pour n=3.



A

B

C

Figure 3.8 : A) Mesure de l'activité de liaison du facteur de transcription HNF-1 α à sa séquence consensus réalisée à partir d'extraits nucléaires issus de cellules 143B et 143B rho0.

Les extraits nucléaires sont incubés en présence de la séquence consensus de HNF-1 α fixée dans les puits d'une plaque 96 puits. Le facteur lié est détecté au moyen d'un anticorps polyclonal de lapin, puis d'un anticorps secondaire couplé à l'HRP. La révélation est effectuée en présence du substrat de l'enzyme. Les résultats sont exprimés en pourcentages de l'activité de liaison de HNF-1 α dans les cellules 143B et représentent la moyenne \pm un écart-type pour n=3.

B) Analyse, en Western blot, de l'abondance du facteur de transcription HNF-1 α dans des extraits nucléaires issus de cellules 143B et 143B rho0. Une quantité de 20 μ g de protéines nucléaires a été chargée dans un gel NuPAGE 4-12 %. La protéine HNF-1 α est révélée en présence d'un anticorps anti-HNF-1 α . Un contrôle de charge est effectué par la détection de la protéine TBP (TFIID).

C) Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription HNF-1 α dans des cellules 143B et 14B rho0. Les cellules sont ensemencées sur des lamelles couvre-objets à une densité de 25000 cellules par puits dans une plaque de 24 puits. Elles sont fixées à la PFA 4 % puis perméabilisées au Triton X-100. Le marquage est ensuite effectué par une incubation avec un anticorps anti-HNF-1 α puis un anticorps secondaire couplé à une sonde ALEXA. Les flèches montrent la localisation essentiellement nucléaire de HNF-1 α .

FCCP est un agent découplant qui permet le retour des H⁺ dans la matrice sans passer par la F0-F1 ATPsynthase et dissipe donc le potentiel de membrane mitochondrial. Toutes ces molécules inhibent donc la synthèse d'ATP.

Les cellules 143B sont ensemencées dans des boîtes de 75 cm² à une dilution de 1 : 8 et incubées ou non pendant 6 h avec 1 μ M d'antimycine A, 10 μ M d'oligomycine ou 8 μ M de FCCP. Les extraits nucléaires sont réalisés après 16 h de récupération dans du DHG additionné de SVF et un test de liaison à l'ADN est ensuite effectué selon la méthode décrite au point 1.5.2. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.7.

Nous pouvons constater qu'une inhibition de l'activité mitochondriale de courte durée (6 h) en présence de fortes concentrations en inhibiteurs n'a aucun effet sur l'activité de liaison du facteur HNF-4 α à l'ADN. Ces conditions d'incubation sont couramment utilisées au laboratoire et induisent une diminution du contenu en ATP dans les cellules d'environ 40 % (Arnould et al., 2002). Il est possible que l'augmentation de l'abondance et de l'activité de HNF-4 α dans les cellules 143B rho0 soit dûe à une adaptation à plus long terme de ces cellules déplétées en ADNmt. Il n'est en effet pas rare d'observer des différences entre les réponses cellulaires obtenues pour une inhibition chronique de l'activité mitochondriale (déplétion en ADNmt) ou celles observées en présence d'inhibiteurs métaboliques induisant une inhibition aigüe. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en traitant des cellules 143B au bromure d'éthidium pour induire une déplétion en ADNmt et en réalisant des tests de liaison à l'ADN à différents temps pour tenter d'identifier la mise en place de ce processus d'adaptation et l'augmentation de la liaison de HNF-4 α . Des incubations plus longues (3-4 jours) en présence des inhibiteurs métaboliques à ces concentrations ou à des concentrations plus faibles sont également envisageables. Enfin, sachant que la concentration en calcium cytosolique libre est augmentée dans les cellules rho0 (Arnould et al., 2002), des tests de liaison de HNF-4a réalisés à partir d'extraits de cellules 143B rho0 préalablement incubées en présence de BAPTA-AM, un chélateur intracellulaire de calcium seront également réalisés pour rechercher une éventuelle participation du calcium intracellulaire dans l'augmentation de l'expression et de liaison du facteur HNF-4a dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial.

Ne possédant pas encore de système rapporteur luciférase répondant à HNF-4 α au laboratoire et afin de savoir si l'augmentation de l'abondance et de la liaison à l'ADN du facteur de transcription s'accompagne d'un effet transactivateur de ce facteur, nous avons recherché l'abondance, la localisation subcellulaire et l'activité de liaison à l'ADN de HNF-1 α , un autre récepteur nucléaire de la famille des HNF dont l'expression est régulée par HNF-4 α (Gragnoli et al., 1997).

Des extraits nucléaires préparés à partir de cellules 143B et 143B rho0 ont été mis en présence d'un fragment d'ADN biotinylé contenant la séquence consensus de HNF-1 α , au fond des puits d'une plaque de 96 puits tapissés de streptavidine. Après plusieurs rinçages, l'abondance du facteur de transcription fixé à sa séquence consensus a été estimée en utilisant un anticorps anti-HNF-1 α , puis un anticorps secondaire couplé à la HRP. L'absorbance du produit de la réaction colorimétrique a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

A la figure 3.8 A, on peut observer une augmentation de 300 % de la liaison de HNF-1 α à sa séquence consensus. Suivant la même démarche que pour HNF-4 α , nous avons ensuite effectué un Western blotting à partir de 20 µg d'extraits nucléaires préparés à partir de cellules 143B et 143B rho0. A la figure 3.8 B, on peut constater que l'abondance de la protéine HNF-1 α augmente également fortement dans les cellules 143B rho0. Tout comme HNF-4 α , l'augmentation de la liaison à l'ADN de HNF-1 α est probablement due à une plus grande abondance du facteur de transcription dans le noyau. Un marquage en immunofluorescence et des observations au microscope confocal nous ont également permis de confirmer la surexpression nucléaire de HNF-1 α dans les cellules 143B rho0.

Contrairement au « pattern » de marquage obtenu pour HNF-4 α , nous n'observons pas d'accumulation péri-nucléaire de HNF-1 α .

Afin de vérifier que l'activation de HNF-4 α est non seulement corrélée à mais bien responsable de la surexpression de HNF-1 α , nous pourrions rechercher l'abondance de ce dernier dans des cellules 143B rho0 transfectées avec un siRNA permettant de réprimer l'expression de HNF-4 α .

A notre connaissance, c'est la première fois que l'activation des facteurs de transcription HNF-4 α et HNF-1 α est décrite dans un contexte de dysfonctionnement mitochondrial. De plus, sans être décrits comme des facteurs régulant la mitobiogenèse, ces facteurs contrôlent l'expression de plusieurs gènes codant des protéines mitochondriales. Rappelons également que parmi tous les facteurs testés au laboratoire, ces facteurs, avec CREB, semblent les seuls à être activés dans des cellules déplétées en ADNmt comme les cellules 143 B rho0. Il serait donc intéressant de pouvoir caractériser la voie de signalisation menant à l'activation de HNF-4 α . Au niveau post-traductionnel, une première piste pourrait impliquer le NO en tant que messager secondaire du dysfonctionnement mitochondrial. En effet, il a été démontré que la production de NO, dans un contexte inflammatoire par exemple, pouvait entraîner la diminution de la liaison de HNF-4α à l'ADN et ainsi réduire son action transactivatrice (Vossen and Erard, 2002). Le mode d'action du NO impliquerait la nitrosylation des cystéines présentes dans le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription (Marshall et al., 2000). Etant donné que dans notre modèle de cellules déplétées en ADNmt il semble que la production de NO soit diminuée, il est possible d'envisager un effet de cette diminution de la production du NO sur l'augmentation de la liaison du facteur HNF-4 α à l'ADN. D'autres pistes devraient cependant être envisagées car comme l'abondance de la protéine est augmentée dans les cellules 143B rho0, une régulation au niveau transcriptionnel est probalement impliquée. Pour cela, une étude du promoteur de HNF-4 α devrait être réalisée afin de rechercher des sites potentiels pour des facteurs de transcription. Cette analyse permettrait de dégager des facteurs de transcription candidats susceptibles de modifier le niveau de transcription du gène dans un contexte de dysfonctionnement mitochondrial.

De nombreux travaux montrent qu'en amont de l'activation de facteurs de transcription, la communication moléculaire rétrograde entre la mitochondrie et le noyau implique également l'activation ou la diminution de l'activité de certaines protéines kinases. Par exemple, nous savons que dans les cellules L929 et 143B déplétées en ADNmt, la CaMKIV est activée et entraîne l'activation de CREB (Arnould et al., 2002).

Nous nous sommes donc ensuite intéressés à deux kinases, la caséine kinase II et l'AMPK, décrites comme étant des « senseurs énérgétiques » de la cellule. L'activité de ces deux kinases pourrait donc être modifiée dans le cadre d'un dysfonctionnement énergétique chronique. Ces deux kinases sont, de plus, impliquées dans le processus de biogenèse mitochondriale en régulant l'activité de facteurs de transcription comme NRF-1 (Bergeron et al., 2001; Gugneja and Scarpulla, 1997). Enfin, mentionnons que l'AMPK a également été décrite pour réguler l'activité de HNF-4 α . En effet, une activation de l'AMPK se traduit par une inhibition de la formation des dimères de HNF-4 α et une diminution de la stabilité de la protéine (Hong et al., 2003). Il est donc intéressant de doser l'activité de ces enzymes dans les cellules déplétées en ADNmt. Nous avons choisi pour cela les L929 et L929 rho⁻. Les mêmes expériences devraient également être réalisées sur des cellules 143 B et 143 B rho0.





Figure 3.9 : A) Mesure de l'activité kinase de l'AMPK immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules L929 et L929 rho-.

Après immunoprécipitation de l'AMPK à partir de lysats clairs de cellules L929 et L929 rho-, le dosage de l'activité kinase *in vitro* est réalisé en présence d'un peptide synthétique et d'ATP radioactif. Le peptide phosphorylé est alors retenu sur une membrane et après deux rinçages à l'aide d'acide phosphorique, la radioactivité associée à la membrane est comptée. Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne de deux tests (n=2). La quantité d'AMPK immunoprécipitée (IP) présente dans chaque test est contrôlée par une analyse en Western blotting avec un anticorps anti-AMPK.

B) Mesure de l'activité kinase de la caséine kinase II (CKII) immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules L929 et L929 rho-.

Après immunoprécipitation de la CKII, le dosage de l'activité kinase *in vitro* est réalisé en présence d'un peptide synthétique et d'ATP radioactif. Le peptide phosphorylé est alors retenu sur une membrane et après deux rinçages à l'aide d'acide phosphorique, la radioactivité associée à la membrane est comptée. Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne de deux tests (n=2). La quantité de CKII immunoprécipité (IP) présente dans chaque test est contrôlée par une analyse en Western blotting avec un anticorps anti-CKII.

A

B

3.6 Recherche de l'etat d'activite de l'AMPK et de la CASEINE KINASE II

Nous avons donc réalisé un dosage d'activité kinase *in vitro* après immunoprécipitation de la CKII et de l'AMPK. Les cellules L929 et L929 rho⁻ repiquées dans des boîtes de 75 cm² sont lysées dans un tampon de lyse contenant du Triton X-100 à 1%. Les protéines sont alors dosées et des volumes de lysats clairs correspondant à une quantité déterminée de protéines sont ensuite incubés en présence d'anticorps anti-CKII ou anti-AMPK pendant 1 h avant l'ajout de billes d'agarose couvertes de protéines A/G reconnaissant le fragment Fc des anticorps. Les dosages sont réalisés sur des aliquots contenant les complexes immuns en présence d'un peptide synthétique contenant un site de phosphorylation reconnu par la kinase d'intérêt et d'ATP radioactif. Après un temps de réaction, le peptide phosphorylé est récupéré sur une membrane de phosphocellulose. Après élimination de l'ATP par plusieurs rinçages en présence d'acide phosphorylé, permettra de quantifier l'activité de la kinase *in vitro*. Afin de déterminer l'abondance de la kinase dans chaque test, un aliquot aura été prélevé au terme de l'immunoprécipitation pour une analyse en Western blot.

Les résultats obtenus et présentés à la figure 3.9 montrent une activation de l'AMPK dans les cellules L929 rho⁻ tandis que l'activité de la CKII est réduite. Ces résultats sont intéressants si l'on considère que la CKII est connue pour phosphoryler le facteur NRF-1 et augmenter sa capacité de liaison à l'ADN (Gugneja and Scarpulla, 1997). Bien que nous n'avons aucun argument pour dire que cette kinase phosphoryle bien NRF-1 dans les cellules déplétées en ADNmt, une diminution de l'activité de cette enzyme est corrélée à la diminution de l'activité de NRF-1 dans ces cellules.

L'activité de l'AMPK est régulée de manière allostérique et covalente. En effet, elle est activée par une augmentation de la concentration en AMP dans la cellule et inhibée par l'ATP. Elle peut également être le substrat d'autres kinases comme l'AMPKK (AMPK kinase) qui phosphoryle l'AMPK sur la Thr172 (Rutter et al., 2003). Mentionnons toutefois que les activités kinases dosées *in vitro* ne reflètent pas toujours l'activité de l'enzyme dans la cellule, particulièrement pour les enzymes régulées par un mécanisme allostérique.

Nous avons donc tenté de caractériser l'état d'activation de l'AMPK par la recherche du motif de phosphorylation au niveau de la Thr172. Pour cela, nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence de la forme phosphorylée de l'AMPK. Cette expérience nous a également permis de vérifier l'activation de l'AMPK dans les cellules 143B et 143B rho0. Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles couvre-objets dans des boîtes de 24 puits. Le lendemain, elles sont fixées à la paraformaldéhyde puis perméabilisées avec du PBS contenant 1 % de Triton X-100. Les cellules fixées ont ensuite été incubées en présence d'un anticorps anti-AMPK phosphorylée (Thr172) puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa avant un montage au Mowiol et des observations en microscopie confocale. Le résultat de ces observations (figure 3.10A) montrent une augmentation très nette de la forme phosphorylée de l'AMPK dans les cellules 143B rho0. Ce résultat confirme l'activation de la kinase dans les cellules déplétées en ADNmt. De plus, il semble que la forme active de l'AMPK soit également séquestrée et s'accumule dans un domaine cellulaire particulier dans les cellules 143B rho0. A l'heure actuelle, nous sommes incapables d'interpréter ce « pattern » de marquage.

La confirmation de l'activation de l'AMPK dans les cellules déplétées en ADNmt vient d'une expérience dans laquelle nous avons cherché à mettre en évidence la phosphorylation de l'un des substrats de cette enzyme.

Parmi les nombreuses protéines substrats de l'AMPK, nous avons choisi l'ACC (Acetyl-CoA Carboxylase), une enzyme clé dans le métabolisme énergétique de la cellule puisqu'elle participe à la chaîne de réactions impliquées dans la synthèse des acides gras (Saha and Ruderman, 2003). De plus, l'ACC est responsable de la production de malonyl-



B $PACC \longrightarrow Pacc$

Figure 3.10 : A) Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la protéine AMPK phosphorylée sur la Thr172 dans des cellules 143B et 143B rho0.

Les cellules 143B et 143B rho0 sont ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits dans une boîte de 24 puits. Le lendemain, elles sont fixées à la PFA 4 % puis perméabilisées au Triton X-100. Elles sont ensuite incubées avec un anticorps anti-AMPK dirigé contre la Thr172 phosphorylée puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type ALEXA. Deux grossissements sont présentés (40 X et 100 X).

B) Analyse de l'abondance de la forme phosphorylée de l'ACC (Ser79) en Western blot réalisé sur des lysats clairs de cellules L929, L929 rho⁻ et L929 préalablement incubées pendant 3 h en présence d'AICAR à 500 μM.

La lyse cellulaire a été effectuée dans un tampon de lyse contenant 1 % de Triton X-100 et 20 μ g de protéines de lysats clairs ont été chargés dans un gel NuPAGE 4-12 %. La forme phosphorylée de l'ACC (pACC) est révélée en présence d'un anticorps dirigé contre la Ser79. Un contrôle de charge est effectué par la détection de l' α tubuline.

CoA dans la cellule, un inhibiteur allostérique de la CPT-1, et donc une molécule qui régule le taux de ß-oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Une fois phosphorylée sur la Ser79 par l'AMPK, l'ACC est inactivée. Cette inactivation va induire une augmentation du processus de ß-oxydation des acides gras suite à la levée de l'inhibition de la CPT-1.

Afin de confirmer l'activation de l'AMPK dans les cellules L929 rho⁻, nous avons donc recherché l'abondance de la forme phosphorylée de l'ACC en Western blot. Les résultats obtenus pour une analyse réalisée sur 20 µg de lysats clairs préparés à partir de cellules L929 et L929 rho⁻ sont présentés à la figure 3.10B. Un contrôle positif a également été réalisé et est composé de cellules L929 incubées préalablement en présence d'AICAR à 500 µM pendant 180 min. L'AICAR est un analogue de l'AMP qui, une fois métabolisé dans la cellule, active l'AMPK (Hardie et al., 1998). Nous pouvons donc constater que la forme phosphorylée de l'ACC est plus abondante dans les cellules L929 rho⁻, de même que dans les cellules L929 incubées en présence d'AICAR.

Etant donné que l'AMPK est connue comme un senseur des besoins énergétiques de la cellule, il est donc attendu que cette enzyme soit activée dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. Néanmoins, l'activation de l'AMPK dans les cellules déplétées en ADNmt n'est pas corrélée à l'activation du facteur de transcription NRF-1. En effet, nous observons une diminution de l'activité transactivatrice de ce facteur et de l'abondance du facteur (figure 3.4) dans les cellules déplétées en ADNmt. Le rôle éventuel de la diminution de l'activité de la CKII dans la diminution de l'activité de NRF-1 a déjà été discuté précédemment.

Rappelons que l'AMPK est décrite comme étant capable de modifier l'activité de HNF-4a. En effet, Hong et al. ont montré que l'AMPK pouvait phosphoryler le facteur de transcription HNF-4 α sur la Ser304. Cependant, dans des cellules rénales issues de hamster, cette phosphorylation est inhibitrice et induit une réduction de l'activité de HNF-4 α en diminuant la liaison du facteur à l'ADN et en favorisant sa dégradation (Hong et al., 2003). Dans les cellules déplétées en ADNmt, l'activation de l'AMPK n'est pas corrélée à une diminution de la liaison de HNF-4a à l'ADN. En effet, nous observons même une augmentation de la liaison dans les cellules déficientes pour l'activité mitochondriale. Il serait donc important de déterminer si l'AMPK activée phosphoryle ou non HNF-4a dans les cellules déplétées en ADNmt. La forme active de l'AMPK semble être localisée dans une région cellulaire où pourrait également s'accumule HNF-4a (Figures 3.6 et 3.10). Des doubles marquages en immunofluorescence de la forme active de l'AMPK et de HNF-4 α pourraient permettre de savoir si ces deux protéines co-localisent au sein de la cellule. De plus, des expériences visant à mettre une interaction physique entre ces deux protéines pourraient être envisagées par des co-immunoprécipitations à partir de lysats de cellules L929 rho⁻ et 143B rho0. Toujours par la technique d'immunoprécipitation, des interactions éventuelles entre HNF-4α et PGC-1α ou encore entre les kinases CKII ou AMPK et le facteur NRF-1 devraient également être recherchées pour tenter de mettre en évidence des interactions potentielles entre ces partenaires protéiques dans le contexte du dysfonctionnement mitochondrial.

L'activation de l'AMPK, engendrée par une augmentation du rapport AMP/ATP dans la cellule déplétée en ADNmt devrait avoir pour conséquence de rediriger le métabolisme cellulaire vers une plus grande production d'ATP, en favorisant l'incorporation de glucose et la β -oxydation des acides gras (Carling et al., 2003). Nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'adaptation métabolique des cellules déplétées en ADNmt en mesurant l'incorporation d'une forme non métabolisable de glucose marquée radioactivement : le 2-déoxy-(1,2-³ H) D-glucose.





Les cellules sont ensemencées dans une boîte de 24 puits à une densité de 50000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont incubées 30 min en présence de PBS contenant du 2-déoxy-D (1,2-³H) glucose (1 μ Ci). Les cellules sont ensuite rincées, lysées et la radioactivité est comptée sur 300 μ l de lysat. Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) rapportés à la quantité de protéines (cpm/ μ g de protéines) et représentent la moyenne \pm un écart-type pour n=3 ou n=2.

3.7 ETUDE DE L'INCORPORATION DE 2-DEOXY-(1,2-³ H) D-GLUCOSE TRITIE

L'expérience préliminaire qui suit a pour but de corréler l'activation de l'AMPK à l'incorporation de glucose dans les cellules déficientes pour l'activité mitochondriale. Dans cette expérience, nous utiliserons également les lignées de cellules cybrides 143B rho0 repeuplées avec des mitochondries de patients atteints du syndrome MERRF. Ce modèle cellulaire est plus relevant biologiquement que les cellules déplétées en ADNmt car le dysfonctionnement mitochondrial est induit par une mutation ponctuelle naturelle (A8344G) apparue dans le gène ARNt^{Lys} codé par le génome mitochondrial (Chomyn, 1998).

Des cellules L929, L929 rho⁻, 143B, 143B rho0, cybrides sauvages et cybrides mutées ont été ensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans une boîte de 24 puits. Le jour de l'incorporation, elles sont incubées 30 min à 37 °C en présence de PBS contenant 1 μ Ci/ml de 2-déoxy-(1,2-³H)-D-glucose. La radioactivité associée à l'importation du 2-déoxy-(1,2-³H)-D-glucose dans les cellules est ensuite comptée et rapportée à la quantité de protéines par puits.

Les résultats, présentés à la figure 3.11, montrent une augmentation de l'incorporation du glucose radioactif dans les cellules déplétées ou mutées dans l'ADNmt. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait que ces cellules ne dépendent plus que de la glycolyse pour générer leur ATP et doivent donc incorporer plus de glucose pour maintenir un certain niveau de production d'ATP. Néanmoins, Park *et al.* ont montré que l'importation de glucose est diminuée dans des hépatocytes dont les mitochondries sont déplétées en ADNmt. Ces auteurs expliquent les effets observés par une diminution de l'abondance des ARNm pour les transporteurs de glucose GLUT1, 3 et 4 dans ces cellules {Park, 2001 #239}. Il serait dès lors intéressant de rechercher le niveau d'expression de ces différents transporteurs de glucose dans nos modèles cellulaires. Une fois le(s) transporteur(s) de glucose identifié(s), le rôle éventuel de l'AMPK activée dans l'importation de glucose dans les cellules parentales ou en inhibant l'action de l'enzyme par la surexpression d'un dominant négatif de l'AMPK dans les cellules déplétées. Les effets de ces conditions sur l'abondance des transporteurs au glucose et sur l'importation de glucose par les cellules pourraient être recherchés.

Signalons encore que le facteur de transcription HNF-1 α , qui semble activé dans les cellules déplétées en ADNmt, est impliqué dans le contrôle de l'expression du transporteur GLUT2 (Ban et al., 2002). Rappelons également que HNF-1 α est un gène cible de HNF-4 α . Nous pourrions donc nous demander si l'activation de cette voie peut rendre compte de l'incorporation de glucose plus importante observée dans les cellules déplétées en ADNmt. Des études utilisant un système rapporteur où le gène de la luciférase est placé sous le contrôle du promoteur authentique de GLUT2 pourraient être réalisées, ainsi que des expériences d'incorporation de glucose par des cellules dans lesquelles l'abondance des facteurs HNF-1 α et/ou HNF-4 α serait modifiée.

En conclusion et bien que de nombreuses données sont encore préliminaires, les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que les cellules déplétées en ADNmt peuvent induire une réponse cellulaire qui passe par l'activation de kinases, comme l'AMPK et de facteurs de transcription comme HNF-1 α et HNF-4 α . Dans le futur, nous devrons caractériser la ou les voies de signalisation conduisant à l'activation de ces différents acteurs moléculaires. Nous devrons tenter d'établir des liens entre les facteurs HNFs, les kinases CKII et AMPK et leur rôle éventuel dans le contrôle de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales participant au processus de mitobiogenèse.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail au point 1.4, la biogenèse mitochondriale est un processus complexe et encore mal connu. On peut distinguer la synthèse, le transport et l'assemblage de phospholipides ; la coordination de l'expression des

gènes répartis dans les deux génomes et la problématique de l'importation des protéines mitochondriales néosynthétisées dans le cytosol. C'est à ce dernier point que nous avons consacré le paragraphe suivant.

Dans cette partie, nous avons voulu confirmer des résultats obtenus par Cindy Gilquin au cours de son mémoire (2003). Ce travail consistait en la mise au point d'un test d'importation *in vitro* de protéines recombinantes et marquées radioactivement dans des mitochondries purifiées à partir de cellules. Au terme de ce mémoire, il est apparu que l'importation de protéines mitochondriales, mesurée sur base du comptage de la radioactivité associée à la fraction enrichie en mitochondries après le test d'importation, était réduite d'environ 75-80 % dans les mitochondries de cellules 143B rho0.

Ce test d'importation destiné à quantifier l'importation de protéines mitochondriales à partir l'importation d'une protéine traceur radioactive n'est pas sans problème. En effet, nous devons tenir compte de la pureté des fractions sur lesquelles nous travaillons qui, bien qu'enrichies en mitochondries, sont certainement contaminées par des lysosomes capables éventuellement de dégrader la protéine traceur. De plus, la préservation de l'état de couplage des mitochondries (force motrice de l'importation des protéines matricielles) peut être variable d'une préparation à l'autre et donc interférer avec les résultats obtenus.

Nous avons donc voulu visualiser l'importation de protéines mitochondriales dans des cellules déplétées ou non en ADNmt. Pour ce faire, nous avons utilisé une autre approche faisant appel à la surexpression et à la translocation de protéines de fusion adressées à la mitochondrie dans des cellules L929 et L929 rho⁻. Ces protéines sont, après marquages, visualisables en microscopie confocale.

3.8 VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE DE L'IMPORTATION DE PROTEINES ADRESSEES A LA MITOCHONDRIE

Dans un premier temps, nous avons utilisé la protéine mNTH1-EGFP qui est une protéine de fusion constituée d'une endonucléase possédant un NLS (Nuclear Localisation Site) et une séquence putative d'importation mitochondriale traduite en phase avec la protéine fluorescente EGFP (Ikeda et al., 2002).

Des cellules L929 ont donc été ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits sur des lamelles couvre-objets dans des boîtes de 24 puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées transitoirement au Superfect avec 1 µg d'un vecteur d'expression codant pour la protéine de fusion mNTH1-EGFP. Afin de visualiser le réseau mitochondrial, le lendemain de la transfection, les cellules sont incubées 15 min avec DHG contenant 250 nM de la sonde MitoTracker Red (CM-H2XROS). Après montage, les cellules transfectées sont observées au microscope confocal. Les micrographies obtenues sont présentées à la figure 3.12. On peut observer une localisation mitochondriale de la protéine de fusion dans certaines cellules. Cependant, et bien que possédant une pré-séquence d'adressage mitochondrial, la protéine mNTH1-EGFP semble avoir une localisation essentiellement nucléaire en raison de la présence du NLS. Ceci est observé dans la plupart des cellules transfectées avec cette construction. Nous n'avons donc pas comparé l'importation de protéines mitochondriales dans les cellules L929 et L929 rho⁻ à partir de la surexpression de cette protéine.

Dans un deuxième temps, nous avons donc utilisé un outil plus approprié afin de pouvoir observer une localisation exclusivement mitochondriale de la protéine traceur surexprimée. Pour cela, nous avons utilisé un vecteur d'expression codant pour la protéine chimérique Apoaequorine possédant une étiquette HA (hémaglutinine) précédée de la séquence d'adressage mitochondrial de la sous-unité VIII de la cytochrome c oxydase, qui permet l'importation de la protéine dans la mitochondrie.

Des cellules L929 et L929 rho⁻ ont été ensemencées à une densité de 25000 cellules par puits sur des lamelles couvre-objets dans des boîtes de 24 puits. Le lendemain, elles ont été transfectées transitoirement au Superfect avec 1 µg de plasmide codant pour la protéine de

MitoTracker Red

mNTH1-EGFP

Superposition



Figure 3.12 : Visualisation en microscopie confocale de la localisation de la protéine de fusion mNTH1-EGFP surexprimée et des mitochondries marquées par une incorporation de la sonde MitoTracker Red dans des cellules L929.

Les cellules sont repiquées sur des lames couvre-objets à une densité de 25000 cellules par puits dans une boîte de 24 puits. Le lendemain, elles sont transfectées avec 1 μ g d'un plasmide codant pour la protéine mNTH1-EGFP. Pour le marquage des mitochondries, le milieu est remplacé par 300 μ l de PBS contenant 250 nM de sonde MitoTracker Red. Après plusieurs rinçages, les cellules sont fixées avec 1 ml de tampon cacodylate de sodium contenant 0,5 % de glutaraldéhyde. Après montage des lames couvre-objets, les cellules sont observées au microscope confocal. La localisation mitochondriale de la protéine mNTH1-EGFP est obtenue en superposant les images obtenues pour chaque canal de fluorescence. mtHA-apoaequorine

cytochrome c

Superposition



Figure 3.13 : Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la protéine de fusion mtHA-apoaequorine et du cytochrome c dans des cellules L929 et L929 rho⁻.

Les cellules sont repiquées sur des lames couvre-objets à une densité de 25000 cellules par puits dans une boîte de 24 puits. Le lendemain, elles sont transfectées avec 1 µg de plasmide codant pour la protéine mtHA-Apoaequorine. Le lendemain, elles sont fixées au PBS-4% PFA puis perméabilisées au Triton X-100. Elles sont ensuite incubées avec un anticorps primaire anti-HA et un anticorps anti-cytochrome c, puis avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à un fluorochrome de type ALEXA (vert) et un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à un fluorochrome de type ALEXA (rouge).

fusion mtHA-Apoaequorine. Le lendemain de la transfection, les cellules sont perméabilisées à la paraformaldéhyde et fixées avec du PBS contenant 1 % de Triton X-100. Pour la réalisation du double marquage, les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps primaire anti-HA et un anticorps primaire anti-cytochrome c dirigé contre une protéine marqueur des mitochondries. Après l'incubation avec les anticorps secondaires, le montage est réalisé et les cellules sont observation en microscopie confocale.

Les microphotographies obtenues sont présentées à la figure 3.13. On peut constater que l'expression de la protéine mtHA-Apoaequorine est plus importante dans les cellules L929 que dans les cellules déplétées en ADNmt. En raison du statut énergétique des cellules déplétées en ADNmt, cette observation n'est pas surprenante. Par contre et de manière beaucoup plus intéressante, on peut observer que la co-localisation de la protéine mtHA-Apoaequorine et du cytochrome c est moins importante dans les cellules L929 rho⁻ que dans les cellules L929. Ces résultats suggèrent donc une diminution de la localisation mitochondriale de la protéine traceur dans les cellules L929 rho⁻ et donc une importation plus faible de la protéine mtHA-Apoaequorine dans les mitochondries de ces cellules. Ces données obtenues *in vivo* tendent donc à confirmer les résultats obtenus *in vitro* au cours du mémoire de Cindy Gilquin.

La diminution de l'importation de protéines mitochondriales dans les cellules déplétées en ADNmt peut s'expliquer par le fait que les deux forces motrices principales de l'importation des protéines mitochondriales, à savoir le $\Delta \psi$ m et la disponibilité en ATP, son plus faibles dans ces cellules. Il est également possible que la machinerie d'importation n'est plus entièrement fonctionnelle dans les cellules déplétées en ADNmt. En effet, Joseph *et al.* ont montré que dans des cellules C2C12 rho⁻, l'abondance des protéines TOM20 et TOM 23 est réduite, ce qui expliquerait une diminution de l'importation de protéines mitochondriales matricielles (Joseph et al., 2004).

Il semble donc que les structures mitochondriales soient maintenues dans les cellules déplétées en ADNmt alors même que l'activité d'importation des protéines mitochondriales synthétisées dans le cytosol est réduite.

Néanmoins, nous ne pouvons pas réduire l'entièreté du processus de biogenèse mitochondriale au seul processus d'importation dépendant des complexes TOM et TIM. En effet, il pourrait exister des voies d'importations non « classiques » comme pour le cytochrome c, dont l'importation est indépendante des récepteurs TOM 20 et TOM 70 (Wiedemann et al., 2003).

Il est parfois difficile d'estimer et de quantifier le processus de biogenèse sur base du niveau d'expression de protéines mitochondriales marqueurs. En effet, tous les gènes ne sont pas régulés de la même manière. Certains marqueurs sont surexprimés ou sous-exprimés, d'autres ne sont pas modifiés {Joseph, 2004 #40}. De plus, le taux d'importation de certaines protéines peut être très variable et les résultats des études pour l'importation de protéines matricielles peuvent ne pas s'appliquer à l'importation de protéines membranaires. Enfin, la mitobiogenèse nécessite la synthèse et l'assemblage de nombreux phospholipides dont les mécanismes sont encore moins bien connus. Cependant, l'abondance globale des phospholipides présents dans les membranes mitochondriales pourrait être un bon marqueur de l'abondance de la population mitochondriale dans son ensemble. Il existe en effet, des sondes fluorescentes capables de marquer spécifiquement le compartiment mitochondrial.

Pour terminer ce mémoire, nous avons donc réalisé des expériences préliminaires visant à quantifier la population mitochondriale en utilisant la sonde fluorescente NAO, qui a une affinité particulière pour les cardiolipines présentes dans la membrane mitochondriale interne (Mileykovskaya et al., 2001). Etant donné qu'il a été démontré que, dans les cellules déplétées en ADNmt, le facteur de transcription CREB est constitutivement activé suite à la phosphorylation de la Ser133 par la CaMKIV (Arnould et al. 2002), et que ce facteur est suspecté jouer un rôle positif dans la mitobiogenèse de cellules musculaires qui surexpriment



Figure 3.14 : Abondance de la population mitochondriale dans des cellules L929 (colonnes noires) et L929 rho⁻ (colonnes blanches) mesurée par l'accumulation de la sonde NAO.

Les cellules sont ensemencées dans une boîte de 24 puits à une densité de 25000 cellules par puits et transfectées transitoirement avec 1 μ g d'un plasmide codant pour M1-CREB ou K-CREB. L'incorporation du NAO est ensuite réalisée par une incubation des cellules de 30 min avec 10 μ M de sonde 48 h (A) et 72 h (B) post-transfection. Après plusieurs rinçages, les cellules sont lysées et la fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont calculés en intensités de fluorescence normalisées par la quantité de protéines et représentent la moyenne \pm un écart-type pour n=3.

B

A

la CaMKIV (Wu et al. 2002), nous avons recherché l'effet éventuel de la surexpression de dominants négatifs de CREB (K-CREB et M1-CREB) sur l'abondance de la population mitochondriale dans des cellules déplétées en ADNmt. La quantification de la population mitochondriale est réalisée par un marquage des mitochondries de cellules L929 et L929 rhoau NAO.

Des cellules L929 et L929 rho ont été ensemencées à raison de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées transitoirement avec 0,75 μ g d'un vecteur vide pGl2 (contrôles) ou d'un vecteur d'expression codant pour K-CREB ou M1-CREB. Deux ou trois jours plus tard, les cellules sont incubées 30 min en présence de la sonde NAO à 10 μ M dans du HBSS, rincées puis lysées. La fluorescence associée à l'incorporation de la sonde fluorescente est mesurée au spectrofluorimètre sur un aliquot des lysats clairs. Les résultats d'intensité de fluorescence sont ensuite normalisés par la quantité de protéines. Les résultats sont présentés à la figure 3.15.

On peut constater que l'abondance de la population mitochondriale est légèrement supérieure dans les cellules L929 rho⁻. De plus, la surexpression des dominants négatifs de CREB n'a pas d'effet sur l'abondance de la population mitochondriale, et ce, quelque soit le temps considéré. Plusieurs explications peuvent être avancées : 1) l'efficacité de transfection trop faible que pour pouvoir visualiser un effet, 2) un temps qui n'est pas suffisamment long que pour que les changements s'établissent sur le processus de mitobiogenèse et enfin 3) une absence d'effet de la surexpression des dominants négatifs de CREB sur la population mitochondriale mesurée par l'accumulation de NAO.

Il serait intéressant de développer des lignées stables inductibles pour ces dominants négatifs pour éviter l'effet transitoire de la transfection. Cet outil permettrait de rechercher des effets à plus long terme. Une approche similaire pourrait également être entreprise pour les facteurs HNF. Enfin l'effet de la surexpression de dominants négatifs pour CREB devrait être recherché sur l'abondance de marqueurs protéiques de la mitochondrie comme COXIV, le cytochrome c, TOM40...

En dépit de ces résultats négatifs et comme le rôle du calcium, de la CaMKIV et de CREB dans la biogenèse ont été démontrés par Wu *et al.* à partir de souris transgéniques surexprimant une forme constitutivement active de la CaMKIV (Wu et al. 2002), nous avons fait une dernière tentative visant à préciser le rôle du calcium dans le maintien d'une structure mitochondriale dans les cellules déplétées en ADNmt.

Pour tenter d'éviter les problèmes liés à la transfection transitoire et essayer de mettre en évidence un éventuel rôle du calcium dans le processus de mitobiogenèse dans les cellules déplétées en ADNmt, nous avons réalisé une expérience préliminaire visant à rechercher l'effet d'un chélateur de calcium intracellulaire comme le BAPTA-AM sur l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules L929 rho⁻ et 143B rho0.

Les cellules L929 rho et 143B rho0 ont été ensemencées à raison de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 12 puits. Le lendemain, le milieu de culture a été remplacé ou non par du milieu contenant le BAPTA-AM à une concentration de 10 μ M. Après trois jours d'incubation, les cellules sont incubées 30 min en présence de la sonde NAO (10 μ M), puis rincées, lysées et la fluorescence associée au NAO est mesurée sur un aliquot au spectrofluorimètre. Les valeurs d'intensité de fluorescence sont ensuite normalisées par la quantité de protéines comme décrit précédemment. Nous pouvons constater, à la figure 3.15, qu'après une incubation de trois jours en présence de BAPTA-AM, l'abondance de la population mitochondriale des cellules déplétées en ADNmt quantifiée par l'incorporation de NAO semble diminuer (environ 50-60 %) dans les deux types cellulaires.

Si ces résultats se confirment et sont supportés par d'autres approches expérimentales comme des approches préliminaires morphologiques, ils permettraient d'impliquer l'augmentation de la concentration en calcium observée dans les cellules déplétées en ADNmt dans le maintien de la biogenèse mitochondriale des cellules rho0. L'augmentation de la



Figure 3.15 : Estimation de l'abondance de la population mitochondriale dans des cellules L929 rho⁻ et 143B rho0 incubées 72 h en présence ou non de BAPTA-AM à 10 μ M.

Les cellules L929 rho⁻ et 143B rho0 sont ensemencées à raison de 25000 cellules par puits dans une boîte de 12 puits. Elles sont ensuite incubées 72 h avec 2 ml de DHG + 10 % SVF contenant ou non 10 μ M de BAPTA-AM. L'incorporation du NAO est ensuite effectuée par une incubation des cellules avec 10 μ M de sonde pendant 30 min. Après plusieurs rinçages, les cellules sont lysées et l'intensité de fluorescence est mesurée sur un volume de 100 μ l au spectrophotomètre. Les résultats sont calculés en intensités de fluorescence normalisées par la quantité de protéines et exprimés en pourcentages des cellules contrôles L929 rho- ou 143B rho0 comme la moyenne pour n=2.

concentration en calcium cytosolique se situe en amont de l'activation de CREB. Il est également possible que le calcium active d'autres voies de signalisation que la voie CaMKIV/CREB, ce qui expliquerait que l'inhibition de l'activité de CREB par la surexpression de dominants négatifs pour ce facteur soit sans effet sur l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules déplétées en ADNmt.

La mitochondrie est un organite essentiel au maintien de l'homéostasie énergétique de la cellule eucaryote. En effet, elle intervient dans de nombreux processus tels que la production d'ATP, le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras. Elle joue également un rôle important dans l'homéostasie du calcium, la biosynthèse des stérols et la thermogenèse adaptative. Son dysfonctionnement impliqué dans de nombreuses pathologies mitochondriales ainsi que sa participation à de nombreux processus apoptotiques en fait un sujet d'étude très actuel.

Le concept de communication moléculaire rétrograde entre la mitochondrie et le noyau implique que la cellule doit être capable de percevoir et d'intégrer des signaux émis par la mitochondrie non fonctionnelle et d'y répondre par l'activation de voies de signalisation menant à une modification de l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales ou non (Butow, 2004). A l'heure actuelle, deux types de messagers secondaires sont décrits pour faire le lien entre le dysfonctionnement mitochondrial et de nombreuses voies de signalisation cellulaires : les ROS (Suzuki et al ., 1998) et le calcium (Biswas et al., 1999).

Des modèles d'étude couramment utilisés dans l'étude de la communication moléculaire entre les mitochondries non fonctionnelles et le noyau sont constitués de lignées de cellules déplétées partiellement (rho⁻) ou complètement (rho0) en ADNmt (Chandel et al., 1999). Dans ces cellules, deux observations marguantes sont à noter : tout d'abord le maintien des structures mitochondriales (Gilkerson et al., 2000) et la conservation d'un certain potentiel de membrane. Ces deux caractéristiques sont observées dans les cellules déplétées en ADNmt malgré l'absence d'une chaîne de transporteurs d'électrons fonctionnelle (Appelby et al., 1999). Ces deux observations sont à la base de la recherche actuellement menée au laboratoire par Ludovic Mercy (2^{ème} année de thèse, FRIA) visant à mieux comprendre les mécanismes permettant à la cellule déplétée en ADNmt de maintenir une structure mitochondriale ainsi qu'un potentiel de membrane mitochondrial. Les études déjà réalisées dans ce cadre ont déjà permis de mettre en évidence le rôle d'un canal à chlore intracellulaire et mitochondrial (mtCLIC) dans le maintien du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules L929 rho⁻ (Arnould et al., 2003). La surexpression de ce canal à chlore dans les cellules rho⁻ est dépendante de l'activité des facteurs de transcription CREB et p53 (Arnould et al., 2003). Rappelons que CREB est constitutivement activé dans les cellules déplétées en ADNmt (L929 rho⁻ et 143B rho0) (Arnould et al., 2002).

Sur base de ces données, les buts de ce mémoire étaient de : 1) rechercher le rôle éventuel du facteur de transcription CREB dans le maintien de la structure mitochondriale dans les cellules déplétées en ADNmt, 2) continuer la recherche et la caractérisation de l'état d'activation et de l'expression de différents facteurs de transcription et co-activateur connus ou suspectés pour jouer un rôle dans la mitobiogenèse et 3) de confirmer des résultats antérieurs qui montrent une diminution de l'importation de protéines dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt.

Dans le cadre de la mitobiogenèse, deux voies ont récemment été décrites pour tenter d'expliquer l'augmentation de la population mitochondriale observée dans des cellules musculaires soumises à une demande énergétique intense. La première voie implique la CaMKIV et et le facteur CREB contrôlant le niveau d'expression du co-activateur PGC-1 α (Wu et al., 2002). La deuxième voie de signalisation est dépendante de la production d'oxyde nitrique ou NO dont la concentration cellulaire contrôle également, par des mécanismes encore largement inconnus, l'expression du co-activateur PGC-1 α (Nisoli et al., 2003). Ces

deux voies ont donc en commun l'activation d'un co-activateur essentiel de la mitobiogenèse, qui coordonne l'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines impliquées dans la mitobiogenèse tels que les protéines de la chaîne respiratoire mais également les facteurs de transcription NRFs, régulateurs essentiels de l'expression de nombreux gènes codant des protéines mitochondriales (Wu et al., 1999). Nous nous sommes donc intéressés à ces deux voies de signalisation dans des cellules déplétées complètement ou partiellement en ADNmt (L929 rho⁻ ou 143B rho0) et à leur implication éventuelle dans le maintien de la structure mitochondriale au sein de ces cellules.

Tout d'abord, nous avons voulu savoir si le facteur de transcription CREB, activé constitutivement dans les cellules L929 rho⁻, joue un rôle dans l'expression du co-activateur PGC-1a dans ces cellules. Pour cela, nous avons utilisé une approche de transfection transitoire des cellules avec une construction contenant un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur (version tronquée) de PGC-1a. Bien que la construction utilisée réponde positivement à la surexpression d'une forme constitutivement active de CREB (VP16-CREB), il semble que l'activité de CREB dans les cellules déplétées en ADNmt soit insuffisante pour activer le rapporteur. De plus, par une analyse de l'abondance de la protéine PGC-1 a endogène, on observe une diminution d'environ 40 % du niveau d'expression de cette protéine dans les cellules déplétées en ADNmt. L'abondance de la protéine est donc corrélée à la plus faible activation du rapporteur luciférase dans les cellules déplétées en ADNmt. Ces observations nécessitent évidemment des études complémentaires : Nous pourrions par exemple utiliser un système rapporteur luciférase dans lequel le gène de la luciférase est placé sous le contrôle du promoteur complet de PGC-1a. Nous pourrions également quantifier le taux de transcrits du gène PGC-1a endogène en « real-time PCR ». Il semble donc que l'abondance de PGC-1a soit plus faible dans les cellules déplétées en ADNmt.

Nous avons ensuite tenté d'étudier l'importance de la deuxième voie impliquée dans la mitobiogenèse et faisant intervenir le NO comme messager secondaire (Nisoli, 2003 #14). Pour cela nous avons dosé la concentration en NO dans des cellules déplétées en ADNmt. Il apparaît que la production de NO dans ces cellules est plus faible que dans les cellules parentales. Il serait dès lors intéressant de rechercher le lien qui existe éventuellement entre la diminution de la production de NO et la diminution de l'expression de PGC-1 a observée dans les cellules déplétées en ADNmt. Pour cela, le traitement de cellules déplétées en ADNmt par des molécules comme le SNAP, qui stimulent la production de NO, pourrait être réalisé avant de rechercher l'abondance de PGC-1a. De même, nous pourrions rechercher l'abondance et l'activité de PGC-1a dans des cellules parentales (pourvues d'ADNmt) préalablement incubées en présence de L-NAME ou d'oxyhémoglobine, respectivement un inhibiteur de NOS et un « scavenger » de NO. Ces expériences visant à moduler la concentration en NO dans les cellules, permettraient de répondre à la question de savoir si le NO joue un rôle dans le contrôle de l'expression du co-activateur PGC-1 a dans les cellules déplétées en ADNmt. Des expériences similaires pourraient être entreprises pour rechercher l'effet du NO sur l'abondance de la population mitochondriale ou l'expression de protéines mitochondriales (cytochrome c, COXIV, COXI, ...) couramment utilisées comme marqueurs de la mitobiogenèse.

Le rôle du co-activateur PGC-1 α dans la biogenèse mitochondriale a été mis en évidence par le fait qu'il est capable de participer non seulement à la régulation de l'expression du facteur de transcription NRF-1 mais également d'augmenter l'action transactivatrice de ce facteur (Wu et al., 1999). Dans nos modèles cellulaires, nous avons donc tenté de corréler la diminution de l'abondance de PGC-1 α à une diminution de l'abondance de NRF-1. Une analyse en Western blot nous a permis de mettre en évidence une légère diminution de l'abondance de NRF-1 dans les cellules déplétées en ADNmt. PGC-

 1α jouant également le rôle de co-activateur du facteur NRF-1, ce résultat permet également d'expliquer la diminution de l'activité de NRF-1 (± 20 %) observée dans les cellules déplétées en ADNmt et mesurée à l'aide un système rapporteur luciférase répondant à ce facteur.

L'abondance de deux acteurs importants de la mitobiogenèse (NRF-1 et PGC-1 α) diminue donc dans les cellules déplétées en ADNmt. Pour rechercher un effet éventuel de cette diminution sur la transcription d'un gène cible de ces facteurs, nous nous sommes intéressés à l'expression de mtTFA, un facteur de transcription impliqué dans la réplication de l'ADNmt dont l'expression est régulée par NRF-1 et PGC-1 α (Virbasius et al., 1994). Après avoir confirmé, à l'aide d'un système rapporteur luciférase, que le promoteur du mtTFA répond bien à une surexpression de PGC-1 α , nous nous sommes intéressés directement à l'expression de la protéine mtTFA endogène dans des cellules déplétées ou non en ADNmt. Il apparaît clairement que l'abondance de mtTFA diminue fortement dans les cellules déplétées en ADNmt. Nous avons donc pu mettre en évidence que la diminution de l'expression de PGC-1 α et de NRF-1 est bien corrélée à la diminution de l'abondance de mtTFA dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial.

En conclusion, il apparaît donc que trois acteurs décrits pour participer activement au processus de biogenèse mitochondriale voient leur abondance et/ou leur activité réduite(s) dans des cellules déplétées en ADNmt. Bien que toujours présents et actifs, il est possible que ces facteurs n'expliquent pas, à eux seuls, le maintien de la structure mitochondriale dans les cellules déplétées en ADNmt. Il est donc nécessaire de poursuivre la recherche de l'état d'activité d'autres acteurs moléculaires décrits pour jouer un rôle dans la régulation de l'expression de gènes codant des protéines mitochondriales.

Jusqu'à présent, de tous les facteurs étudiés au laboratoire (voir figure 1.28), seul le facteur de transcription CREB présente une activité plus élevée dans les cellules déplétées en ADNmt. Louet et al. ayant montré une coopération des facteurs de transcription CREB et HNF-4α dans le CRU du gène de la CPT-1 (Louet et al., 2002), nous nous sommes intéressés à l'état d'activité du facteur HNF-4 dans les cellules déplétées en ADNmt. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation de la liaison de ce facteur à l'ADN ainsi qu'une légère augmentation de HNF-4α dans des extraits nucléaires de cellules déplétées en ADNmt. De plus, un marquage en immunofluorescence à également permis de visualiser la surexpression et la localisation nucléaire de ce facteur. Il serait maintenant utile de confirmer ces observations par des études à l'aide de systèmes rapporteurs permettant de rechercher une modification éventuelle de l'activité de HNF-4α dans les cellules rho0. Néanmoins, nous avons déjà pu mettre en évidence la surexpression de HNF-1 α , un gène cible de HNF-4 α (Gragnoli et al., 1997). En effet, HNF-1a, un autre facteur de transcription de la famille des HNFs, est également plus abondant dans le noyau des cellules rho0, et présente une activité de liaison à l'ADN plus importante dans des extraits nucléaires préparés à partir de cellules déplétées en ADNmt. Afin de pouvoir corréler l'activité transactivatrice de HNF-4a à l'expression différentielle de HNF-1a dans les cellules rho0, l'utilisation de siRNAs (small/short interferent RNA) dirigés contre le transcrit de HNF-4a est envisagée. Cette approche pourrait également servir à déterminer si l'expression et l'activité de HNF-4 sont importantes pour le maintien de la structure et de l'abondance des mitochondries dans les cellules déplétées en ADNmt. La quantification de la population mitochondriale par un marquage au NAO et le contrôle de l'expression de plusieurs marqueurs protéiques mitochondriaux pourraient être envisagés dans des cellules transfectées avec un siRNA pour HNF-4 α .

Des recherches permettant de caractériser les voies de signalisation conduisant à l'activation du facteur HNF-4 α dans les cellules déplétées en ADNmt sont également à effectuer. Nous avons cependant déjà pu mettre en évidence le fait que l'inhibition des

phosphorylations oxydatives mitochondriales pendant des temps courts (6 h) par des inhibiteurs métaboliques n'est pas suffisante pour induire une augmentation de la liaison de HNF-4 α à l'ADN. Des expériences utilisant des temps d'inhibition plus longs en présence de ces inhibiteurs ou le traitement de cellules parentales par du bromure d'éthidium suivis de tests de liaison pour le facteur HNF-4α à des temps réguliers sont envisagées et devraient déterminer si l'activation de HNF-4 est un phénomène précoce ou tardif dans l'adaptation des cellules au stress énergétique chronique subi par les cellules déplétées en ADNmt. De plus, étant donné que la concentration cytosolique en calcium est plus élevée dans les cellules déplétées en ADNmt (Arnould et al., 2002), nous rechercherons le rôle éventuel du calcium sur l'activité de liaison de HNF-4a et HNF-1a à l'ADN dans des cellules rho0 préalablement incubées en présence d'un chélateur intracellulaire de calcium comme le BAPTA. Une autre voie pouvant réguler l'activité de liaison à l'ADN de HNF-4\alpha implique la production de NO. En effet, il a été montré que la production de NO diminue l'activité de liaison du facteur HNF-4 α à l'ADN (Vossen et al., 2002). Nous pourrions donc tenter de savoir si la production de NO, plus faible dans les cellules déplétées en ADNmt, est responsable de l'augmentation de la liaison de HNF-4 α à l'ADN en utilisant des molécules capables de modifier la concentration en NO cellulaire comme le SNAP, l'oxyhémoglobine ou le L-NAME.

Après avoir mis en évidence l'accumulation de HNF-4 α et l'augmentation de l'expression d'un de ses gènes cibles comme HNF-1 α , nous avons recherché l'état d'activité de deux kinases capables de moduler l'activité de facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale comme la CKII et l'AMPK (Gugneja et al., 1997)(Bergeron et al., 2001).

Nous avons montré par des expériences d'immunoprécipitation suivies de dosages d'activité kinase *in vitro* que l'activité de la CKII semble plus faible dans les cellules L929 rho⁻. Par contre, l'activité de l'AMPK augmente dans ces cellules. Ce dernier résultat a été confirmé en immunofluorescence par la détection de l'AMPK phosphorylée sur la Thr172. Nous avons également montré que l'AMPK est active dans la cellule en recherchant l'état de phosphorylation d'un des substrats de l'AMPK comme l'ACC. Nous avons effectivement montré que la phsophorylation de l'ACC sur la Ser79 augmente dans les cellules L929 rho-, confirmant ainsi l'activation de l'AMPK observé dans ces cellules déplétées en ADNmt.

Sachant que l'AMPK activée a été décrite comme étant capable de diminuer l'activité de liaison du facteur HNF-4 α à l'ADN (Hong et al., 2003), il serait nécessaire de rechercher les interactions éventuelles existant entre ces deux protéines dans nos modèles cellulaires. Les observations en microscopie confocale ayant montré une séquestration/accumulation de la forme phosphorylée de l'AMPK dans une région péri-nucléaire ressemblant fortement au profile de marquage obtenu pour HNF-4 α , il serait intéressant, par un double marquage en immunofluorescence, de vérifier si ces deux protéines co-localisent dans la cellule. La recherche d'interactions physiques entre ces deux protéines pourrait également être mises en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation. Enfin, il serait également intéressant de rechercher si l'AMPK (ou une autre kinase) est capable de phosphoryler HNF-4 α sur un autre résidu que la Ser304, induisant ainsi une éventuelle activation de ce facteur de transcription.

Nous nous trouvons donc devant une contradiction par rapport à la littérature. En effet, l'activation de l'AMPK est décrite dans les hépatocytes pour diminuer la liaison de HNF-4 α à l'ADN (Hong et al., 2003). Cependant, Vossen *et al.* ont montré que l'augmentation de la production de NO a le même effet sur HNF-4 α (Vossen et al., 2002). Il serait donc intéressant de vérifier si la concentration plus faible du NO dans les cellules rho0 n'est pas responsable de l'augmentation de la liaison et de l'accumulation de HNF-4 α et si oui de rechercher les mécanismes impliqués.

Les rôles de l'AMPK sont nombreux étant donné que cette enzyme est impliquée dans un phénomène de maintien de l'équilibre énergétique de la cellule, un phénomène menant à diminuer les consommations et à augmenter la production d'ATP. Cette kinase est donc impliquée dans des processus tels que la β-oxydation des acides gras et le transport du glucose dans la cellule. Nous avons donc mesuré l'incorporation du glucose dans nos différentes lignées cellulaires. Nous avons pu constater une augmentation de cette incorporation dans les lignées déplétées partiellement (L929 rho⁻), totalement (143B rho0) ou mutées (cybrides mutées) dans l'ADNmt. Il est intéressant de savoir que HNF-1a, le produit du gène cible de HNF-4a, est décrit pour contrôler positivement l'expression du gène du transporteur de glucose GLUT2 (Ban et al., 2002). Comme nous avons montré une augmentation d'activité de liaison de HNF-1a à l'ADN ainsi qu'une incorporation du glucose plus élevée dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial, il serait intéressant de rechercher le niveau d'expression de GLUT2 dans ces cellules et d'observer l'effet de la surexpression de dominants négatifs de HNF-4a ou HNF-1a sur l'expression de ce transporteur. Le rôle de l'AMPK activée dans l'incorporation du glucose et dans la régulation de l'expression de transporteurs au glucose pourrait également être recherchée.

Finalement, nous avons vu que la mitobiogenèse nécessite l'importation de nombreuses protéines mitochondriales synthétisées dans le cytosol. Un dernier objectif de ce mémoire visait à confirmer des résultats obtenus précédemment qui montraient une réduction de l'importation de protéines recombinantes marquées radioactivement dans des mitochondries isolées à partir de cellules déplétées en ADNmt. Nous avons utilisé une autre approche pour étudier le même processus. En effet, nous avons réalisé, dans des cellules déplétées ou non en ADNmt, des tests d'importation de protéines de fusion, adressées à la mitochondrie et présentant un « tag » visualisable en microscopie confocale. La première construction utilisée consistait en une protéine de fusion entre l'EGFP et une protéine faisant partie du BER et possédant un NLS ainsi qu'une pré-séquence mitochondriale putative. La présence du NLS conduisant à une localisation préférentielle de la protéine dans le noyau, nous avons donc abandonné cet outil au profit de la mtHA-Apoaequorine. Cette protéine de fusion contient l'apoaequorine fusionnée à la pré-séquence d'adressage mitochondrial de la sous-unité VIII de la cytochrome c oxydase et une étiquette HA. Cette protéine étant adressée exclusivement à la mitochondrie, nous avons pu réaliser des observations en microscopie confocale qui ont confirmé une diminution de l'importation des protéines à destination mitochondriale dans les cellules déplétées en ADNmt L929 rho-.

Le processus de mitobiogenèse passe également par l'assemblage de composants lipidiques qui constituent les membranes. L'abondance totale des phospholipides présents dans les membranes mitochondriales peut donc constituer un bon marqueur de l'abondance de la population mitochondriale (Mileykovskaya et al., 2001). Afin de rechercher un rôle éventuel de la voie dépandante du calcium et impliquant l'activation de CREB dans le maintien de la biogenèse mitochondriale de cellules déplétées en ADNmt, nous avons donc recherché l'effet de la surexpression transitoire de dominants négatifs de CREB (M1-CREB et K-CREB) ou d'une incubation de trois jours en présence de BAPTA sur l'abondance de la population mitochondriale dans des cellules déplétées en ADNmt marquées au NAO. Bien que la surexpression des deux dominants négatifs n'a pas d'effet sur l'abondance de la population mitochondriale estimée après 48 h et 72 h, il semble que la présence de BAPTA conduise à une diminution de l'abondance de la population mitochondriale dans des cellules déplétées en ADNmt. Pour tenter d'expliquer ces résultats, nous pouvons proposer qu'il est possible que, outre la voie CaMKIV / CREB, l'élévation de la concentration en calcium cytosolique dans les cellules déplétées en ADNmt initie d'autres voies de signalisation participant à l'accumulation de la mitochondrie dans les cellules. Néanmoins, étant limité par la technique de la transfection transitoire, nous envisageons d'établir des lignées de cellules

rho0 surexprimant, de manière stable et inductible, des dominants négatifs de CREB et de HNF-4 α . Ces lignées seraient d'excellents outils permettant de rechercher le(s) rôle(s) éventuel(s) de ces facteurs de transcription dans la mitobiogenèse de cellules déplétées en ADNmt.

5 BIBLIOGRAPHIE

Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **357**, 593-615.

Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S.Y., Klein-Szanto, A., Vijayasarathy, C. and Avadhani, N.G. (2001) Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *Embo J*, 20, 1910-1920.

Anderson, K.A., Ribar, T.J., Illario, M. and Means, A.R. (1997) Defective survival and activation of thymocytes in transgenic mice expressing a catalytically inactive form of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase IV. *Mol Endocrinol*, **11**, 725-737.

Appelby, R.D., Porteus, W.K., Hughes, G., James, A.M., Shannon, D., Wei, Y. and Murphy, M.P. (1999) Quantitation and origin of the mitochondrial membrane potentiel in human clls lacking mitochondrial DNA. *Eur.J.Biochem.*, 262.

Arnould, T., Mercy, L., Houbion, A., Vankoningsloo, S., Renard, P., Pascal, T., Ninane, N., Demazy, C. and Raes, M. (2003) mtCLIC is up-regulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells. *Faseb J*, 17, 2145-2147.

Arnould, T., Vankoningsloo, S., Renard, P., Houbion, A., Ninane, N., Demazy, C., Remacle, J. and Raes, M. (2002) CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J*, 21, 53-63.

Aschenbach, W.G., Sakamoto, K. and Goodyear, L.J. (2004) 5' adenosine monophosphateactivated protein kinase, metabolism and exercise. *Sports Med*, **34**, 91-103.

Baar, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P. and Holloszy, J.O. (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J*, 16, 1879-1886.

Ban, N., Yamada, Y., Someya, Y., Miyawaki, K., Ihara, Y., Hosokawa, M., Toyokuni, S., Tsuda, K. and Seino, Y. (2002) Hepatocyte nuclear factor-1alpha recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes*, **51**, 1409-1418.

Barrell, B.G., Bankier, A.T. and Drouin, J. (1979) A different genetic code in human mitochondria. *Nature*, **282**, 189-194.

Bartlett, K. and Eaton, S. (2004) Mitochondrial beta-oxidation. Eur J Biochem, 271, 462-469.

Baumhueter, S., Mendel, D.B., Conley, P.B., Kuo, C.J., Turk, C., Graves, M.K., Edwards, C.A., Courtois, G. and Crabtree, G.R. (1990) HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev*, 4, 372-379.

Bereiter-Hahn, J. and Voth, M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, **27**, 198-219.

Berg, O.G. and Kurland, C.G. (2000) Why mitochondrial genes are most often found in nuclei. *Mol Biol Evol*, **17**, 951-961.

Bergeron, R., Ren, J.M., Cadman, K.S., Moore, I.K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L.H., Semenkovich, C.F. and Shulman, G.I. (2001) Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. Am J Physiol Endocrinol Metab.

Berridge, M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol*, **200** (Pt 2), 315-319.

Biswas, G., Adebanjo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M. and Avadhani, N.G. (1999) Retrograde Ca2+ signaling in

Bibliographie

C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *Embo J*, **18**, 522-533.

- 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, 1371-1381.
- Boore, J.L. (1999) Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Res, 27, 1767-1780.
- 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**, 248-254.
- 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**, 247-250.
- Brix, J., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem*, **272**, 20730-20735.
- Brown, G.C. (2003) Cell biology. NO says yes to mitochondria. Science, 299, 838-839.
- Buchet, K. and Godinot, C. (1998) Functional F1-ATPase Essential in Maintaining Growth and Membrane Potential of Human Mitochondrial DNA-depleted rho 0 Cells.
- Butow, R.A. and Avadhani, N.G. (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell*, 14, 1-15.
- Carafoli, E. (2003) Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci*, **28**, 175-181.
- Carling, D., Fryer, L.G., Woods, A., Daniel, T., Jarvie, S.L. and Whitrow, H. (2003) Bypassing the glucose/fatty acid cycle: AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1157-1160.
- Cassuto, H., Olswang, Y., Heinemann, S., Sabbagh, K., Hanson, R.W. and Reshef, L. (2003) The transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in the kidney requires the HNF-1 binding site of the gene. *Gene*, **318**, 177-184.
- Chandel, N.S. and Schumacker, P.T. (1999) Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Lett*, **454**, 173-176.
- Chatila, T., Anderson, K.A., Ho, N. and Means, A.R. (1996) A unique phosphorylationdependent mechanism for the activation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase type IV/GR. *J Biol Chem*, **271**, 21542-21548.
- Choi, Y.S., Kim, S. and Pak, Y.K. (2001) Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, **54 Suppl 2**, S3-9.
- Chomyn, A. (1998) The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet*, **62**, 745-751.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. and Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, 365, 855-859.
- Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S. and Schapira, A.H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, **345**, 50-54.
- Connor, M.K., Irrcher, I. and Hood, D.A. (2001) Contractile activity-induced transcriptional activation of cytochrome C involves Sp1 and is proportional to mitochondrial ATP synthesis in C2C12 muscle cells. *J Biol Chem*, **276**, 15898-15904.
- Cross, R.L. (2004) Molecular motors: turning the ATP motor. Nature, 427, 407-408.

Delbart, D. (2000) Les mitochondries : biologie et incidences physiopathologiques.

Desjardins, P., Frost, E. and Morais, R. (1985) Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 5, 1163-1169.

- DiMauro, S. and Moraes, C.T. (1993) Mitochondrial encephalomyopathies. Arch Neurol, 50, 1197-1208.
- DiMauro, S. and Schon, E.A. (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease. Am J Med Genet, **106**, 18-26.
- Duchen, M.R. (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*, **529 Pt 1**, 57-68.
- Elfering, S.L., Sarkela, T.M. and Giulivi, C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitricoxide synthase. *J Biol Chem*, **277**, 38079-38086.
- Endo, T. and Kohda, D. (2002) Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 3-14.
- Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. (1989) Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem*, **264**, 14361-14368.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.G. and Gustafsson, C.M. (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*, **31**, 289-294.
- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A. and Montoya, J. (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, **88**, 41-56.
- Fiskum, G. and Lehninger, A.L. (1979) Regulated release of Ca2+ from respiring mitochondria by Ca2+/2H+ antiport. *J Biol Chem*, **254**, 6236-6239.
- Frey, T.G. and Mannella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. TIBS, 25.
- Frey, T.G., Renken, C.W. and Perkins, G.A. (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta*, **1555**, 196-203.
- Gammie, A.E., Kurihara, L.J., Vallee, R.B. and Rose, M.D. (1995) DNM1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J Cell Biol*, **130**, 553-566.
- Garesse, R. and Vallejo, C.G. (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, **263**, 1-16.
- Gilkerson, R.W., Margineantu, D.H., Capaldi, R.A. and Selker, J.M. (2000) Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett*, **474**, 1-4.
- Gilkerson, R.W., Selker, J.M. and Capaldi, R.A. (2003) The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, **546**, 355-358.
- Giulivi, C. (1998) Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J*, **332** (Pt 3), 673-679.
- Goffart, S. and Wiesner, R.J. (2003) Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol*, **88**, 33-40.
- Goglia, F., Moreno, M. and Lanni, A. (1999) Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett*, **452**, 115-120.
- Goto, M., Terada, S., Kato, M., Katoh, M., Yokozeki, T., Tabata, I. and Shimokawa, T. (2000) cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **274**, 350-354.
- Graeber, M.B. and Muller, U. (1998) Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *J Neurol Sci*, **153**, 251-263.
- Gragnoli, C., Lindner, T., Cockburn, B.N., Kaisaki, P.J., Gragnoli, F., Marozzi, G. and Bell, G.I. (1997) Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes*, 46, 1648-1651.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. Science, 283, 1476-1481.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS1018.

- Gugneja, S. and Scarpulla, R.C. (1997) Serine phosphorylation within a concise aminoterminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J Biol Chem*, 272, 18732-18739.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C. and Ladias, J.A. (1997) Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*, **272**, 539-550.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P. and Clarke, S.J. (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*, **84**, 153-166.
- Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T. and Spiegelman, B.M. (2003) An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 7111-7116.
- Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*, **67**, 821-855.
- Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol*, **21**, 1393-1403.
- Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I. and Bar-Tana, J. (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature*, **392**, 512-516.
- Herzberg, N.H., Middelkoop, E., Adorf, M., Dekker, H.L., Van Galen, M.J., Van den Berg, M., Bolhuis, P.A. and Van den Bogert, C. (1993) Mitochondria in cultured human muscle cells depleted of mitochondrial DNA. *Eur J Cell Biol*, 61, 400-408.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B. and Montminy, M. (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 179-183.
- Hong, Y.H., Varanasi, U.S., Yang, W. and Leff, T. (2003) AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem*, 278, 27495-27501.
- Hood, D.A. (2001) Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, **90**, 1137-1157.
- Hyde-DeRuyscher, R.P., Jennings, E. and Shenk, T. (1995) DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4457-4465.
- Ikeda, S., Kohmoto, T., Tabata, R. and Seki, Y. (2002) Differential intracellular localization of the human and mouse endonuclease III homologs and analysis of the sorting signals.
- Ishida, A., Shigeri, Y., Taniguchi, T. and Kameshita, I. (2003) Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther*, **100**, 291-305.
- Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S. and Tjian, R. (1990) GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*, **63**, 155-165.
- Jezek, P. and Garlid, K.D. (1998) Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. Int J Biochem Cell Biol, **30**, 1163-1168.
- Jiang, G., Lee, U. and Sladek, F.M. (1997) Proposed mechanism for the stabilization of nuclear receptor DNA binding via protein dimerization. *Mol Cell Biol*, **17**, 6546-6554.
- Joseph, A.M., Rungi, A.A., Robinson, B.H. and Hood, D.A. (2004) Compensatory responses of protein import and transcription factor expression in mitochondrial DNA defects. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**, C867-875.
- Kanki, T., Nakayama, H., Sasaki, N., Takio, K., Alam, T.I., Hamasaki, N. and Kang, D. (2004) Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. Ann N Y Acad Sci, 1011, 61-68.
- King, M.P. and Attardi, G. (1996) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Method in enzymology*, **264**.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. and Clapham, D.E. (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, **427**, 360-364.

Klingenspor, M. (2003) Cold-induced recruitement of brown adipose tissue thermogenesis.

- Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A. and Viollet, B. (2001) Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, **50**, 1515-1521.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H. and Kirchhausen, T. (2003) Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, **14**, 1953-1963.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. and Rojo, M. (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*, 13, 4343-4354.
- Li, R., Hodny, Z., Luciakova, K., Barath, P. and Nelson, B.D. (1996a) 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**, 18925-18930.
- Li, R., Luciakova, K. and Nelson, B.D. (1996b) Expression of the human cytochrome c1 gene is controlled through multiple Sp1-binding sites and an initiator region. *Eur J Biochem*, 241, 649-656.
- Litchfield, D.W. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*, **369**, 1-15.
- Louet, J.F., Chatelain, F., Decaux, J.F., Park, E.A., Kohl, C., Pineau, T., Girard, J. and Pegorier, J.P. (2001) Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferatoractivated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem J*, 354, 189-197.
- Louet, J.F., Hayhurst, G., Gonzalez, F.J., Girard, J. and Decaux, J.F. (2002) The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem*, **277**, 37991-38000.
- Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, **404**, 652-660.
- Man, P.Y., Turnbull, D.M. and Chinnery, P.F. (2002) Leber hereditary optic neuropathy. J Med Genet, **39**, 162-169.
- Marshall, H.E., Merchant, K. and Stamler, J.S. (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *Faseb J*, **14**, 1889-1900.
- Marusich, M.F., Robinson, B.H., Taanman, J.W., Kim, S.J., Schillace, R., Smith, J.L. and Capaldi, R.A. (1997) Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta*, **1362**, 145-159.
- Mayr, B. and Montminy, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylationdependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 599-609.
- McLennan, H.R. and Degli Esposti, M. (2000) The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr*, **32**, 153-162.
- Mendel, D.B. and Crabtree, G.R. (1991) HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J Biol Chem*, **266**, 677-680.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2004) Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem*.
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Birke, R.L., Zheng, D., Lutterodt, L. and Haines, T.H. (2001) Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett*, **507**, 187-190.

- 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**, 44-49.
- Montminy, M. (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. Annu Rev Biochem, 66, 807-822.
- Moore, F., Weekes, J. and Hardie, D.G. (1991) Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem*, **199**, 691-697.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J.,
 Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J.,
 Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S.,
 Hirschhorn, J.N., Altshuler, D. and Groop, L.C. (2003) PGC-1alpha-responsive genes
 involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human
 diabetes. *Nat Genet*, 34, 267-273.
- Morais, R. (1996) Isolation of avian mitochondrialDNA-less cells. *Methods in enzymology*, **264**.
- Moyes, C.D. (2003) Controlling muscle mitochondrial content. J Exp Biol, 206, 4385-4391.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S. and Carruba, M.O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, **299**, 896-899.
- O'Brien, T.W. and Kalf, G.F. (1967) Ribosomes from rat liver mitochondira. II. Partial characterization. *J Biol Chem*, **242**, 2180-2185.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. and Shaw, J.M. (1998) The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. J Cell Biol, 143, 333-349.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S. and Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**, 664-666.
- Patti, M.E., Butte, A.J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E.J., Goldfine, A.B., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C.R. and Mandarino, L.J. (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8466-8471.
- Petrescu, A.D., Hertz, R., Bar-Tana, J., Schroeder, F. and Kier, A.B. (2002) Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). J Biol Chem, 277, 23988-23999.
- Pfanner, N. and Chacinska, A. (2002) The mitochondrial import machinery: preproteinconducting channels with binding sites for presequences. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 15-24.
- Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptorgamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, **24**, 78-90.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B.M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92, 829-839.
- Radsak, K., Kato, K., Sato, N. and Koprowski, H. (1971) Effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA and cytochrome synthesis in HeLa cells. *Exp Cell Res*, 66, 410-416.
- Renard, P., Ernest, I., Houbion, A., Art, M., Le Calvez, H., Raes, M. and Remacle, J. (2001) Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res*, 29, E21.

Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J.C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F.J. and Spiegelman, B.M. (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4012-4017.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. and Pozzan, T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca2+ responses. *Science*, **280**, 1763-1766.

Roise, D. and Schatz, G. (1988) Mitochondrial presequences. J Biol Chem, 263, 4509-4511.

- Rutter, G.A., Da Silva Xavier, G. and Leclerc, I. (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. *Biochem J*, **375**, 1-16.
- Saha, A.K. and Ruderman, N.B. (2003) Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. *Mol Cell Biochem*, **253**, 65-70.
- Scarpulla, R.C. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*, **286**, 81-89.
- Schlame, M., Rua, D. and Greenberg, M.L. (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res*, 39, 257-288.
- Schwartz, M.P., Huang, S. and Matouschek, A. (1999) The structure of precursor proteins during import into mitochondria. *J Biol Chem*, **274**, 12759-12764.
- Seidel-Rogol, B.L. and Shadel, G.S. (2002) Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, 30, 1929-1934.
- Sekito, T., Thornton, J. and Butow, R.A. (2000) Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol Biol Cell*, **11**, 2103-2115.
- Shadel, G.S. and Clayton, D.A. (1993) Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *J Biol Chem*, **268**, 16083-16086.
- Shaw, J.M. and Nunnari, J. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*, **12**, 178-184.
- Sladek, F.M., Zhong, W.M., Lai, E. and Darnell, J.E., Jr. (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev*, 4, 2353-2365.
- Soderling, T.R. (1999) The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci*, **24**, 232-236.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G. (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, **402**, 371-372.
- 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, 542-545.
- Taylor, D.G., Haubenwallner, S. and Leff, T. (1996) Characterization of a dominant negative mutant form of the HNF-4 orphan receptor. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2930-2935.
- Thompson, C.C., Brown, T.A. and McKnight, S.L. (1991) Convergence of Ets- and notchrelated structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science*, **253**, 762-768.
- Tieu, Q. and Nunnari, J. (2000) Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol*, **151**, 353-366.
- Viollet, B., Kahn, A. and Raymondjean, M. (1997) Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol*, 17, 4208-4219.
- Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. (1991) Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol Cell Biol*, **11**, 5631-5638.

- Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl* Acad Sci US A, 91, 1309-1313.
- Vossen, C. and Erard, M. (2002) Down-regulation of nuclear receptor DNA-binding activity by nitric oxide--HNF4 as a model system. *Med Sci Monit*, **8**, RA217-220.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. Science, 283, 1482-1488.
- Wang, H., Maechler, P., Antinozzi, P.A., Hagenfeldt, K.A. and Wollheim, C.B. (2000) Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem*, 275, 35953-35959.
- Wang, H., Maechler, P., Hagenfeldt, K.A. and Wollheim, C.B. (1998) Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *Embo J*, 17, 6701-6713.
- Weber, K., Bruck, P., Mikes, Z., Kupper, J.H., Klingenspor, M. and Wiesner, R.J. (2002) Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology*, 143, 177-184.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Prinz, T., Ryan, M.T., Meisinger, C., Pfanner, N. and Truscott, K.N. (2003) Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome c: a unique relationship to the TOM machinery. J Mol Biol, 327, 465-474.
- Winder, W.W., Holmes, B.F., Rubink, D.S., Jensen, E.B., Chen, M. and Holloszy, J.O. (2000) Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 88, 2219-2226.
- Wisely, G.B., Miller, A.B., Davis, R.G., Thornquest, A.D., Jr., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J.T., Willson, T.M. and Williams, S.P. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure (Camb)*, **10**, 1225-1234.
- Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R. and Williams, R.S. (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. Science, 296, 349-352.
- Wu, X., Spiro, C., Owen, W.G. and McMurray, C.T. (1998) cAMP response element-binding protein monomers cooperatively assemble to form dimers on DNA. J Biol Chem, 273, 20820-20827.
- 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, 115-124.
- Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Cox, N.J., Fajans, S.S., Signorini, S., Stoffel, M. and Bell, G.I. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*, 384, 458-460.
- Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs, W.H., 3rd and Montminy, M.R. (1988)
 Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB.
 Nature, 334, 494-498.
- Yao, Y.L., Yang, W.M. and Seto, E. (2001) Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol*, **21**, 5979-5991.

15 JUIN 2004