



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la sensibilité de cellules déplétées en ADN mitochondrial (RHO^o) à l'apoptose

Votquenne, Julien

Award date:
2005

[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.



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

Faculté des Sciences

**ETUDE DE LA SENSIBILITE DE CELLULES DELETEES EN ADN MITOCHONDRIAL (RHO⁰)
A L'APOPTOSE**

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

**Julien VOTQUENNE
Août 2005**

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be
<http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude de la sensibilité de cellules déplétées en ADN mitochondrial (ρ^0) à l'apoptose

VOTQUENNE Julien

Résumé

De nombreuses pathologies humaines et animales dont certaines maladies neurodégénératives sont sous-tendues par des dysfonctionnements mitochondriaux et souvent associées à une mortalité cellulaire par apoptose. L'utilisation de cellules partiellement ou totalement déplétées en ADN mitochondrial (ADN_{mt}) comme modèles d'étude des dysfonctionnements mitochondriaux est couramment employée afin d'étudier les réponses cellulaires à une altération de l'activité mitochondriale. Ce travail a été réalisé dans le but de caractériser la sensibilité des cellules 143B déplétées en ADN_{mt} (ou ρ^0) à l'apoptose induite par la staurosporine, un sujet controversé dans la littérature.

Une première approche au niveau transcriptomique utilisant la technologie des damiers à ADN nous a permis de mettre en évidence que des gènes codant des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L) et pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bid, Caspases-3, -7 et -9, p53, c-Myc) sont sous-exprimés dans les cellules 143B ρ^0 . Cette analyse a été complétée par l'identification de gènes codant des protéines impliquées dans l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire qui sont différentiellement exprimés dans les cellules 143B et 143B ρ^0 en réponse à une incubation en présence de staurosporine. Une seconde approche basée sur les dosages de la fragmentation de l'ADN et de l'activité de la caspase-3 nous a permis de caractériser la réponse apoptotique dans ces lignées cellulaires et de mettre en évidence que les cellules 143B déplétées en ADN_{mt} sont plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine. Enfin, nous avons étudié les effets de la déplétion de l'ADN_{mt} et de la staurosporine sur la localisation et l'abondance de différentes protéines pro- et anti-apoptotiques telles que l'inhibiteur endogène de caspases XIAP, les protéines de la famille Bcl-2 : Bax, Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1, et le cytochrome c.

Ce travail a contribué à caractériser la réponse des cellules 143B ρ^0 à l'apoptose induite par la staurosporine et à commencer la recherche de mécanismes susceptibles d'expliquer la plus grande résistance de cellules présentant un dysfonctionnement à l'apoptose induite.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2005

Promoteur : T. Arnould

Un mémoire, ce n'est pas qu'un projet scientifique c'est aussi une formidable aventure humaine avec des hauts, des bas, des héros et des bourreaux. Tous les gens que je vais remercier ici ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je voudrais premièrement remercier le professeur Remacle pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et le professeur Raes qui m'a soutenu lors de ma demande tardive pour obtenir un sujet de mémoire à l'U.R.B.C.. Je tiens également à lui faire mes excuses, ainsi qu'au professeur Remacle, à Patsy et à mon promoteur pour les « petits problèmes » que nous avons eu, j'espère que ce ne seront pas là les seuls souvenirs que vous garderez de moi.

Je voudrais remercier Thierry Arnould, mon promoteur, finalement nous y sommes arrivés ! Ça aura été dur. Je n'aurai pas été un mémorant facile et j'ai bien souvent failli baisser les bras lorsque je sortais de votre bureau qui me faisait parfois prendre le chemin des écoliers ... mais notre collaboration aura finalement porté ses fruits, merci. Merci Andrée, ma patiente tutrice qui m'a appris ce qu'était la vie de labo et l'utilisation de nombreux appareils tous plus chers et plus fragiles les uns que les autres ... vous voyez ... rien n'a explosé à cause de moi ;-). Merci les Mito's (sans « y » et sans « h » ! ;-)). Merci tous les gens du labo, surtout Seb Pyr et Seb Toff, pour leurs bons conseils, leur humour et leur sympathie qui rendaient ce béton gris et ces pailles de faïence beaucoup plus colorés que les magnifiques portoirs du labo. Merci les techniciens, Coralie, Martine, Edouard, Améline, Noëlle ...

Il y a des personnes que je tiens à remercier plus personnellement parce qu'elles ont intensivement contribué à la réalisation de ce mémoire. D'abord merci à tous « mes » compteurs/placeurs qui m'ont aidé, lorsque je devais repiquer en boîte multipuits, à placer ces petits et transparents couvre-objets et à compter ces minuscules cellules. Merci Catherine, toi qui m'a aidé, pauvre berger, à retrouver mes moutons verts ;-), qu'est-ce que nos séances de confocal vont me manquer, je reviendrais bien observer quelques dinosaures et ciels étoilés avec toi pendant que cette vilaine imprimante grogne pour attirer l'attention de notre seigneur (merci Marc pour ton écran mais, s'il te plaît, passe au PC ! lol). Merci papa, maman, sans qui je ne serais pas là (j'ai toujours rêvé de dire ça ... ;-)), vous vous êtes battus pour moi depuis que je suis né, grâce à vous j'ai suivi un enseignement « normal » ... grâce à vous je suis passé de futur caneur de chaise à futur biologiste (désolé Tinou, je sais que ce n'est pas la microchirurgie mais il ne faut quand même pas pousser ;-)). Merci Renzo, parce que tu rends ma maman heureuse et pour la bonne ambiance que tu mets dans l'aquarium. Merci mes « collègues », les mémorants d'U.R.B.C., avec qui on en a fait de belles au bureau (on verra sûrement quelques extraits sur Biotaupe (www.biotaupe.be.tf) (Quoi ?! Comment ça la pub est interdite ?!) (Désolé pour ma grande babeille les gars ;-)). Merci mes amis de l'Arsenal pour qui je planifiais mes manip's afin d'avoir un temps de midi ... à midi ! Merci Monsieur Propre et Bubul pour nos soirées, nos dîners, nos soupers, nos sorties ... nos longues conversations sur tout et rien ... nos coups d'blues, nos coups d'joie. Merci Dam's, d'abord pour tout ce qui vient d'être dit sur notre quatuor de zygotos et puis pour tout le reste, pour nos retards, nos délires, nos gâteaux au chocolat, nos longues ballades à chercher ce qu'on allait manger ... t'es vraiment un ami génial. Merci Audrey, pour ton soutien, ton amitié ... malgré tout. Merci Mandarine pour ton soutien ... en direct du Vietnam ! Merci Justine pour m'avoir « virtuellement » tenu compagnie au bureau pendant les « vacances ». Merci ma Jessica, toujours au bout du fil, quand ça allait trop et pas trop au labo, à la vie, à l'amour. Et enfin, merci à toi ma Dibou, au final, ç'aura été toi ma plus grande motivation pour terminer ce mémoire et merci Chantal, vous êtes adorable, vos mails m'ont apporté (et m'apporteront ?) tellement de bonne humeur qu'ils m'ont gravé à vie un sourire dans le coeur.

Merci,

Liste des abréviations :

ADN _{mt}	ADN mitochondrial
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
Apaf-1	Apoptotic Protéase-Activating Factor-1
ARC	Apoptosis Repressor with CARD
ARN _m	ARN messenger
ARN _r	ARN ribosomique
ARN _t	ARN de transfert
ATCC	American Tissue and Cell Collection
BAR	Bifunctional Apoptosis Regulator
Bcl-2	B-Cell Lymphoma
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BSA	Bovine Serum Albumin
CaMKIV	Calmoduline Kinase IV
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase	CysteinyI Aspartate-Specific protéASE
CCCP	Carbonyl Cyanide <i>m</i> -ChloroPhenylhydrazone
CDK	Cyclin Dependent Kinase
c-FLIP	FADD-Like ICE-inhibitory Protein
CRE	cAMP Responsive-Element
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
DED	Death Effector Domain
DHG	Dulbecco's modified eagle's medium High Glucose
DIA1	DIaphorase
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FADD	Fas-Associated Death Domain
FCCP	Carbonyl Cyanide <i>p</i> -triFluoro-methoxyPhenylhydrazone
GCK	GluCoKinase
GLUT1	facilitated GLUcose Transporter member 1
GPX	Glutathion PeroXidase
GR	Glutathion Reductase
GSH et GSSG	Glutathion
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase
GST	Glutathion Transferase
HRP	Horse Radish Protein
HSP-70	Heat Shock Protein 70
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	Interleukin-1beta-Converting Enzyme
IRES	Internal Ribosome Entry Site
LHON	Leber's hereditary optic neuropathy
Mcl-1	Myeloid Cell factor 1
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
mtCLIC	mitochondrial Chloride Intracellular Channel
NARP	Neuropathy, Ataxia, Retinis Pigmentosa
NF κ B	Nuclear Factor Kappa B
NGF	Neuronal Growth Factor
NRF-1	Nuclear Respiratory Factor-1
NRF-2	Nuclear Respiratory Factor-2
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase

PBS	Phosphate Buffer Saline
PCK2	Phosphoenolpyruvate CarboxyKinase 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PGC	PPAR γ Coactivator
PIB	Phosphate Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKC	Proteine Kinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTP	Permeability Transition Pore
ROS	Reactive Oxygen Species
RRF	Red Ragged Fiber
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Smac/Diablo	Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with LOW pI
SOD	SuperOxyde Dismutase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBP	TATA box Binding Protein
TBP	Tata box Binding Protein
TIM	Transporter of Inner Membrane
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TOM	Transporter of Outer Membrane
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TXNR1	ThioreXiNe Reductase 1
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
XIAP	X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Table des matières

1.	INTRODUCTION	1
1.1.	LA MITOCHONDRIE	1
1.1.1.	Composition et structure	1
1.1.2.	La respiration cellulaire	1
1.1.3.	La mitochondrie et les ROS	2
1.1.4.	La mitochondrie et le Ca ⁺⁺	3
1.1.5.	L'ADN mitochondrial	3
1.2.	LA COMMUNICATION NOYAU-MITOCHONDRIE	4
1.3.	LES PATHOLOGIES MITOCHONDRIALES	5
1.3.1.	Historique	5
1.3.2.	Notion d'hétéroplasmie et d'homoplasmie	5
1.3.3.	Les causes ultimes des maladies mitochondriales	6
1.3.4.	La complexité des maladies mitochondriales	6
1.4.	LES MODÈLES D'ÉTUDE CELLULAIRE DES PATHOLOGIES MITOCHONDRIALES	7
1.4.1.	Obtention de lignées cellulaires partiellement ou totalement déplétées en ADN _{mt}	7
1.4.2.	Les cellules cybrides	8
1.4.3.	Biologie des cellules rho ⁰	8
1.5.	LA COMMUNICATION MITOCHONDRIE-NOYAU OU « COMMUNICATION RÉTROGRADE »	10
1.6.	L'APOPTOSE	12
1.6.1.	Les membres de la famille Bcl-2	12
1.6.2.	Les caspases et leur(s) substrat(s)	14
1.6.3.	La voie extrinsèque	15
1.6.4.	La voie intrinsèque	15
1.6.4.2.	La mécanistique de l'apoptose et la mitochondrie	16
1.7.	LE DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL ET L'APOPTOSE	18
1.8.	LA STAUROSPORINE	20
1.9.	OBJECTIFS DE CE MÉMOIRE	21
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	22
2.1.	CULTURES CELLULAIRES :	22
2.1.1.	Sous-cultures :	22
2.2.	ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE GÈNES INDUITE PAR UN DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL :	22
2.2.1.	Les contrôles	23
2.2.2.	Principe des damiers à ADN	23
2.2.3.	Extraction d'ARN _{tot} :	23
2.2.4.	Rétrotranscription des ARN _m en ADN _c :	24
2.2.5.	Hybridation sur chips :	25
2.2.6.	Analyse des données : quantification et normalisation de l'expression génique	25
2.3.	MARQUAGES EN IMMUNOFLOUORESCENCE ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE :	26
2.4.	WESTERN BLOTTING :	26
2.4.1.	Fractionnement cellulaire et préparation des lysats :	26
2.4.2.	Dosage des protéines par la méthode de Bradford :	27
2.4.3.	Préparation des solutions :	27
2.4.4.	Préparation des gels et migration :	27
2.4.5.	Transfert des échantillons sur une membrane de PVDF :	28
2.4.6.	Marquage et révélation :	28
2.5.	MISE EN ÉVIDENCE DE LA SENSIBILITÉ DIFFÉRENTIELLE DES CELLULES 143B ET 143B RHO ⁰ À L'APOPTOSE INDUITE PAR LA STAUROSPORINE :	29
2.5.1.	Extraction d'ADN et visualisation sur gel d'agarose :	29
2.5.2.	Dosage de la fragmentation de l'ADN par un kit ELISA :	29
2.6.	DOSAGE DE L'ACTIVITÉ CASPASE-3 :	30
3.	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	32
3.1.	MODIFICATIONS DE L'EXPRESSION GÉNIQUE INDUITES PAR LA DÉPLÉTION DE L'ADN _{MT} : ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS L'APOPTOSE AU NIVEAU TRANSCRIPTOMIQUE	32
3.1.1.	Le facteur de transcription c-Myc : un candidat à l'hypersensibilisation à l'apoptose	35
3.2.	EFFETS DE LA STAUROSPORINE SUR LA MORPHOLOGIE DES CELLULES 143B ET 143B RHO ⁰	37
3.3.	MISE EN ÉVIDENCE DE L'INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LA STAUROSPORINE DANS DES CELLULES 143B ET 143B RHO ⁰ : LA FRAGMENTATION DE L'ADN	37

3.3.1.	Mise en évidence de la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose	38
3.3.2.	Etude des effets de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules 143B et 143B rho0 : dosage de la fragmentation de l'ADN par ELISA.....	38
3.4.	ABONDANCE, LOCALISATION ET ACTIVITÉ DE LA CASPASE-3 DANS DES CELLULES 143B ET 143B RHO ⁰ INCUBÉES EN PRÉSENCE DE STAUROSPORINE.....	41
3.4.1	Analyse de l'abondance relative et de la localisation subcellulaire de la caspase-3 par Western Blot et marquages en immunofluorescence.....	41
3.4.1.	Dosage de l'activité de la caspase-3.....	42
3.5.	LA STAUROSPORINE ET LA TRANSLOCATION DU CYTOCHROME C.....	45
3.5.1	Le calcium et la caspase-3 : influence de l'ionomycine et du BAPTA-AM.....	46
3.6.	LOCALISATION ET 'ABONDANCE DE DIFFÉRENTES PROTÉINES PRO- OU ANTI-APOPTOTIQUES DANS LES CELLULES 143B ET 143B RHO ⁰ : INFLUENCE DE LA STAUROSPORINE	48
3.6.1.	Localisation et abondance des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bcl-2, Bcl-X _L et Mcl-1	48
3.6.2.	Localisation et abondance de la protéine pro-apoptotique Bax.....	50
3.5.	LES EFFETS DE LA STAUROSPORINE SUR L'EXPRESSION GÉNIQUE : ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE GÈNES DANS LES CELLULES 143B ET 143B RHO ⁰ LORS D'UNE STIMULATION À LA STAUROSPORINE	51
4.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	54

Introduction

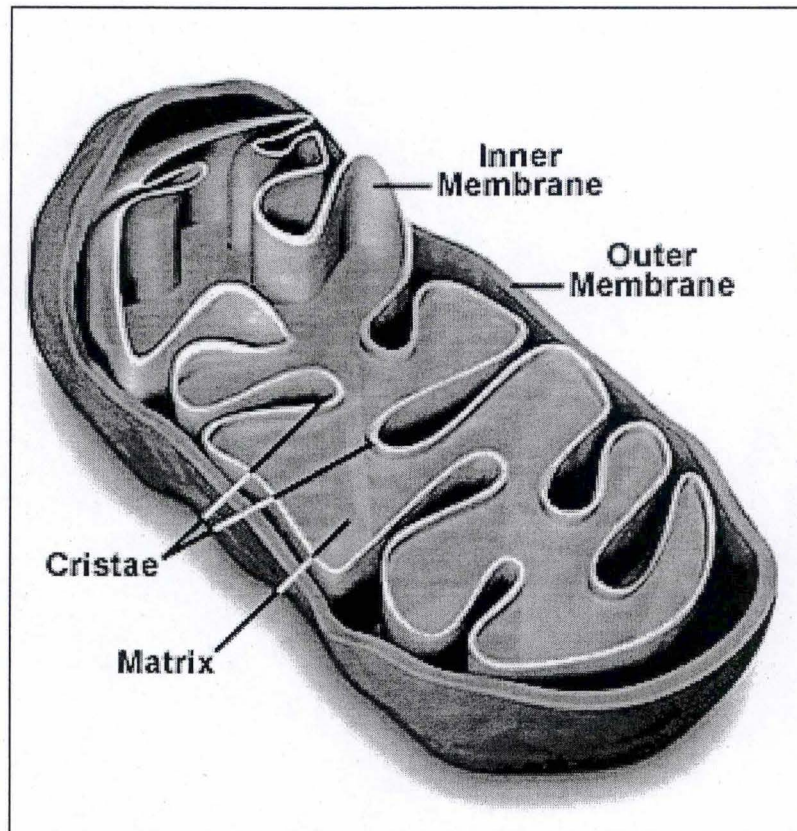


Figure 1.1 : Structure de la mitochondrie. La mitochondrie se compose de quatre compartiments : la membrane interne qui forme les crêtes mitochondriales, renferme la chaîne de transporteurs des électrons et délimite la matrice et l'espace intermembranaire qui contient des protéines pro-apoptotiques et est délimité par la membrane mitochondriale externe (micro.magnet.fsu.edu/cells/mitochondria).

1. Introduction

1.1. *La mitochondrie*

1.1.1. *Composition et structure*

La mitochondrie est un organite ubiquiste des cellules eucaryotes résultant de l'endosymbiose, il y a environ 2 milliards d'années, d'une α -protéobactérie ancestrale probablement du genre *Rickettsia* (Gray et al., 2001). Le nombre ainsi que la taille des mitochondries dans la cellule varient en fonction de l'état d'activité de celle-ci suite aux fusions et fissions subies par l'organite. A cet égard, il faut considérer la mitochondrie plus comme un réseau mitochondrial dynamique capable d'évoluer en fonction des besoins cellulaires que comme un organite « isolé » (Yaffe, 1999). La mitochondrie se compose de quatre compartiments : la matrice mitochondriale contenant le génome mitochondrial, vestige de son origine bactérienne. Ce génome est présent sous la forme de plusieurs copies d'ADN circulaire double brins et sera vu plus en détails au point 1.1.5.. L'espace intermembranaire renferme de nombreuses protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, dont le rôle principal est d'assurer le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire et donc de permettre la régénération de l'ATP, l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor), la pro-caspase-9 et l'endonucléase G. Cet espace intermembranaire est délimité par deux membranes : les membranes mitochondriales interne (MMI) et externe (MME) dont les compositions en phospholipides et en protéines sont très différentes. En effet, la MMI est riche en cardiolipines lui conférant, d'une part, une faible perméabilité aux ions, permettant le maintien du potentiel électrochimique généré par la chaîne de transporteurs d'électrons et, d'autre part, une grande rigidité qui assure le maintien de l'assemblage des complexes protéiques de la chaîne respiratoire. Elle présente de nombreuses invaginations, constituant les crêtes mitochondriales, qui permettent l'augmentation de sa surface et donc du nombre de protéines. La MME possède, quant à elle, une perméabilité aux molécules de petite taille (< 1500 Da) et aux ions tels que le Ca^{++} et le Na^{++} . Cette perméabilité sélective est régulée par la présence de porines (VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel) (Figure 1.1).

1.1.2. *La respiration cellulaire*

En plus de la production d'ATP, la mitochondrie est impliquée dans de nombreuses réactions métaboliques comme le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras (< 20 C) et le cycle de l'urée. Elle est également le site de nombreuses voies biosynthétiques telles que la synthèse des hormones stéroïdiennes, des groupements porphyriques (utilisés dans les clusters Fe-S des complexes de la chaîne respiratoire) et des corps cétoniques (Delsite et al., 2002). Cet organite est également l'un des « centre d'intégration » de l'apoptose ou mort cellulaire programmée, essentielle à l'homéostasie des tissus des organismes multicellulaires dont il sera question au point 1.6 (Zimmermann et al., 2001).

Nous allons uniquement décrire ici la production de l'ATP par les phosphorylations oxydatives mitochondriales. Le NADH et le FADH_2 produits au niveau du cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale vont apporter respectivement leur(s) électron(s) aux complexes I (NADH ubiquinone oxydoréductase) et II (succinate déshydrogénase) de la chaîne de transporteurs des électrons. Ces électrons vont être transférés par l'ubiquinone au complexe III (ubiquinone cytochrome c oxydoréductase) et, via le cytochrome c, au complexe

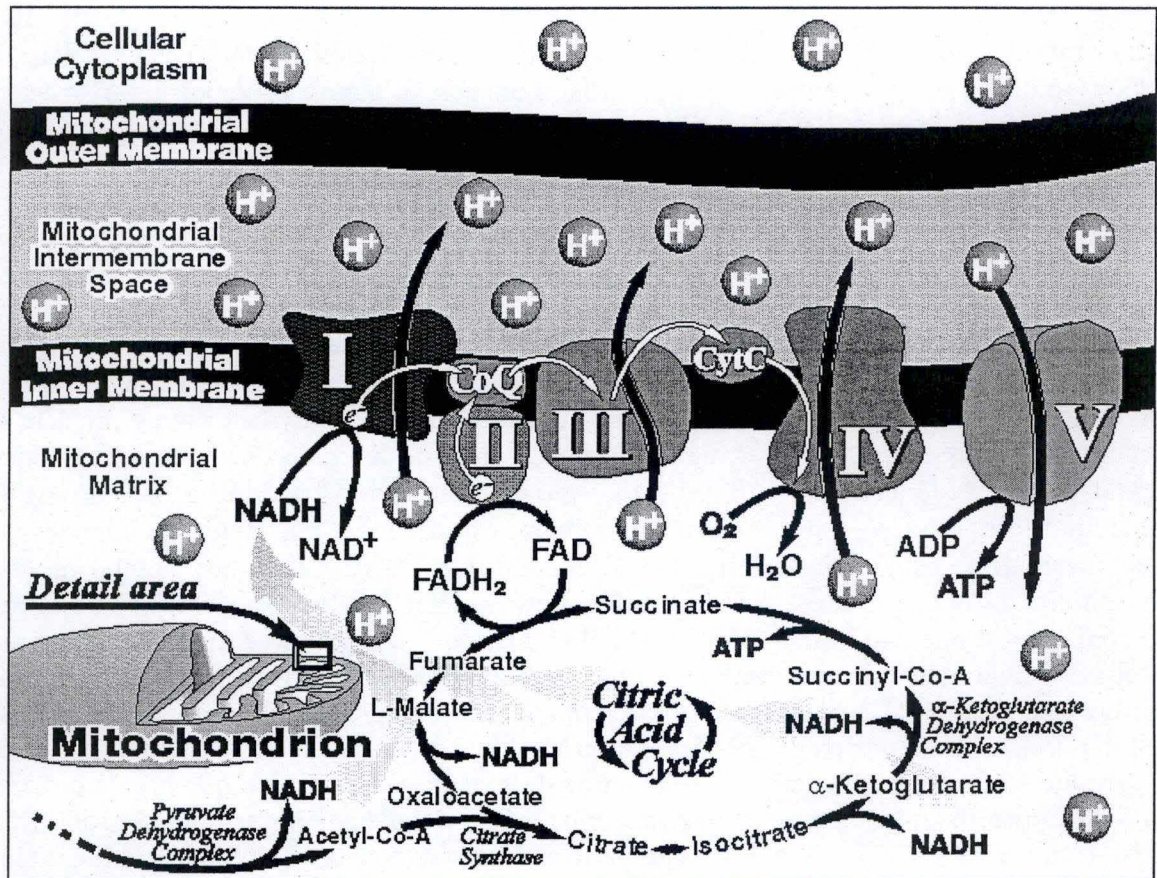


Figure 1.2 : La chaîne de transporteurs des électrons. Les molécules de NADH (réduites lors de la glycolyse et du cycle de Krebs) vont transférer des électrons au complexe I de la chaîne respiratoire. Ceux-ci vont alors être acheminés, ainsi que les électrons transférés par le FADH₂ au complexe II, jusqu'au complexe IV où ils permettront la réduction de l'O₂ en H₂O. L'énergie perdue par les électrons permet un transfert des protons de la matrice mitochondriale dans l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV. Le gradient électrochimique ainsi créé va permettre de régénérer le pool d'ATP cellulaire à partir d'ADP et de Pi au niveau du complexe V ou F₀-F₁ATPase (www.ceri.com).

IV (cytochrome oxydase) qui permettra le transfert de quatre électrons à une molécule d' O_2 pour former, avec quatre protons, deux molécules d' H_2O (Figure 1.2). L'énergie des électrons transférés est convertie en un potentiel électrochimique ($\Delta\Psi_m$), compris entre -220 mV et -180 mV, par les complexes I, III et IV via le transfert de protons de la matrice mitochondriale dans l'espace intermembranaire lui conférant un pH plus faible que celui de la matrice. Le potentiel électrochimique généré par la chaîne respiratoire va permettre la régénération du pool d'ATP à partir d'ADP via la F_0F_1 -ATPase qui va catalyser cette réaction en contrepartie du retour des protons dans la matrice. L'ATP matriciel et l'ADP cytosolique sont ensuite échangés lors d'un co-transport par l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase) qui permet à la réaction de se poursuivre (Buchet et al., 1998). En contrepartie de la production d'ATP, la mitochondrie est l'un des principaux lieux de production de radicaux libres dérivés de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species)

1.1.3. La mitochondrie et les ROS

Dans les cellules de mammifères, plus de 90 % de l'oxygène consommé est utilisé par la mitochondrie et plus de 4 % de cet oxygène est transformé en espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) (Brookes et al., 2004; Vergani et al., 2004). En effet, il arrive, même en conditions normales, que les électrons qui transitent par la chaîne respiratoire ne parviennent pas jusqu'au complexe IV pour réduire l' O_2 en H_2O . Ils sont, dans ce cas, transférés directement à l'oxygène moléculaire et participent à sa réduction partielle formant des radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ réactifs et instables (leur temps de demi-vie est de 10^{-9} s). Ces radicaux superoxydes sont convertis par dismutation spontanée ou suite à l'action enzymatique des superoxydes dismutases en H_2O_2 qui pourra lui-même être converti en OH^{\cdot} en présence d'ions métalliques par la réaction de Fenton. Les radicaux superoxydes produits dans la mitochondrie pourraient être transférés dans le cytosol par l'intermédiaire du canal VDAC (Brookes et al., 2004).

Il existe dans la cellule trois enzymes anti-oxydantes importantes qui permettent de réguler l'abondance des radicaux libres, les SOD, la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase. Comme il a été dit précédemment, les SOD catalysent la dismutation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène dans la matrice mitochondriale (Mn-SOD) et dans le cytosol (Cu/Zn-SOD). La GPX, elle, catalyse la conversion des peroxydes en oxydes et en H_2O en oxydant le glutathion (GS) qui sera réduit par la glutathion réductase (GR). La catalase catalyse également la conversion de l' H_2O_2 en H_2O mais de manière plus efficace et est surtout active lors de stress oxydatifs intenses. De nombreuses études ont montré que les ROS ne sont pas seulement, à forte concentration, des entités toxiques capables de réagir avec les biomolécules de haut poids moléculaire possédant des doubles liaisons telles que les lipides membranaires, les protéines et l'ADN mais qu'ils étaient également impliqués dans des voies de signalisation intracellulaires (Brookes et al., 2004; Poyton et al., 1996). Citons à titre d'exemple que la perturbation de la génération mitochondriale des ROS peut affecter le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'activité des facteurs de transcription, de métalloprotéases, de protéines kinases et de phosphatases (Brookes et al., 2004). Une augmentation de la production des ROS par la mitochondrie peut aussi bien être causée par une activation que par une inhibition de la chaîne de transporteurs des électrons. Dans le cas d'une inhibition de la chaîne respiratoire, ceci s'explique lorsque l'on observe l'état de réduction du principal acteur de la production des radicaux superoxydes, la quinone, qui est plus abondante sous sa forme réduite. L'activité de la chaîne respiratoire, et donc la production des ROS, est en partie contrôlée par la concentration en calcium dans la cellule dont l'homéostasie est également régulée par la mitochondrie (Figure 1.3).

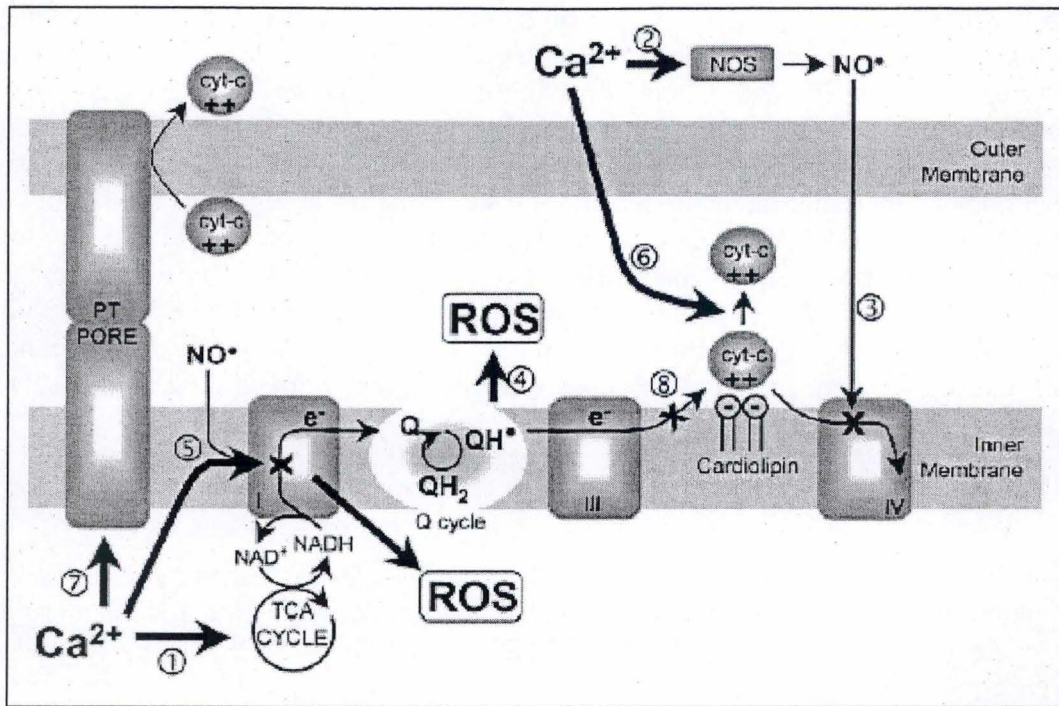


Figure 1.3 : Mécanismes de stimulation de la production des ROS par le calcium. Le calcium peut activer le cycle de Krebs et donc la chaîne de transporteurs des électrons (1). Il peut activer la NO synthase (NOS)(2) dont le produit (NO) va inhiber le complexe IV (3). Il peut également, conjointement avec le NO, inhiber le complexe I. L'inhibition des complexes I et IV ainsi que l'activation du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire va augmenter la production de ROS à ce niveau (4 et 5). De plus, le calcium peut entraîner la rupture des interactions entre les cardiolipines et le cytochrome c (6) et, à fortes concentrations, favoriser l'ouverture du PTP (7). Le cytochrome c sera alors libéré bloquant par la même occasion l'activité du complexe III (8)(d'après Brookes et al. 2004).

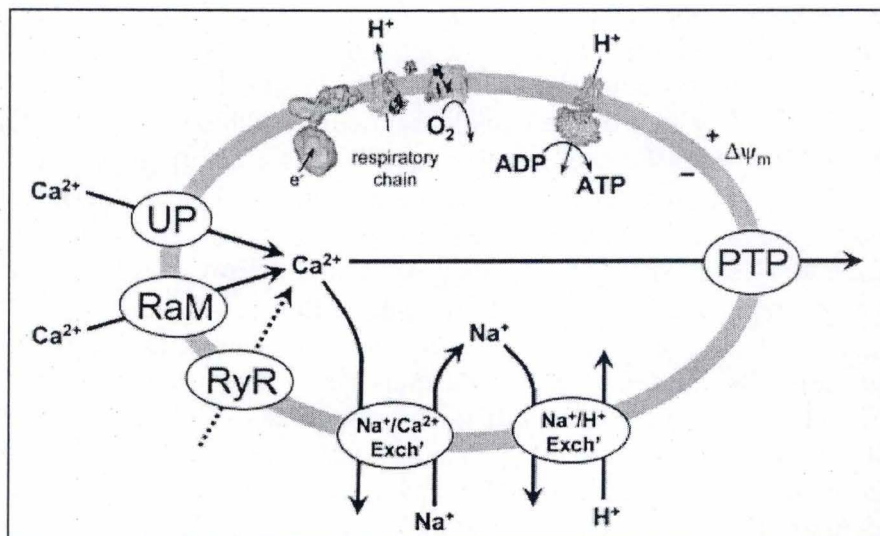


Figure 1.4 : Importation et exportation du calcium à travers la membrane mitochondriale interne. L'importation du calcium dans la mitochondrie peut se faire par un uniporteur (UP) grâce au potentiel de membrane mitochondrial ou via les transporteurs RAM et RyR. L'exportation du calcium est réalisée par antiport avec le sodium, les protons ou par le PTP (d'après Brookes et al 2004).

1.1.4. La mitochondrie et le Ca^{++}

La mitochondrie est l'un des sites assurant l'homéostasie cellulaire du Ca^{++} (Brookes et al., 2004). Le transport du Ca^{++} du cytosol vers la matrice mitochondriale est réalisé par un uniporteur grâce au potentiel de membrane qui résulte, en grande partie, de l'exportation des protons par la chaîne respiratoire. Il existe également deux autres mécanismes d'entrée du Ca^{++} dans la matrice mitochondriale à travers la membrane interne : l'un, appelé RaM pour « Rapid-Mode Uptake », permet une modification rapide (de l'ordre de la milliseconde) de la concentration calcique matricielle et l'autre via le canal mRyR dépendant des récepteurs à la ryanodine que l'on trouve uniquement dans les cellules excitables.

La mitochondrie ne peut pas accumuler une quantité infinie de Ca^{++} et celui-ci doit être exporté dans le cytosol à un taux comparable à celui de son importation dans la matrice donnant lieu à un cycle du Ca^{++} à travers la membrane mitochondriale interne (Chakraborti et al., 1999)(Figure 1.4). Le Ca^{++} peut quitter la mitochondrie de différentes manières : par le cotransporteur spécifique $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ (ou H^+) ou bien encore par l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore), un pore aspécifique permettant le passage des ions et molécules de moins de 1.500 kDa. L'ouverture de ce pore, qui est également impliquée dans la mort cellulaire programmée (que nous traiterons en détail au point 1.6), est probablement médiée par l'interaction du côté matriciel entre la cyclophiline D et l'ANT qui est facilitée par le Ca^{++} intramitochondrial (Gunter et al., 2004).

La production d'ATP par phosphorylation oxydative est non seulement fonction de la concentration en ADP et en P_i qui reflète les besoins énergétiques de la cellule mais est également régulée par la concentration calcique matricielle ($[\text{Ca}^{++}]_{\text{mt}}$)(Gunter et al., 2004). Ainsi, il a été montré que le Ca^{++} augmente le taux de production du NADH suite à l'activation de la pyruvate déshydrogénase, de l'isocitrate déshydrogénase et de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Une légère augmentation de la $[\text{Ca}^{++}]_{\text{mt}}$ active également la F_1F_0 -ATP synthase, la chaîne de transporteurs des électrons et l'ANT (Brookes et al., 2004; Gunter et al., 2004). L'activation de la chaîne respiratoire par le Ca^{++} va également entraîner une augmentation de la production des ROS par la mitochondrie (figure 1.4) (Brookes et al., 2004). Ceci explique l'importance de la régulation de la concentration calcique matricielle. Lorsque celle-ci est trop importante, suite à une forte augmentation de la concentration calcique cytosolique par exemple, la diminution du $\Delta\Psi_{\text{m}}$ et l'activation de la chaîne respiratoire vont augmenter le taux de production des ROS qui pourront déstabiliser les membranes mitochondriales et induire l'apoptose (Duchen, 2000).

1.1.5. L'ADN mitochondrial

Du fait de son origine endosymbiotique, la mitochondrie possède son propre ADN (ADN_{mt}) se présentant sous la forme d'une molécule circulaire d'ADN double brins de 16,6 kb chez l'homme. L' ADN_{mt} est présent en de multiples copies (de 100 à 10.000 copies/cellule) (Fernandez-Silva et al., 2003). Les molécules d' ADN_{mt} , contrairement à l'ADN nucléaire, ne sont pas associées à des protéines histones. Elles sont cependant organisées en nucléoïdes comprenant en moyenne de 2 à 8 molécules d'ADN qui permettent la structuration et la ségrégation des molécules d' ADN_{mt} lors de la fission mitochondriale (Legros et al., 2004).

La réplication de l' ADN_{mt} se déroule dans la matrice mitochondriale de façon indépendante du cycle cellulaire et est initiée au site de régulation de la molécule appelé « boucle D » ou « boucle de déplacement » contenant l'origine de réplication du brin H (O_H), lieu de fixation

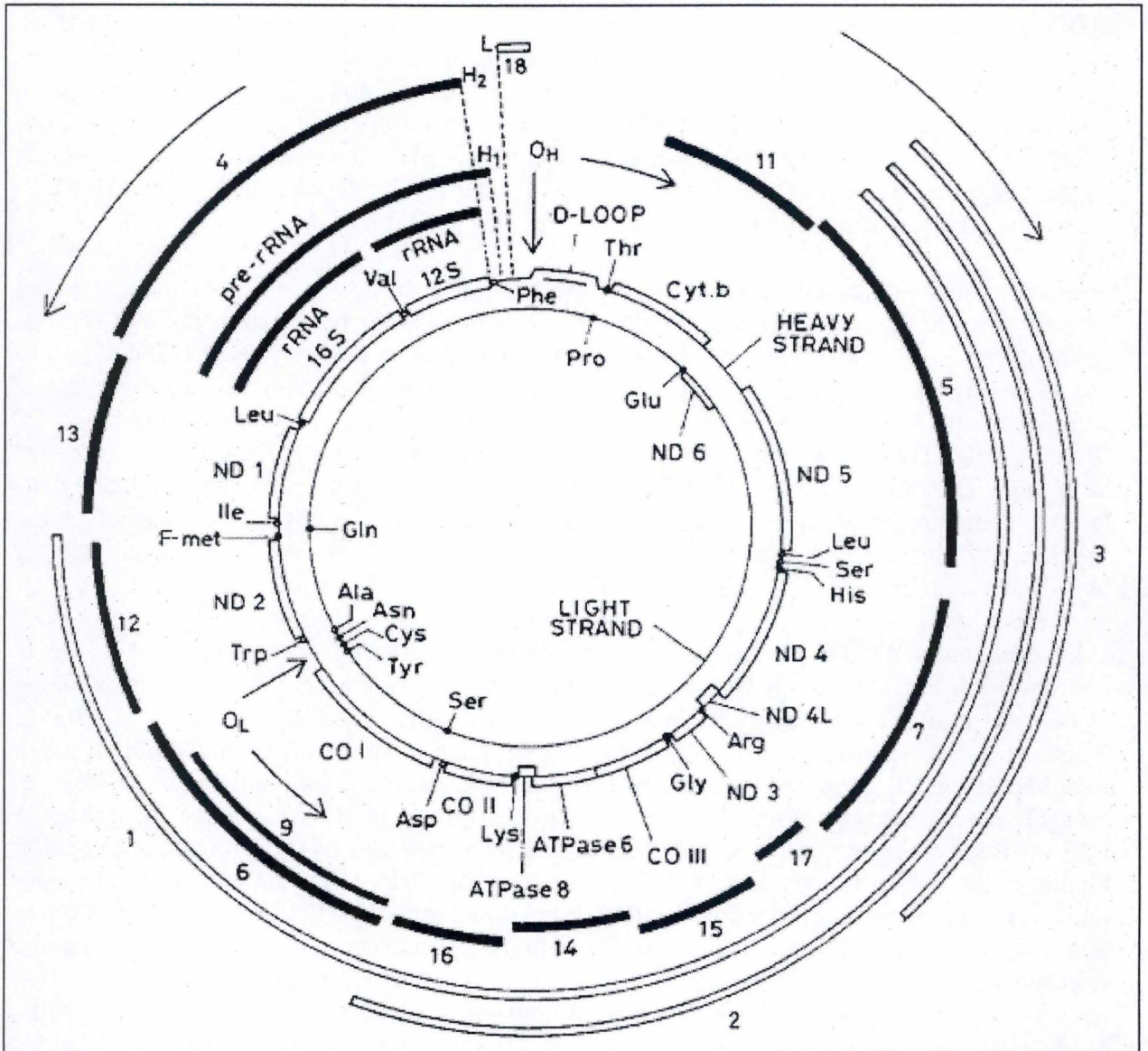


Figure 1.5 : Carte génétique du génome mitochondrial humain. Les deux cercles internes représentent les deux brins de l'ADN_{mt}. Les cercles extérieurs représentent les ARN transcrits du brin H (lignes noires) et du brin L (lignes blanches). Les sites d'initiation de la transcription des brins H et L sont respectivement représentés par H₁/H₂ et L. OH et OL représentent les origines de répliation des brins H et L respectivement (d'après Fernandez-Silva et al. 2003).

de l'ADN polymérase γ . Le brin H est synthétisé pendant que la machinerie de transcription suit le brin L servant de matrice. Une fois que celle-ci atteint l'origine de réplication du brin L (O_L), le brin H néosynthétisé est déplacé et le brin L est répliqué (Fernandez-Silva et al., 2003). La réplication de l'ADN_{mt} est dépendante de la transcription de ce dernier puisque l'initiation de la réplication du brin H nécessite de courtes amorces d'ARN. La transcription de l'ADN_{mt} humain débute à trois sites d'initiations distincts situés au niveau du « D-loop » : deux pour le brin H (H_1 et H_2) et un pour le brin L (L)(Figure 1.5). La transcription du brin H au départ du site H_1 est plus fréquente qu'au départ du site H_2 (de l'ordre de vingt fois) et la transcription à partir des trois sites donne lieu à des transcrits polycistroniques nécessitant plusieurs étapes de maturation. Les principaux promoteurs contenant les sites d'initiations H_1 et L, HSP₁ et LSP sont fonctionnellement indépendants et peuvent être activés par le facteur de transcription mitochondrial mtTFA (Fernandez-Silva et al., 2003). Chez les mammifères, les ARN_r et ARN_m mitochondriaux dérivent donc de transcrits polycistroniques contenant un ou plusieurs ARN_t. L'excision des ARN_t par des endonucléases et leur « processing » en 3' permettent souvent la maturation de l'extrémité 5' de l'ARN_m qui le suit (Fernandez-Silva et al., 2003). La traduction de ces ARN_m se fait, chez les mammifères, par les mitoribosomes liés à la membrane mitochondriale interne.

Au cours de l'évolution, le nombre de protéines mitochondriales codées par l'ADN_{mt} a diminué en faveur de l'ADN nucléaire. Ceci a pu se produire directement par des échanges de matériel génétique entre l'endosymbiote et son hôte ou bien par sélection : les deux génomes codant pour des protéines fonctionnellement redondantes (Gray et al., 2001; Wallace, 1999). L'ADN_{mt} code, chez l'homme, pour 13 protéines essentielles à la phosphorylation oxydative telles que des protéines constituant, en partie, les complexes I, III, IV, V et les sous-unités 6 et 8 de l'unité F_0 de la F_0F_1 -ATPase (DiMauro, 2004). L'ADN_{mt} code également pour 2 ARN_r et 22 ARN_t. Toutes les autres protéines participant à la biogenèse mitochondriale (estimées entre 800 et 1500) sont codées par l'ADN nucléaire. Le fait que les gènes codant pour les protéines mitochondriales soient physiquement localisés dans des génomes distincts et présents dans des compartiments cellulaires différents implique des communications entre le noyau et la mitochondrie permettant la coordination de l'expression de gènes des génomes nucléaire et mitochondrial.

1.2. La communication noyau-mitochondrie

Entre 800 et 1500 protéines participant à la biogenèse mitochondriale sont connues pour être traduites dans le cytosol à partir de transcrits codés par des gènes nucléaires. Parmi ceux-ci, on peut citer, à titre d'exemples, les gènes codant pour des sous-unités de la chaîne de transporteurs des électrons (Figure 1.6), pour des protéines impliquées dans l'importation de protéines mitochondriales, pour les facteurs de transcription mitochondriaux mtTFA (Mitochondrial Transcription Factor A) et mtTFB (Mitochondrial Transcription Factor B) et pour VDAC. L'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et en particulier pour des protéines impliquée dans la phosphorylation oxydative est régulée par les facteurs de transcription NRF-1 (Nuclear Respiratory Factor-1) et NRF-2/GABP. Il existe également d'autres facteurs de transcription tels que les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) qui régulent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial des acides gras. La coordination de l'expression entre les deux génomes pourrait être assurée par le fait que NRF-1 et NRF-2/GABP contrôlent tous deux l'expression des facteurs de transcription mitochondriaux mtTFA et mtTFB (Butow et al., 2004; Miranda et al., 1999). Il a récemment été montré, qu'en plus de l'ARN polymérase II, une polymérase, jusque là inconnue, provenant de la transcription alternative du gènes codant l'ARN

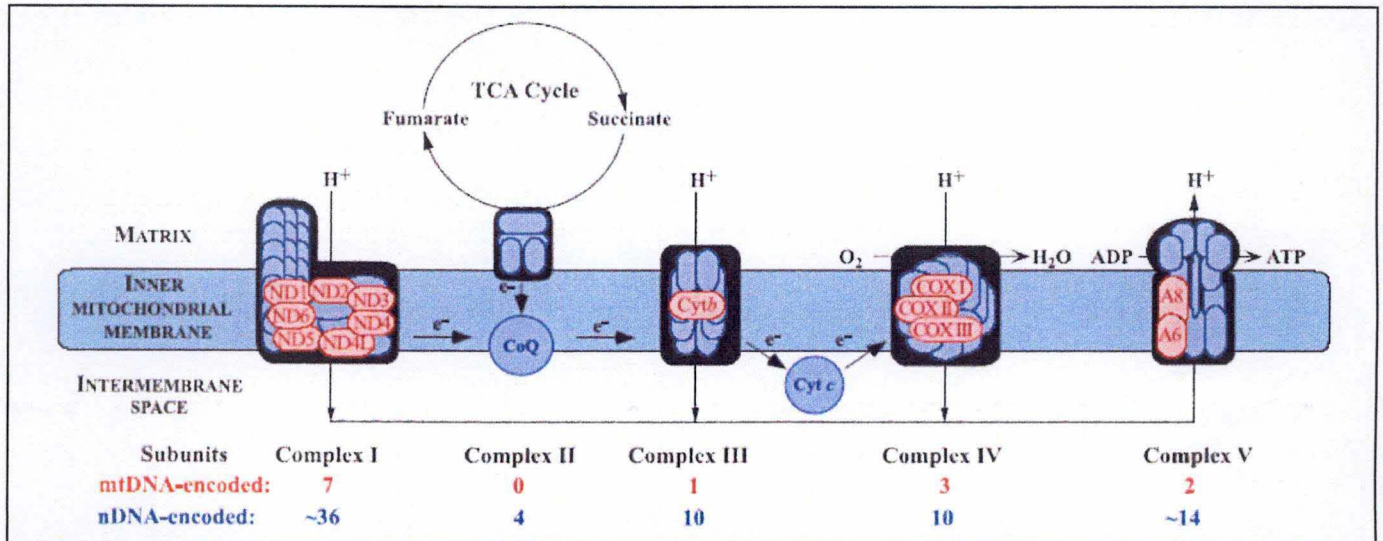


Figure 1.6 : Contribution de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial à la synthèse des complexes de la chaîne de transporteurs d'électrons. Ce schéma de la chaîne de transporteurs d'électrons montre en rouge les sous-unités codées par l'ADNmt et en bleu les sous-unités codées par l'ADN nucléaire. Alors que les électrons circulent le long de la chaîne de transporteurs des électrons, des protons sont pompés par les complexes I, III et IV de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons va permettre de régénérer le pool d'ATP cellulaire à partir d'ADP et de Pi en passant par le complexe V (d'après DiMauro et al. 2004).

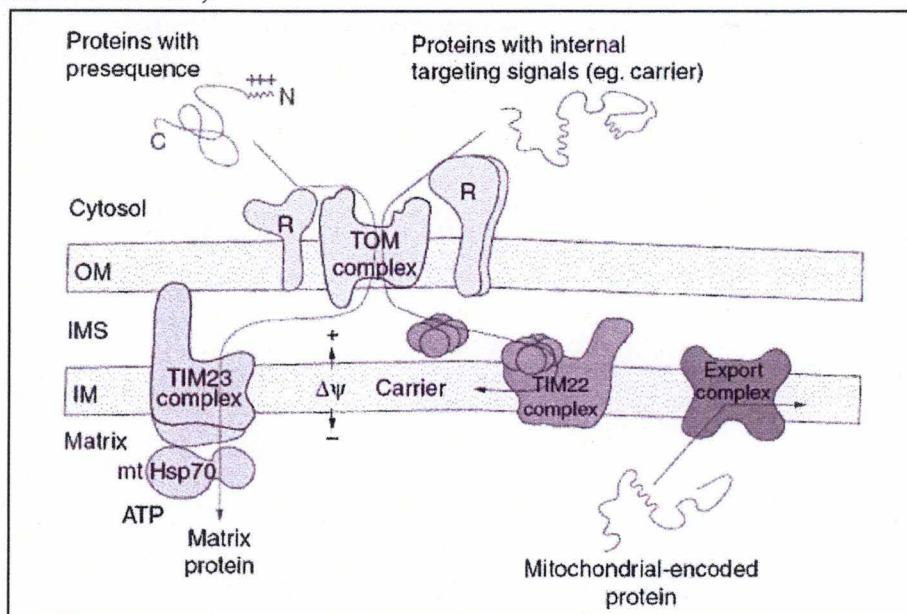


Figure 1.7 : Mécanismes d'importation des protéines dans la mitochondrie. Quatre types de complexes d'importation ou d'exportation sont connus dans la mitochondrie : trois participent à l'importation de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire (TOM, TIM 23 et TIM 22) et un permet l'exportation de protéines de la matrice vers la membrane interne (Export). Les précurseurs protéiques possèdent une séquence NH₂-terminale ou une séquence d'adressage interne qui se lie à un récepteur (R) spécifique qui permet leur importation par le complexe TOM de la membrane externe. Le précurseur à destination de la matrice mitochondriale et qui possède une pré-séquence NH₂-terminale est importé à travers la membrane interne via TIM 23. Cette importation nécessite un potentiel de membrane $\Delta\psi_m$ ainsi que l'activité ATPasique de la HSP70mt. Si la protéine est destinée à la membrane interne, elle possède une séquence d'adressage interne et est guidée vers le complexe TIM 22 par des « TIM carriers » de l'espace intermembranaire (d'après Truscott et al. 2003).

polymérase mitochondriale pouvait procéder à la transcription de gènes nucléaires (Kravchenko et al., 2005). Cette découverte pourrait également expliquer le mécanisme par lequel le génome nucléaire et le génome mitochondrial synchronisent l'expression des gènes codant pour des protéines mitochondriales. Les protéines mitochondriales traduites dans le cytosol à partir d'ARN_m par les ribosomes libres seront importées dans la mitochondrie via les transporteurs membranaires TOM (Transporter of Outer Membrane) et TIM (Transporter of Inner Membrane) (Figure 1.7)(Truscott et al., 2003). Les protéines codées par le génome mitochondrial sont, quant à elles, directement synthétisées dans la mitochondrie par la machinerie de traduction mitochondriale.

1.3. Les pathologies mitochondriales

1.3.1. Historique

La communauté scientifique porte un intérêt croissant à l'étude des réponses cellulaires au dysfonctionnement mitochondrial. Cet intérêt est sous-tendu par le nombre élevé de pathologies humaines et animales dues à des remaniements de l'ADN_{mt} et des gènes de l'ADN_{nucléaire} codant pour des protéines mitochondriales. La découverte de l'implication que pouvaient avoir les mitochondries dans certaines pathologies fut réalisée, il y a plus de 40 ans, lorsqu'on constata un nombre élevé de mitochondries au phénotype anormal dans des muscles striés squelettiques. Dix ans après cette découverte, pas moins de 50 pathologies mitochondriales dues à des mutations ponctuelles dans l'ADN_{mt} et une centaine dues à des réarrangements dans le génome mitochondrial (délétion, duplication, déplétion) ont été répertoriées (Figure 1.8)(Wallace, 1999). Ces pathologies peuvent également être causées par des mutations et/ou des réarrangements dans les gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales (Tableau 1.1). Il est maintenant bien établi que les mitochondries sont à l'origine de nombreuses maladies affectant principalement les tissus requérant de grande quantité d'énergie tels que les muscles et le cerveau (Rozwodowska et al., 2000; Wallace, 1999).

Lors de la fécondation, ce sont les mitochondries de l'oocyte qui sont transmises au futur embryon. Par conséquent, les maladies causées par des modifications de l'ADN_{mt} présenteront une hérédité strictement maternelle. Les maladies dues, quant à elles, à des modifications de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales présenteront une hérédité Mendélienne classique (DiMauro, 2004). Les paragraphes qui suivent traiteront exclusivement des maladies mitochondriales liées à des réarrangements ou à des mutations dans l'ADN_{mt}.

1.3.2. Notion d'hétéroplasmie et d'homoplasmie

L'ADN_{mt} est soumis à un haut taux de mutations (10 à 20 fois plus important que l'ADN_{nucléaire}) (Rozwodowska et al., 2000). Les raisons de la plus grande sensibilité de l'ADN_{mt} aux mutations peuvent s'expliquer, d'une part, par la faible efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN dans la mitochondrie et, d'autre part, par la protection moins importante apportée par la structure de l'ADN_{mt}. En effet, rappelons que l'ADN_{mt} n'est pas, contrairement à l'ADN_{nucléaire}, enroulé autour de protéines histones (Fernandez-Silva et al., 2003). Ce taux de mutations plus important peut également s'expliquer par la proximité de la chaîne de transporteurs d'électrons, site mitochondrial majeur de la production de ROS.

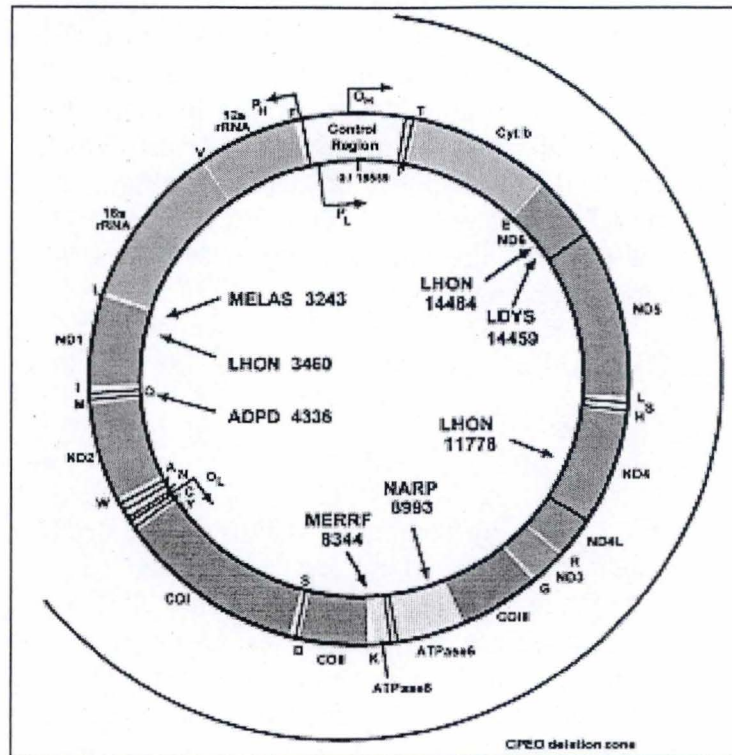


Figure 1.8 : Carte du génome mitochondrial humain (16.549 pb) et localisation de différentes mutations impliquées dans des pathologies mitochondriales. Différentes mutations de l'ADNmt peuvent entraîner l'apparition de diverses pathologies humaines telles que les syndromes MERRF, MELAS, LHON, ADPD, LDYS et NARP (d'après Wallace et al. 1999).

Genome	Gene	[mtDNA]	Biochemistry	Clinical phenotype	
mtDNA	irRNA ^{Leu(UUR)}	single Δ	↓ prot. synth.	KSS; ocular myopathy; PS	
	irRNA ^{Lys}		↓ prot. synth.	MELAS	
	other tRNAs		↓ prot. synth.	MERRF	
	ATPase6		↓ ATP synth.	multiple phenotypes	
	ND1, ND4, ND6		↓ complex I	NARP/MILS	
	ND1, ND4		↓ complex I	LHON	
	Cyt b		↓ complex III	myopathy ^a	
	COX III		↓ complex IV	myopathy ^a	
	nDNA	NDUF		↓ complex I	LS
		SDHA		↓ complex II	LS
BCS1L			↓ complex III	GRACILE	
SURF1			↓ complex IV	LS	
SCO1			↓ complex IV	hepatoencephalomyopathy	
SCO2			↓ complex IV	cardioencephalomyopathy	
COX10			↓ complex IV	nephroencephalomyopathy	
COX 15			↓ complex IV	cardioencephalomyopathy	
ATP 12			↓ complex V	fatal infantile multisystemic	
TP		multiple Δ	↓	MNGIE	
ANT1		multiple Δ	↓ prot. synth.	adPEO-plus ^b	
Twindle		multiple Δ	↓ prot. synth.	adPEO-plus ^b	
POLG		multiple Δ	↓ prot. synth.	ad/arPEO-plus ^b	
dGK		depletion	↓ prot. synth.	hepatocerebral syndrome	
TK2		depletion	↓ prot. synth.	myopathy; SMA	
TAZ			↓ cardiolipin	Barth syndrome	
OPA1			↓ mit. Motility	ad optic atrophy	

Abbreviations and symbols: Δ, deletion; KSS, Kearns - Sayre syndrome; PS, Pearson syndrome; MELAS, Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; LS, Leigh syndrome; MILS, maternally inherited LS; GRACILE, growth retardation, aminoaciduria, cholestasis, lactacidosis, early death; adPEO, autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia; arPEO, autosomal recessive PEO; SMA, spinal muscular atrophy. [mtDNA] indicates changes of mtDNA secondary to nDNA mutations (defects of intergenomic signaling).

^a Mutations in cyt b and COX genes can also cause multisystemic diseases.

^b Plus refers to proximal weakness, neuropathy, psychiatric disorders, parkinsonism.

Tableau 1. 1 : Classification génétique et biochimique des maladies mitochondriales (d'après DiMauro et al. 2004).

LHON mutation	Class	Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Amino acid conservation	Estimated frequency in all LHON cases, %	Frequency in 11778 +, %	Frequency in 11778 -, %	Frequency in controls, %
3460	I	ND1	G→A	A→T	M	15	0	30	0
4160 ^a	I	ND1	T→C	L→P	H	<1	ND	Rare	0
11778	I	ND4	G→A	R→H	H	50	100	0	0
15257	I	Cytb	G→A	D→N	H	9	0	17	0.3
3394 ^b	I/II	ND1	T→C	Y→H	H	?	7	7	0.9
7444	I/II	COI	G→A	Term→K	NA	5	0	9	1
4216	II	ND1	T→C	Y→H	L	—	21	53	13
4917	II	ND2	A→G	D→N	H	—	3	3	4
5244 ^{c,d}	II	ND2	G→A	G→S	H	—	0	5	0
13708	II	ND5	G→A	A→T	M	—	25	34	6
15812 ^e	II	Cytb	G→A	V→M	M	—	0	9	0.1

Tableau 1. 2 : Liste des mutations de l'ADNmt connues pour engendrer le syndrome LHON (d'après Brown et al. 1992).

Lorsqu'une mutation ou un réarrangement survient dans le génome mitochondrial, la cellule contient une population hétérogène de mitochondries contenant un mélange de molécules d'ADN porteuses ou non de la mutation. Cet état est connu sous le nom d'hétéroplasmie. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, les mitochondries sont distribuées « aléatoirement » entre les cellules filles de telle sorte qu'après plusieurs générations, le génotype mitochondrial de la cellule peut conserver un état hétéroplasmique ou ne contenir que des mitochondries dont l'ADN est porteur ou non de la mutation (homoplasmie)(Figure 1.9)(DiMauro, 2004; Wallace, 1999). Ce processus explique le côté chronique de nombreuses maladies mitochondriales ainsi que l'hétérogénéité des symptômes liés à une même modification dans l'ADN_{mt}. En effet, au cours de la maladie, le pourcentage de mitochondries anormales peut augmenter dans la cellule avec comme conséquence une diminution des apports en énergie. Des symptômes tels qu'une ataxie (absence de coordination des mouvements), un motif typique des fibres musculaires squelettiques, qui semblent déchirées, dû à la prolifération palliative des mitochondries (connu sous le nom de « Ragged-Red Fiber » (RRF)) que l'on trouve entre autres dans le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers). D'autres symptômes, spécifiques au tissu touchés peuvent également apparaître tels que la surdité et la cécité (Wallace, 1999).

1.3.3. Les causes ultimes des maladies mitochondriales

Les altérations de l'ADN_{mt} entraînant la diminution de la production d'ATP peuvent être la cause de maladies mitochondriales en agissant à trois niveaux : la diminution de la production d'énergie, l'augmentation de la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène et enfin l'induction de la mort cellulaire. Des mutations dans les gènes mitochondriaux ou nucléaires (Figure 1.6) codant pour les sous-unités des complexes de la chaîne de phosphorylation oxydative vont perturber la synthèse d'ATP et diminuer la production d'énergie. De plus, comme nous l'avons déjà mentionné, la phosphorylation oxydative est l'une des voies principales de production des ROS dans la mitochondrie. Lorsque la chaîne de transporteurs d'électrons est inhibée par des mutations au niveau des gènes codant pour les protéines la composant, les électrons accumulés dans les premières étapes (le complexe I et CoQ ainsi que le complexe III) servent directement à réduire l'O₂ en O₂⁻ qui pourra lui même être converti en H₂O₂ et OH^o (Brookes et al., 2004; Wallace, 1999). Ces ROS vont réagir avec les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques mitochondriaux ou cellulaires et les endommager. Ils pourront également inactiver les centres Fe-S des complexes de la chaîne de transporteurs d'électrons tel que le complexe III, diminuant de ce fait la production d'énergie et entraînant la production de plus en plus importante de ROS (Wallace, 1999). Une augmentation de la production des ROS et une diminution de l'apport en énergie peuvent, *in fine*, aboutir à la mort de la cellule par apoptose.

1.3.4. La complexité des maladies mitochondriales

Nous pouvons illustrer la complexité des maladies mitochondriales en détaillant la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON) qui entraîne une perte de l'acuité visuelle et une perturbation de la vision des couleurs suite à l'atrophie du nerf optique (Rozwodowska et al., 2000), et la dystonie, caractérisée par des mouvements désordonnés, un retard mental et une petite stature. Ces deux pathologies peuvent être causées par la même substitution de base (G14459A) dans le gène mitochondrial codant pour la sous-unité 6 de la NADH déshydrogénase entraînant une diminution de l'activité du complexe I (Wallace, 1999). Cependant, le syndrome LHON peut également résulter de 10 autres mutations ponctuelles (Tableau 1.2)(Brown et al., 1992). Une autre pathologie mitochondriale, le syndrome de

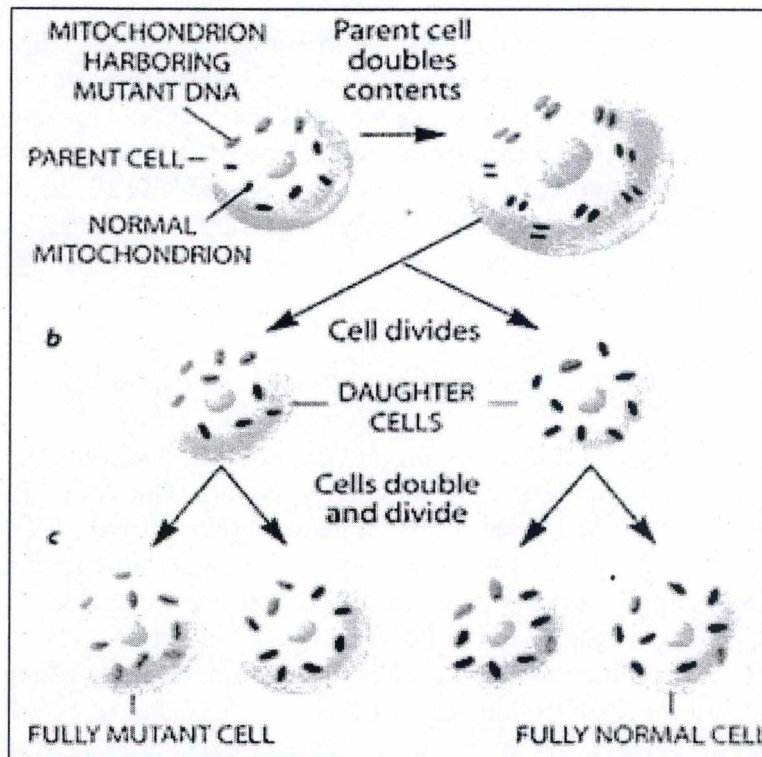


Figure 1.9 : La ségrégation rélicative. L'ADNmt est soumis à un haut taux de mutations de par la faible efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN dans la mitochondrie, la proximité de la chaîne de transporteurs d'électrons, principale source mitochondriale de la production de ROS et la structure de l'ADNmt dépourvue de nucléosome. Lorsqu'une mutation survient, la cellule contient une population hétérogène de mitochondries (avec et sans mutation), état connu sous le nom d'hétéroplasmie. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, les mitochondries sont distribuées aléatoirement entre les cellules filles de telle sorte qu'après plusieurs générations, le génotype mitochondrial de la cellule peut être de façon prédominante « mutant » ou « sauvage » (homoplasmie) ou présenter un mélange des deux génotypes au pourcentages variables (d'après Wallace et al. 2001).

Leigh, est causée par la mutation T8993G dans le gène mitochondrial codant pour la sous-unité 6 de l'ATP synthase mitochondriale. Cette mutation est toujours hétéroplasmique mais, lorsqu'elle est présente dans l'ADN_{mt} de la cellule à un pourcentage inférieur à 75 %, les symptômes sont, entre autres, une ataxie et une rétinite pigmentaire (NARP : Neuropathy, Ataxia, Retinis Pigmentosa) alors qu'à un pourcentage supérieur à 95 %, le patient atteint présentera le syndrome de Leigh, souvent léthal, caractérisé par une ataxie, une hypotonie, un retard du développement, une atrophie de l'œil ainsi qu'une paralysie des muscles extra-oculaires (Rozwodowska et al., 2000; Wallace, 1999).

En plus des mutations dans le génome mitochondrial qui surviennent dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, de nombreuses pathologies peuvent résulter de mutations dans les gènes mitochondriaux codant différents ARN_t de l'organite. Le syndrome MERRF, causé par des mutations (A8344G, T8356C ou G8363A) dans le gène codant pour l'ARN_t^{lys} (DiMauro, 2004) entraîne une perturbation de la synthèse protéique mitochondriale suite à la terminaison prématurée de la traduction des protéines aux codons correspondant à la lysine (Enriquez et al., 1995). Les patients atteints de ce syndrome présentent différents symptômes tels que des épilepsies myocloniques, une ataxie cérébelleuse et, comme la plupart des pathologies mitochondriales résultant d'un dysfonctionnement de la synthèse protéique, une myopathie visible dans les cellules musculaires squelettiques sous la forme de fibres rouges à l'aspect déchirés due à la prolifération et à l'accumulation de mitochondries sous le sarcolemme (Wallace, 1999). Outre le syndrome MERRF, d'autres syndromes peuvent être la conséquence d'une mutation dans un ARN_t mitochondrial tel que le syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) dû à des mutations dans le gène de l'ARN_t^{Leu} mitochondrial (A3243G) et qui se manifeste, entre autres, par des migraines, des nausées, une hyperlactacidémie ainsi que des troubles métaboliques tels que le diabète de type II (Wallace, 1999).

Les dysfonctionnements de la mitochondrie sont également suspectés jouer un rôle dans les maladies neuro-dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Wallace, 1999) et la maladie de Parkinson (Parker et al., 1998). Des lignées de cellules neuronales déplétées en ADN_{mt} ont d'ailleurs été sélectionnées afin d'étudier plus en détails les mécanismes cellulaires qui pourraient aboutir à l'apparition de ce type de maladies (Miller et al., 1996).

1.4. Les modèles d'étude cellulaire des pathologies mitochondriales

Afin d'étudier les maladies mitochondriales et les réponses de la cellule à un dysfonctionnement mitochondrial causé par des mutations et/ou des réarrangements dans l'ADN_{mt}, différentes lignées cellulaires, partiellement ou totalement déplétées en ADN_{mt} ou encore affectées par différentes mutations connues pour engendrer des maladies mitochondriales chez l'homme et l'animal, ont été générées (Miceli et al., 2005; Miller et al., 1996; Park et al., 2001; Tsuruzoe et al., 1998).

1.4.1. Obtention de lignées cellulaires partiellement ou totalement déplétées en ADN_{mt}.

L'obtention de cellules partiellement ou totalement déplétées en ADN_{mt} est réalisée par une mise en culture prolongée de cellules transformées possédant un haut pouvoir glycolytique en présence de faibles concentrations en bromure d'éthidium (ou 2,7-diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridinium-bromide), une molécule aromatique capable de s'insérer dans

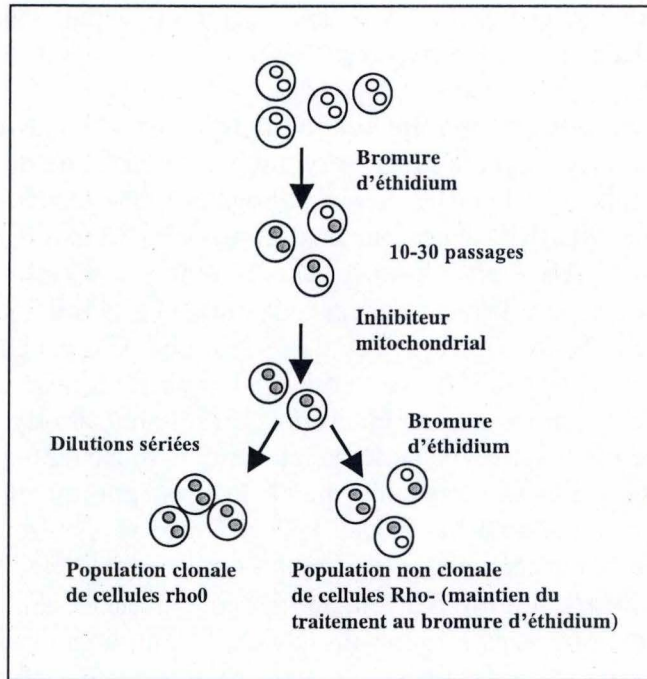


Figure 1.10 : Obtention de lignées clonales ou non de cellules déplétées en ADNmt. Les cellules déplétées en ADNmt par un traitement au bromure d'éthidium et ayant subi un « shift glycolytique » sont s lectionn es en présence d'inhibiteur de l'activité mitochondriale. L'obtention de lignées clonales de cellules rho0 est r alis e par des dilutions s riees et contr l e par PCR ou analyse de l'expression et/ou de l'activité d'enzymes cod es par le génome mitochondrial.

l'ADN et l'ARN double brins (Nass, 1970). Cette molécule est cependant capable, à faible concentration, d'inhiber la réplication et la transcription de l'ADN_{mt}, par son action inhibitrice sur l'hélicase et la polymérase γ (Leibowitz, 1971). Après 30 à 50 passages, les cellules sont sélectionnées pour leur capacité à produire de l'ATP en absence de mitochondries fonctionnelles (ayant subi un « shift glycolytique ») à l'aide d'inhibiteurs métaboliques de la chaîne de transporteurs des électrons tel que l'antimycine A (inhibiteur du complexe III) ou l'oligomycine (inhibiteur du complexe F₀ de la F₀F₁-ATPase ou complexe V). Après cette sélection, il est possible d'obtenir des populations clonales (rho⁰) ou non (rho⁻) de cellules déplétées en ADN_{mt}. Les cellules rho⁻, dont le contenu en ADN_{mt} varie, issues de populations non clonales doivent être continuellement traitées avec de faibles concentrations en bromure d'éthidium afin d'éviter le repeuplement des cellules par de l'ADN_{mt} et donc une réversion du phénotype. Les cellules rho⁰ sont des cellules totalement déplétées en ADN_{mt} issues de populations clonales obtenues par dilutions sériées et ne nécessitent plus d'être incubées en présence de bromure d'éthidium (Figure 1.10). L'absence de molécule d'ADN_{mt} est vérifiée en réalisant une PCR (Polymerase Chain Reaction) en présence d'amorces choisies pour s'hybrider spécifiquement à des séquences de l'ADN_{mt} ou encore en caractérisant le niveau d'expression de protéines mitochondriales codées par des gènes mitochondriaux comme la sous-unité I de la cytochrome oxydase (Arnould et al., 2002).

1.4.2. Les cellules cybrides

Afin d'étudier les pathologies mitochondriales causées par des mutations ou des réarrangements de l'ADN_{mt}, on peut générer, par fusion au polyéthylène glycol de cellules rho⁰ et de cellules énucléées de patients atteints de la pathologie, des cellules cybrides (ou cellules hybrides cytoplasmiques) repeuplées en mitochondries dont l'ADN présente la mutation ou le réarrangement d'intérêt responsable du syndrome (Laderman et al., 1996). Ces cellules sont d'une grande utilité pour l'étude de la réponse cellulaire à un dysfonctionnement mitochondrial.

1.4.3. Biologie des cellules rho⁰

D'un point de vue morphologique, les cellules déplétées en ADN_{mt} présentent une fragmentation du réseau mitochondrial laissant apparaître des mitochondries plus individualisées que dans les cellules rho⁺ et possédant un nombre moins important de crêtes mitochondriales (Gilkerson et al., 2000). Ces cellules sont auxotrophes pour l'uridine car l'activité de la dihydroorotate déshydrogénase, une enzyme de la membrane mitochondriale interne intervenant dans la synthèse des bases pyrimidiques, nécessite une chaîne de transporteurs d'électrons fonctionnelle (Morais, 1996). Les cellules déplétées en ADN_{mt} présentent également une prolifération plus lente que les lignées parentales, due à un allongement du cycle cellulaire, qui est probablement causé par la diminution de l'énergie disponible et à l'activation de l'expression de p21, un inhibiteur de CDKs (Cyclin-Dependent Kinase) (Xiong et al., 1993). Il a en effet été montré au laboratoire que l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre dans les cellules déplétées en ADN_{mt} entraînait l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP-Responsive Element Binding protein) qui, en modulant l'activité du facteur de transcription p53, contrôle l'expression de cet inhibiteur des CDKs (Arnould et al., 2002; Miceli et al., 2005). Ce point sera abordé plus en détails au chapitre traitant de la « communication rétrograde » qui étudie les voies de signalisation conduisant à la modification de l'expression de gènes nucléaires en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial (voir point 1.5).

1.4.3.1. Le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

De manière surprenante, malgré la disruption de la chaîne de transporteurs des électrons, les mitochondries déplétées en ADN_{mt} maintiennent un potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$), certes inférieur à celui des mitochondries couplées (- 60 à - 120 mV contre - 180 à - 220 mV), mais suffisant pour permettre une importation des protéines mitochondriales traduites dans le cytosol (Buchet et al., 1998). La chaîne de transporteurs d'électrons n'étant plus fonctionnelle dans les cellules rho⁰, différentes hypothèses ont été émises afin d'expliquer l'apparition d'un potentiel électrochimique dans ces cellules. Buchet et ses collègues ont montré que les cellules 143B rho⁰ dépourvues des sous-unités 6 et 8 de la F₀F₁-ATPase, contiennent une F₁-ATPase dissociée et active qui est essentielle à leur croissance (Buchet et al., 1998). Dans ces cellules rho⁰, l'ANT fonctionne en sens inverse, échangeant l'ATP⁴⁻ produit lors de la glycolyse contre l'ADP³⁻ provenant de l'hydrolyse de l'ATP⁴⁻ glycolytique par la F₁-ATPase présente dans la membrane mitochondriale interne qui, lorsqu'elle est dissociée de F₀, fonctionne selon un mode ATPasique. Cette hydrolyse permet de renouveler le stock d'ADP nécessaire à l'échange ADP/ATP assuré par l'ANT. Cet échange d'une molécule chargée trois fois négativement contre une molécule chargée quatre fois négativement contribue au maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Ce potentiel ne peut cependant pas être complètement expliqué par l'inversion de l'activité de l'ANT (Appleby et al., 1999). Des études menées au laboratoire ont permis de proposer un nouveau mécanisme de maintien de ce potentiel qui impliquerait un canal à chlore mitochondrial. En effet, Arnould et son équipe ont mis en évidence que le gène mtCLIC (mitochondrial Chloride Intracellular Channel) codant pour un canal à Cl⁻ intracellulaire localisé dans la MMI est surexprimé dans les cellules L929 rho⁻ (cellules de fibrosarcome murin) par rapport aux cellules parentales (Arnould et al., 2003). Cette surexpression est sous le contrôle du facteur de transcription p53 (Fernandez-Salas et al., 1999). De plus, Arnould et son équipe ont pu montrer que CLIC4, un orthologue humain de mtCLIC voit également son expression augmenter dans les cellules 143B rho⁰ et dans les cybrides MERRF présentant une mutation A8344G affectant l'ARN_t^{lys} mitochondrial (Arnould et al., 2003). Leurs observations sur des tests fonctionnels montrent que les ions Cl⁻ sont plus abondamment et plus rapidement importés dans les mitochondries des cellules rho⁰. Ce transport d'ions pourrait contribuer au maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial.

1.4.3.2. L'homéostasie du Ca⁺⁺ et des ROS

Plusieurs études mentionnent une modification de l'homéostasie du Ca⁺⁺ dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. Ainsi, Arnould et son équipe ont constaté une augmentation de la concentration en calcium libre cytosolique dans des cellules de fibrosarcome murin L929 rho⁻ et l'équipe de Amuthan a constaté une telle augmentation dans des cellules A549 de carcinome de poumon déplétées en ADN_{mt} (Amuthan et al., 2002; Arnould et al., 2002). Dans ces cellules A549, l'augmentation de la concentration en calcium libre cytosolique pourrait résulter de la sur-expression du canal RyR1, un canal au calcium exprimé spécifiquement dans les cellules musculaires lisses. De façon contradictoire, l'équipe de Sherer a montré que dans les cellules SH-SY5Y dérivées d'un neuroblastome, la déplétion de l'ADN_{mt} entraînait une légère diminution de la concentration en calcium libre dans le cytosol (Sherer et al., 2000).

L'âge et les dysfonctionnements de la mitochondrie qui en résultent suite à l'accumulation de mutations dans le génome mitochondrial peuvent entraîner une production plus importante de ROS (Kujoth et al., 2005; Vergani et al., 2004). La question se pose alors de savoir si les

cellules rho⁰ peuvent encore générer des ROS et si ces cellules nécessitent des défenses antioxydantes aussi efficaces que les lignées parentales dont elles dérivent. Vergani et son équipe ont étudié l'abondance et l'activité de différentes molécules et enzymes antioxydantes dans des lignées cellulaires provenant de différents tissus. Ils ont montré que dans trois lignées cellulaires déplétées en ADN_{mt} : 143B rho⁰ (os), RD rho⁰ (muscle) et A549 rho⁰ (poumon), les concentrations en glutathion réduit (GSH) et e, sa forme oxydée (GSSG), étaient plus faibles dans les cellules rho⁰ que dans les lignées parentales (Vergani et al., 2004). Ils ont également montré une diminution de l'activité et de l'expression de la SOD1 cytosolique (Cu/ZnSOD) et de la SOD2 mitochondriale (MnSOD) dans les cellules rho⁰. Des études portant sur la contribution des deux superoxyde dismutases dans les cellules 143B et RD rho⁰ ont montré que la Cu/ZnSOD était sous-exprimée dans les cellules 143B rho⁰ alors que l'expression de la MnSOD diminuait dans les cellules RD rho⁰. Ces données suggèrent que les cellules peuvent répondre de manière différente à une déplétion en ADN_{mt} en fonction du tissu dont elles proviennent. L'équipe de Park a également montré que dans les cellules SK-Hep1 dérivées d'un hépatome, l'établissement d'une lignée déplétée en ADN_{mt} engendrait une augmentation transitoire de la concentration en O[•] mais que celle-ci redevenait normale après établissement de la lignée rho⁰ (Park et al., 2004). Il apparaît donc que la concentration en ROS dans les cellules rho⁰ est, d'une part, dépendante de l'augmentation de leur production et, d'autre part, de la modification de l'abondance et de l'activité des mécanismes de défenses. Dans les cellules 143B rho⁰ que nous avons étudiées dans ce travail, la concentration en ROS est décrite comme augmentée (Vergani et al., 2004).

Les modifications de l'expression des gènes constatées dans les différentes études mentionnées ci-dessus sont probablement le résultat d'une communication entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. Ces voies de signalisation permettent à la cellule de s'adapter aux différentes perturbations qu'entraînent, en conditions pathologiques, la déplétion partielle ou totale de l'ADN_{mt}, des mutations ponctuelles ou des réarrangements dans le génome mitochondrial qui modifient le fonctionnement de la mitochondrie.

1.5. La communication mitochondrie-noyau ou « communication rétrograde »

La communication rétrograde a d'abord été étudiée chez les organismes *Neurospora crassa* et *Tetrahymena* cultivés en présence d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction mitochondriale (Poyton et al., 1996). Lors de ces études, les auteurs ont constaté que l'inhibition de la synthèse protéique mitochondriale entraînait une augmentation de l'expression de protéines mitochondriales codées par des gènes nucléaires telles que les ADN et ARN polymérase mitochondriales (Poyton et al., 1996). Parmi les gènes surexprimés dans les cellules de levure présentant un dysfonctionnement mitochondrial, l'étude de la régulation de l'expression du gène *CIT2*, qui code pour la citrate synthase peroxisomale, a permis d'identifier les produits des gènes *RTG1*, *RTG2* et *RTG3* comme étant impliqués dans la communication rétrograde mitochondriale (Butow et al., 2004; Poyton et al., 1996). La protéine Rtg1p est un facteur de transcription de la famille des bHLH (basic Helix-Loop-Helix) capable d'hétérodimérisation avec la protéine Rtg3p. La perception du dysfonctionnement mitochondrial pourrait se faire notamment grâce à la diminution de la concentration en glutamate, métabolisé dans le cycle de Krebs, qui découle de l'état non fonctionnel de celui-ci. Lors de l'activation de la voie de communication rétrograde, la protéine Rtg2p, qui possède un domaine de liaison à l'ATP à son extrémité N-terminale, va s'associer et déphosphoryler en partie la protéine inhibitrice Mks1p. Cette inactivation de Mks1p permet alors la déphosphorylation partielle de Rtg3p qui est associée à Rtg1p et forme

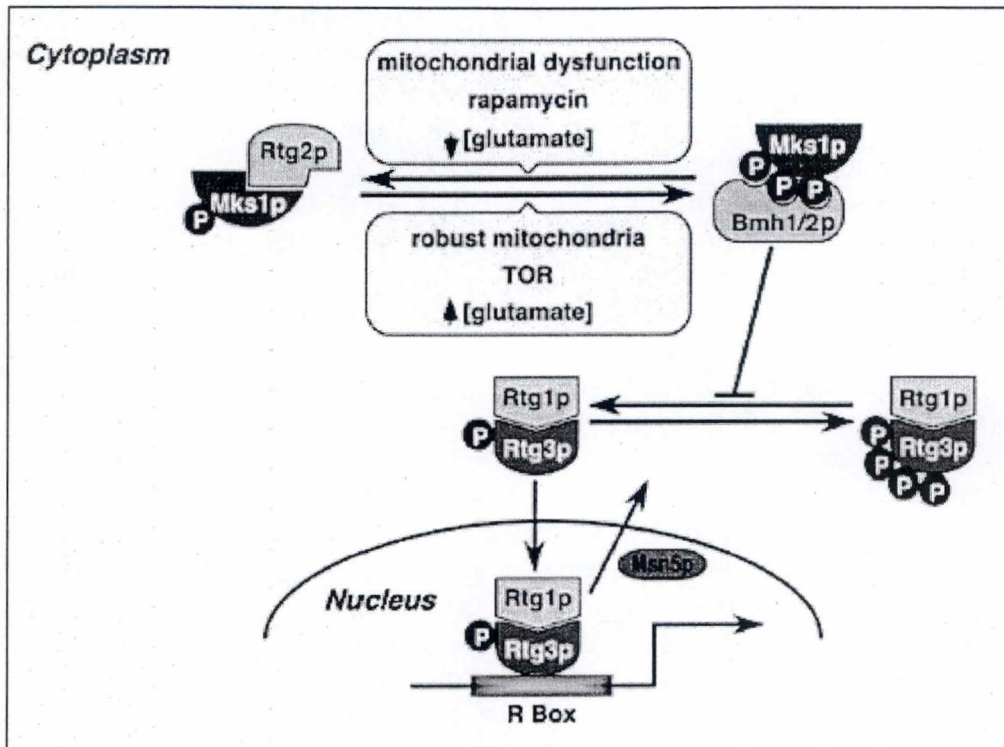


Figure 1. 11 : Activation de la voie de communication rétrograde chez la levure. Lors d'un dysfonctionnement mitochondrial, la concentration en glutamate diminue en raison du cycle de Krebs qui n'est plus fonctionnel. Cette diminution de la concentration en glutamate entraîne l'activation de Rtg2p qui va lier Mks1p et la déphosphoryler partiellement. Cela va permettre une déphosphorylation partielle de Rtg3p qui ne sera dès lors plus séquestrée dans le cytoplasme et pourra transloquer dans le noyau pour y jouer son rôle de régulateur de la transcription avec Rtg1p (*d'après Liu et al. 2003*).

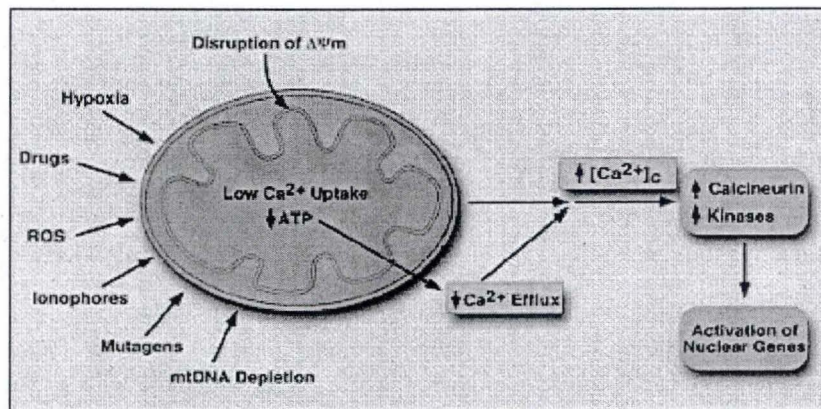


Figure 1. 12 : La communication rétrograde induite par un dysfonctionnement mitochondrial. La diminution du $\Delta\Psi_m$ et de la production d'ATP induite par différents stimuli affectant l'activité bioénergétique de la mitochondrie va conduire à une augmentation de la concentration calcique cytosolique. Le Ca^{++} va jouer le rôle de messager secondaire et activer divers facteurs de transcription permettant des changements/modifications de l'expression génique (*d'après Butow et al. 2004*).

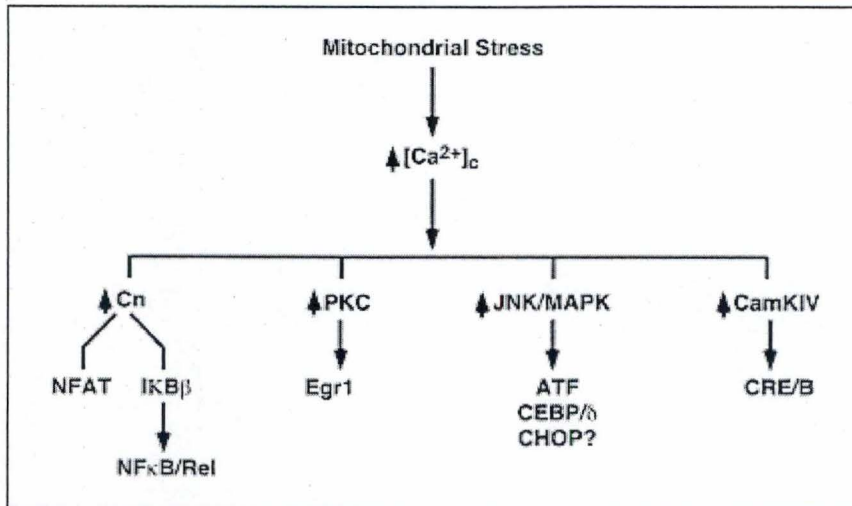


Figure 1. 13 : Activation de différents facteurs nucléaires et cytoplasmiques régulateurs de la transcription par un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à une communication rétrograde mitochondrie-noyau. L'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{++} permet d'activer différentes phosphatase (Cn) et kinases (PKC, MAPK, CamKIV) qui activent à leur tour différents facteurs de transcription (d'après Butow et al. 2004).

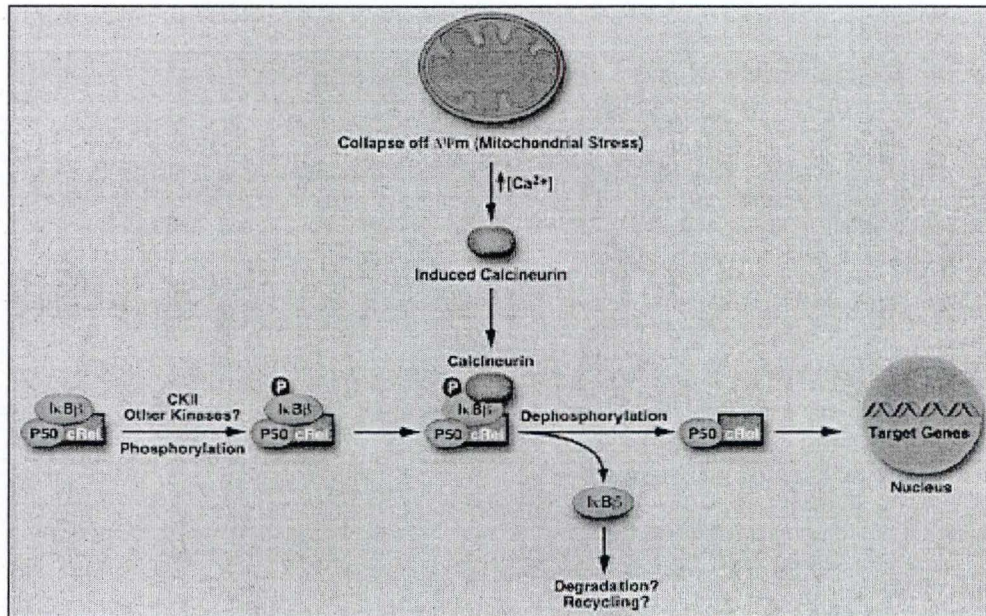


Figure 1. 14 : Activation du facteur NF κ B induite par un dysfonctionnement mitochondrial. L'inhibiteur I κ B est inactivé suite à l'augmentation de la concentration calcique cytosolique. NF κ B peut alors transloquer dans le noyau et y jouer son rôle de régulateur de la transcription (d'après Butow et al. 2004).

un dimère séquestré dans le cytosol lorsque Rtg3p est hyperphosphorylée. L'hétérodimère Rtg1p/Rtg3p transloque alors dans le noyau et active la transcription des gènes cibles (Figure 1.11)(Liu et al., 2003).

Dans les cellules eucaryotes de mammifères, les voies de communication rétrograde sont souvent initiées par une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{++} . En effet, un dysfonctionnement mitochondrial induit, par exemple, par des molécules découplantes telles que le FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluorométhyl)phénylhydrazone) ou le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone), ou encore par des déplétions/mutations dans l'ADN_{mt}, conduit à une diminution du $\Delta\psi_m$ et donc à une diminution de l'import de Ca^{++} dans la matrice mitochondriale. De plus, l'efflux de calcium dans le milieu extracellulaire est également diminué en raison de la diminution de la concentration en ATP qui perturbe l'activité des pompes au Ca^{++} dépendantes de l'ATP (Ca^{++} -ATPase). Ceci conduit à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre (Amuthan et al., 2002; Biswas et al., 1999)(Figure 1.12). Le Ca^{++} libre jouera alors le rôle de messenger secondaire en activant des phosphatases dépendantes du calcium telles que la calcineurine (Cn) et des kinases dépendantes du calcium telles que les protéines kinase C (PKCs), les JNK/MAPK ou encore la calmoduline kinase IV (CaMKIV) (Amuthan et al., 2002; Arnould et al., 2002)(Figure 1.13). Ces kinases et phosphatases régulent à leur tour l'activité de facteurs de transcription tels que CREB et NF κ B (Nuclear Factor κ B) (Butow et al., 2004).

Parmi ces différentes voies, la voie conduisant à l'activation de CREB a été mise en évidence au laboratoire (Arnould et al., 2002). Il a été mis en évidence que de nombreux gènes dont l'expression était modifiée par un dysfonctionnement mitochondrial possédaient des séquences CRE (cAMP Responsive-Element) dans leur promoteur. L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique induite par un dysfonctionnement mitochondrial conduit à l'activation de la calcium/calmoduline kinase IV en induisant une diminution de l'interaction de la kinase avec la phosphatase 2A (PP2A) régulatrice qui inhibe son activité par déphosphorylation (Anderson et al., 2004). La CaMKIV activera alors, par phosphorylation de la Ser 133, la protéine CREB, lui permettant d'interagir dans le noyau avec le co-activateur CBP/P300 et de jouer son rôle de facteur de transcription. CREB phosphorylé pourrait également interagir avec p53, modifiant son activité transcriptionnelle, ce qui entraînera une augmentation de l'expression de p21^{waf/cip1}, un inhibiteur des CDKs et donc du cycle cellulaire (Arnould et al., 2002). L'activation du facteur de transcription NF κ B en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial serait le résultat d'une déphosphorylation de son inhibiteur I κ B β par la calcineurine permettant la révélation des sites NLS (Nuclear Localisation Sequence) cryptiques entraînant sa translocation dans le noyau (Butow et al., 2004)(Figure 1.14). Rappelons que de nombreuses études montrent également que l'augmentation de la production de ROS en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial est également capable d'activer ce facteur (Poyton et al., 1996).

On peut citer comme exemples de modifications d'expression de gènes liées à la communication rétrograde mitochondriale que des gènes codant pour comme la PCK2 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2) et la GCK (glucokinase), des protéines de la glycolyse, sont surexprimés dans les cellules 143B rho⁰, ARPE19 rho⁰ (épithélium rétinien) et des fibroblastes cybrides GMO6225 repeuplés avec des mitochondries de patients atteints syndrome de Kearns-Sayre (Miceli et al., 2005).

En raison du rôle essentiel de la mitochondrie et des implications multiples des ROS et du calcium dans la mort cellulaire par apoptose, il est intéressant d'utiliser les cellules rho⁰

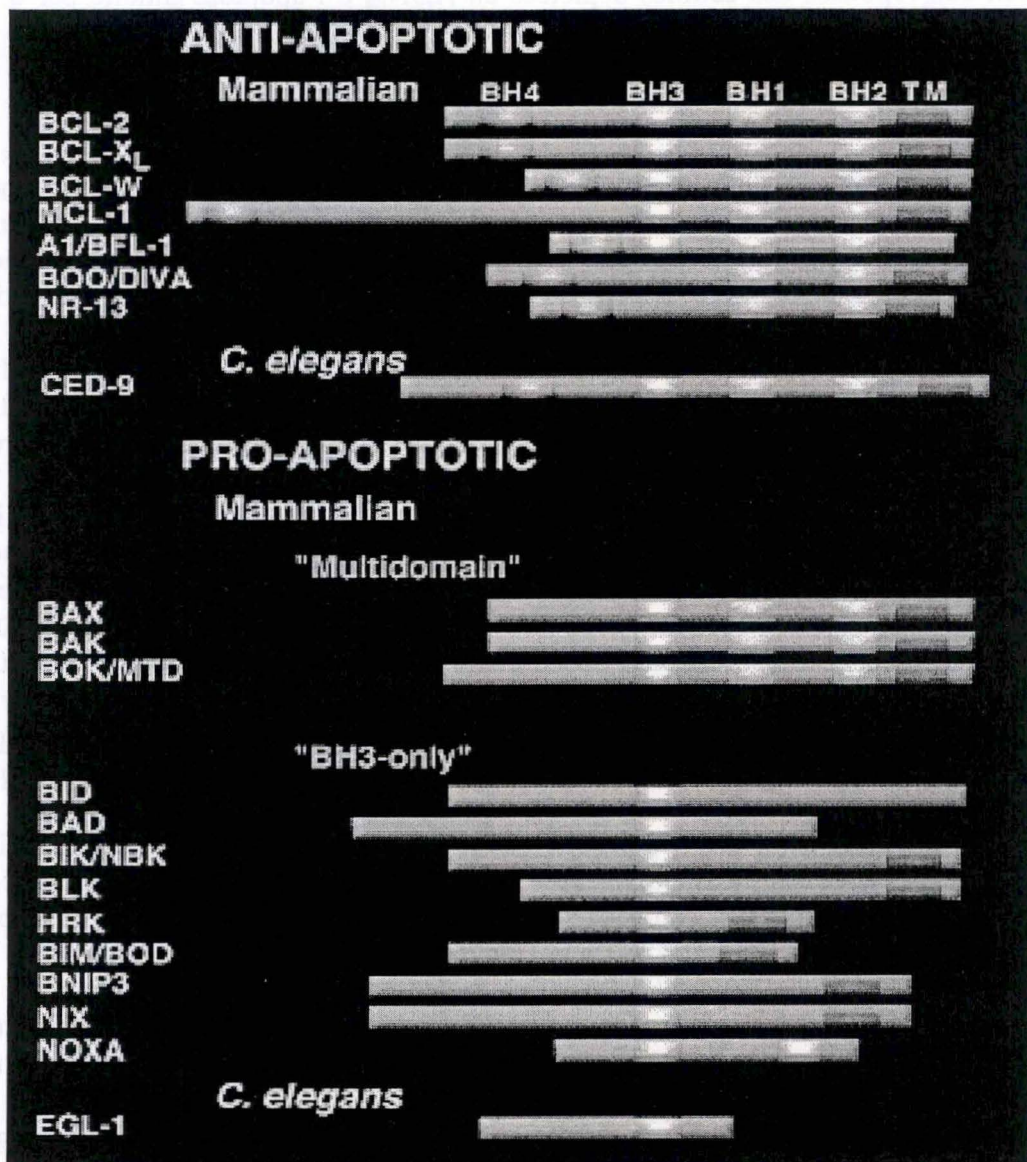


Figure 1. 16 : Schéma représentant les membres principaux de la famille Bcl-2 et une illustration de leurs domaines d'homologie à Bcl-2 (BH : Bcl-2 Homology domain) (d'après Scorrano et al. 2003).

un dimère séquestré dans le cytosol lorsque Rtg3p est hyperphosphorylée. L'hétérodimère Rtg1p/Rtg3p transloque alors dans le noyau et active la transcription des gènes cibles (Figure 1.11)(Liu et al., 2003).

Dans les cellules eucaryotes de mammifères, les voies de communication rétrograde sont souvent initiées par une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{++} . En effet, un dysfonctionnement mitochondrial induit, par exemple, par des molécules découplantes telles que le FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluorométhyl)phénylhydrazone) ou le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone), ou encore par des déplétions/mutations dans l'ADN_{mt}, conduit à une diminution du $\Delta\psi_m$ et donc à une diminution de l'import de Ca^{++} dans la matrice mitochondriale. De plus, l'efflux de calcium dans le milieu extracellulaire est également diminué en raison de la diminution de la concentration en ATP qui perturbe l'activité des pompes au Ca^{++} dépendantes de l'ATP (Ca^{++} -ATPase). Ceci conduit à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre (Amuthan et al., 2002; Biswas et al., 1999)(Figure 1.12). Le Ca^{++} libre jouera alors le rôle de messenger secondaire en activant des phosphatases dépendantes du calcium telles que la calcineurine (Cn) et des kinases dépendantes du calcium telles que les protéines kinase C (PKCs), les JNK/MAPK ou encore la calmoduline kinase IV (CaMKIV) (Amuthan et al., 2002; Arnould et al., 2002)(Figure 1.13). Ces kinases et phosphatases régulent à leur tour l'activité de facteurs de transcription tels que CREB et NF κ B (Nuclear Factor κ B) (Butow et al., 2004).

Parmi ces différentes voies, la voie conduisant à l'activation de CREB a été mise en évidence au laboratoire (Arnould et al., 2002). Il a été mis en évidence que de nombreux gènes dont l'expression était modifiée par un dysfonctionnement mitochondrial possédaient des séquences CRE (cAMP Responsive-Element) dans leur promoteur. L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique induite par un dysfonctionnement mitochondrial conduit à l'activation de la calcium/calmoduline kinase IV en induisant une diminution de l'interaction de la kinase avec la phosphatase 2A (PP2A) régulatrice qui inhibe son activité par déphosphorylation (Anderson et al., 2004). La CaMKIV activera alors, par phosphorylation de la Ser 133, la protéine CREB, lui permettant d'interagir dans le noyau avec le co-activateur CBP/P300 et de jouer son rôle de facteur de transcription. CREB phosphorylé pourrait également interagir avec p53, modifiant son activité transcriptionnelle, ce qui entraînera une augmentation de l'expression de p21^{waf/cip1}, un inhibiteur des CDKs et donc du cycle cellulaire (Arnould et al., 2002). L'activation du facteur de transcription NF κ B en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial serait le résultat d'une déphosphorylation de son inhibiteur I κ B β par la calcineurine permettant la révélation des sites NLS (Nuclear Localisation Sequence) cryptiques entraînant sa translocation dans le noyau (Butow et al., 2004)(Figure 1.14). Rappelons que de nombreuses études montrent également que l'augmentation de la production de ROS en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial est également capable d'activer ce facteur (Poyton et al., 1996).

On peut citer comme exemples de modifications d'expression de gènes liées à la communication rétrograde mitochondriale que des gènes codant pour comme la PCK2 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2) et la GCK (glucokinase), des protéines de la glycolyse, sont surexprimés dans les cellules 143B rho⁰, ARPE19 rho⁰ (épithélium rétinien) et des fibroblastes cybrides GMO6225 repeuplés avec des mitochondries de patients atteints syndrome de Kearns-Sayre (Miceli et al., 2005).

En raison du rôle essentiel de la mitochondrie et des implications multiples des ROS et du calcium dans la mort cellulaire par apoptose, il est intéressant d'utiliser les cellules rho⁰

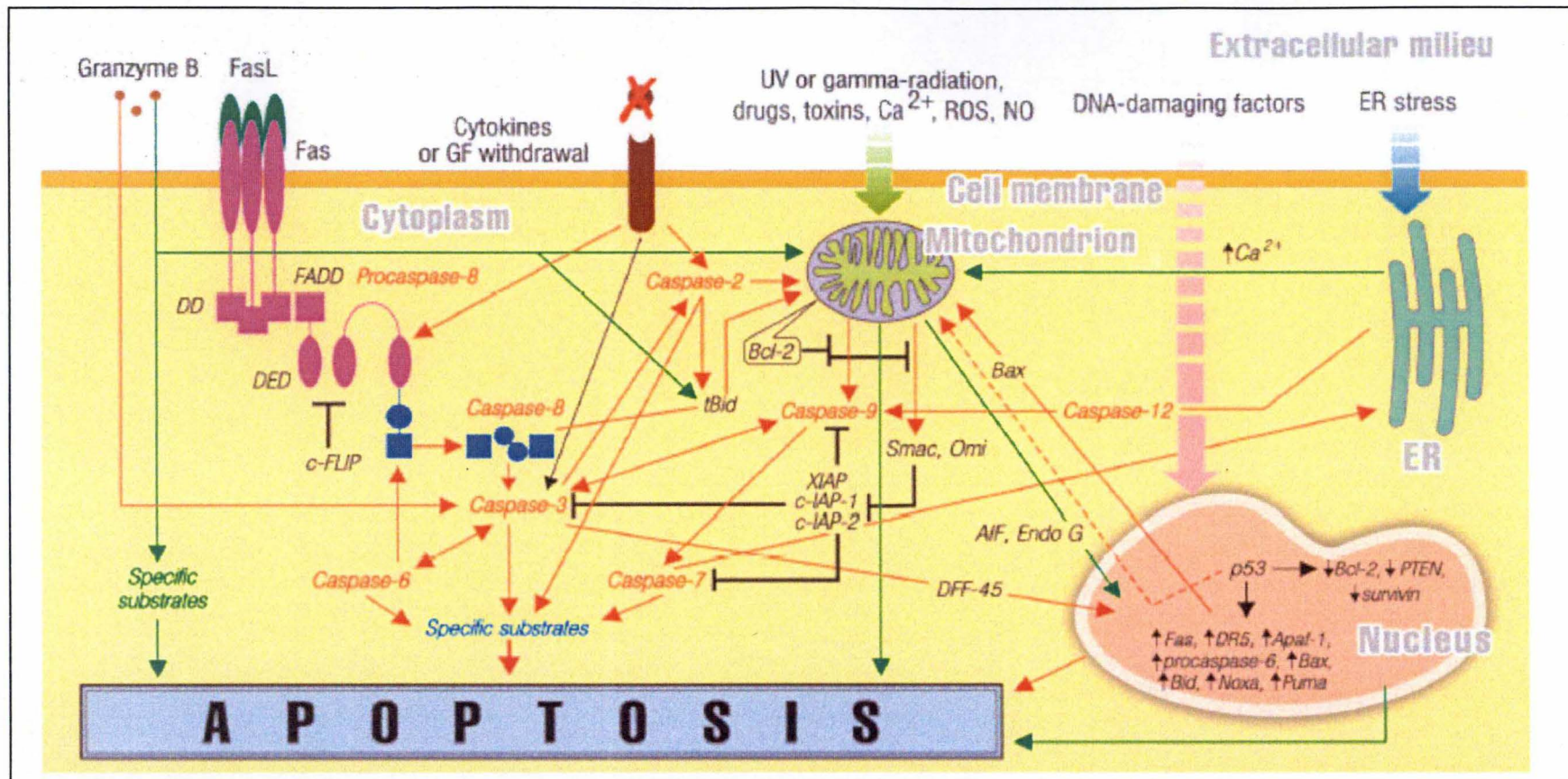


Figure 1. 15 : Schéma général reprenant les principaux effecteurs et régulateurs de l'apoptose dépendante des caspases (en rouge) et indépendante des caspases (en vert). L'apoptose peut être induite par différents stimuli tels que la liaison de ligands aux récepteurs de mort, la perturbation du fonctionnement mitochondrial ou des autres organites suite à l'action de certaines molécules, des U.V. et autres facteurs de stress comme les ROS, l'altération de l'ADN nucléaire, Ces stimuli vont conduire à l'activation des caspases, les enzymes clef de l'apoptose soit directement par les récepteurs à domaine de mort (voie extrinsèque) soit après la libération du cytochrome c dans le cytosol suite à la débalance de l'action des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (voie intrinsèque). D'autres protéines comme des endonucléases qui vont cliver l'ADN ou des inhibiteurs des IAP (Smac/Diablo) peuvent également être relargués par la mitochondrie en même temps que le cytochrome c. Ces dernières vont faciliter l'activation des caspases en levant l'inhibition imposée par les IAP (d'après Philchenkov 2004).

comme modèle de recherche sur la mort cellulaire programmée. Le but de notre travail étant de comparer la sensibilité des cellules 143B et 143B rho⁰ à l'induction de l'apoptose par la staurosporine, nous allons maintenant introduire l'apoptose et faire une revue de la littérature ayant trait aux réponses des cellules déplétées en ADN_{mt} à l'apoptose induite par différents stimuli.

1.6. L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme physiologique dépendant de l'ATP qui joue un rôle essentiel dans le développement et l'homéostasie tissulaire. Les cellules en apoptose présentent quelques caractéristiques morphologiques et physiologiques typiques : la cellule s'arrondit, se détache du substrat, se fragmente en « corps apoptotiques », la phosphatidylsérine présente dans le feuillet interne de la membrane migre dans le feuillet externe par un mécanisme de « flip-flop » signalant ainsi l'état apoptotique de la cellule aux cellules phagocytaires, la chromatine se condense avant que l'ADN ne se fragmente suite à un clivage internucléosomique. Cette fragmentation de l'ADN est une étape tardive du processus apoptotique qui génère des fragments dont la taille est de 180 pb (ou des multiples de 180 pb) et est responsable du profil typique « en échelle » de l'apoptose observé lors de la migration sur gel d'agarose de l'ADN extrait de cellules apoptotiques (Allen et al., 1997; Zimmermann et al., 2001). Contrairement à la nécrose, l'apoptose est une mort régulée de la cellule qui ne conduit pas à la libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire et n'induit donc pas le déclenchement d'une réponse inflammatoire (Philchenkov, 2004). Ce « suicide » cellulaire a été particulièrement bien étudié chez le nématode *Caenorhabditis elegans* qui, au cours de son développement, voit 131 des 1090 cellules le composant mourir par apoptose et ce, de manière reproductible et selon un programme bien défini. Des analyses génétiques ont mis en évidence quatre gènes codant pour des acteurs centraux régulant ce processus : *ced-3* et *ced-4* (pro-apoptotiques), *ced-9* (anti-apoptotique) et *egl-1* codant pour une protéine qui, lorsqu'elle se lie à *ced-9*, favorise l'action de *ced-4* qui pourra ainsi activer *ced-3*. Les orthologues des gènes *ced-3* et *ced-9* chez les mammifères sont respectivement la protéase initialement appelée ICE (Interleukin-1beta-Converting Enzyme), un membre de la famille des caspases (Cysteinyl Aspartate Specific Proteases), et Bcl-2 (Philchenkov, 2004; Zimmermann et al., 2001). *Ced-4* code, quant à lui, pour un orthologue d'Apaf-1 retrouvé chez les mammifères et *egl-1* pour une protéine à domaine BH3 homologue à la protéine Bad.

En réponse à différents stimuli pro-apoptotiques comme les U.V., les radiations gamma, certaines drogues et toxines, la liaison de facteurs tels que le TNF α à son récepteur ou encore des dommages à l'ADN, différentes voies de signalisation peuvent conduire à l'apoptose (Figure 1.15). On distingue deux grandes voies conduisant à l'apoptose. La première est la voie extrinsèque médiée par des récepteurs à domaine de mort (Death Domain) et la seconde la voie intrinsèque médiée par la mitochondrie. Ces voies passent par un mécanisme commun de mise à mort : l'activation des caspases.

Avant de présenter la mécanistique des réponses apoptotiques, nous allons décrire brièvement les principaux acteurs impliqués dans ces réponses.

1.6.1. Les membres de la famille Bcl-2

La protéine Bcl-2 (B-Cell Lymphoma) fut identifiée pour la première fois comme le produit d'un proto-oncogène dans des lymphocytes B folliculaires. Elle fut ensuite décrite comme une protéine mammalienne orthologue du répresseur d'apoptose *ced-9* de *C. elegans*. Au moins

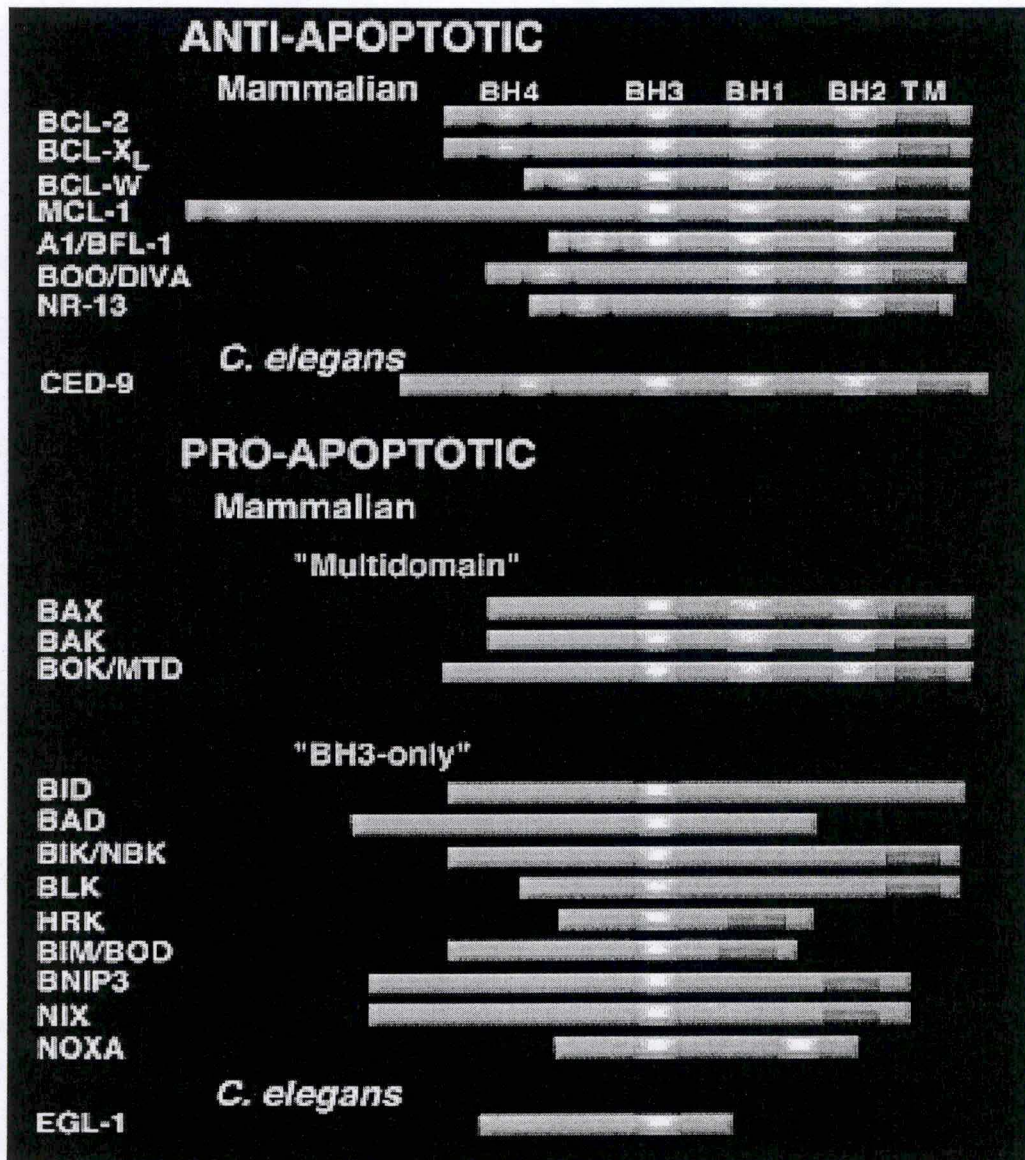


Figure 1. 16 : Schéma représentant les membres principaux de la famille Bcl-2 et une illustration de leurs domaines d'homologie à Bcl-2 (BH : Bcl-2 Homology domain) (d'après Scorrano et al. 2003).

19 membres de la famille Bcl-2 ont maintenant été identifiés chez les mammifères. Tous possèdent au moins un des quatre domaines homologues à Bcl-2 (BH1 à BH4) (Scorrano et al., 2003). Les membres de la famille Bcl-2 peuvent être regroupés en 3 catégories fonctionnelles (Figure 1.16) :

1.6.1.1. Les protéines pro-apoptotiques : « Bax-like »

Ce groupe comprend les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Bok/Mtd et Bcl-X_S qui partagent des homologies de séquence avec les domaines BH1, BH2 et BH3 (permettant l'interaction avec les protéines « Bcl-2-like ») mais ne possèdent pas de domaine BH4. Citons par exemple les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bax qui forment, comme pour Bcl-2, une poche hydrophobe dans laquelle se replie le domaine d'insertion en membrane lorsque la protéine est inactive. Lors de son activation, Bax dont la localisation est cytosolique ou interagissant faiblement avec la membrane mitochondriale externe, subit un changement de conformation exposant alors son domaine hydrophobe lui permettant de s'insérer dans la membrane mitochondriale externe où il pourra exercer son rôle pro-apoptotique suite à son oligomérisation pour former un pore transitoire (Scorrano et al., 2003). Une seconde hypothèse relative à son rôle pro-apoptotique propose que l'interaction de Bax avec VDAC, conduise à la formation et à l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore) permettant la libération des molécules pro-apoptotiques présentes dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Kroemer et al., 2000).

1.6.1.2. Les protéines anti-apoptotiques : « Bcl-2-like »

Ce groupe reprend les protéines Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13 et Boo/Diva. Elles exercent toutes une activité anti-apoptotique et sont capables d'interagir avec les domaines BH d'autres protéines impliquées dans l'apoptose. Elles partagent toutes au moins les domaines BH1 et BH2 bien que les protéines ayant le plus d'homologie avec Bcl-2 possèdent les 4 domaines (Zimmermann et al., 2001). Les domaines BH1, BH2 et BH3 forment une poche hydrophobe stabilisée par le domaine BH4. Cette poche permet l'interaction de ces protéines avec les protéines pro-apoptotiques leur permettant d'inhiber leur action par séquestration. Par exemple, la protéine Bcl-2 peut former un hétérodimère avec les protéines Bax, Bad, Bak ou Bid et inhiber ainsi leur action pro-apoptotique. Citons encore comme exemple la protéine Mcl-1 (Myeloid Cell factor 1) qui ne possède pas de domaine BH4 mais est capable d'interagir avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pour retarder l'induction de l'apoptose. A l'exception d'A1/Bfl-1, les membres de ce groupe possèdent également un domaine hydrophobe d'insertion en membrane leur permettant une localisation dans les membranes mitochondriales externes, nucléaires ou du réticulum endoplasmique (Thomenius et al., 2003).

1.6.1.3. Les protéines « BH3-only »

Le groupe des « BH3-only » comprend les protéines Bid, Bad, Bim, Bik/Nbk, Blk, Hrk, Bnip3, BimL, Puma, Noxa et Nix qui sont, pour la plupart, des inducteurs indirects de l'apoptose. En effet, leur fonction consiste à inhiber des inhibiteurs d'apoptose de la famille « Bcl-2-like » en s'y liant par leur domaine BH3. Bid et Bim seraient de plus capables de se lier et d'activer directement Bax et Bak (Zimmermann et al., 2001) et Bid pourrait également servir de point de liaison entre les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose dont il sera question aux points 1.6.3. et 1.6.4..

Enzyme	Map position of gene	Size of enzyme precursor (kDa)	Prodomain type	Active subunits (kDa)	Adaptor proteins	Caspase-activating complex	Caspase proteolytic specificities
Apoptotic initiator caspases							
Caspase-2	7q34-q35	51	Long, with CARD region	19/12	PIDD, RAIDD, PIDDosome?	PACAP, DEF-CAP	VDVAD ^b
Caspase-8	2q33-q34	55	Long, with two DED-regions	18/11	FADD, DEDAF, ASC	DISC	(L/V/D)E(T/V/T)D ^c
Caspase-9	1p36.1-p36.3	45	Long, with CARD region	17/10	Apaf-1, Nod-1, Apoptosome	PACAP	(L/V/D)EHD
Caspase-10	2q33-q34	55	Long, with two DED-regions	17/12	FADD, DEDAF	DISC	(L/V/L)EXD
Caspase-12 ^d	#9 ^e	50	Long, with CARD region	20/10	TRAF-2		Unknown
Apoptotic effector caspases							
Caspase-3	4q35	32	Short	17/12	NA ^f		DE(V/D)D
Caspase-6	4q25	34	Short	18/11	NA		(T/V/D)E(H/V/D)D
Caspase-7	10q25.1-q25.2	35	Short	20/12	NA		DE(V/D)D
Inflammatory caspases							
Caspase-1	11q22.2-q22.3	45	Long, with CARD region	20/10	ASC, NALP1, CARDIAK, CARD-8, Ipaf, Nod-1	Inflammasome	(W/Y/F)EHD
Caspase-4	11q22.2-q22.3	43	Long, with CARD region	20/10	Unknown		(W/L)EHD
Caspase-5	11q22.2-q22.3	48	Long, with CARD region	20/10	ASC, NALP1	Inflammasome	(W/L/F)EHD
Caspase-11 ^d	#9	42	Long, with CARD region	20/10	Unknown		(V/I/P/L)EHD
Other mammalian caspases							
Caspase-14	19p13.1	30	Short	20/10	NA		
Invertebrate caspases^g							
Ced-3		56	Long, with CARD region	17/14	Ced-4, RAIDD		DEXD
Dep-1 ^h	58E3-59F4	36	Short	22/13	NA		DEVD
Dronc ^h	67C4-67C5	50	Long, with CARD region	20/14	DARK ⁱ		VDVAD

* Adapted from Ref. 3 with modifications.
^b The sequence of amino acid residues is presented in P₄-P₁ direction; the proteolysis occurs after the aspartic acid residue in the P₁ position.
^c In parentheses each amino acid possibility is listed.
^d Detected in murine cells.
^e The *pseudo-caspase-12* gene is localized on human chromosome 11q22.3.
^f NA - not applicable.
^g Only several caspases are given as an example.
^h The *Drosophila* caspases.
ⁱ A *Drosophila* homologue of Apaf-1.

Tableau 1. 3 : Caractéristiques fonctionnelles et structurales des caspases (d'après Philchenkov 2004).

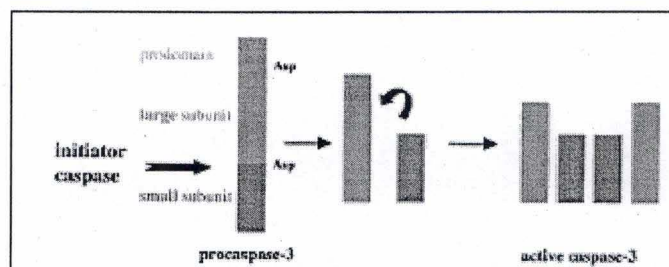


Figure 1. 17 : Mécanisme d'activation des caspases. L'activation des caspases se fait par deux clivages protéolytiques : un entre la petite sous-unité et la grande sous-unité et un autre entre le prodomaine et la grande sous-unité. Ces clivages permettent une hétérotétramérisation de deux petites sous-unités et deux grandes sous-unités donnant la forme active de la caspase (d'après Zimmermann et al. 2004).

Protein	Length of protein (in amino acids)	Molecular weight (kDa)	Domain structures	Caspase specificity	Preferential expression
NAIP (BIRC1)	1403	156	BIR1, BIR2, BIR3, NOD	Caspase-3 and -7	Liver, placenta, spinal cord and brain
c-IAP1 (BIRC2)	604	70	BIR1, BIR2, BIR3, CARD, RING	Caspase-3 and -7	Ubiquitous; with highest levels in thymus, testis and ovary
c-IAP2 (BIRC3)	618	68	BIR1, BIR2, BIR3, CARD, RING	Caspase-3 and -7	Ubiquitous; with highest levels in spleen and thymus
XIAP (BIRC4)	497	57	BIR1, BIR2, BIR3, RING	Caspase-3, -7 and -9	Ubiquitous
Survivin (BIRC5)	142	17	BIR	Caspase-3 and -7	Embryonic tissue, transformed cell lines, and solid tumors
Linin (BIRC7)	298	31	BIR, RING	Caspase-3, -7 and -9	Embryonic tissue, some adult tissues, and malignant cell lines (colon and lung cancer, melanoma)
ILP-2 (BIRC8)	236	25	BIR, RING	Caspase-9	Testis
c-FLIPL (I-FLICE)	480	55	DED, DED, pseudo-caspase domain	Caspase-8 and -10	Muscle, lymphoid tissues and testis; also detectable in melanoma cell lines and malignant melanoma tumors
ARC	338	30	CARD	Caspase-2 and -8	Heart and skeletal muscle
BAR	450	46	RING, SAM, DED	Caspase-8	Brain

Tableau 1.4 : Particularités de quelques inhibiteurs endogènes de caspase (*d'après Philchenkov 2004*).

La régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2 résulte de l'équilibre qu'il y a entre les protéines des groupes pro- et anti-apoptotiques. Les stimuli pro-apoptotiques vont conduire à l'activation des protéines dites « BH3 only » qui vont perturber cet équilibre en dimérisant avec les protéines anti-apoptotiques levant l'inhibition qu'elles imposaient aux membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et entraînant, *in fine*, l'activation des caspases ou effecteurs de la mort cellulaire.

1.6.2. Les caspases et leur(s) substrat(s)

Les caspases (Tableau 1.3) sont synthétisées sous une forme inactive et comportent quatre domaines : un prodomaine NH₂-terminal pouvant être court (20 à 30 acides aminés) pour les caspases effectrices ou long (plus de 90 acides aminés) pour les caspases initiatrices, une grande sous-unité d'un poids moléculaire avoisinant les 20 kDa, une petite sous-unité d'environ 10 kDa et un domaine reliant ces deux sous-unités catalytiques qui n'est pas toujours présent (Philchenkov, 2004). L'activation de ces enzymes se fait par un double clivage protéolytique aboutissant à la séparation des deux sous-unités et à leur hétérotétramérisation (la forme active se compose de deux petites et de deux grandes sous-unités)(Figure 1.17)(Philchenkov, 2004). Les caspases peuvent être classées en deux groupes : les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10 et probablement 11) qui activent les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) par des réactions de protéolyse partielle en cascade. Les caspases initiatrices interagissent avec leurs activateurs respectifs par un domaine d'interaction protéine-protéine DED (Death Effector Domain) pour les caspases 8 et 10 ou CARD (Caspase Recruitment Domain) pour les caspases 1, 2, 4 et 9. Les caspases effectrices, une fois activées, pourront dégrader leur(s) substrat(s) et entraîner les changements morphologiques typiques des cellules en apoptose. Les caspases effectrices peuvent également être activées par différentes protéases autres que les caspases telles que les cathepsines, la calpaïne ou le granzyme B libéré par les acteurs du système immunitaire (Neumar et al., 2003).

Les caspases possèdent une cystéine dans leur site catalytique et reconnaissent, puis clivent leur(s) substrat(s) après un résidu aspartate compris dans des séquences conservées de type « DEVD ». Parmi les substrats des caspases effectrices, on peut citer les caspases elles-mêmes, iCAD/DFF45 un inhibiteur de la DNase DFF40/CAD responsable du clivage internucléosomal de l'ADN, des membres de la famille Bcl-2 tels que Bax, Bcl-2, Bcl-X_L et Bid (Earnshaw et al., 1999; Wolf et al., 1999). Citons encore le clivage de la gelsoline et de la fodrine responsable du détachement de la membrane plasmique du cytosquelette aboutissant à l'arrondissement de la cellule (Kothakota et al., 1997). Un grand nombre de substrats des caspases peuvent donc être clivés, qu'il s'agisse de protéines du cytosquelette, de la membrane plasmique ou de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et la division cellulaire. On peut citer, comme exemple de substrat des caspases impliqué dans la réparation de l'ADN, la protéine PARP (poly(ADP-ribose) polymerase), une enzyme nucléaire possédant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine catalytique et un domaine d'automodification qui est activé lors de dommages à l'ADN. Cette enzyme catalyse la formation de polymères ramifiés d'ADP-riboses sur les protéines interagissant avec l'ADN telles que les histones, le facteur de transcription p53, des topoisomérases et des ARN et ADN polymérases. Cette poly(ADP)-ribosylation diminuerait, par répulsion de charge, l'affinité de ces protéines pour l'ADN, rendant l'accès à l'ADN plus aisé pour les enzymes de réparation (Susse et al., 2004).

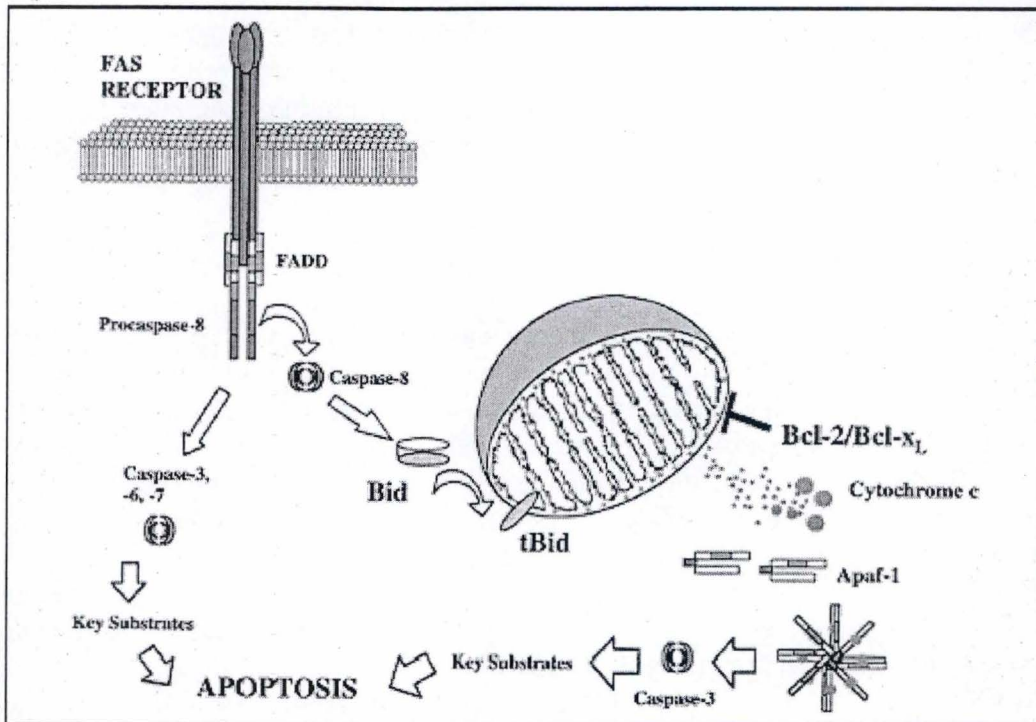


Figure 1. 18 : La voie extrinsèque de l'apoptose. L'oligomérisation des récepteurs à domaine de mort (Death Domain) tels que FAS permet de recruter des adaptateurs comme FADD nécessaires au recrutement et à l'activation de la procaspase-8 en caspase-8. Celle-ci pourra alors activer la voie des caspases ainsi que l'apoptose médiée par la mitochondrie (d'après Zimmermann 2001).

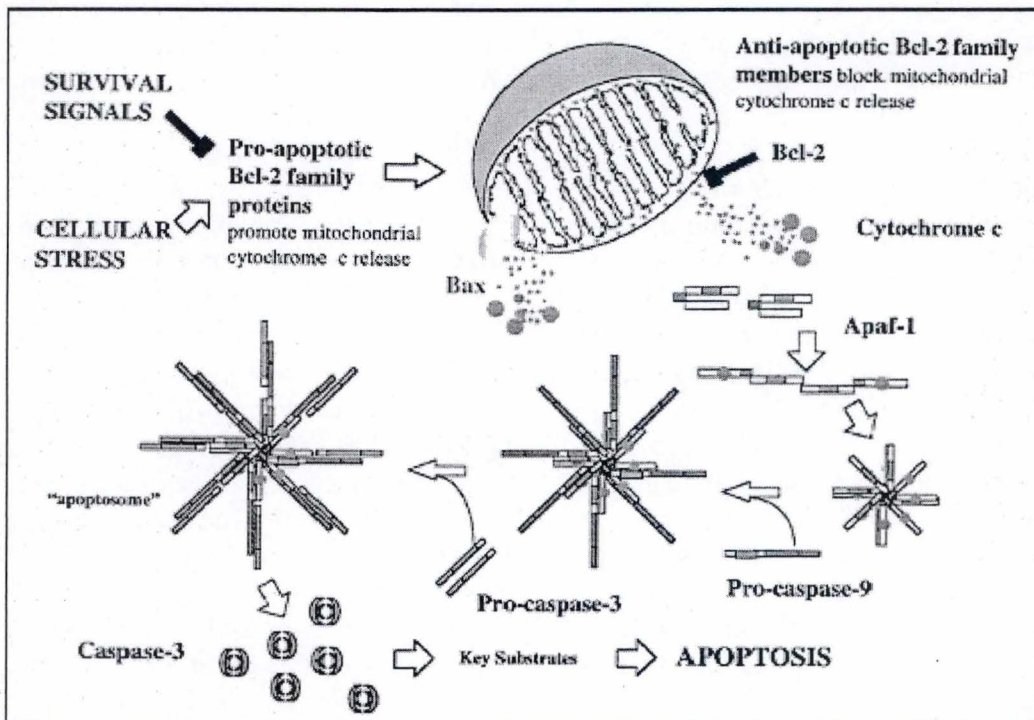


Figure 1. 19 : Mécanisme de formation de l'apoptosome. L'apoptosome est constitué d'Apaf-1 et de la pro-caspase-9 qui s'associent suite à la libération du cytochrome c par la mitochondrie. Cette association va permettre l'activation de la pro-caspase-9 en caspase 9 qui activera ensuite la pro-caspase-3 en caspase-3 (d'après Zimmermann 2004).

Afin d'inhiber, en conditions normales, toute activation accidentelle des caspases, la cellule possède des inhibiteurs endogènes de caspases appelés IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) qui se lient aux caspases ou aux récepteurs de mort. Cette famille d'inhibiteurs comprend, chez les cellules eucaryotes de mammifères, 7 protéines connues comme c-FLIP (FADD-Like ICE-inhibitory Protein), BAR (Bifunctional Apoptosis Regulator), ARC (Apoptosis Repressor with CARD), XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis) et les c-IAPs (Tableau 1.4)(Philchenkov, 2004). Les IAPs exercent leur activité inhibitrice en se liant aux caspases par des domaines conservés BIR (Baculovirus IAP Repeat) afin de les inhiber de manière compétitive empêchant la caspase de reconnaître et donc de cliver son substrat (Suzuki et al., 2001). Les protéines IAP possèdent de plus un domaine RING ayant une activité ubiquitine ligase de type E3 qui va permettre l'ubiquitination de l'IAP et sa dégradation par le protéasome 26s, ainsi que celle de la caspase à laquelle elle est liée (Zimmermann et al., 2001).

1.6.3. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque fait référence aux mécanismes d'induction de la mort cellulaire par apoptose induits par des stimuli extracellulaires tels que le TNF α (Tumor-Necrosis Factor α), l'absence de facteur de croissance comme le NGF (Neuronal Growth Factor) ou par des interactions cellules-cellules (notamment dans le cadre de la réponse immunitaire) via l'interaction Fas/Fas-ligand (Zimmermann et al., 2001)(figure 1.18). Les récepteurs de mort de la super-famille des récepteurs au TNF tels que le TNFR1, Fas et TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) sont caractérisés par 2 à 5 copies d'un domaine extracellulaire riche en cystéines et par la présence d'un domaine intracellulaire dit « domaine de mort » (ou death domain (DD)) (Aggarwal, 2000). L'apoptose peut être induite lors de la liaison de leur ligand entraînant la trimérisation des récepteurs et ainsi le rapprochement des domaines de mort permettant la formation d'un complexe de signalisation. Par exemple, le récepteur Fas activé par la liaison de FasL va recruter des protéines adaptatrices FADD (Fas-associated DD) via des interactions entre leur domaine de mort respectif (DD-DD). Ces adaptateurs possèdent également un « domaine effecteur de mort » cellulaire (Death Effector Domain (DED)) qui va permettre de recruter les procaspases-8 qui s'auto-activeront par protéolyse. En effet les procaspases-8 sont capables, après un changement conformationnel, de s'auto-activer car elles possèdent, comme la plupart des substrats de ces protéines, des résidus aspartate entre les différents domaines. La caspase-8 pourra à son tour activer les caspases effectrices en aval et entraîner la mort cellulaire (Figure 1.18)(Zimmermann et al., 2001).

1.6.4. La voie intrinsèque

La mitochondrie contient, dans son espace intermembranaire, des facteurs pro-apoptotiques tels que l'endonucléase G, la protéine Smac/Diablo, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et surtout, le cytochrome c, protéine responsable de l'activation de la caspase-9 au niveau de l'apoptosome (formé des protéines Apaf-1, de la pro-caspase-9 et du cytochrome c)(figure 1.19). Tous ces facteurs seront libérés dans le cytosol lors de la perception des stimuli adéquats tels que des dommages à l'ADN et autres stress cellulaires comme l'augmentation de la production des ROS (Vergani et al., 2004). Il existe également une connexion entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque de l'apoptose assurée par la caspase-8 qui est activée par les récepteurs à domaines de mort. En effet, cette caspase est capable de cliver Bid en tBid qui transloque alors dans la mitochondrie et peut interagir avec différentes protéines mitochondriales impliquées dans la formation du PTP pour permettre la libération des

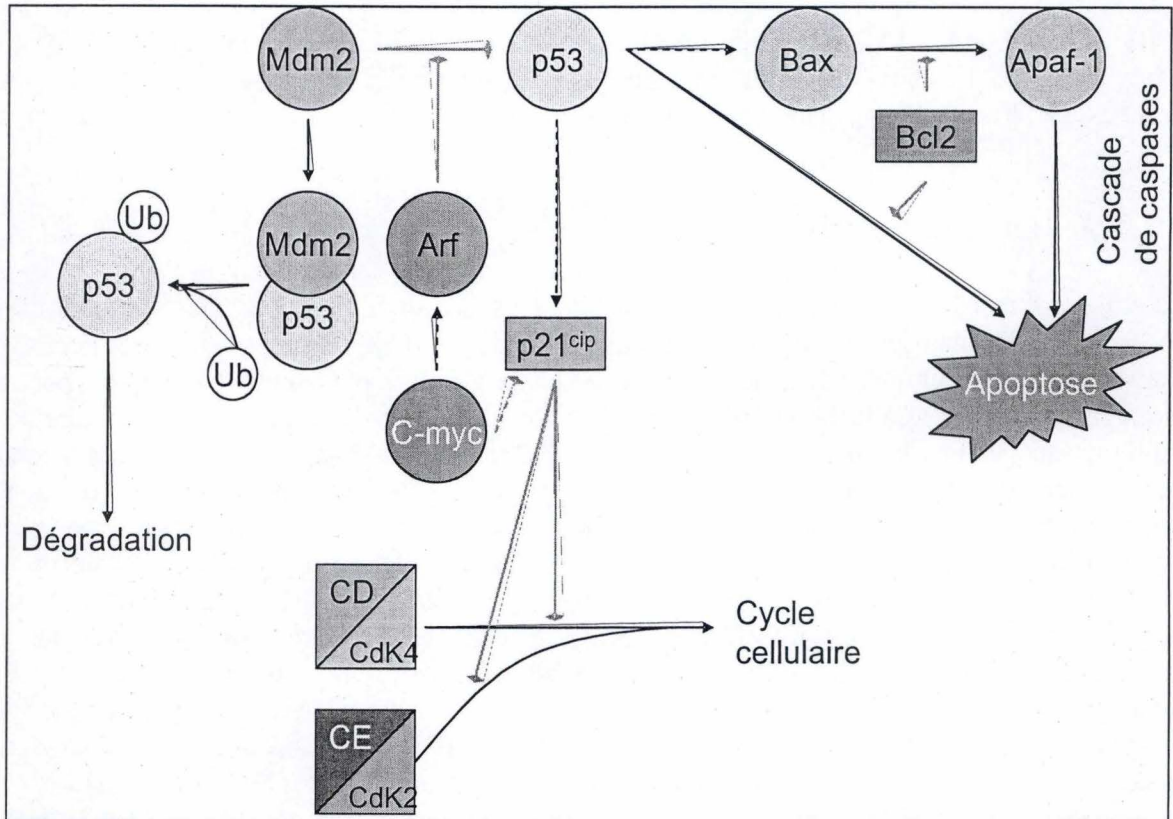


Figure 1. 20 : L'action de p53 et de ses partenaires dans l'apoptose. Lors de la perception de dommages à l'ADN par la cellule, le facteur de transcription p53 induit l'expression de p21 afin d'arrêter le cycle cellulaire ainsi que l'expression de gènes codant des enzymes de la machinerie de réparation de l'ADN ou active l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax. La protéine c-Myc joue un rôle apoptogène en inhibant la transcription de p21, inhibant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire, et en activant l'expression de Arf qui va inhiber la dégradation de p53 par le protéasome en empêchant son interaction avec Mdm2, une ubiquitine ligase (*d'après Haupt et al. 2003*)

protéines pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire (Scorrano et al., 2003; Zimmermann et al., 2001).

1.6.4.1. L'apoptose en réponse au stress : cas des dommages à l'ADN

Lors de dommages à l'ADN comme des cassures simple brin ou la formation de dimères de thymine causés par les U.V. et les radiations pénétrantes, le choix de la réponse cellulaire caractérisée par l'arrêt du cycle cellulaire puis la réparation des dommages à l'ADN ou par l'induction de l'apoptose est sous le contrôle de la protéine p53, un facteur de transcription suppresseur de tumeurs, et de ses différents partenaires (Figure 1.20)(Giaccia et al., 1998; Haupt et al., 2003). Le facteur de transcription p53 est impliqué dans la réponse cellulaire à différents stress exogènes et endogènes tels que des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes, la perte de contact avec la matrice extracellulaire ou encore l'hypoxie qui pourraient aboutir à une croissance anormale des cellules (Giaccia et al., 1998; Haupt et al., 2003). L'arrêt du cycle cellulaire par p53 est médié par l'intermédiaire de p21 un gène cible de p53 codant une protéine inhibant les CDKs impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. L'induction de l'apoptose médiée par p53 est, quant à elle, régulée de manières dépendantes et indépendantes de la transcription par p53. En effet, ce régulateur transcriptionnel peut induire l'apoptose par la voie extrinsèque en augmentant l'expression des récepteurs de la superfamille des récepteurs au TNF α tels que Fas et TRAIL rendant la cellule plus sensible à ces stimuli pro-apoptotiques (Haupt et al., 2003). Il peut également activer la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose en augmentant l'expression d'au moins trois membres pro-apoptotiques de la « famille Bcl-2 » : Bax, Noxa et PUMA et induire l'expression d'Apaf-1, protéine impliquée dans la formation de l'apoptosome et l'auto-activation de la caspase-9. La contribution de p53 à la voie intrinsèque ne se résume pas à une activité transcriptionnelle puisqu'il est également capable d'agir directement au niveau de la mitochondrie en interagissant avec Bcl-X_L et Bcl-2 et augmenter la perméabilité de la MME (Haupt et al., 2003). Un deuxième acteur important dans la prise de décision cellulaire médiée par p53 (arrêt du cycle cellulaire ou apoptose) en réponse aux stress est le facteur de transcription c-Myc (figure 1.20). Celui-ci est en effet capable d'inhiber l'action de p53 sur la transcription de p21 et donc de lever l'inhibition du cycle cellulaire contrôlée par p53 favorisant ainsi l'induction de l'apoptose (Haupt et al., 2003). De plus, c-Myc est également capable d'inhiber l'activité de l'ubiquitine ligase (Mdm2) qui régule l'activité transcriptionnelle de p53 en contrôlant sa dégradation par le protéasome 26s. La protéine c-Myc est donc régulée « finement » par le contrôle de sa stabilité. De plus la modulation de son activité fait intervenir des phosphorylations. En effet, l'activation de la voie de Ras (Raf-MEK-ERK) conduit à la phosphorylation de la protéine c-Myc sur la Ser 62 et cette phosphorylation est nécessaire à la phosphorylation subséquente sur la Thr 58 par la glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β). Cette deuxième phosphorylation est nécessaire à la déphosphorylation de la Ser 62 par la PP2A. La dégradation de c-Myc par le protéasome ne se produit que lorsque la Ser 62 est déphosphorylée et peut être inhibée, par exemple en phase G1 du cycle cellulaire, suite à l'activation de la voie des PI3K/Akt conduisant à l'inhibition de la GSK-3 β et par conséquent à la stabilisation de c-Myc (Dominguez-Sola et al., 2004).

1.6.4.2. La mécanistique de l'apoptose et la mitochondrie

Les différents stress qui induisent une réponse apoptotique faisant intervenir la mitochondrie provoquent la délocalisation de différents facteurs pro-apoptotiques présents dans l'espace intermembranaire de l'organite. Le cytochrome c, par exemple, délocalisé dans le cytosol, pourra interagir avec la protéine Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1)

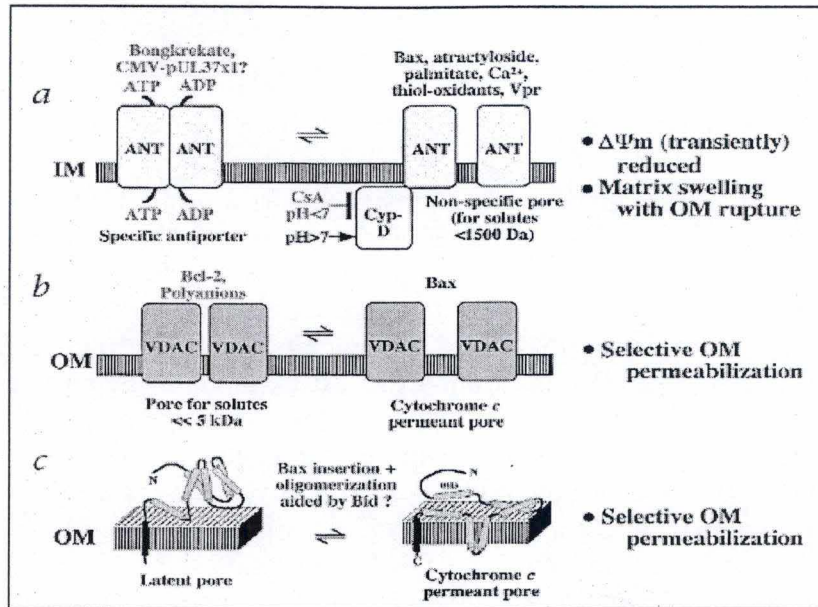


Figure 1.21.: Modification de la perméabilité des membranes mitochondriales. a) Formation d'un pore aspécifique par l'ANT en interaction avec des molécules favorisant l'apoptose comme le Ca²⁺, le palmitate ou les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, ...). b) Ouverture du canal VDAC dépendante du potentiel de membrane VDAC qui peut interagir avec Bax. c) Formation d'un pore aspécifique par l'oligomérisation de Bax (d'après Kroemer et al. 2000).

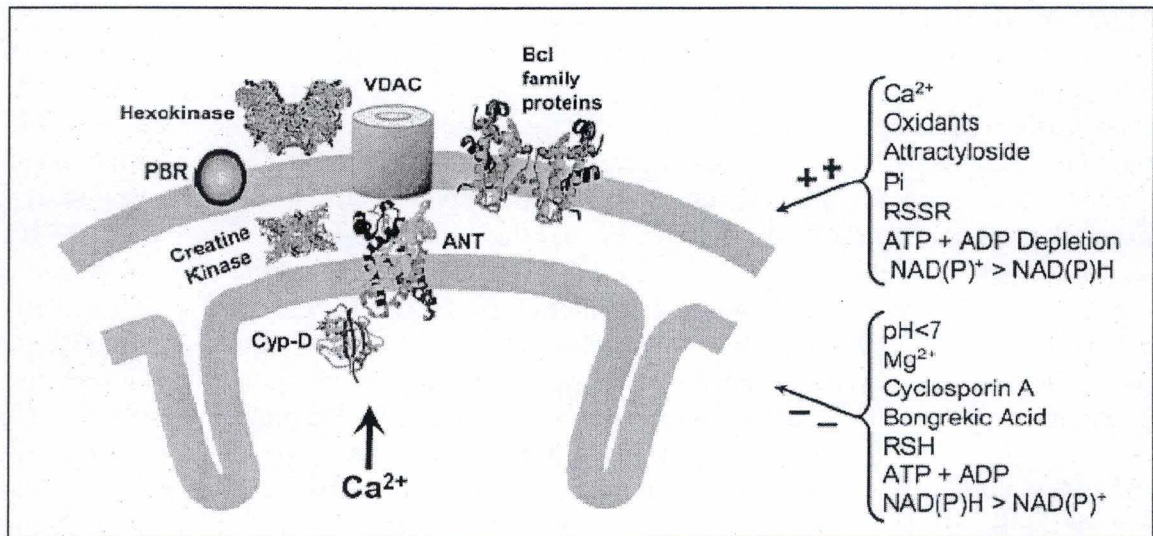


Figure 1.22 : Le PTP. L'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe lors de l'apoptose permettant la libération des protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire dans le cytosol pourrait être due à la formation d'un pore transitoire impliquant l'ANT (inhibé par l'acide bongkréique) et VDAC ainsi que des protéines telles que la cyclophiline D (inhibée par la cyclosporine A), le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), l'hexokinase et des protéines de la famille Bcl-2 (d'après Brookes P. S. et al. 2004).

et former l'apoptosome : un complexe multiprotéique formé des protéines Apaf-1, du cytochrome c et de la pro-caspase-9, qui activera la cascade de caspase menant à la mort cellulaire (Figure 1.19). Le cytochrome c, synthétisé dans le cytosol, est importé dans l'espace intermembranaire mitochondrial où il s'associe à un groupement hème pour former l'holocytochrome c, seule forme capable d'interagir avec Apaf-1. Ceci explique pourquoi le cytochrome c se trouvant dans le cytosol après sa synthèse n'induit pas l'apoptose (Zimmermann et al., 2001). L'espace intermembranaire contient également les protéines pro-apoptotiques AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G impliquée dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. AIF est responsable de la formation de fragments d'ADN de haut poids moléculaire (50 kpb) alors que l'endonucléase G induit à la fois la fragmentation internucléosomale (tout comme la protéine CAD) et la formation de fragments de haut poids moléculaire. Ces deux protéines sont impliquées dans l'apoptose nucléaire de manière indépendante des caspases (Cande et al., 2002; van Loo et al., 2001).

En plus de l'activation directe de caspases par l'apoptosome, une seconde voie d'activation de l'apoptose, indépendante du cytochrome c, a récemment été découverte. Lorsque le cytochrome c est relargué dans le cytosol, deux autres protéines à caractère apoptogène sont également libérées de la mitochondrie. La protéine Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI) et HtrA2/Omi. Ces protéines favorisent l'activation des caspases en s'associant aux protéines IAPs. La dissociation des caspases et des IAPs lève ainsi l'inhibition exercée par ces dernières (Zimmermann et al., 2001).

La délocalisation du cytochrome c, nécessaire à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la caspase-9, passe par la formation transitoire d'un pore par les protéines pro-apoptotiques qui augmente la perméabilité de la MME. Afin d'expliquer la modification de la perméabilité des membranes mitochondriales, trois modèles ont été proposés (Figure 1.21) et méritent notre attention. Dans le premier modèle, l'ANT, en interagissant avec des molécules favorisant l'apoptose comme le Ca^{++} , le palmitate ou les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, ...), va former un pore non-spécifique entraînant la perméabilisation de la membrane mitochondriale interne. Cette perméabilisation conduit au gonflement de la matrice mitochondriale suite au choc osmotique provoqué par l'entrée d'eau. La surface de la membrane mitochondriale interne étant beaucoup plus importante que celle de la membrane externe du fait des crêtes, le gonflement matriciel va provoquer la rupture de la membrane externe et conduire à la libération des différentes protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire (Kroemer et al., 2000). Le second modèle propose que l'ouverture du canal VDAC, dépendante du potentiel de membrane, permette la perméabilisation de la membrane externe sans affecter la membrane interne. L'interaction entre VDAC et Bax transloqué du cytosol dans la MME en réponse au stimulus pro-apoptotique entraînerait un changement de conformation du canal, formant un pore aspécifique. Bcl-2 pourrait inhiber la formation de ce pore en séquestrant la protéine Bax par une interaction protéine-protéine (Scorrano et al., 2003). Il est également possible que VDAC interagisse avec l'ANT pour former ce pore aspécifique ou PTP (Figure 1.22)(Kroemer et al., 2000). Enfin, un troisième modèle propose que l'oligomérisation de Bax soit directement responsable de la formation d'un pore sans qu'il n'y ait d'interaction avec d'autres protéines. Cette oligomérisation pourrait être favorisée par Bid ou tBid (Kroemer et al., 2000). Ces modèles visant à expliquer les mécanismes de modification de la perméabilité des membranes mitochondriales responsable de la délocalisation des molécules pro-apoptotiques mitochondriales ne sont probablement pas exclusifs (Kroemer et al., 2000; Skulachev, 2002).

1.7. Le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose

Nous avons donc vu que la mitochondrie est une structure subcellulaire très importante pour la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose. De ce fait, de nombreuses études ont été menées sur des cellules ayant subi des mutations, des réarrangements ou une déplétion de l'ADN_{mt} afin d'étudier les mécanismes de la mort cellulaire dans les cellules ne présentant plus de mitochondries fonctionnelles. Ces études ont montré une grande hétérogénéité dans les réponses de différentes lignées de cellules déplétées en ADN_{mt} à un stimulus pro-apoptotique. Il apparaît que la sensibilité de ces cellules à l'apoptose varie selon la lignée cellulaire considérée, l'origine et la sévérité du dysfonctionnement mitochondrial et l'inducteur de l'apoptose utilisé. En plus des mécanismes impliqués dans la réponse apoptotique des cellules possédant des mitochondries non fonctionnelles qui restent peu connus, il existe actuellement une controverse dans la littérature quant à la sensibilité des cellules rho⁰ à l'apoptose. Nous allons maintenant rapidement faire état des quelques études récentes sur le sujet.

De nombreuses études montrent une forte corrélation entre la libération du cytochrome c dans le cytosol en réponse à des stimuli apoptotiques tels que l'induction de dommages à l'ADN ou des molécules apoptogènes (staurosporine, étoposide, ...) et la diminution du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) (Ferri et al., 2001; Skulachev, 2002; Stoetzer et al., 2002). Ces observations laissent penser que la diminution du $\Delta\psi_m$ induite par l'utilisation d'agents découplants comme le FCCP ou par la déplétion de l'ADN_{mt} pourrait entraîner la translocation du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytosol et l'exécution de l'apoptose. Cependant, de récentes études montrent que la diminution du $\Delta\psi_m$, à elle seule, n'est pas suffisante pour induire la mort cellulaire programmée (Biswas et al., 2005). Même si les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial possèdent souvent un $\Delta\psi_m$ plus faible, cela n'implique donc pas forcément une sensibilité accrue à l'apoptose induite.

Une étude de Biswas et ses collaborateurs sur des myoblastes C2C12 et des cellules A549 (de carcinome du poumon) déplétées en ADN_{mt} montre que ces cellules sont plus résistantes à l'induction de l'apoptose par la staurosporine. Ces auteurs montrent également que la diminution du potentiel de membrane mitochondrial induite par une déplétion de l'ADN_{mt} est responsable de la surexpression de gènes nucléaires codant pour des acteurs importants de la réponse apoptotique tels que Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bad et Bid (Biswas et al., 2005). Dans les cellules C2C12 rho⁰, ils ont également montré que la libération du cytochrome c et de la protéine Smac/Diablo induite par la staurosporine n'était pas modifiée. Ils ont de plus constaté que, dans les cellules C2C12 rho⁰, la protéine pro-apoptotique Bid ne subissait pas de clivage protéolytique en tBid après une stimulation à la staurosporine. Bien que des protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bad et Bid soient surexprimées dans les cellules C2C12 déplétées en ADN_{mt} ou traitées avec un agent découplant comme le CCCP, ces cellules présentent une résistance accrue à l'apoptose induite par la staurosporine. Cette équipe a également montré que ces protéines pro-apoptotiques étaient localisées dans la membrane mitochondriale interne contrairement à leur localisation classique dans le cytosol ou la membrane externe de la mitochondrie. Cette localisation atypique, couplée à la surexpression de Bcl-2 et Bcl-X_L, permettrait d'expliquer, du moins en partie, la résistance de ces cellules rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine.

Park et son équipe ont également montré que les cellules SK-Hep1 rho⁰ d'hépatome étaient plus résistantes à l'apoptose induite par le paraquat, une molécule générant des radicaux libres

dérivés de l'oxygène (Park et al., 2004). Une analyse de l'expression de gènes dans ces cellules a permis de montrer une augmentation de l'expression de gènes codant pour des enzymes mitochondriales telles que la MnSOD (SOD2) et la glutathion peroxydase, deux enzymes impliquées dans la détoxification des ROS. Même si la production des ROS est augmentée dans ces cellules déplétées en ADN_{mt} en présence de paraquat, la surexpression d'enzymes antioxydantes comme la SOD2 et la glutathion peroxydase prévient l'induction de l'apoptose par les ROS. Par ailleurs, l'équipe de Vergani a tenté de savoir si les cellules déplétées en ADN_{mt} possédaient des mécanismes de défense contre les ROS aussi efficaces que les cellules possédant des mitochondries fonctionnelles (Vergani et al., 2004). Pour y parvenir, ils ont étudié le niveau d'expression des gènes codant différentes enzymes impliquées dans la détoxification des ROS telles que les SOD, la GPx (glutathion peroxydase), la GR (glutathion reductase) et la GST (glutathion transférase) dans des lignées cellulaires dérivées de carcinome du poumon ou d'ostéosarcome. Leurs résultats ont montré que la déplétion de l'ADN_{mt} affectait les mécanismes de défense d'une manière spécifique à chaque tissu. La modification de l'expression et de l'activité des enzymes antioxydantes comme les SOD1 et SOD2 observées dans différentes lignées rho⁰ pourraient expliquer la sensibilité différentielle que présentent les cellules déplétées en ADN_{mt}. De plus, Cardoso et son équipe ont montré que les cellules de tératocarcinome NT2 déplétées en ADN_{mt} ne présentaient pas de variation dans la sensibilité à l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène (Cardoso et al., 2004). Cette équipe a également mis en évidence que l'induction de l'apoptose par le peptide β -amyloïde (β 25-35), qui provoque l'activation des caspases et génère également un stress oxydatif, nécessitait une chaîne de transporteurs d'électrons fonctionnelle et par conséquent que le peptide β -amyloïde était incapable d'induire l'apoptose sur ces cellules rho⁰ (Castedo et al., 2002). Jiang et ses collaborateurs ont décrit que l'apoptose induite par la staurosporine se déroulait de manière comparable dans les cellules d'ostéosarcome 143B déplétées en ADN_{mt} et les cellules parentales. Ils ont constaté que le cytochrome c était bien présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial des cellules rho⁰ et qu'il était délocalisable lors du déclenchement de l'apoptose (Jiang et al., 1999). Enfin, Liu et son équipe ont montré que les cellules 143B rho⁰ présentent une sensibilité accrue à l'apoptose induite par la staurosporine ou une exposition aux U.V. (Liu et al., 2004). En effet, ces auteurs rapportent que la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3 sont plus importantes dans ces cellules. Ces auteurs ont également mis en évidence que différentes cellules cybrides obtenues à partir de la fusion de fibroblastes énucléés de patients atteints des syndromes MERRF, MELAS ou CPEO avec des cellules 143B rho⁰ étaient plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine ou les U.V. (Liu et al., 2004). Mentionnons encore que la sensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine de cellules cybrides MERRF a été étudiée et confirmée au laboratoire dans le cadre du mémoire de Guillaume Rommelaere (Juin 2005).

En conclusion, nous pouvons voir qu'il existe une controverse dans la communauté scientifique quant à l'hypersensibilité ou à la résistance à l'apoptose de cellules possédant des mitochondries non fonctionnelles. Ces différences dans la réponse cellulaire peuvent découler du type cellulaire, de l'origine et de la sévérité du dysfonctionnement mitochondrial ainsi que de la nature des stimuli utilisés pour induire l'apoptose. C'est la recherche et la caractérisation de la sensibilité des cellules 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine mais surtout la recherche des mécanismes qui contrôlent la réponse apoptotique dans ces cellules qui sont à la base de ce travail.

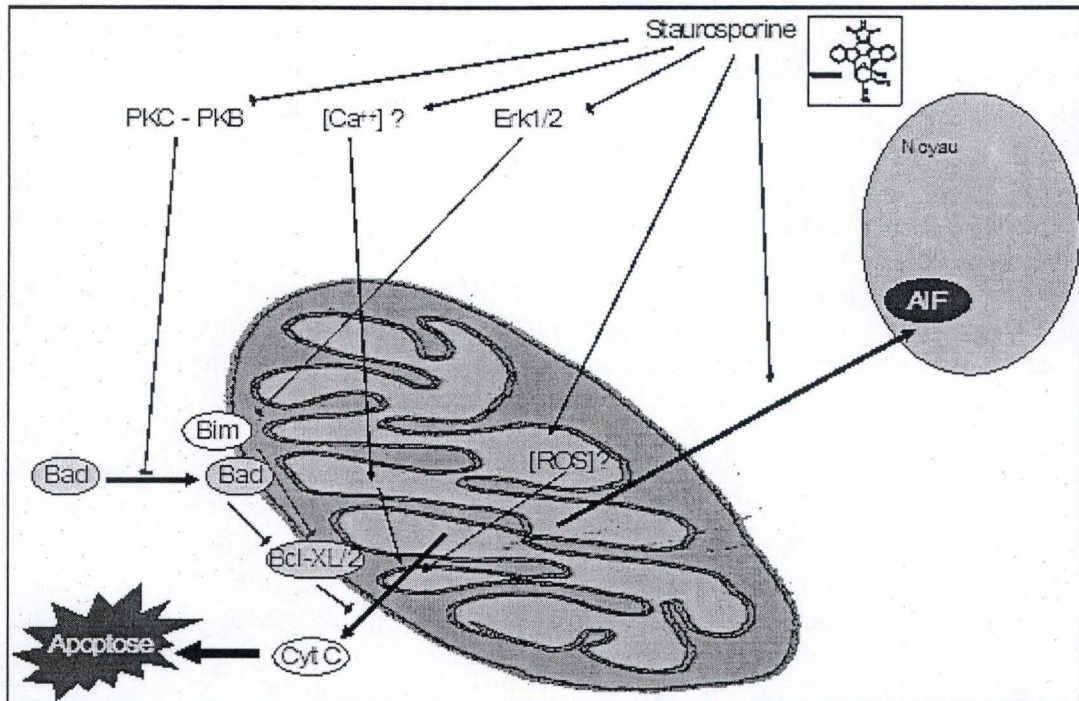


Figure 1. 23 : L'induction de l'apoptose par la staurosporine. La staurosporine est un inhibiteur des PKB et PKC. Cette inhibition va lever la séquestration de Bad par la protéine 14-3-3 dans le cytosol car il ne sera plus phosphorylé par les PKB et PKC. De plus, la staurosporine augmente la concentration en calcium dans la mitochondrie et la production de ROS. Ces différents mécanismes vont aboutir à la libération du cytochrome c par la mitochondrie et à l'activation des caspases (d'après Liu et al. 2004).

1.8. La staurosporine

La staurosporine est une molécule naturelle isolée pour la première fois en 1977 par Omura S. à partir de la bactérie *Sreptomyces staurosporeus* et qui est utilisée par cet organisme comme anti-fongique (Omura et al., 1977). Il a été montré que la staurosporine avait, entre autres, un effet apoptogène et inhibait les protéines kinases B et C (Stoetzer et al., 2002; Thuret et al., 2003; Zhang et al., 2004a). La staurosporine est décrite comme activant la voie intrinsèque de l'apoptose et ce par différents mécanismes (Figure 1.23). La staurosporine, en inhibitant les protéines kinases B et C, favorise l'action pro-apoptotique de Bad puisque, sous sa forme phosphorylée, la protéine Bad est séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3 (Won et al., 2003). La staurosporine augmente également la production des ROS dans la mitochondrie (Gil et al., 2003). Ceux-ci vont faciliter la libération du cytochrome c, notamment, en déstabilisant les membranes mitochondriales et vont perturber le contrôle de l'homéostasie des ions Ca^{++} par la mitochondrie, augmentant ainsi la concentration en calcium cytosolique libre (Gil et al., 2003; Liu et al., 2004). Les ions calcium pourront ainsi activer différentes protéases comme la calpaïne capable de cliver les protéines Bcl-2, Bid et les caspases. L'inhibition des PKB/PKC impliquées dans des voies de signalisation anti-apoptotiques, l'augmentation de la production des ROS par la cellule et l'activation de protéases dépendantes du calcium va conduire à l'induction de l'apoptose par la staurosporine. Des dérivés de la staurosporine, plus sélectifs pour l'inhibition des PKC, ont déjà été utilisés dans la recherche thérapeutique anti-cancéreuse en raison de leurs effets anti-prolifératifs.

1.9. Objectifs de ce mémoire

Ce travail a été réalisé dans le but d'étudier la sensibilité de cellules 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine et de débiter une étude des mécanismes visant à mieux comprendre la réponse apoptotique de ces cellules. Un travail comparable a également été réalisé au laboratoire sur des cellules cybrides MERRF présentant une mutation ponctuelle (A8344G) touchant l'ARN_t mitochondrial porteur de la lysine. Cette mutation conduit donc à une diminution de la synthèse de protéines mitochondriales qui affecte *in fine* les phosphorylations oxydatives. Il a été montré que les cellules cybrides sont plus sensibles à l'apoptose que les cellules parentales (Guillaume Rommelaere, Mémoire de licence, juin 2005).

Dans un premier temps, nous avons continué un travail entrepris au laboratoire dans le cadre de la thèse de Ludovic Mercy visant à caractériser les changements d'expression de gènes induits par un dysfonctionnement chronique de l'activité mitochondriale. Dans ce cadre, nous avons décidé de comparer les profils d'expression de gènes (au niveau transcriptomique) dans des cellules 143B et 143B rho⁰. Pour cela, nous avons réalisé une hybridation d'ADN_c préparés à partir de ces cellules sur un damier à ADN dit généraliste « Human General Chip » (Eppendorf) permettant l'analyse de l'expression de 202 gènes ciblant différentes fonctions cellulaires comme la prolifération cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose... (voir liste de gènes et « design » du damier en Annexes I et II). Nous nous sommes intéressés exclusivement à l'analyse de gènes différentiellement exprimés ayant une fonction connue dans les processus apoptotiques.

Dans un deuxième temps et vu la controverse qui existe quant à la différence de sensibilité de cellules déplétées en ADN_{mt} à l'apoptose induite et surtout en raison de l'absence de mécanismes qui expliquent ces différences, nous avons étudié la sensibilité de cellules 143B et 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine en caractérisant l'état de la fragmentation de l'ADN génomique et l'état d'activité de la caspase-3, deux marqueurs importants de la réponse apoptotique.

Enfin, dans le but de tenter de mettre en évidence des mécanismes potentiellement responsables du comportement différentiel de ces lignées cellulaires en présence de staurosporine, nous avons caractérisé le niveau d'expression de gènes codant pour des effecteurs de l'apoptose tels que Bcl-2, Bax, Bcl-XL, Mcl-1 et le cytochrome c. L'abondance relative de ces marqueurs a également été étudiée par Western blot réalisés sur des fractions enrichies (mais non pures) en protéines mitochondriales, nucléaires et cytosoliques de cellules 143B et 143B rho⁰, préalablement incubées ou non en présence de staurosporine, obtenues par des centrifugations différentielles. La localisation de certains acteurs a également été recherchée par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale. Nous avons ainsi établi une cartographie de l'abondance et de la localisation d'acteurs pro- et anti-apoptotiques dans des cellules présentant une déficience de l'activité mitochondriale induite par une déplétion en ADN_{mt} incubées en présence de staurosporine. Pour terminer et dans une expérience tout à fait préliminaire, nous avons étudié l'expression différentielle de gènes impliqués dans l'apoptose dans les deux lignées de cellules incubées ou non en présence de l'inducteur apoptotique. Pour cela, nous avons utilisé un damier à ADN ciblé sur l'apoptose : le « DualChipTM Human Apoptosis » (Eppendorf) permettant l'étude de l'expression de 135 gènes impliqués dans l'apoptose, le cycle cellulaire... (voir liste des gènes et « design » du damier en Annexes III et IV).

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. *Cultures cellulaires :*

Dans ce travail, deux lignées cellulaires ont été utilisées. Des cellules 143B, issues d'un ostéosarcome humain, provenant de l'A.T.C.C. (American Tissues and Cell Collection, USA) généreusement données par le professeur G. Attardi (California Institute of Technology, CIT, USA) et des cellules 143B rho⁰ issues d'une population clonale de cellules 143B totalement déplétées en ADN_{mt} obtenue par la culture prolongée (30 passages) dans du milieu contenant du bromure d'éthidium à faible concentration (50 µg/µl) suivie d'une sélection en présence d'oligomycine (un inhibiteur de la F₀F₁-ATPase). Ces cellules caractérisées précédemment par King M.P. et Attardi G. (King et al., 1989) sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (Costar) en présence de 15 ml de milieu DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose : 4,5 g/l) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco BRL, Grande Bretagne). Ce milieu est supplémenté, dans le cas des cellules 143B rho⁰, par de l'uridine (50 µg/ml)(Sigma, U-3003), en raison de leur auxotrophie pour cette molécule, et du pyruvate (1 mM)(Sigma, P-2256). Les cellules sont maintenues à 37 °C dans une étuve (HERAEUS, Allemagne) dont l'atmosphère contient 5 % de CO₂ et 95 % d'air humide.

2.1.1. *Sous-cultures :*

Les cellules sont repiquées deux fois par semaine à une dilution de 1/10 pour les cellules 143B et de 1/5 pour les cellules 143B rho⁰ en raison de la capacité plus faible de ces cellules à proliférer. En effet, le temps de doublement pour les cellules 143B rho⁰ est d'environ 29h contre 20h pour les cellules 143B (Buchet et al., 1998). Après avoir décanté le milieu de culture, les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile composé de 0,9 % de NaCl, 10 mM K₂HPO₄/K₂HPO₄ (pH 7.4) afin d'éliminer les résidus de sérum qui pourraient inhiber l'action de la trypsine. Les cellules sont détachées à l'aide de 2 ml de trypsine 0,25 % (Gibco) et resuspendues dans une quantité adéquate de milieu de culture DHG contenant 10 % de sérum de SVF. Elles sont alorsensemencées à la dilution souhaitée dans des boîtes de 75 cm², 25 cm² ou dans des multipuits (Costar).

2.2. *Analyse de l'expression différentielle de gènes induite par un dysfonctionnement mitochondrial :*

Afin d'analyser l'expression différentielle de gènes induite par un dysfonctionnement mitochondrial, une hybridation sur damier à ADN, le « DualChips Human General » (Eppendorf Array Technology), a été réalisée à partir d'extraits d'ARN_{tot} de cellules 143B et 143B rho⁰ rétrotranscrits en ADN_c. Ce damier comporte 202 sondes de capture pour des transcrits de gènes présentant différentes fonctions (Annexe I). Celles-ci sont représentées en triplicats sur le damier dont le design est présenté dans l'annexe II. Une seconde hybridation sur damier à ADN a également été réalisée à la fin de ce travail sur la DC Human Apoptosis spécialement développée pour l'étude des gènes participant à la réponse apoptotique et/ou au contrôle du cycle cellulaire. Cette hybridation a été réalisée à partir d'extraits d'ARN_{tot}, rétrotranscrits en ADN_c, de cellules 143B et 143B rho⁰ préalablement incubées durant 6 h en présence de staurosporine (100 nM) (Sigma S-4400) dans le but d'identifier des gènes dont l'expression est modifiée en réponse à une molécule apoptogène. Ce damier à ADN comporte 135 sondes de capture permettant l'identification et la quantification de transcrits codant pour

des protéines impliquées dans l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire (Annexe IV), également représentées en triplicats selon le design présenté dans l'annexe V.

2.2.1. Les contrôles

En plus des sondes de capture, ces deux damiers à ADN comportent plusieurs contrôles d'hybridation positifs et négatifs, contrôles de fixation positifs et négatifs ainsi que des sondes de capture pour des standards internes permettant la normalisation des données lors des calculs d'abondance relative.

Les contrôles d'hybridation positifs et négatifs sont tous deux constitués de séquences d'ADN complémentaires à de l'ADN_c provenant d'espèces éloignées de l'espèce humaine. Lors de l'hybridation, une sonde biotinylée correspondant au contrôle d'hybridation positif est ajoutée afin de s'assurer de l'efficacité de l'hybridation. Les spots correspondant aux contrôles d'hybridations négatifs doivent rester éteints et correspondent au bruit de fond présenté par des sondes de capture non biotinylées et « spottées » sur le damier.

Les contrôles de fixation positifs sont des sondes de capture préalablement multi-biotinylées qui sont « spottées » en concentrations croissantes (0,5 nM à 300 nM) et permettent de vérifier le bon déroulement de la fixation des sondes de capture sur le damier. Ils doivent présenter une intensité de fluorescence croissante. Les contrôles de fixation négatifs permettent quant à eux de vérifier qu'il n'y a pas eu de contamination lors de la fixation des sondes de capture et correspondent à des spots sur le damier qui ne contiennent pas de sondes de capture et doivent rester éteints.

Les standards internes sont ajoutés avant l'étape de rétrotranscription et permettent de s'assurer de l'efficacité de la rétrotranscription des ARN_m et donc de l'incorporation des nucléotides biotinylés. Ils correspondent à des ARN synthétiques de séquences connues générés à partir d'un clone d'ADN végétal contenant une extrémité 3'-poly(A). Ils sont détectés lors de l'hybridation par des sondes de capture de séquences complémentaires disposées à différentes concentrations dans six zones différentes du damier.

2.2.2. Principe des damiers à ADN

L'ARN_{tot} est extrait des cellules. Les ARN_m présents dans ces extraits sont ensuite rétrotranscrits en ADN_c biotinylés qui sont alors hybridés sur le damier à ADN. L'hybridation de ces ADN_c aux sondes de capture est détectée à l'aide d'anticorps dirigés contre la biotine et marqués à la cyanine-3.

2.2.3. Extraction d'ARN_{tot} :

L'ARN_{tot} de deux et quatre boîtes de 75 cm² de cellules 143B et 143B rho⁰ confluentes respectivement a été extrait pour les hybridations sur la DC Human General. Les extractions d'ARN_{tot} réalisées en vue de l'hybridation sur la DC Human Apoptosis ont été réalisées à partir de 2 et 2 boîtes de 75 cm² de cellules 143B et 143B rho⁰ respectivement. Celles-ci ont été incubées (test) ou non (contrôle) durant 6 h en présence de staurosporine à 100 nM.

L'ensemble des étapes expérimentales décrites ci-dessous est réalisé dans un environnement « RNase free » afin d'éviter la dégradation de l'ARN.

Lors de l'extraction, les boîtes sont décantées et les cellules rincées une fois avec 10 ml de PBS (150 mM NaCl, 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7.4) stérile à 4°C. Elles sont ensuite raclées dans 1 ml de solution dénaturante (RNAgents, Promega) contenant du détergent et des sels. Le lysat cellulaire est transféré dans un microtube (Sarstedt) et le volume porté à 1200 μl avec la solution dénaturante. Il est ensuite homogénéisé à la seringue (Terumo) et aliquoté en deux tubes de 600 μl auxquels on ajoute 60 μl de d'acétate de sodium 2M (pH 4.0) (RNAgents, Promega). Les tubes sont homogénéisés par 5 inversions. L'extraction est réalisée en ajoutant aux tubes 600 μl d'une solution de Phénol/Chloroforme/Isoamyl (Promega) afin de séparer les phases aqueuses contenant l'ARN de la phase organique contenant les protéines. Après une incubation de 15 minutes sur glace, la solution est centrifugée à 10.000 g pendant 20 minutes à 4°C (Biofuge 17RS, Heraeus) et la phase aqueuse (supérieure) contenant l'ARN est prélevée en prenant soin de ne pas toucher l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique qui contient l'ADN génomique. L'ARN extrait est précipité par un équivalent d'isopropanol (RNAgents, Promega), placé à -20 °C durant une heure et est finalement récupéré après une centrifugation de 10 minutes à 4°C à 10.000 g. Le culot d'ARN_{tot} est rincé avec 1 ml d'éthanol 75% à 4 °C et laissé à sécher à température ambiante après une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 10.000 g et 4°C. L'ARN_{tot} est ensuite resuspendu dans de l'eau « RNase free » puis dosé en lisant l'absorbance à 260 nm au GeneQuant (GeneQuant II, Pharmacia Biotech). La concentration d'ARN_{tot} est obtenue en multipliant par 40 la valeur d'absorbance à 260 nm. La qualité de l'ARN_{tot} récupéré est analysée à l'aide d'un Bioanalyseur 2100 (Agilent 2100) qui permet d'obtenir le profil électrophorétique qui renseigne sur son intégrité.

2.2.4. *Rétrotranscription des ARN_m en ADN_c :*

En fonction de la concentration en ARN_{tot} obtenue, un volume correspondant à 40 μg d'ARN_{tot} est prélevé pour la rétrotranscription en ADN_c qui servira respectivement à l'hybridation sur la « DC Human General » et la « DC Human Apoptosis ». On ajoute à ce volume 2 μl d'une solution contenant les 6 standards internes à différentes concentration (Mix Standard Interne, Eppendorf Array Technology), 2 μl d'oligo(dT) (Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer, Invitrogen). Le tout est porté à un volume de 9,5 μl avec de l'eau « RNase free ». Les standards internes permettront de vérifier le bon déroulement de la rétrotranscription et interviendront dans le processus de normalisation. Le mélange est incubé durant 10 minutes à 70°C afin de permettre aux amorces oligo-dT de s'hybrider sur la queue poly-A des ARN_m. Il est ensuite directement refroidi sur glace durant 5 minutes. On y ajoute ensuite le mélange de réaction contenant 4 μl de tampon de rétrotranscription 5x (Invitrogen), 2 μl de DTT (Dithiothreitol) à 0,1M, 1 μl d'inhibiteur de RNase (Ribonucléase Inhibitor, Promega) et 2 μl d'un mélange de dNTP (100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dGTP et 16 mM dCTP (Roche)) et de 1 mM dCTP biotinylé (Perkin Elmer). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, on ajoute 1,5 μl de transcriptase inverse (SuperscriptRII, 200 U/ μl , Invitrogen) et la solution est incubée pendant 90 minutes à 42°C. Après cette incubation, 1,5 μl de transcriptase inverse sont à nouveau ajoutés afin d'augmenter l'efficacité de la rétrotranscription de l'ARN_m en ADN_c et la solution est de nouveau incubée pendant 90 minutes à 42°C. La solution est ensuite incubée pendant 15 minutes à 70°C suite à quoi 1 μl de RNase H (Superscript II RnaseH, 2 U/ μl , Gibco BRL) est ajouté. Le mélange est incubé pendant 20 minutes à 37°C afin de digérer les ARN_r, les ARN_t ainsi que les hybrides ARN_m/ADN_c. Les ADN_c sont alors dénaturés par un passage de 3 minutes à 95°C et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

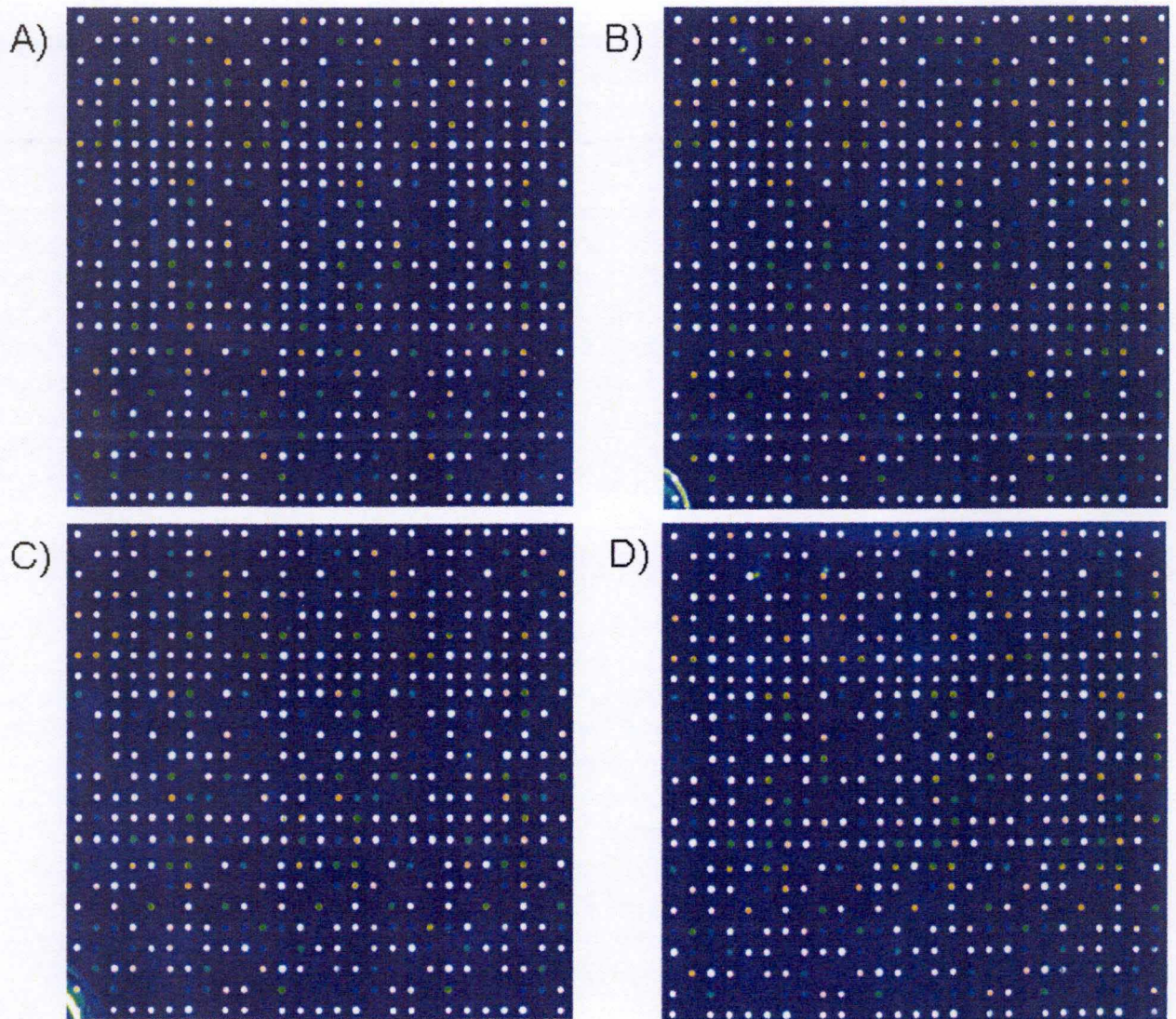


Figure 2. 1 : Scans du damier « DC Human Apoptosis » à un gain 70 après hybridations des ADN_c obtenu après rétrotranscription d'extraits d'ARN_{tot} de cellules 143B (A et B) et 143B rho⁰ stimulées (B et D) ou non (A et C) avec de la staurosporine à 100 nM pendant 6 heures.

2.2.5. Hybridation sur chips :

Les hybridations d'ADN_c ont été effectuées à partir des deux kits suivants « DualChip Kit Human General » et « DualChip Kit Human Apoptosis » de la firme Eppendorf.

Un mélange contenant 10 µl de tampon d'hybridation A, 40 µl de tampon d'hybridation B, 10 µl de contrôles positifs d'hybridation, 17,5 µl d'eau « RNase free » et le produit de la rétrotranscription est chauffé une minute à 60°C afin d'éviter la précipitation du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) contenu dans le tampon d'hybridation B. Ce mélange est dispensé dans la chambre d'hybridation et la lame est placée dans un thermomixer (Thermomixer Comfort, Eppendorf) pour une incubation d'une nuit à 60°C à 1.400 rpm durant laquelle se déroulera l'hybridation. Les chambres d'hybridation sont retirées et les lames rincées 4 fois 2 minutes par immersion dans du tampon de rinçage (Unibuffer 2,5 % contenant 0,1 % de Tween-20). Elles sont retournées sur 800 µl d'un anticorps dirigé contre la biotine couplé à la cyanine-3 (Lucron Bioproduct) dilué 1000 fois. Elles sont alors incubées pendant 45 minutes à l'obscurité puis rincées 5 fois 2 minutes dans du tampon de rinçage et 2 fois 2 minutes dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite séchées par centrifugation pendant 5 minutes à 600 rpm (Centra CL3R, ThermoIEC).

2.2.6. Analyse des données : quantification et normalisation de l'expression génique

La cyanine-3 est un fluorochrome excité à une longueur d'onde de 550 nm qui réémet à 570 nm et permet la quantification des ARN_m exprimés dans la cellules puisque l'intensité de fluorescence correspond à l'abondance des ADN_c qui se sont hybridés sur les sondes de capture. Les lames sont scannées au scanner confocal (ScanArray Express, Packard BioScience) aux gains 100, 70 et 50 correspondant à des sensibilités différentes du photomultiplicateur (figure 2.1). L'intensité de fluorescence de chaque spot est ensuite mesurée à l'aide du programme Silverquant (Silverquant Analyser, Eppendorf Array Technology) qui calcule la moyenne des intensités des pixels composant le spot et y soustrait la moyenne des intensités des pixels voisins qui constituent le bruit de fond. Cette quantification est réalisée sur des images scannées au format TIFF 16 bits. Une fois cette quantification réalisée, on soustrait de chaque valeur la moyenne des intensités des contrôles d'hybridation négatifs. Pour chaque damier, le ratio de l'intensité de chacun des spots du test sur l'intensité de chacun des spots du contrôle est calculé et divisé par la moyenne des ratios de 2 standards internes propres à chaque zone. Ces valeurs sont ensuite normalisées à l'aide de la moyenne des intensités des gènes de maintenance, c'est-à-dire les gènes définis sur la chips comme « house keeping gene » et dont l'expression n'est pas modifiée par les conditions expérimentales. On peut alors observer les gènes qui sont sous-exprimés dans le test qui présenteront un ratio test/contrôle inférieur à un, les gènes dont l'expression ne varie pas (test/contrôle = ~1) et les gènes qui sont sur-exprimés dans le test (test/contrôle > 1). Ces calculs sont effectués à l'aide du programme Statistical Software (Eppendorf Array Technology) pour chaque gain afin de pouvoir quantifier la variation d'expression des gènes fortement et faiblement exprimés.

Anticorps dirigé contre	Espèce d'origine	Dilution	Firme
Bcl-2	Souris	1/100	Upstate
Bcl-XL	Souris	1/100	Sigma
XIAP	Souris	1/100	MBL
Bax	Lapin	1/100	PharMingen
Mcl-1 (s-19)	Lapin	1/100	SantaCruz
Procaspase-3	Lapin	1/250	PharMingen
c-Myc	Souris	1/100	Clontech
Anticorps de lapin	Chèvre	1/1000	Molecular Probes
Anticorps de souris	Chèvre	1/1000	Molecular Probes

Tableau 2. 1 : Tableau reprenant la liste des anticorps primaires et secondaires et des dilutions utilisés pour les marquages en immunofluorescence.

2.3. Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale :

Des marquages en immunofluorescence ont été réalisés dans le cadre de ce travail afin d'évaluer de manière relative l'abondance et la localisation de protéines d'intérêt impliquées dans le processus apoptotique dans les cellules 143B et 143B rho⁰. Les protéines étudiées dans ce cadre sont Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax, la procaspase-3 et XIAP.

Les cellules sontensemencées la veille du marquage sur des lamelles couvre-objets stérilisées dans une boîte 24 puits (Costar) à une densité de 50.000 cellules par puits. Les cellules sont fixées au PBS-paraformaldéhyde 4 % (Merck) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite rincées 2 fois au PBS (150 mM NaCl, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄; pH 7.4) et perméabilisées pendant 5 minutes au PBS-TRITON X-100 1 % (Sigma). Elles sont alors rincées deux fois au PBS-BSA (Bovine Serum Albumine fraction V ; pH 5,2) 1 % pour limiter l'adsorption non spécifique des anticorps et incubées 16h à 4 °C avec 30 µl de l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 1 % (tableau 2.1). Au terme de l'incubation, les cellules sont rincées 3 fois au PBS-BSA 1 % et incubées pendant une heure à l'obscurité, afin de préserver le fluorochrome, avec 30 µl d'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 ou, pour c-Myc, à l'Alexa 568, dilué 1000 x dans du PBS-BSA 1 % (tableau 2.1). Les cellules sont rincées 2 fois au PBS-BSA 1 % et une fois au PBS. Les noyaux sont alors marqués par une incubation de 30 minutes avec du TOPRO-3 (Molecular Probe, T-3605) dilué 80 fois dans une solution de RNase à 2 mg/ml dans du PBS. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS et les lamelles couvre-objets montées sur lames (Menzel, SuperFrost) au Mowiol (0,1 g de Mowiol (Sigma) par ml de tampon Tris 1,5 M ; pH 8,8 contenant 22 % de glycérol) préchauffé à 60 °C. Les lames sont placées 16 heures à 4 °C afin de permettre la polymérisation du Mowiol et observées au microscope confocal à fluorescence (Leica, Allemagne).

2.4. Western blotting :

Afin de rechercher l'abondance de différents acteurs pro- et anti-apoptotiques dans différents compartiments cellulaires (cytosol, mitochondrie, noyau) et les modifications dans l'abondance et la localisation de ces protéines des cellules 143B et 143B rho⁰ préalablement incubées pendant 4 heures avec de la staurosporine à 500 nM, nous avons réalisé un fractionnement par centrifugation différentielle et extrait les protéines des fractions enrichies. Ces extraits ont été utilisés pour réaliser des Western blots en SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) visant à rechercher l'abondance de Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax, PARP-1, le cytochrome c et la pro-caspase-3.

2.4.1. Fractionnement cellulaire et préparation des lysats :

Les échantillons ont été préparés à partir de 3 boîtes de 75 cm² (Costar) confluentes de cellules 143B et 143B rho⁰ incubées ou non pendant 4 heures avec de la staurosporine à 500 nM. Sur glace, les boîtes sont décantées et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS puis avec 10 ml de tampon sucrose/imidazole (40 mM sucrose, 3 mM imidazole ; pH 7,4). Les cellules sont alors raclées dans 400 µl de sucrose/imidazole contenant 16 µl de PIC (Protease Inhibitor Cocktail)(Roche # 1697498) et 16 µl de PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) de composition : 25 nM Na₃VO₄, 250 mM p-nitrophénylpyrophosphate, 250 mM β-glycérophosphate et 125 mM NaF. Les suspensions cellulaires provenant des 3 boîtes sont alors regroupées et transférées dans un homogénéisateur de Dounce. Après 30 passages, la

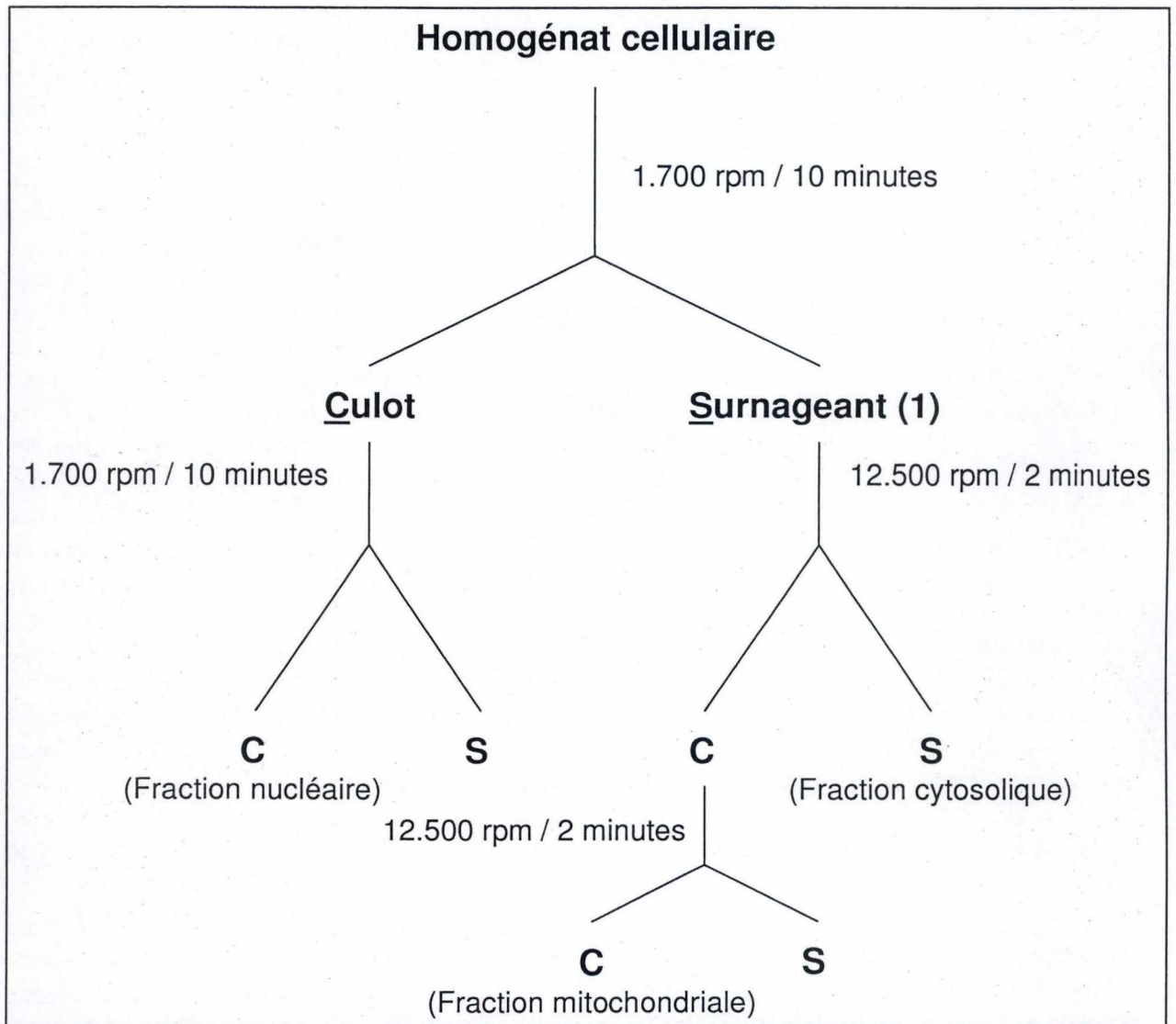


Figure 2. 2 : Schéma reprenant les différentes étapes de centrifugations différentielles permettant l'obtention de fractions enrichies en mitochondries, en noyaux et de la fraction appelée cytosolique dans ce mémoire.

suspension est centrifugée à 1700 rpm pendant 10 minutes à 4°C (figure 2.2). Le culot, qui correspond à la fraction nucléaire (et aux cellules non homogénéisées), est resuspendu dans 1 ml de sucrose/imidazole et le surnageant est conservé (1). Le culot resuspendu est à nouveau centrifugé à 1700 rpm pendant 10 minutes à 4 °C et le culot, qui contient principalement la fraction nucléaire, est resuspendu dans 70 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl ; pH 8, 10 % ASB-14 (Sigma, A-1346)). Le surnageant (1) est centrifugé à 12500 rpm pendant 2 minutes à 4 °C et le surnageant, qui correspond à la fraction appelée « cytosolique » lors de ce mémoire, est conservé à -20°C. Le culot est rincé dans 1 ml de sucrose/imidazole et centrifugé à 12500 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Le culot, enrichi en mitochondries, est resuspendu dans 30 µl de tampon de lyse. Les lysats sont ensuite soniqués 30 minutes et dilués 5 x dans du tampon Tris-Triton (10 mM Tris-HCl ; pH 8, 2 % Triton X-100). Après une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm, les surnageants sont aliquotés et stockés à -20 °C jusqu'à utilisation.

2.4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

Pour doser les protéines par la méthode de Bradford, on ajoute 1 µl d'échantillon à 1 ml de solution de colorant diluée 5 fois (Biorad Protein Assay, 500-0006). Après 10 minutes, l'absorbance à 595 nm est lue au spectrophotomètre. Un étalon de concentration protéique connue constitués de 2,5 µl d'étalon BSA (2 µg/µl) permet de calculer la concentration protéique des échantillons. Afin d'éliminer la contribution de la solution à l'absorbance, l'absorbance d'un blanc pour l'étalon et pour l'échantillon est également mesurée à 595 nm après 10 minutes d'incubation avec la solution de coloration. Le blanc échantillon est réalisé à partir de 2 µl de d'une solution 10 mM Tris ; pH 8.0 + 10 % ASB-14 dilué 5 x dans une solution 10 mM Tris ; pH 8.0 + 2 % TRITON X-100 et le blanc étalon est réalisé à partir de 2,5 µl d'eau. La concentration en protéines est calculées selon la formule :

$$\text{Concentration protéique } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{(\text{Abs. éch.} - \text{Abs. blanc éch.}) \times \text{Vol. éch.} \times \text{Conc. étalon}}{(\text{Abs. étalon} - \text{Abs. blanc étalon}) \times \text{Vol. éch.}}$$

Avec Abs. : valeur d'absorbance ; éch. : échantillon ; Vol. : volume ; Conc. : concentration

2.4.3. Préparation des solutions :

- Tampon de migration 10 fois : (pour 1 l) 63,2 g de Tris-HCl ; 10 g de SDS ; 40 g de glycine
- Tampon du gel de séparation : (pour 200 ml) 36,5 g Tris-HCl pH 8,9 ; 0,8 g de SDS
- Tampon du gel de concentration : (pour 100 ml) 5,1 g de Tris-HCl pH 6,8 ; 0,4 g de SDS
- Mix gel de concentration : (pour 24 ml) 6 ml de tampon de concentration ; 4 ml Acrylamide/Bisacrylamide (30/0,8) (Biorad) ; 14 ml d'eau
- Gel de séparation : voir tableau 2.2
- Tampon de transfert : (pour 5 l) 24 g Tris ; 115 g glycine ; 1 l MeOH
- TBS (Tris Buffer Saline) 10 fois : (pour 1 l) 24,22 g Tris pH 7,6 ; 80,06 g NaCl

2.4.4. Préparation des gels et migration :

Afin de pouvoir analyser l'abondance de protéines de poids moléculaires variés, nous avons réalisé des gels d'acrylamide à 12 et 15 %. Pour ce faire une solution contenant 35 ml de « gel mix », dont la composition est détaillée au tableau 2.2, 175 µl d'APS (Ammonium Persulfate)(Amersham, 17-1311-01, 10 %) et 10,5 µl de TEMED (Amersham, 17-1312-01) est coulée entre les plaques. La solution est couverte par 1 ml d'isobutanol afin que la

Gel mix	15 %	12 %
Gel buffer	60 ml	60 ml
Acryl/Bis (30%)	125 ml	100 ml
H ₂ O	65 ml	90 ml

Tableau 2. 2 : Composition des « Gel mix » utilisés lors de la préparation du gel d'électrophorèse SDS-PAGE

Protéine cible	Firme	Référence	Espèce	Incubation	Température	Dilution	Agent bloquant
Bcl-XL	Sigma	B 9429	souris	16 heures	4°C	1/1000	gloria
Bcl-2	Sigma	B3170	souris	2 heures	ambiante	1/1000	gloria
Mcl-1	Santa Cruz	sc-819	lapin	2 heures	ambiante	1/1000	gloria
Bax	Upstate	06-499	lapin	16 heures	4°C	1/500	gloria
Cytochrome c	Santa Cruz	sc-7159	lapin	16 heures	4°C	1/2000	gloria
Caspase-3	Pharmingen	556425	lapin	16 heures	4°C	1/5000	ECL
PARP	Pharmingen	556493	souris	16 heures	4°C	1/1000	gloria
TBP	Santa Cruz	SC-204	lapin	16 heures	4°C	1/5000	gloria
TOM 20	BD	612278	souris	16 heures	4°C	1/20 000	ECL
tubuline	Sigma	T5168	souris	16 heures	4°C	1/30 000	gloria

Tableau 2. 3 : Anticorps primaires utilisés pour la détection de protéines d'intérêt par la méthode du Western Blot.

polymérisation de l'acrylamide se déroule en l'absence d'oxygène. Le gel est polymérisé pendant 45 minutes à température ambiante. Il est ensuite rincé abondamment à l'eau distillée. Le gel de concentration composé de 10 ml de mix de gel de concentration, 50 µl d'APS et 3 µl de TEMED est alors coulé entre les plaques et le peigne introduit. Après un temps de polymérisation de 15 minutes, le peigne est retiré et le montage est déposé dans la cuve d'électrophorèse que l'on remplit de tampon de migration. Un étalon de poids moléculaire (12 µl d'étalon See Blue, Invitrogen, LC 5925) ainsi que les échantillons sont chargés. Les échantillons sont chargés à raison de 50 µl d'échantillon par puits, volume contenant 10 µl de bleu de charge 5 fois (0,5 M Tris-HCl pH 6,8 ; 20 % SDS ; 20 % glycérol ; 1 % bleu de bromophénol ; 20 % β-mercaptoéthanol) et 30 µg de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosolique ou 15 µg de protéines pour les fractions nucléaires. Avant d'être chargés, les échantillons ont été dénaturés par un passage de 3 minutes à 100 °C. La migration se fait d'abord à un ampérage de 35 mA pendant 45 minutes dans le gel de concentration et ensuite à 45 mA pendant 5 heures dans le gel de séparation.

2.4.5. *Transfert des échantillons sur une membrane de PVDF :*

Après la migration, les échantillons sont transférés sur une membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride)(Amersham, RPN 303 F) préalablement réhydratée pendant une minute dans du méthanol 100 % et rincée 5 minutes dans du tampon de transfert. Le gel est placé sur la membrane et un montage en « sandwich » est réalisé à l'aide d'éponge et de papiers Whatman imbibés de tampon de transfert. Ce montage est placé dans une cuve pour les transferts semi-secs à 150 mA pendant 2 heures ou 30 mA pendant 16 heures. La membrane est alors bloquée, afin d'éviter l'adsorption non spécifique des anticorps, pendant 2 heures dans du TBS-Tween 0,1 % contenant 2 % d'agent bloquant (Amersham, U.K.) ou 2 % de lait Gloria (Nestlé) en fonction de l'anticorps (voir tableau 2.3)

2.4.6. *Marquage et révélation :*

L'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (tableau 2.3), est dilué selon les recommandations dans du TBS-Tween 0,1 % contenant 2 % d'agent bloquant ou 2 % de lait Gloria selon l'anticorps. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant 2 heures à température ambiante ou 16 heures à 4 °C et est ensuite rincée 3 fois 15 minutes avec du TBS-Tween 0,1 %. Elle est ensuite incubée pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la Horse Raddish Peroxydase (HRP), dirigé contre les IgG de souris (Amersham, NA 931 V) ou de lapin (Amersham, NA 934 V) en fonction de l'anticorps primaire, dilué 150.000 fois dans du TBS-Tween 0,1 % contenant 2 % d'agent bloquant. La membrane est ensuite rincée 3 fois 15 minutes dans du TBS-Tween 0,1 %.

La présence des protéines est détectée par chémoluminescence en utilisant une solution de révélation contenant le substrat de la HRP et du luminol (Amersham, Advanced Western Blot Detection Kit). La membrane est placée pendant 5 minutes au contact de la solution de révélation. Elle est ensuite révélée en chambre noire par une impression sur film sensible (Amersham, Hyperfilms ECL). Celui-ci est ensuite passé dans une solution de révélation (Ilford), dans de l'eau et dans une solution de fixation (Ilford). Il est ensuite rincé à l'eau, séché et scanné.

2.5. Mise en évidence de la sensibilité différentielle des cellules 143B et 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine :

Afin d'étudier la sensibilité différentielle des cellules 143B et 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine, différentes conditions de stimulation (concentrations en staurosporine et temps d'incubation avec la molécule) ont été testées et les effets de la staurosporine visualisés par la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose. Nous avons également dosé la fragmentation de l'ADN en utilisant le kit commercial « Cell Death Detection ELISA » (Roche, #1 544 675).

2.5.1. Extraction d'ADN et visualisation sur gel d'agarose :

Le protocole d'extraction utilisé est tiré du chapitre « Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue » de l'ouvrage intitulé « Current Protocols In Molecular Biology »

L'extraction est faite à partir de boîtes confluentes de 25 cm² de cellules 143B incubées ou non (contrôle) pendant 16 heures en présence de staurosporine à 100, 500 ou 1000 nM. Au terme des 16 heures, le milieu est récupéré et les cellules adhérentes sont trypsinisées et ajoutées au milieu prélevé. Les cellules sont alors récupérées par une centrifugation à 500 g pendant 5 minutes et resuspendues dans 1 ml de PBS et à nouveau centrifugées. Les culots sont resuspendus dans 300 µl de tampon de lyse (100 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 25 mM EDTA ; 0,5 % SDS ; 0,1 ng/ml de protéinase K ; 1 mM CaCl₂) et placés pendant 2 heures à 50 °C puis sous agitation à 37 °C pendant 16 heures. On ajoute alors à chaque lysat un équivalent de phénol avant de les centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes. La phase supérieure contenant l'ADN génomique est récupérée et recentrifugée pendant 10 minutes à 2000 rpm. On ajoute au surnageant un demi volume d'acétate de d'ammonium et 2 volumes d'éthanol 100 % et on laisse précipiter l'ADN génomique pendant 2 heures à -20 °C. L'ADN génomique est sédimenté par une centrifugation de 2 minutes à 2000 rpm et rincé avec de l'éthanol à 70 %. La solution est de nouveau centrifugée, l'éthanol est décanté et le culot est séché à l'air libre avant d'être resuspendu dans 40 µl de tampon TE (1 mM Tris pH 8.0 ; 1 mM EDTA) et incubé 2 heures à 65 °C avant d'être stocké à 4 °C. La quantification de l'ADN se fait par une mesure de l'absorbance à 260 nm au GeneQuant et la concentration est calculée suivant la formule

$$[ADN] = \text{Absorbance à } 260 \text{ nm} \times 50.0 \times \text{dilution}$$

Un volume équivalent à 10 µg d'ADN est chargé dans un gel d'agarose 1,2 % en présence de bromure d'éthidium (0,5 g/µl) et soumis à une électrophorèse (120 V pendant une heure). Le gel est alors déposé sur un transilluminateur U.V. (Vilber Lourmat) afin de visualiser l'ADN.

2.5.2. Dosage de la fragmentation de l'ADN par un kit ELISA :

Le dosage de la fragmentation de l'ADN a été réalisé à partir d'extraits d'ADN génomique de cellules 143B et 143B rho⁰ incubées ou non (contrôle) avec de la staurosporine à 100 nM pendant 16 heures. La fragmentation a été mesurée à l'aide du kit « Cell Death Detection ELISA » (Roche). Afin d'étudier plus en détails les mécanismes sous-jacents aux variations de sensibilité des cellules 143B et 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine, les cellules ont également été incubées pendant 16 heures en présence de staurosporine 100 nM et

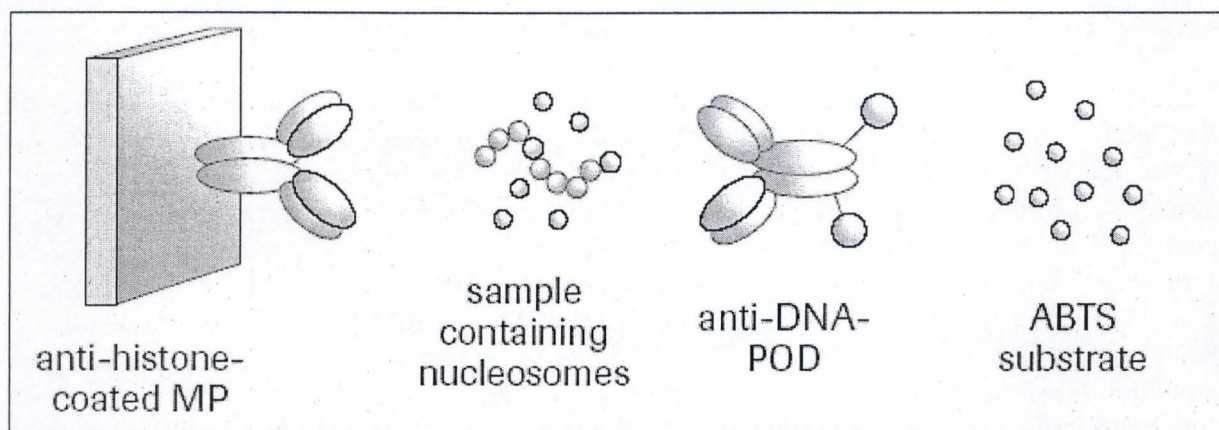


Figure 2.3 : Principe du test de détection de la fragmentation de l'ADN. Des anticorps anti-histone H1 sont fixés sur une plaque de 96 puits. Les nucléosomes sont fixés par ces anticorps. La liaison est ensuite détectée par une réaction colorimétrique par l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'ADN couplés à une peroxydase qui va cliver le substrat ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthizoline sulfonate) en un produit coloré détectable par mesure de l'absorbance à 405 nm au spectrophotomètre.

de zVAD-fmk (5 μ M)(BD Biosciences, #550377) ou de staurosporine 100 nM, d'acide bongkréique (10 μ M)(Calbiochem, #203671) et de cyclosporine A (100 nM)(Sigma, C-3662).

Le principe du dosage en colorimétrie de type ELISA est présenté à la figure 2.3 Des anticorps dirigés contre l'histone H1 sont fixés sur une plaque 96 puits de manière à capturer les nucléosomes liés aux fragments d'ADN. La liaison de ces fragments est détectée grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'ADN et couplés à une peroxydase. Après plusieurs rinçages, le dosage de l'activité peroxydase est réalisé en présence du substrat ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthizoline sulfonate). Après incubation, le produit de la réaction colorimétrique est dosé à 405 nm au spectrophotomètre.

Les cellules 143B et 143B rho⁰ sontensemencées à raison de 50.000 cellules par puits dans une boîte 24 puits (Costar). Elles sont ensuite incubées pendant 16h avec les différentes molécules activatrices/inhibitrices.

Après avoir récupéré les cellules en suspension par centrifugation, une lyse est effectuée dans 250 μ l de tampon de lyse fourni avec le kit. Les lysats sont centrifugés 7 minutes à 13.000 rpm de manière à sédimenter l'ADN non fragmenté. Les surnageants sont récoltés et 100 μ l sont incubés pendant 90 minutes dans les puits tapissés d'anticorps anti-Histone H1. Après 3 rinçages avec le tampon fourni dans le kit, l'anticorps couplé à une peroxydase et dirigés contre l'ADN est ajouté dans les puits et incubé pendant 90 minutes. Après 3 autres rinçages, le substrat de la peroxydase est ajouté et la densité optique est mesurée à 405 nm à différents temps. La densité optique mesurée est proportionnelle au nombre de fragments d'ADN générés lors de l'apoptose. Afin de normaliser les valeurs obtenues, un dosage protéique selon la méthode de Bradford a été réalisé sur des puits « frères »ensemencés avec la même densité de cellules et ayant subi les mêmes traitements. Le dosage protéique a été réalisé sur des lysats cellulaires obtenus avec un tampon de lyse de composition : 150 mM KCl ; 1 mM EDTA ; 100 mM Tris pH 7.4 ; 1 % TRITON X-100 car le tampon de lyse fourni avec le kit interfère avec le dosage protéique.

2.6. Dosage de l'activité caspase-3 :

La caspase-3 est une enzyme clef de la réponse apoptotique dans de nombreuses lignées cellulaires et l'activité de cette enzyme est un bon moyen de quantifier l'importance de la réponse apoptotique. L'activité de la caspase-3 a été mesurée dans les cellules 143B et 143B rho⁰ incubées ou non en présence de staurosporine 100 ou 500 nM pendant 4 heures et de BAPTA-AM 20 μ M (Molecular Probes, B-1205) ou d'ionomycine 1 μ M (Sigma, I-0634). Le dosage de l'activité de cette enzyme a été réalisé en spectrofluorimétrie grâce à un substrat spécifique, le Ac-DEVD-AFC, qui une fois clivé par la caspase-3 au site DEVD libère le groupement AFC (7 amino-4-trifluorométhyl coumarine) fluorescent.

Les cellules 143B et 143B rho⁰ sont repiquées à confluence dans des boîtes 6 puits (Costar). Elles sont incubées ou non pendant 16 heures avec de la staurosporine à 100 ou 500 nM et de l'ionomycine à 1 μ M ou du BAPTA-AM à 20 μ M. Le milieu de culture est collecté et les cellules rincées avec 1 ml de PBS. Le PBS et le milieu sont centrifugés à 1.000 rpm pendant 10 minutes afin de récupérer les cellules en suspension. Le culot est rincé avec 5 ml de PBS et recentrifugé 10 minutes à 1.000 rpm et resuspendu dans 100 μ l de PBS. Les cellules adhérant aux puits sont raclées dans 200 μ l de PBS et transférées dans un microtube auquel on ajoute les cellules provenant de la centrifugation du PBS et du milieu. Après une centrifugation de

10 minutes à 1.000 rpm, le culot de cellules est resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse (10 mM Hepes/KOH pH 7,0 ; 10% sucrose ; 2 mM EDTA ; 0,1% CHAPS ; 5 mM DTT ; 10 µg/ml d'aprotinine). Après 30 minutes d'incubation, le lysat est centrifugé à 1.000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est recentrifugé à 10.000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est aliquoté et stocké à -80 °C jusqu'à utilisation. Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford afin de normaliser les résultats de fluorescence.

Dans un microtube, on ajoute 50 µl de tampon de réaction (40 mM PIPES pH 7,2 ; 200 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 0,2 % CHAPS ; 0,10 % sucrose ; 10 mM DTT), un volume d'échantillon correspondant à 5-20 µg de protéines et 1 µl de substrat Ac-DEVD-AFC (concentration finale : 13,7 µM). Les échantillons sont incubés 60 minutes à 37 °C et la fluorescence est mesurée au spectrofluorimètre (Ex : 400 nm, Em : 505 nm). Le calcul de la valeur de fluorescence s'effectue selon la formule :

$$\text{Valeur de fluorescence} = (\text{Test} - \text{Blanc enzyme}) - (\text{Blanc substrat} - \text{Blanc Blanc})$$

Avec le blanc enzyme : tampon de réaction + 1 µl de DMSO + échantillon, le blanc substrat : tampon de réaction + 1 µl de substrat + tampon de lyse et blanc blanc : tampon de réaction + tampon de lyse.

Résultats et discussions

3. Résultats et discussions

Au vu de la controverse dans la littérature quant à la sensibilité à l'apoptose induite par différents stimuli des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial, nous avons tenté, dans ce travail, d'étudier et de caractériser la réponse de cellules 143B (dérivées d'un ostéosarcome humain) et de cellules dérivées déplétées en ADN_{mt} (143B rho⁰) à l'apoptose induite par la staurosporine, une molécule bien décrite pour ses effets apoptogènes (Duan et al., 2003; Feng et al., 2002; Gil et al., 2003; Salvioli et al., 2000; Thuret et al., 2003; Zhang et al., 2004a).

Pour ce faire, nous avons suivi trois approches complémentaires. Premièrement, par une approche transcriptomique, nous avons recherché le niveau d'expression de nombreux effecteurs et/ou régulateurs de l'apoptose en réalisant des hybridations d'ADN_c, préparés à partir de cellules 143B et 143B rho⁰, sur microdamier à ADN. Nous avons d'abord utilisé un damier généraliste : le « DualChips (DC) Human General » afin de caractériser l'expression différentielle de gènes dans les cellules rho⁰. Nous ne nous sommes intéressés qu'aux gènes décrits pour leur participation à la réponse apoptotique. La réponse apoptotique induite par la staurosporine dans les cellules 143B et 143B rho⁰ a été mise en évidence par le dosage d'activité de la caspase-3 et par le dosage de la fragmentation de l'ADN dans les deux lignées cellulaires.

A la fin du travail, dans le but de rechercher les modifications d'expression de gènes induites par un traitement à la staurosporine dans les deux lignées cellulaires, nous avons utilisé le « DC Human Apoptosis » (Eppendorf), un damier spécialement élaboré pour l'analyse d'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans l'apoptose. Cependant, l'abondance d'un transcrit ne se reflétant pas toujours au niveau de l'expression de la protéine, nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence suivies d'observations en microscopie confocale et des analyses en Western blot pour quelques protéines d'intérêt. Les analyses en Western blot réalisées sur des fractions enrichies (mais non pures) en différents organites permettent également d'estimer l'abondance des effecteurs et des régulateurs de l'apoptose dans différentes structures subcellulaires, et de tenir compte ainsi des translocations et des redistributions éventuelles des protéines pro- ou anti-apoptotiques, une caractéristique importante dans la réponse apoptotique.

3.1. Modifications de l'expression génique induites par la déplétion de l'ADN_{mt} : analyse de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose au niveau transcriptomique

Afin de mettre en évidence des modifications de l'expression génique dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial induit par la déplétion de l'ADN_{mt}, nous avons effectué une extraction d'ARN total à partir de cellules 143B et 143B rho⁰. Après une RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), les ADN_c biotinylés générés ont été hybridés sur le damier « DualChips Human General ». Ce damier à ADN contient 202 sondes de capture permettant l'analyse de gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération cellulaire le métabolisme, l'apoptose... (la liste des gènes et le « design » du damier sont présentés dans les Annexes I et II). Les résultats reprenant le niveau d'expression des gènes analysables par le damier sont repris en annexe III. Parmi ces 202 gènes, 13 gènes ont été définis comme « gènes de maintenance » ou HKG (House Keeping Genes) potentiels parmi lesquels 5 ont été sélectionnés pour les calculs de normalisation en

Gènes Abondance relative des transcrits :
143B rho⁰ / 143B (double de RT-PCR)

1 (Mn)SOD	1.20	1.44
2 ADPRT	-2,36	-2,23
3 BAD	-2.00	-1.18
4 BAX	-2.22	-1.52
5 Bcl-2	-	ND
6 Bcl-XL	-3.62	-4.24
7 BID	-2.73	-
8 Casp-2	ND	ND
9 Casp-3	-	ND
10 Casp-7	-2.97	-1.91
11 Casp-8	-1.61	-1.09
12 Casp-9	-2.44	-1.77
13 c-Myc	-2.43	-1.76
14 GPX	-1.96	-2.01
15 JNK1	-1.58	ND
16 JNK2	-2.35	-1.89
17 JNK3	ND	ND
18 MAX	-3.27	-3.56
19 MDM2	-1.09	1.06
20 MEK-1	-2.19	-1.73
21 MEK-2	-2.67	-2.87
22 p53	-1.89	-
23 SMAD4	-3.48	-3.72

Figure 3.1 : Résultats de l'expression de gènes codant pour des protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules 143B et 143B rho⁰ obtenus après hybridation d'ADNc sur le damier « DC Human General ». Les gènes repris dans la colonne de gauche sont des gènes intervenant dans la régulation du processus apoptotique. Les valeurs des colonnes de droite représentent le niveau d'abondance relative des transcrits dans les cellules 143B rho⁰ par rapport aux cellules 143B. Les valeurs sur fond gris représentent une variation quantitative et significative de l'expression génique. Le symbole « - » représente une variation qualitative et significative de l'expression et les lettres « ND » les transcrits non-détectés.

raison de leur absence de variation d'expression dans nos conditions expérimentales (gènes codant l' α -tubuline, la HBP (Highly Basic Protein de 23 kDa), la β -actine, la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et la protéine ribosomale S9).

L'analyse des résultats d'hybridation indique que parmi les 202 gènes analysables par le damier, une centaine de gènes sont sous-exprimés dans les cellules et qu'une dizaine sont sur-exprimés (Annexe III). Parmi ces modifications, on retrouve des rapports d'expression dits « quantitatifs » et « qualitatifs ». La notion de variation d'expression qualitative utilisée dans le cadre d'analyse de résultats d'hybridations sur microdamiers illustre le fait que le ratio entre les intensités d'un spot résultant de l'hybridation d'un transcrite dans la condition « test » et du spot correspondant dans la condition « contrôle » ne peut pas être quantifié en raison du fait que l'intensité de fluorescence de l'un de ces deux spots est soit « saturée » (à tous les gains de sensibilité), ou non discriminée par rapport au bruit de fond. La seule information qui pourra être tirée d'une donnée qualitative sera donc une sous-expression ou une sur-expression du gène sans pouvoir attribuer de valeur quantitative.

Dans le cadre de ce travail, seule l'expression de gènes ayant une implication dans l'apoptose a été analysée (Figure 3.1). Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes codant pour la protéine PARP-1 (ADRPT), Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-X_L, Bid, les Caspases-2, -3, -7, -8, et -9, c-Myc, MAX, Mdm2, les JNKs 1, 2, et 3 (c-Jun-terminal kinases), Mek-1, Mek-2, p53, SMAD4, la GPX et la Mn-SOD (SOD-2 ou superoxyde dismutase mitochondriale).

Nous rappelons que les valeurs présentées à la figure 3.1 sont données à titre indicatif car les hybridations ont été effectuées à partir de deux produits de RT-PCR obtenus à partir d'un échantillon biologique unique. Les résultats qui suivent doivent donc être interprétés avec prudence. Pour les rendre plus fiables, des hybridations réalisées à partir d'au moins trois cultures indépendantes devraient être réalisées. De plus, la vérification des changements d'expression au niveau transcriptomique nécessite souvent une confirmation par une autre technique comme la real-time PCR.

Les transcrits des gènes codant pour la JNK-3 et la caspase-2 sont non détectés, suggérant que ces gènes ne sont pas (ou très peu) exprimés dans ces cellules. Les gènes codant pour la MnSOD et Mdm2 (une protéine dotée d'une activité E3 ubiquitine ligase qui cible p53 vers le protéasome et est donc impliquée dans la stabilité de cette protéine) ne sont pas différenciellement exprimés dans les cellules rho⁰. Par contre, plusieurs gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques (Bad, Bax, Bid, Caspase-3, -7 et -9, c-Myc, MAX et p53) ou anti-apoptotiques (Bcl-X_L) sont sous-exprimés. Le transcrite du gène Bcl-2 n'est détecté qu'une fois sur les deux hybridations et annoté comme sous-exprimé de manière qualitative (-). Finalement, le gène le plus sous-exprimé dans les cellules 143B rho⁰ (3,5 fois) code pour Smad4, un facteur de transcription activé en réponse à une stimulation par le TGF- β (Brodin et al., 1999) qui s'est révélé être pro-apoptotique dans des cellules qui expriment le récepteur alpha à l'œstrogène (ER α) (Li et al., 2005).

Ces résultats obtenus au niveau transcriptomique, bien qu'à confirmer, ne sont pas en accord avec ceux décrits par Biswas et collaborateurs qui montrent que des cellules C2C12 (rhabdomyoblastes) partiellement déplétées en ADN_{mt} sont plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine et expliquent la résistance par une sur-expression des protéines pro-apoptotiques Bax, Bad et Bid qui seraient localisées et séquestrées dans la membrane mitochondriale interne (Biswas et al., 2005). Cependant, Liang et Ulliyatt ont montré que, dans des cellules de lymphome (U937) déplétées en ADN_{mt}, l'expression de Bax et de Bcl-2

ne varie pas (Liang et al., 1998). Ces données contradictoires mettent en évidence la grande hétérogénéité des modifications d'expression de gènes susceptibles d'être induites par une déplétion en ADN_{mt} observée dans des lignées cellulaires différentes.

Parmi les gènes différentiellement exprimés dans les cellules 143B rho⁰, on peut constater que le gène *ADPRT*, codant pour la protéine PARP-1, est sous-exprimé (environ 2 fois). Cette protéine est tantôt décrite comme étant pro- ou anti-apoptotique (Beneke et al., 2000; Szabo, 1998). Cette protéine nucléaire est, entre autres, impliquée dans la réparation des cassures simple brin présentes dans l'ADN et son activité est augmentée dans les cellules soumises à des radiations γ ou à des stress oxydants. Lorsqu'elle est activée en réponse aux dommages à l'ADN, PARP-1 entraîne la poly(ADP-ribose)ylation de nombreuses protéines comme les histones, les topoisomérases I et II, l'ADNpol II, l'ADN ligase 2 et PARP-1 qui est alors inhibée (Szabo, 1998). La poly(ADP-ribose)ylation inhibe l'interaction de ces protéines avec l'ADN (probablement par un effet « répulsion de charges ») et permet l'accessibilité des enzymes de réparation de l'ADN aux sites de cassure (Szabo, 1998).

Le gène codant la JNK-2 (c-Jun N-terminal Kinase-2) est également sous-exprimé dans les cellules rho⁰. Cette protéine est connue dans la littérature comme ayant une action pro-apoptotique lors de l'apoptose médiée par les radiations γ ou l'activation de récepteurs contenant un domaine de mort (« Death Domain ») de la superfamille du récepteur au TNF α (Aggarwal, 2000). Les radiations- γ , en plus de causer des dommages à l'ADN, peuvent activer la voie des Ser/Thr kinases de stress telles que les p38 MAPK et JNKs à leur tour sont capables de favoriser l'apoptose en interagissant avec divers acteurs tels que les caspases, Bcl-2, Bax et p53. La phosphorylation des effecteurs et régulateurs de l'apoptose par ces kinases modifie leur stabilité et donc leur abondance, favorisent des interactions « protéine-protéine » qui assurent des changements dans leur fonction et/ou leur localisation (Kumar et al., 2004). Leur effet pro-apoptotique a également été démontré par leur action de clivage de Bid en jBid entraînant une translocation de ce facteur dans la MME et la libération de Smac/Diablo par la mitochondrie (Papa et al., 2004). De plus, une fois activée, la JNK peut phosphoryler et activer c-Jun, un régulateur transcriptionnel qui sous la forme d'un homo- ou hétérodimère avec les protéines de la famille Fos forme le complexe AP-1 qui contrôle l'expression de Fas/CD95 (Kuwabara et al., 2003). Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les radiations entraînent l'activation de la voie des p38 MAPK/JNK est/sont encore mal(s) connu(s).

Le facteur de transcription p53 est également sous-exprimé dans les cellules 143B rho⁰. La protéine p53 joue un rôle important dans la suppression de tumeurs et constitue un point de contrôle de l'équilibre entre l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée de la cellule en apoptose lors, par exemple, de l'accumulation de dommages à l'ADN. Ces deux réponses cellulaires dépendent également d'autres facteurs de transcription comme la protéine c-Myc, dont le gène est également sous-exprimé dans les cellules déplétées en ADN_{mt} (Haupt et al., 2003). Le facteur de transcription c-Myc qui forme un hétérodimère avec son partenaire protéique Max (également sous-exprimé dans les cellules 143B rho⁰) a été décrit dans de nombreuses études pour son rôle dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Cependant, c-Myc est un facteur qui, lorsqu'il est surexprimé, augmente la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par une privation de sérum ou des dommages à l'ADN par des mécanismes encore peu connus (Iaccarino et al., 2003) (Juin et al., 2002) (Kleefstrom et al., 2002).

La mécanistique du contrôle du cycle cellulaire par p53 et c-Myc est essentiellement, mais non exclusivement, médiée par le contrôle de l'expression de p21/Waf1, un inhibiteur des

CDK (cyclin-dependent kinases). Le rôle de p53 dans l'apoptose est, lorsqu'il est activé sous une forme tétramérique en réponse aux dommages à l'ADN et à l'accumulation de ROS, médié par l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque. Ce facteur contrôle, en effet, l'expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax, Puma et Noxa (Haupt et al., 2003 ; Kuwabara et al., 2003). De plus, l'action de p53 peut ne pas être médiée par sa fonction régulatrice sur la transcription. En effet, il a été décrit que p53 pouvait avoir une localisation mitochondriale et interagir physiquement avec Bcl-2 et Bcl-X_L par son domaine de liaison à l'ADN. Son rôle dans le contrôle de l'apoptose pourrait donc également passer par une séquestration des protéines anti-apoptotiques qui régulent la libération du cytochrome c par la mitochondrie (Haupt et al., 2003).

Bien qu'aucune conclusion quant à la sensibilité des cellules 143B et 143B rho⁰ à l'apoptose ne puisse être tirée directement de cette analyse d'expression de gènes, il est intéressant de noter que des gènes, codant pour les facteurs de transcription tels que p53, SMAD4 et c-Myc, ou des protéines impliquées dans les voies d'activation de ces facteurs tels que les JNKs, connus pour leurs effets pro-apoptotiques, sont tous sous-exprimés dans les cellules rho⁰. Contrairement aux membres de la famille Bcl-2 et aux caspases qui participent plus « tardivement » au processus apoptotique, ces facteurs régulent, en amont, l'expression des protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques et pourraient donc jouer un rôle important dans la sensibilité des cellules déplétées en ADN_{mt} à l'apoptose induite.

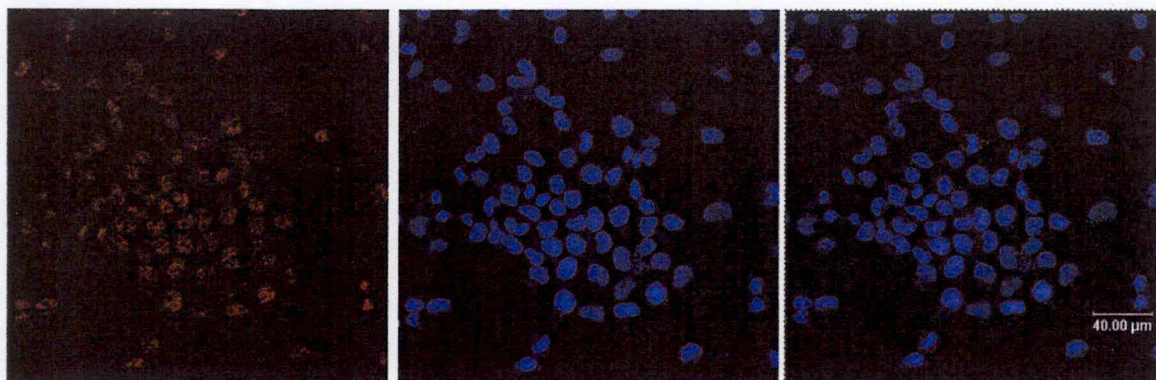
Ces sous-expressions multiples ne semblent pas artéfactuelles car elles n'affectent pas l'ensemble des gènes analysables par le damier. En effet, les gènes codant pour l'interleukine-1 β , pour la molécule d'adhérence ICAM-1 (intercellular-adhesion molecule-1) et la métalloprotéinase-14 (MMP-14) sont fortement surexprimés dans les cellules 143B rho⁰ (voir Annexe III).

Il faut cependant garder à l'esprit qu'il s'agit ici d'une analyse unique basée sur l'abondance relative de transcrits de gènes et que l'expression d'un gène (codant) sous forme d'une protéine fonctionnelle est soumise à de nombreuses régulations (post-transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles) qui peuvent influencer l'abondance, la localisation et/ou la fonction de la protéine d'intérêt. Des vérifications de l'expression au niveau protéique doivent donc être effectuées pour ces candidats. C'est ce que nous avons réalisé pour c-Myc et certains membres de la famille Bcl-2 dans la suite de ce travail.

3.1.1. Le facteur de transcription c-Myc : un candidat à l'hypersensibilisation à l'apoptose

De nombreuses régulations post-traductionnelles peuvent expliquer une différence entre l'abondance d'un ARN_m et de la protéine. Afin d'illustrer ceci, nous pouvons prendre l'exemple du facteur de transcription c-Myc. En effet, la dérégulation de l'expression de l'oncogène c-Myc conduit, assez paradoxalement, à la stimulation de la prolifération cellulaire (observée dans de nombreux types de cellules cancéreuses humaines) ou hypersensibilise les cellules à l'apoptose en réponse à plusieurs stimuli comme l'irradiation, l'hypoxie, l'IFN- γ et l'activation des récepteurs à domaines de mort (TNFR, Fas, TRAIL R)(Haupt et al., 2003; Klefstrom et al., 2002; Qi et al., 2004). Klefstrom et al., ont récemment montré que les effets de sensibilisation étaient médiés par une inhibition de l'activation du facteur NF- κ B, par une surexpression de Bax et la répression de l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (Klefstrom et al., 2002). Il semble également que la présence de facteurs de croissance comme l'IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) ou la présence de sérum s'opposent aux effets pro-apoptotiques induits par la surexpression de c-Myc.

143B



143B rho⁰



c-Myc

TOPRO-3

Superposition
c-Myc / TOPRO-3

Figure 3.2 : Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale du facteur de transcription c-Myc. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ensemencées sur couvre-objets à raison de 50000 cellules par puits dans une boîte 24 puits ont été fixées à la PFA 4% et perméabilisées au TRITON X-100 avant d'être marquées par un anticorps primaire de souris anti-c-Myc révélé par un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de souris couplés à l'Alexa-568. Un contre marquage au TOPRO-3 a été réalisé afin de visualiser les noyaux.

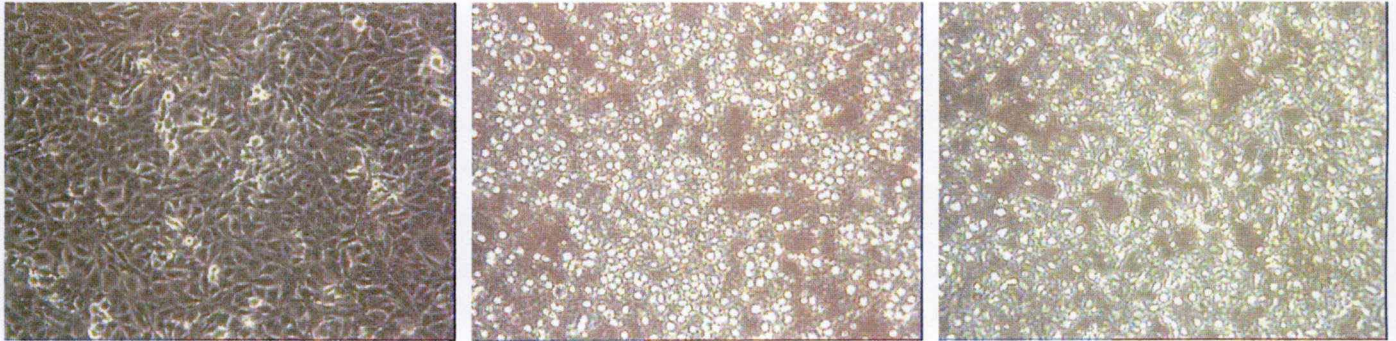
Les résultats de l'hybridation d'ADN_c sur la « DC Human General » obtenus à partir d'ARN total de cellules 143B et 143B rho⁰ montrent une sous-expression de l'ordre de deux fois de l'abondance du transcrite pour c-Myc dans les cellules 143B rho⁰. Pour tenter de confirmer cette différence au niveau protéique, nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence pour c-Myc sur les deux lignées cellulaires suivi d'observations en microscopie confocale. Sur les micrographies présentées à la figure 3.2 on peut voir que la protéine c-Myc semble surexprimée dans le noyau des cellules 143B rho⁰ et ce, contrairement à ce qui a été observé pour l'abondance du transcrite. Cette différence pourrait être expliquée par une traduction plus efficace de l'ARN_m ou par une stabilisation de la protéine c-Myc augmentant son temps de demi-vie. En effet, il est décrit que pour la protéine c-Myc, en plus du système de traduction classique qui consiste en la reconnaissance de la coiffe 5' de l'ARN_m par le complexe de traduction eIF4F suivie par la liaison de la sous-unité ribosomale 40S qui scannerait ensuite l'ARN_m jusqu'au codon d'initiation de l'ORF (*CAP-scanning*) (Kobayashi et al., 2003), on peut observer un mécanisme de traduction alternatif grâce à la présence d'un IRES (Internal Ribosome Entry Site) dans la région 5'-UTR (UnTranslated Region) (Nanbru et al., 1997). Cet IRES permet une traduction indépendante du *CAP-scanning* classique (Nanbru et al., 1997). La traduction au départ de cet IRES, souvent observé pour rendre compte de la surexpression de gènes au niveau protéique dans des cellules présentant une déficience énergétique, peut être activée par la voie de la PI3-K-Akt/PKB (Kobayashi et al., 2003) activée par une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre (Danciu et al., 2003). Rappelons que la concentration en calcium dans le cytosol est plus élevée dans les cellules déplétées en ADN_{mt} (Amuthan et al., 2002; Arnould et al., 2002; Biswas et al., 1999) et soulignons que la voie PI3-K-Akt semble être activée dans les cellules 143B rho⁰ comme le montre l'augmentation de la phosphorylation de la protéine Akt sur la Ser473 dans ces cellules (Ludovic Mercy, thèse en cours).

L'abondance plus élevée de la protéine c-Myc dans les cellules 143B rho⁰ pourrait également s'expliquer par une stabilisation plus importante de la protéine, un mécanisme qui dépend de la voie de la PI3-K. En effet, la stabilité du facteur de transcription c-Myc est régulée par un événement de phosphorylation sur la Ser 62 par les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) Erk1/2. Cette phosphorylation est nécessaire à la phosphorylation subséquente de la Thr 58 par la glycogène synthase kinase 3β (GSK-3β), une Ser/Thr kinase constitutivement active de la voie PI3-k/Akt/GSK3β qui est inhibée par Akt activée (qui phosphoryle la Ser 9 de l'enzyme). La protéine c-Myc sera ensuite dégradée par le protéasome 26 S après la déphosphorylation de la Ser 62 par la PP2A (Protein Phosphatase 2A). La phosphorylation de c-Myc sur la Thr 58 médiée par la GSK-3β pourrait donc être inhibée suite à l'activation de la PI3-K, conférant une plus grande stabilité à la protéine (Dominguez-Sola et al., 2004).

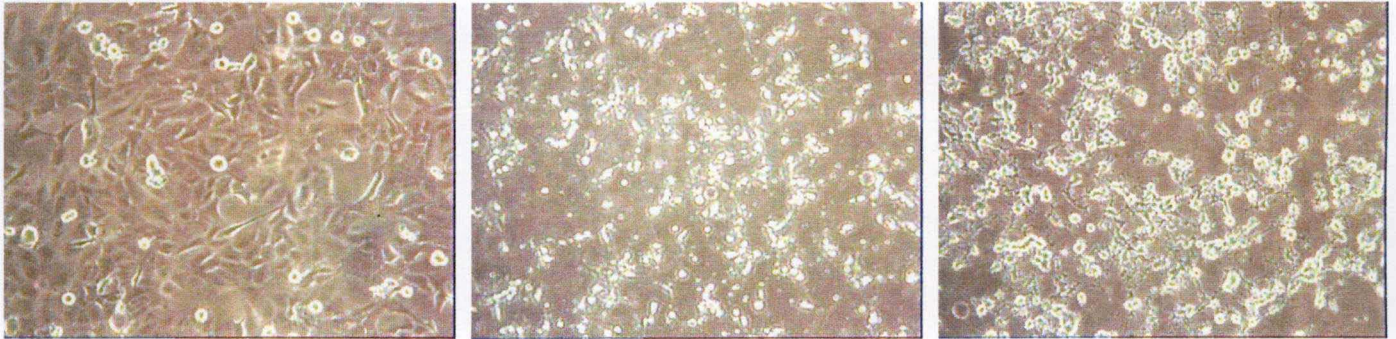
L'accumulation du facteur de transcription c-Myc dans le noyau des cellules 143B rho⁰ pourrait donc être expliquée par l'un ou l'autre (ou les deux) de ces mécanismes.

Après avoir analysé les modifications d'expression de gènes codant pour des protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules 143B rho⁰ et plutôt que de tenter de confirmer l'expression de tous les candidats au niveau protéique, nous avons choisi d'étudier la sensibilité des cellules déplétées en ADN_{mt} à l'apoptose induite par la staurosporine. Rappelons que cette molécule est un inhibiteur à large spectre de nombreuses kinases parmi lesquelles les PKCs qui induit l'apoptose par plusieurs mécanismes dont l'inhibition des PKCs, l'augmentation de la production de ROS et une élévation de la concentration en calcium cytosolique libre dans la cellule (voir introduction point 1.8). Rappelons également que l'intérêt potentiel de ce travail est sous-tendu par l'existence de données contradictoires dans la littérature sur la sensibilité ou la résistance à l'apoptose de cellules déficientes pour

143b



143b rho⁰



CTL

100 nM

500 nM

Figure 3.3 : Micrographie prise au microscope à contraste de phase illustrant les modifications dans la morphologie des cellules 143B et 143B rho⁰ induite par l'apoptose. Les cellules ont été incubées ou non (CTL) avec de la staurosporine à 100 ou 500 nM durant 16h.

l'activité mitochondriale (voir introduction point 1.7). De plus, les mécanismes responsables de la résistance ou de l'hypersensibilité des cellules déplétées en ADN_{mt} sont encore peu connus.

Nous avons donc mis au point un modèle cellulaire d'induction de l'apoptose par la staurosporine et tenté, dans la suite de ce travail, de comparer la réponse apoptotique induite par cette molécule dans des cellules 143B et 143B rho⁰.

3.2. Effets de la staurosporine sur la morphologie des cellules 143B et 143B rho⁰

Parmi les indications de l'entrée d'une cellule en apoptose, on peut noter des changements morphologiques qui surviennent suite à l'inhibition des transporteurs ioniques (Na⁺, -K⁺, et Cl⁻) et au démantèlement des protéines du cytosquelette (Allen et al., 1997). Ces modifications entraînent une rétraction de la cellule provoquée par la sortie massive de fluide. La cellule se détache progressivement de la surface, s'arrondit et n'adhère plus aux cellules voisines. Ces changements sont visibles, même à faible grossissement, en microscopie à contraste de phase. Nous avons donc tout d'abord étudié les effets de la staurosporine sur la morphologie des deux lignées cellulaires. Pour la mise au point du modèle d'apoptose par la staurosporine, nous avons cultivé des cellules 143B et 143B rho⁰ en présence de différentes concentrations en staurosporine et ce pendant plusieurs temps d'incubation. Elles ont ensuite été observées au microscope à contraste de phase (Figure 3.3).

Sur ces micrographies de cellules 143B et 143B rho⁰ incubées pendant 16 h avec de la staurosporine à 100 ou 500 nM, on observe une quantité plus ou moins égale de cellules. Cependant, nous pouvons remarquer qu'à la concentration de 100 nM, les cellules 143B ont tendance à se rétracter et certaines cellules commencent à se détacher de leur support (cellules plus réfringentes). Ce phénomène est beaucoup moins marqué pour les cellules 143B rho⁰, bien qu'une rétraction moins sévère des cellules soit également visible. A la concentration de 500 nM, la majorité des cellules 143B sont détachées de leur support ou complètement rétractées, et les cellules 143B rho⁰ sont moins sévèrement touchées. Il semble donc que les cellules 143B rho⁰ soient plus résistantes, pour les deux concentrations testées. L'analyse morphologique des cellules ne peut cependant pas nous permettre de connaître précisément le type de mortalité (nécrose ou apoptose) induite par la staurosporine.

Afin d'étudier plus en détails la réponse apoptotique des cellules 143B et 143B rho⁰, nous avons réalisé des tests plus informatifs et quantitatifs comme des dosages de la fragmentation de l'ADN, une caractéristique tardive de la réponse apoptotique et des dosages de l'activité de la caspase-3, une caspase effectrice souvent décrite comme responsable de la fragmentation (Allen et al., 1997).

3.3. Mise en évidence de l'induction de l'apoptose par la staurosporine dans des cellules 143B et 143B rho⁰: la fragmentation de l'ADN

Lors de l'apoptose, on peut observer une condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN nucléaire. Des fragments d'ADN de 300 kpb et/ou 50 kpb peuvent être détectés, ils sont probablement le résultat de la dégradation de l'ADN par AIF et l'endonucléase G qui sont relarguées de l'espace intermembranaire mitochondrial en même temps que le cytochrome c (Allen et al., 1997). Par contre, la fragmentation caractéristique donnant un profil en « DNA ladder » (obtenue après migration de l'ADN sur un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium) conduit à la formation de fragments plus petits, de 180 pb ou des multiples de 180 pb. Ceux-ci résultent d'un clivage endonucléique internucléosomal et

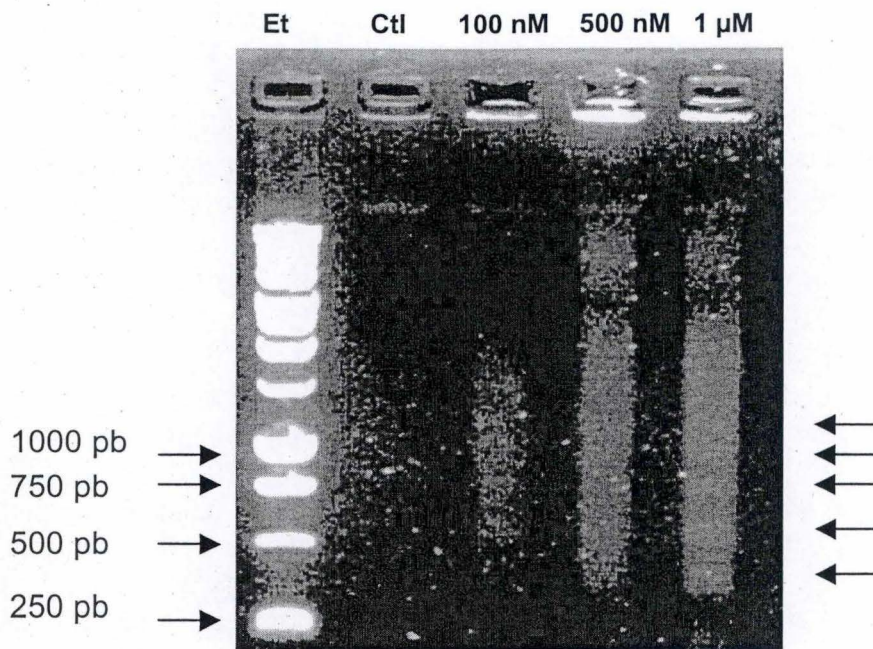


Figure 3.4 : Fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose des cellules 143B. Des cellules 143B ont été incubées ou non (Ctl) durant 16 h avec de la staurosporine à 100 nM, 500 nM ou 1 μ M. L'ADN a été extraits et soumis à une migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1,2 % en présence de bromure d'éthidium.

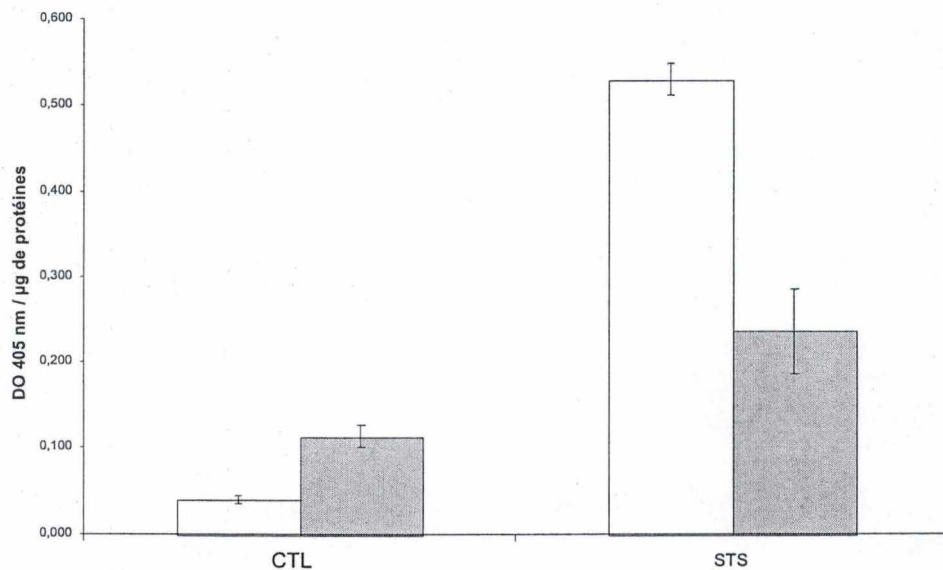


Figure 3.5 : Effet de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN génomique dans des cellules 143B (en blanc) et 143B rho⁰ (en gris). Des cellules 143B t 143B rho⁰ ont été incubées ou non (CTL) en présence de staurosporine (STS) à 100 nM pendant 16 h. Le dosage de la fragmentation a été réalisé grâce au kit « Cell Death Detection ELISA » et est présenté ici comme les valeurs d'absorbance normalisées par les quantités de protéines engagées dans le dosage. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm 1 S.D. pour n = 3.

non systématique par la protéine DFF40/CAD qui est activée, lors de l'apoptose, par la dégradation de son inhibiteur DFF45/ICAD par les caspases comme la caspase-3 (Wolf et al., 1999).

3.3.1. *Mise en évidence de la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose*

Dans ce travail, nous avons voulu mettre en évidence l'induction de l'apoptose par la staurosporine en visualisant sur gel d'agarose le profil en « DNA Ladder » typique. Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole d'extraction de l'ADN et avons testé trois concentrations en staurosporine (100, 500 et 1000 nM) afin de stimuler l'apoptose sur des cellules 143B. Les extractions d'ADN ont été réalisées après 16 h d'incubation car la dégradation de l'ADN est un phénomène tardif de la réponse apoptotique.

Au vu des résultats présentés à la figure 3.4, la fragmentation de l'ADN, et donc l'induction de l'apoptose, semble augmenter avec la concentration en staurosporine. En effet, on peut voir que pour les cellules non traitées, l'ADN non fragmenté ne pénètre pas dans le gel. Par contre, après incubation en présence de staurosporine, on observe une dégradation de l'ADN qui est fonction de la concentration utilisée. Ce résultat suggère qu'une proportion des cellules 143B meurt bien par apoptose en réponse à la staurosporine.

Cependant, bien que cette technique, qui présente l'avantage d'être peu coûteuse, puisse être utilisée, nous avons été confronté à plusieurs problèmes. Tout d'abord, les extraits d'ADN des cellules contrôles et l'ADN non fragmenté des conditions tests ne pénètrent pas dans le gel d'agarose même dans un gel 1%. De plus, la quantification des extraits en spectrophotométrie s'est avérée peu reproductible rendant impossible toute quantification des effets de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN des cellules 143B et 143B rho⁰. Notre but étant de comparer la sensibilité des cellules 143B et 143B rho⁰ à la staurosporine, il était impératif d'utiliser un test reproductible et quantitatif pour comparer la fragmentation de l'ADN dans ces conditions. Nous avons décidé de doser la fragmentation de l'ADN en utilisant un kit commercial basé sur le principe de l'ELISA.

3.3.2. *Etude des effets de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules 143B et 143B rho⁰ : dosage de la fragmentation de l'ADN par ELISA*

La détection de la fragmentation de l'ADN par ELISA se base sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'histone-H1 qui participe à la formation des nucléosomes. Cet anticorps fixé dans le fond d'un puit d'une plaque 96 puits va se lier aux nucléosomes présents dans les fragments d'ADN qui résultent du clivage internucléosomal de l'ADN. Ces fragments seront ensuite détectés grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'ADN double brin et une réaction colorimétrique. La discrimination entre le processus nécrotique et apoptotique, qui aboutissent tous deux à la dégradation de l'ADN, est possible lors de ce dosage puisque, lors de la nécrose, la dégradation de l'ADN se fait de façon aléatoire et les nucléosomes sont dégradés (Allen et al. 1997).

Le premier dosage a été réalisé sur des extraits préparés à partir de cellules 143B et 143B rho⁰ préalablement incubées pendant 16 h en présence de staurosporine à 100 nM. Les résultats présentés à la figure 3.5 montrent premièrement qu'en absence d'incubation avec la staurosporine, la fragmentation basale de l'ADN dans les cellules 143B rho⁰ est plus élevée que dans les cellules parentales.

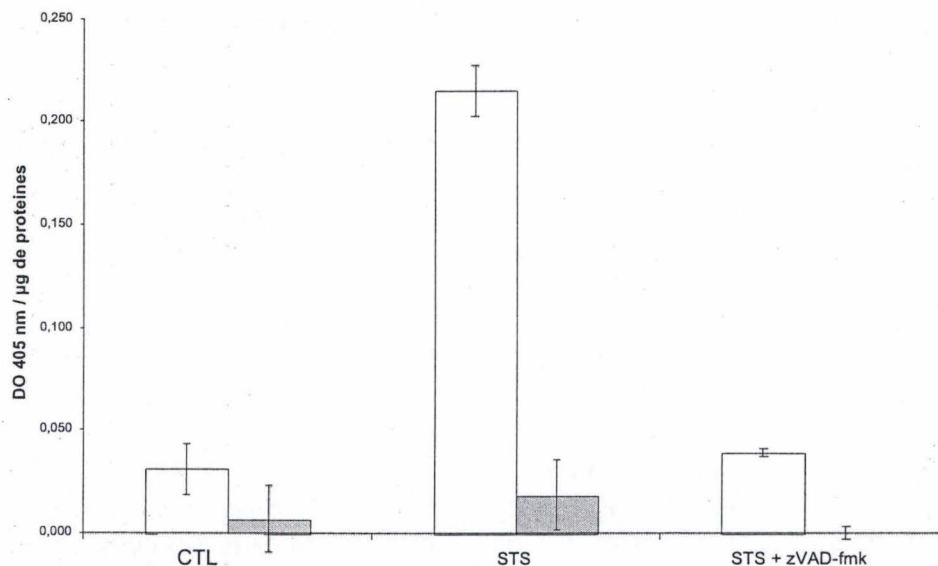


Figure 3.6 : Effet du zVAD-fmk sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans les cellules 143B (en blanc) et 143B rho⁰ (en gris). Des cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées ou non (CTL) pendant 16 h avec de la staurosporine à 100 nM en présence (STS + zVAD-fmk) ou non (STS) de zVAD-fmk à 5 µM. Le dosage de la fragmentation a été réalisé grâce au kit « Cell Death Detection ELISA » et est présenté ici comme valeurs d'absorbance normalisées par les quantités de protéines engagées dans le dosage. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3.

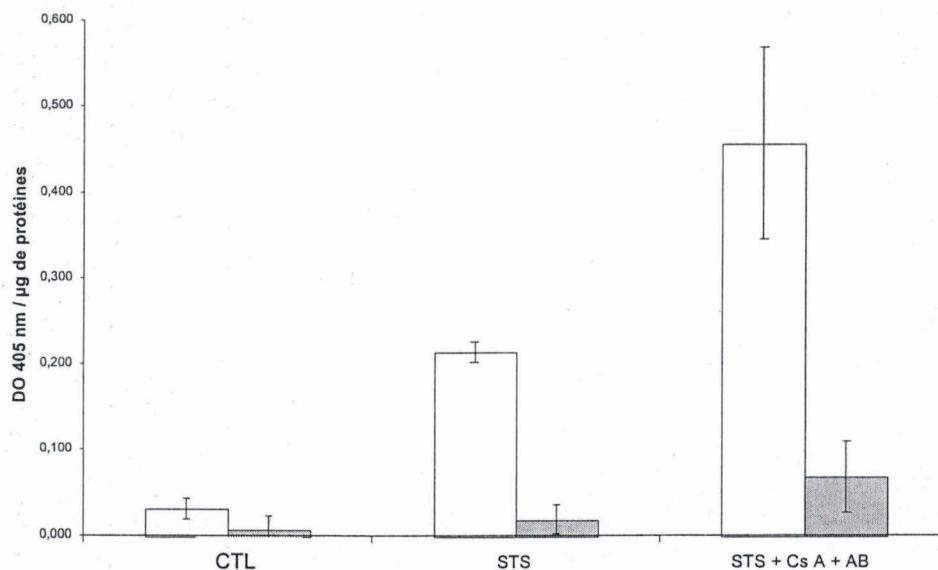


Figure 3.7 : Effet de la cyclosporine A et l'acide bongkrékique sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans les cellules 143B (en blanc) et 143B rho⁰ (en gris). Des cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées ou non (CTL) durant 16 h avec de la staurosporine à 100 nM en présence (STS + Cs A + AB) ou non (STS) de cyclosporine A à 100 nM et d'acide bongkrékique à 10 µM. Le dosage de la fragmentation a été réalisé grâce au kit « Cell Death Detection ELISA » et est présenté ici comme valeurs d'absorbance normalisées par les quantités de protéines engagées dans le dosage. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3.

Par contre, après une stimulation de 16 h avec la staurosporine, la fragmentation de l'ADN est plus importante dans les cellules 143B que dans les cellules déplétées en ADN_{mt}. Ces résultats suggèrent que les cellules 143B rho⁰ sont plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine que les cellules parentales. Ces observations sont en accord avec nos premiers résultats portant sur l'observation de la morphologie des cellules incubées en présence de staurosporine (figure 3.3) et des données de la littérature portant sur des SK-Hep1 rho⁰. En effet, Park et collaborateurs, montrent que ces cellules sont plus résistantes à l'apoptose induite par le paraquat (une molécule qui génère des ROS) et expliquent cette résistance par une sur-expression de la MnSOD (Park et al., 2004). Par contre, ces résultats vont à l'encontre des données de Liu et son équipe qui montrent que les cellules 143B déplétées en ADN_{mt} sont plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine à une concentration de 100 nM (Liu et al., 2004). Nous n'avons pas d'arguments pour tenter d'expliquer ces résultats contradictoires.

La relativement faible concentration en staurosporine utilisée dans cette expérience a été choisie volontairement afin de permettre la mise en évidence d'une sensibilité différente des deux lignées cellulaires à l'apoptose.

Après avoir montré que les deux lignées cellulaires répondaient différemment à un traitement à la staurosporine, nous avons voulu tenter de mettre en évidence les mécanismes potentiellement impliqués dans l'apoptose induite par la staurosporine dans les cellules 143B et déplétées en ADN_{mt}. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur général des caspases et des inhibiteurs de l'ouverture du PTP et avons recherché leur effet éventuel sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine.

3.3.2.1. Effet du zVAD-fmk sur l'induction de l'apoptose par la staurosporine : l'implication des caspases

Afin de vérifier l'implication éventuelle des caspases dans le processus apoptotique induit par la staurosporine dans les cellules 143B et 143B rho⁰, nous avons utilisé un inhibiteur global de ces protéases décrit dans la littérature, le zVAD-fmk (ou benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp-fluorométhylketone). Cette molécule qui inhibe de nombreuses caspases en se liant au site actif de l'enzyme est donc non spécifique et ne permet pas de cibler une caspase particulière (Peter et al., 2003; Slee et al., 1996). Les cellules ont donc été incubées avec la staurosporine à 100 nM en présence ou en absence de l'inhibiteur à 5 µM. Au terme des incubations le dosage de la fragmentation de l'ADN génomique a été réalisé en utilisant le kit de dosage « Cell Death Detection ELISA » (Roche).

Les résultats montrés à la figure 3.6 indiquent une forte diminution de l'augmentation de la fragmentation de l'ADN (et donc de l'apoptose) induite par la staurosporine dans les cellules 143B et 143B rho⁰ incubées en présence de zVAD-fmk. Ces résultats montrent que l'induction de l'apoptose par la staurosporine est dépendante d'une voie d'activation de caspases. Ajoutons encore que la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans les cellules 143B rho⁰ est très faible, ce qui renforce l'idée que ces cellules sont plus résistantes à l'apoptose induite par cette molécule que les cellules parentales 143B.

Il serait intéressant, dans des expériences futures, d'identifier la ou les caspases réellement impliquée(s) dans l'apoptose induite par la staurosporine en utilisant des inhibiteurs de caspases plus spécifiques tels que le Ac-DEVD-CHO qui est connu pour inhiber spécifiquement la caspase-3 (Yao et al., 2003).

3.3.2.2. Effet de la cyclosporine A et de l'acide bongkrélique sur l'induction de l'apoptose par la staurosporine : l'implication du PTP

Afin de tester l'implication éventuelle du PTP (Permeability Transition Pore) lors de l'apoptose induite par la staurosporine dans les cellules 143B et 143B rho⁰, nous avons utilisé deux molécules inhibant l'ouverture de ce pore transitoire : la cyclosporine A et l'acide bongkrélique. Ces molécules agissent par des mécanismes différents sur l'ouverture du PTP, respectivement en se liant à la cyclophiline D au niveau du feuillet interne mitochondrial et à l'ANT. L'acide bongkrélique est connu pour inhiber l'ANT en augmentant la liaison de l'ATP et de l'ADP au transporteur en agissant du côté matriciel de celui-ci (Chua et al., 1977; Stoner et al., 1973). La cyclosporine A est, quant à elle, connue pour inhiber le PTP en interagissant directement avec la cyclophiline D (Chen et al., 2002).

Pour rappel, le PTP est un complexe multi-protéines (composé de l'ANT, VDAC, l'hexokinase, la créatine kinase, le récepteur périphérique aux benzodiazépines et la cyclophiline D) qui formerait un pore aspécifique perméable aux protéines d'une poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa (Skulachev, 2002). L'ouverture du PTP, qui peut être modulée par les protéines de la famille Bcl-2, et le déséquilibre ionique qui s'en suit engendreraient une entrée d'eau massive dans la matrice mitochondriale conduisant au gonflement de l'organite, à l'augmentation de la perméabilité de ses membranes et enfin à la libération des protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, impliqué dans la formation de l'apoptosome (Apaf-1, cytochrome c et pro-caspase-9) et l'activation de la cascade de caspases.

Les résultats obtenus pour la fragmentation de l'ADN dans ces conditions et présentés à la figure 3.7 montrent que la combinaison de l'acide bongkrélique à 10 μ M et de la cyclosporine A à 100 nM n'inhibe pas l'apoptose induite par la staurosporine et semble même amplifier la fragmentation dans les deux lignées cellulaires étudiées. Cet effet, bien que difficilement explicable, pourrait être dû à l'action de la cyclosporine A qui a été décrite comme capable d'induire la production de ROS dans des cellules dérivées de cellules cardiaques, et ce déjà à une concentration de 100 nM (Chen et al., 2002). La staurosporine induit, notamment l'apoptose en augmentant la production cellulaire des espèces dérivées de l'oxygène. La surproduction de ROS dans les cellules incubées avec la cyclosporine A pourrait alors expliquer une fragmentation plus importante de l'ADN et donc une induction de l'apoptose plus importante et ce, malgré l'inhibition du PTP. Les ROS sont en effet capables d'induire une augmentation de la perméabilité membranaire dans les compartiments sub-cellulaires tels que les mitochondries en oxydant les phospholipides membranaires qui seront ensuite dégradés par la phospholipase A2 (Chen et al., 2002). Ajoutons encore que dans le même « background » cellulaire, il a été montré que la staurosporine induit une diminution (et non une augmentation) de la perméabilité de la MME médiée par une fermeture de VDAC et provoque une hypersensibilité de la MME à la digitonine, suggérant un changement dans l'organisation et/ou la composition des lipides de la membrane mitochondriale (Duan et al., 2003). De plus, la cyclosporine A est connue pour être un inhibiteur de la calcineurine qui pourrait avoir un rôle protecteur contre l'apoptose (Lotem et al., 1998). Il faut aussi noter que nous n'avons pas réalisé d'expériences préliminaires visant à déterminer les concentrations optimales en acide bongkrélique et en cyclosporine A, choisies dans cette expérience sur base des données de la littérature. Les concentrations utilisées dans cette expérience ne sont donc peut être pas suffisantes pour entraîner l'inhibition de l'ouverture du PTP. Il serait intéressant

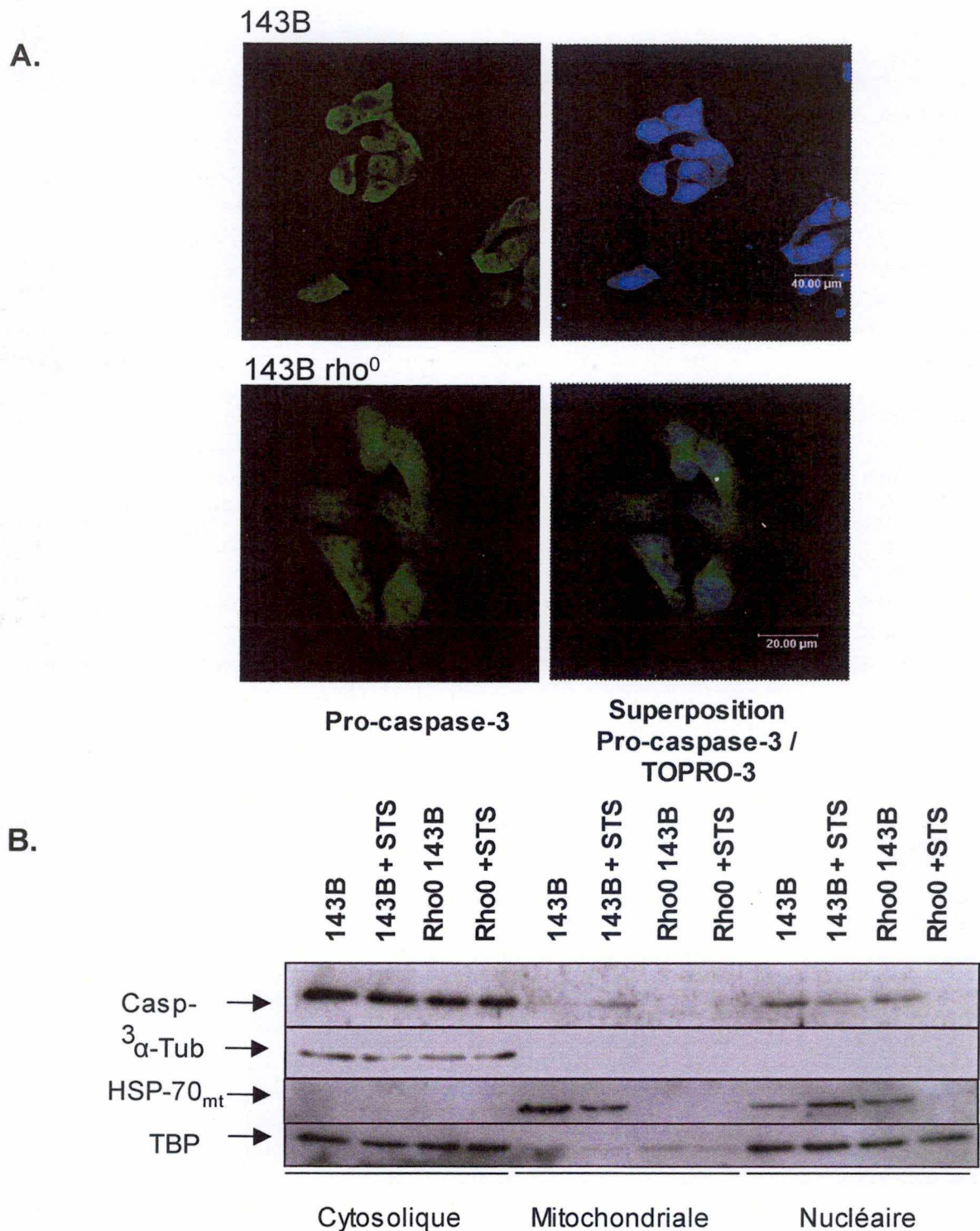


Figure 3.8 : (A.) Marquage en immunofluorescence suivi d'une observation en microscopie confocale et (B.) analyse en western blot de l'abondance et de la localisation de la pro-caspase-3 : A. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ensemencées sur des couvres objets à raison de 50000 cellules par puits dans une boîte 24 puits ont été fixées à la PFA 4% et perméabilisées au TRITON X-100 avant d'être marquées par un anticorps primaire de lapin anti-pro-caspase-3 révélé par un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa-488. Un contre marquage au TOPRO-3 a été réalisé afin de visualiser les noyaux. B. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées (+ STS) ou non durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM. 25 µg de protéines provenant des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires obtenues par centrifugations différentielles sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 12 %) pour réaliser le Western blot. Des contrôles de charge ont été réalisés par l'immunodétection de l' α -tubuline, d'HSP-70_{mt} et de la TBP.

de recommencer cette expérience avec des concentrations plus élevées en acide bongkréique et/ou en cyclosporine A.

Après avoir analysé la fragmentation de l'ADN dans ces différentes conditions, nous avons décidé d'étudier plus en détails l'abondance, la localisation et l'activité de la caspase-3. Cette enzyme est souvent un indicateur plus précoce de l'entrée des cellules en apoptose (Allen et al. 1997). Cette approche nous a permis de mieux préciser certains mécanismes susceptibles de conférer une plus grande résistance des cellules 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine.

3.4. Abondance, localisation et activité de la caspase-3 dans des cellules 143B et 143B rho⁰ incubées en présence de staurosporine

Une seconde manière d'évaluer le déroulement de l'apoptose, à un stade plus précoce que celui de la fragmentation de l'ADN, est d'étudier l'activation des caspases. Ces protéases sont à l'origine des changements morphologiques et de la dégradation de l'ADN observés lors de l'apoptose. En effet, elles comptent parmi leurs substrats des protéines du cytosquelette telles que l'actine et la β -caténine ainsi que la protéine DFF45/iCAD qui, en conditions normales, inhibe l'enzyme DFF40/CAD responsable du clivage internucléosomal de l'ADN (Wolf et al., 1999).

L'activation des caspases est bien sûr dépendante de leur activation par les complexes protéiques tels que l'apoptosome mais est également fonction de leur localisation et de leur abondance dans la cellule. Dans ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur l'activité, l'abondance et la localisation de la caspase-3 lors de la réponse apoptotique de cellules 143B et 143B rho⁰ induite par la staurosporine en raison du fait que cette protéase est connue pour jouer un rôle effecteur majeur dans l'apoptose (Philchenkov, 2004).

3.4.1 Analyse de l'abondance relative et de la localisation subcellulaire de la caspase-3 par Western Blot et marquages en immunofluorescence.

Afin d'analyser les abondances relatives de la caspase-3 dans les cellules 143B et 143B rho⁰, nous avons premièrement réalisé un marquage en immunofluorescence des cellules 143B et 143B rho⁰ avec un anticorps dirigé contre la forme non clivée de la protéine (procaspase-3) (figure 3.8a). On observe une localisation nucléaire et cytosolique de la caspase-3 dans les deux lignées cellulaires mais pas de différence dans l'abondance comme le montrent les intensités de fluorescence du marquage dans ces cellules.

Dans une deuxième approche, dans le but d'analyser l'abondance et la localisation subcellulaire de la caspase-3 dans les cellules et d'étudier des changements éventuels dans les cellules en réponse à un traitement à la staurosporine, nous avons réalisé un Western blot sur des fractions enrichies en protéines cytosoliques, mitochondriales et nucléaires (obtenues par des centrifugations différentielles) préparées à partir des deux lignées cellulaires préalablement incubées pendant 4 h en présence de staurosporine à 500 nM. L'immunodétection de l'enzyme a été réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre les formes active et inactive de la caspase-3.

Les résultats du Western blot présentés à la figure 3.8b montrent une localisation principalement cytosolique et nucléaire, de la caspase-3. L'enzyme n'est pas (ou peu)

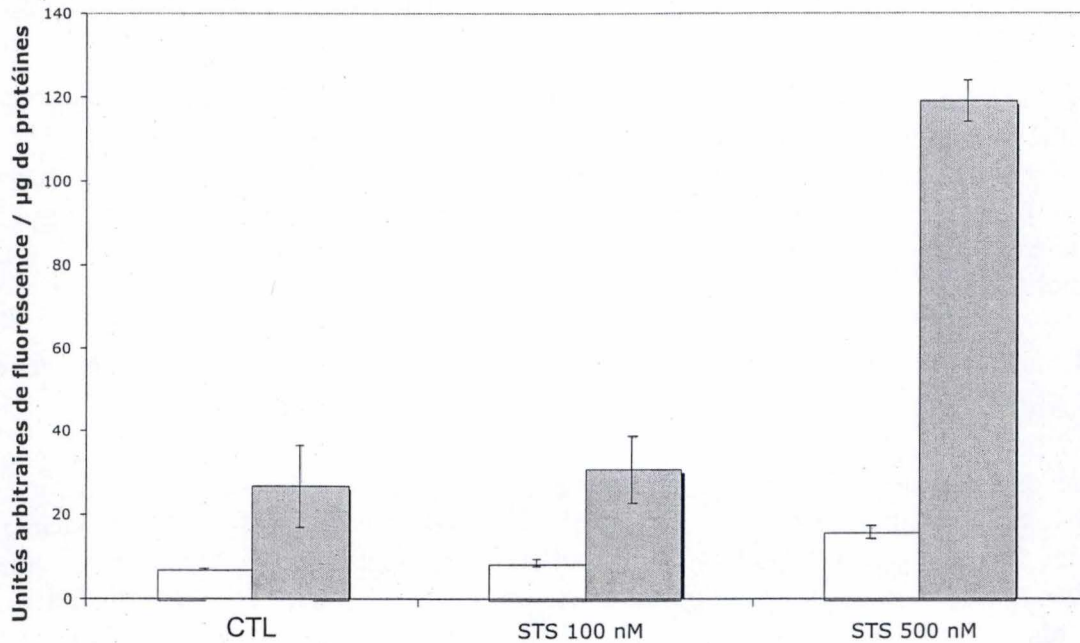


Figure 3.9 : Effet de la staurosporine sur l'activité de la caspase-3 dans des cellules 143B (en blanc) et 143B rho⁰ (en gris). Des cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées durant 4 h sans (CTL) ou avec de la staurosporine à 100 nM ou 500 nM. Le dosage de l'activité de la caspase-3 est effectué en présence d'un substrat synthétique spécifique de l'enzyme, l'Ac-DEVD-AFC. Les intensités de fluorescence sont normalisées par la quantité de protéines engagée dans le dosage et exprimées en unités arbitraires de fluorescence par µg de protéines. Les résultats présentés sont exprimés comme la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3.

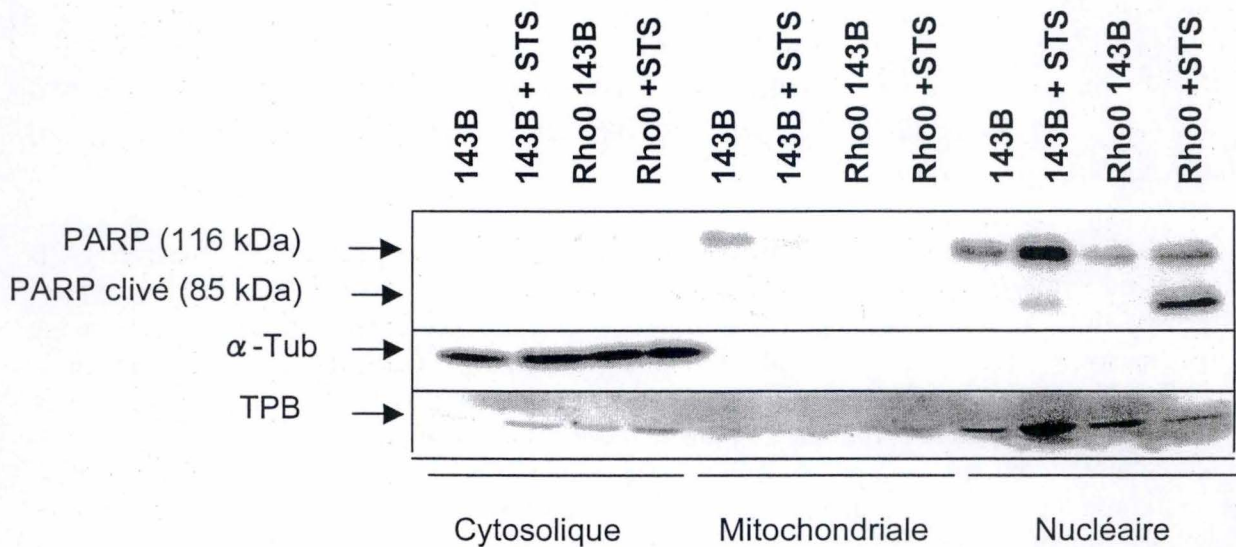


Figure 3.10 : Analyse de l'abondance et de la localisation des protéines PARP-1 et PARP-1 clivée dans différentes fractions sub-cellulaires obtenues par centrifugations différentielles de cellules 143B et 143B rho⁰. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées (+ STS) ou non durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM. 30 µg de protéines pour les fractions cytosoliques et mitochondriales et 15 µg de protéines pour la fraction nucléaire sont ensuite chargées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 12 %) pour réaliser les Western blot. Des contrôles de charge ont été réalisés par l'immunodétection de l'α-tubuline et de la TBP.

délectable dans les fractions mitochondriales sauf dans la condition des cellules 143B incubées en présence de staurosporine. Cette localisation nucléaire de la pro-caspase-3 a déjà été décrite dans d'autres modèles cellulaires d'apoptose (Feng et al., 2005). On peut également constater que l'abondance de la caspase-3 est comparable dans les deux lignées cellulaires et ce, quelque soit la fraction considérée. De plus, une incubation de 4 h avec de la staurosporine 500 nM ne semble modifier ni l'abondance ni la localisation de l'enzyme. Remarquons toutefois que nous obtenons une légère diminution et une disparition complète du signal correspondant à la forme inactive de la caspase-3 respectivement dans la fraction nucléaire des cellules 143B et 143B rho⁰ traitées par la staurosporine et qu'il est décrit que le clivage (et donc l'activation de l'enzyme) se manifeste par une réduction de la forme inactive ou pro-caspase (Zhang et al., 2004b). Nous devons cependant ajouter que seule la forme inactive (36 kDa) a été détectée dans nos conditions expérimentales.

Il faut noter que, sur base des contrôles de charge choisis pour leur spécificité quant à leur localisation dans les fractions cytosolique (α -tubuline), mitochondriale (HSP-70_{mt} ou Heat Shock Protein-70 mitochondriale) et nucléaire (TBP ou Tata-Box Binding Protein), on observe une contamination de la fraction nucléaire par la fraction mitochondriale et de la fraction cytosolique par la fraction nucléaire. Il est donc difficile d'interpréter ces résultats et de tirer des conclusions fiables sur l'abondance relative et la localisation subcellulaire de la pro-caspase-3.

Après avoir étudié l'abondance relative et la localisation de la pro-caspase-3 dans les cellules 143B et 143B rho⁰ et l'influence éventuelle que pouvait avoir une incubation des cellules pendant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM, et n'ayant pas pu détecter la forme active de la caspase-3 en Western blot, nous avons voulu doser l'activité de cette protéase.

3.4.1. Dosage de l'activité de la caspase-3

Ces dosages ont été réalisés en utilisant un substrat spécifique et synthétique de la caspase-3, le Ac-DEVD-AFC, qui a la particularité de libérer un groupement fluorescent (AFC) lorsqu'il est clivé par l'enzyme au site DEVD. Ces dosages ont d'abord été réalisés sur les deux lignées cellulaires étudiées incubées ou non pendant 4 h avec de la staurosporine à 100 ou 500 nM. Ensuite, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'activation des caspases induite par la staurosporine et plus particulièrement l'importance du calcium cytosolique libre dans les cellules, des dosages de l'activité de la caspase-3 ont été réalisés sur des lysats de cellules 143B préalablement incubées ou non avec la staurosporine en présence ou en absence d'ionomycine, un ionophore du calcium. Le même type de dosage a également été réalisé sur des lysats de cellules 143B rho⁰ incubées ou non avec la staurosporine en présence ou en absence de BAPTA-AM, un agent chélateur du calcium intracellulaire.

Les résultats présentés à la figure 3.9 montrent que l'activité de la caspase-3 dans les cellules contrôles est légèrement plus élevée dans les cellules 143B rho⁰. La population de cellules déplétées en ADN_{mt} devrait donc présenter un taux de cellules apoptotiques légèrement plus élevé que la population de cellules parentales. Si ces données sont en accord avec les résultats que nous avons obtenus lors du dosage de la fragmentation de l'ADN (figure 3.5) qui montrent une fragmentation plus importante de l'ADN dans les cellules 143 rho⁰, elles ne sont pas obtenues de manière reproductible (figure 3.6). Lorsque les cellules sont incubées durant 4 h avec de la staurosporine à 100 nM, on remarque que l'activité de la caspase-3 n'est pas augmentée et ce, quelque soit la lignée cellulaire considérée (figure 3.9). Ces résultats ne sont pas corrélés aux données obtenues pour le dosage de la fragmentation de l'ADN. En effet, à

cette concentration en staurosporine, la fragmentation de l'ADN était fortement augmentée dans les cellules 143B qui montrent également une plus forte sensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine. Si la fragmentation de l'ADN est dépendante de l'activation de caspases comme le suggère les résultats d'inhibition totale obtenus en présence de l'inhibiteur des pancaspases (zVAD-fmk), soulignons que d'autres caspases effectrices telles que les caspases-6 et -7 peuvent également conduire à la fragmentation de l'ADN en réponse à une condition apoptogène (Philchenkov et al. 2004). Il serait d'ailleurs impératif de doser l'activité de ces caspases dans les cellules 143B et 143B ρ^0 incubées en présence de staurosporine et de rechercher leur implication éventuelle dans la fragmentation de l'ADN induite dans ces conditions en testant l'effet d'inhibiteurs spécifiques ciblant chacune de ces caspases. Enfin, on constate qu'en présence d'une concentration plus forte en staurosporine (500 nM), la caspase-3 est plus fortement activée dans les cellules 143B ρ^0 (environ 4 fois contre 2 fois pour les cellules 143B). Ces résultats semblent montrer une plus forte sensibilité des cellules 143B ρ^0 à l'apoptose lorsque celle-ci est induite par de la staurosporine à 500 nM. Dans le futur, nous devons absolument compléter notre étude par un dosage de la fragmentation de l'ADN dans les deux lignées cellulaires préalablement incubées en présence de staurosporine à cette concentration et/ou après des temps plus courts d'incubation et par un dosage de l'activité de la caspase-3 après 16 h d'incubation (temps auquel le dosage de fragmentation a été réalisé). Cependant, le fait que la caspase-3 soit plus active dans les cellules déplétées en ADN_{mt} en présence de staurosporine à 100 nM, condition pour laquelle la fragmentation est plus faible que celle déterminée dans les cellules 143B (caractérisée par une activité caspase-3 très faible dans ces conditions) nous permet de penser que la caspase-3 pourrait ne pas jouer un rôle majeur dans la fragmentation de l'ADN des cellules humaines d'ostéosarcome soumises à la staurosporine. Les expériences décrites ci-dessus couvrant toute la durée de l'incubation (16 h) devraient permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Pour confirmer les résultats obtenus pour l'activation de la caspase-3 dans les cellules incubées en présence de staurosporine, nous avons recherché l'abondance, la localisation et l'état de clivage de la protéine PARP-1, un substrat endogène de la caspase-3 bien connu. (Szabo, 1998). Pour vérifier l'activation de la caspase-3 *in situ*, nous avons donc réalisé un Western blot visant à rechercher les formes clivées et non clivées de PARP-1 sur des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires préparées à partir de cellules 143B et 143B ρ^0 préalablement incubées pendant 4 h en présence de staurosporine à 500 nM.

3.4.1.1. Visualisation de l'activité de la caspase-3 par le clivage d'un substrat endogène : la protéine PARP-1

Comme indiqué précédemment, la protéine PARP-1 joue un rôle important dans la réparation de l'ADN. En effet, en réponse à des dommages à l'ADN, cette enzyme se lie aux endroits de cassure, hydrolyse le NAD⁺ en nicotinamide et ADP-ribose pour transférer des polymères d'ADP-riboses sur de nombreuses protéines nucléaires dont PARP-1, des facteurs de transcription comme p53 et les protéines histones provoquant leur dissociation de l'ADN et permettant l'accès aux enzymes de réparation (Szabo, 1998). La protéine PARP-1 est l'un des nombreux substrats de la caspase-3 probablement parce que le rôle joué par PARP-1 dans la réparation de l'ADN est inutile dans les cellules en apoptose. De plus, l'activité de cette enzyme consomme de grandes quantités d'ATP, également nécessaire dans l'initiation de la réponse apoptotique pour la formation de l'apoptosome.

Le Western blot permettant de visualiser l'abondance des formes actives et clivées de PARP-1 réalisé sur des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires obtenues par

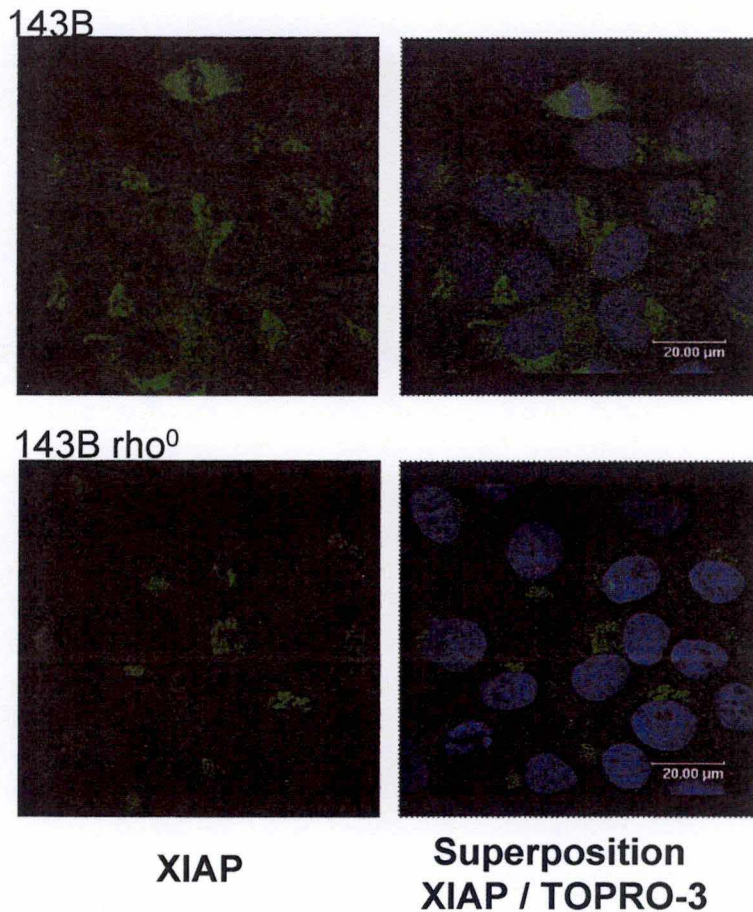


Figure 3.11 : Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de l'inhibiteur de caspases XIAP : Des cellules 143B et 143B rho⁰ ensemencées sur des couvres objets à raison de 50000 cellules par puits dans une boîte 24 puits ont été fixées à la PFA 4%, perméabilisées au TRITON X-100 avant d'être marquées par un anticorps primaire de souris anti-XIAP révélé par un anticorps de chèvre anti IgG de souris couplé à l'Alexa-488. Un contre marquage au TOPRO-3 a été réalisé afin de visualiser les noyaux.

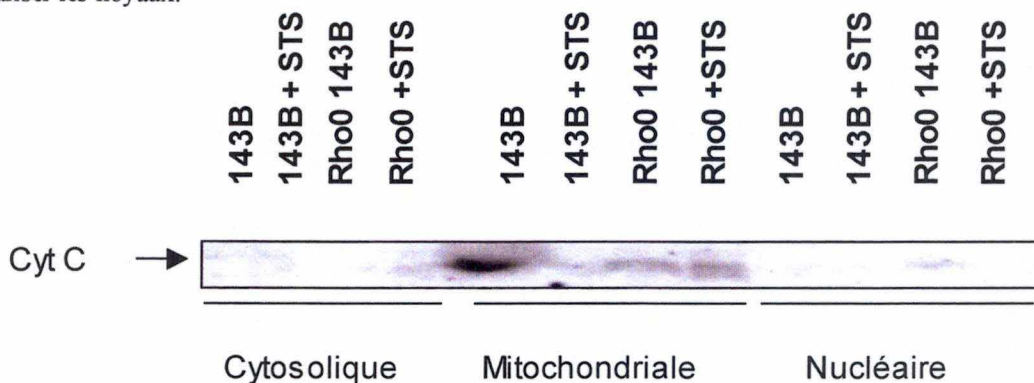


Figure 3.12 : Analyse de l'abondance du cytochrome c dans différentes fractions subcellulaires obtenues par centrifugations différentielles de cellules 143B et 143B rho⁰ préalablement incubées en présence de staurosporine. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées (+ STS) ou non durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM. 30 μg de protéines des fractions cytosoliques et mitochondriales et 15 μg de protéines de la fraction nucléaire sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 15 %) pour réaliser le Western blot.

centrifugations différentielles d'homogénats de cellules 143B et 143B rho⁰ préalablement incubées ou non en présence de staurosporine à 500 nM pendant 4 h est présenté à la figure 3.10. Nous pouvons observer une localisation essentiellement nucléaire de la protéine dans les deux lignées cellulaires. On constate également qu'elle est plus abondante dans les cellules 143B que dans les cellules déplétées en ADN_{mt} confirmant ainsi les résultats obtenus au niveau de l'expression du gène *ADPRT* analysée par la « DC Human General » (figure 3.1). De plus, la staurosporine semble induire une augmentation de l'abondance de PARP-1 et ce, dans les deux lignées cellulaires. Enfin, et comme attendu sur base des résultats de dosage de l'activité caspase-3, on constate que l'incubation des cellules avec la staurosporine à 500 nM provoque un clivage beaucoup plus important de la protéine PARP-1 dans les cellules 143B rho⁰ que dans les cellules parentales, ce qui confirme l'activation plus importante de la caspase-3 dans ces conditions.

Après avoir confirmé la plus forte activation de la caspase-3 dans les cellules 143B rho⁰ en réponse à la staurosporine et pour tenter d'expliquer ces activations différentes dans les deux lignées cellulaires, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait jouer les IAPs et plus particulièrement XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein), une protéine endogène capable d'inhiber les caspases.

3.4.1.2. Analyse de l'abondance et de la localisation de la protéine XIAP dans les cellules 143B et 143B rho⁰

Afin de prévenir une activation fortuite des caspases dans la cellule et de réguler finement la réponse apoptotique, la cellule possède des inhibiteurs endogènes de ces protéases connus sous le nom d'IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein). Leur activité inhibitrice s'exerce par une interaction physique entre la protéine IAP et la caspase cible qui est médiée par des domaines conservés BIR (Baculovirus IAP Repeat) présents sur les protéines IAPs. Cette liaison a été décrite pour inhiber, de manière compétitive, l'activité de la caspase-3 qui ne peut dès lors plus reconnaître et cliver ses substrats (Suzuki et al., 2001). Lors de l'induction de l'apoptose, les protéines Smac/DIABLO et Omi/HtrA2, localisées et séquestrées dans l'espace intermembranaire mitochondrial, peuvent être libérées en même temps que le cytochrome c et se lier aux IAPs, favorisant ainsi leur dégradation par le protéasome et libérant les caspases de leur inhibiteur (Martins et al., 2002).

Vu son rôle important dans le contrôle de l'activité des caspases, nous avons voulu observer l'abondance et la localisation de la protéine XIAP dans des cellules 143B et 143B rho⁰ par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale.

Les micrographies présentées à la figure 3.11 montrent une localisation principalement péri-nucléaire de la protéine XIAP dans les deux lignées cellulaires. On constate également que la protéine semble moins abondante dans les cellules 143B déplétées en ADN_{mt}.

Même s'il est nécessaire de confirmer ces observations par une autre approche telle que le Western blot, l'abondance moins importante de la protéine XIAP dans les cellules 143B rho⁰ est intéressante pour tenter d'expliquer d'une part, l'activité basale de la caspase-3 dans ces cellules (figure 3.9) et, d'autre part, la plus forte activation de la caspase-3 dans ces cellules en réponse à un traitement par la staurosporine. Rappelons que la staurosporine induit notamment l'apoptose en inhibant les kinases PKB et PKCs or, la protéine PKB/Akt (une Ser/Thr kinase en aval de la PI3-K) joue un rôle important dans la stabilisation de la protéine XIAP en la phosphorylant au niveau de la Ser 87. Cette phosphorylation empêche son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Dan et al., 2004). L'abondance plus

faible de XIAP ainsi que sa dégradation qui pourrait être facilitée par l'inhibition d'Akt en présence de staurosporine pourrait donc expliquer l'activation plus forte de la caspase-3 dans les cellules 143B rho⁰ lors de l'apoptose induite par la staurosporine. Cette hypothèse reste évidemment à confirmer.

En amont de l'activation de la caspase-3 on trouve bien souvent un événement de translocation du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. Une fois libéré le cytochrome c pourra participer à la formation de l'apoptosome avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9 et donc contribuer à l'activation des caspases effectrices comme la caspase-3 (Zimmermann et al., 2001).

3.5. La staurosporine et la translocation du cytochrome c

Nous avons ensuite tenté de mettre en évidence la libération du cytochrome c mitochondrial dans le cytosol de cellules 143B et 143 rho⁰ lors de leur incubation en présence de staurosporine. Pour cela, nous avons analysé l'abondance de la protéine par un Western blot réalisé sur des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires préparées à partir de cellules 143B et 143B rho⁰ incubées ou non pendant 4 h en présence de staurosporine à 500 nM.

Les résultats présentés à la figure 3.12 montrent une localisation mitochondriale de la protéine tant dans les cellules 143B que 143B rho⁰. Bien que n'ayant pas de contrôle de charge pour cette expérience, on constate, dans ces dernières, que la protéine est moins abondante que dans les cellules parentales. De plus, la staurosporine induit bien une diminution de l'abondance du cytochrome c dans la fraction mitochondriale des cellules 143B. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'augmentation de l'abondance de cette protéine dans la fraction cytosolique des cellules 143B incubées en présence de staurosporine. De plus, l'incubation des cellules 143B rho⁰ en présence de staurosporine ne semble pas entraîner de diminution de l'abondance du cytochrome c dans la mitochondrie mais ces résultats sont difficiles à discuter en absence d'un contrôle de charge approprié. Il est, pour ces raisons, difficile de tirer une conclusion quant à l'implication de la translocation du cytochrome c pour expliquer la variation de l'activité de la caspase-3 lors de l'incubation des cellules 143B et 143B rho⁰ en présence de staurosporine.

Si on regarde dans la littérature, de nombreuses études montrent que la délocalisation du cytochrome c en réponse à un traitement en présence de staurosporine est un phénomène attendu dans de nombreux types cellulaires (Duan et al. 2003) y compris les cellules déplétées en ADN_{mt} (Jiang et al. 1999). Cependant, si l'on considère la cinétique de ce changement et le nombre de cellules qui entrent en apoptose de manière non synchronisée lors du traitement, (Duan et collaborateurs ont montré que seulement 10 à 15 % de cellules d'une population de 143B montrent une délocalisation du cytochrome c après 4 h de traitement en présence de 1 µM en staurosporine (Duan et al. 2003)), il est raisonnable de penser que le moment choisi pour rechercher la libération du cytochrome c soit trop précoce que pour pouvoir mettre en évidence la modification de la localisation du cytochrome c. L'analyse sur une cinétique complète et en présence de plusieurs concentrations en staurosporine est à envisager. Si l'absence de détection du cytochrome c dans les fractions cytosoliques est causée par un manque de sensibilité de la technique utilisée, les résultats obtenus sur l'activation de la caspase-3 dans des cellules 143B rho⁰ incubées avec la staurosporine pendant 4 h (dont on n'est pas certains qu'elle représente l'activation maximale que l'on peut attendre pour des temps plus longs) sont réconciliables avec une éventuelle libération de cytochrome c

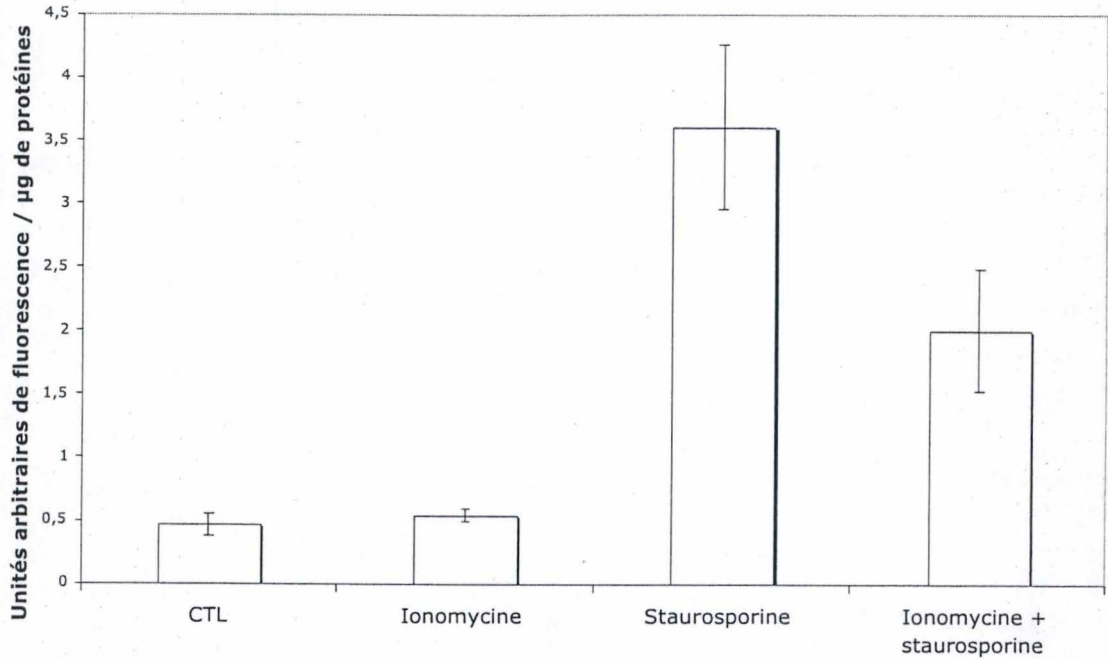
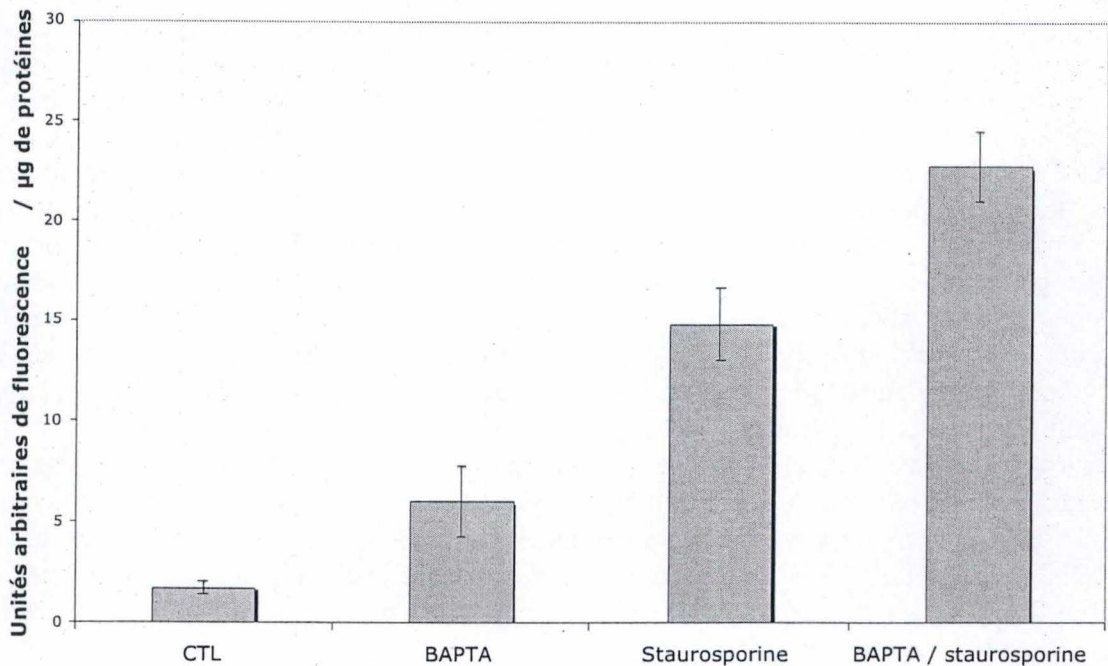
A.**B.**

Figure 3.13 : (A.) Effet de l'ionomycine sur l'activité de la caspase-3 induite par la staurosporine dans les cellules 143B. (B.) Effet du BAPTA-AM sur l'activité de la caspase-3 induite par la staurosporine dans les cellules 143B rho⁰. A. Des cellules 143B ont été incubées ou non (CTL) durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM en présence ou non d'ionomycine à 1 µM. B. Des cellules 143B rho⁰ ont été incubées ou non (CTL) durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM en présence ou non de BAPTA-AM à 20 µM. Le dosage de la caspase-3 est effectué en présence d'un substrat synthétique spécifique de l'enzyme, l'Ac-DEVD-AFC. Les intensités de fluorescence sont normalisées par la quantité de protéines engagée dans le dosage et exprimées en unités arbitraires de fluorescence par µg de protéines. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3.

suffisante pour initier le programme apoptotique dans une fraction de la population cellulaire mais insuffisante que pour pouvoir la détecter par l'approche utilisée. En Western blot, cette délocalisation du cytochrome c n'est d'ailleurs souvent visible que pour des temps de 6 à 16 h d'incubation en présence de staurosporine (Liu et al. 2004)(Duan et al. 2003)(Zhang et al. 2004).

Pour continuer notre investigation sur les mécanismes potentiellement responsables de la différence de sensibilité à l'apoptose des deux lignées cellulaires étudiées et vu l'importance supposée du Ca^{++} dans le processus apoptotique déclenché par la staurosporine, nous avons étudié les effets de modifications de la concentration en calcium intracellulaire sur l'activité de la caspase-3 et son activation induite par la staurosporine. En effet, rappelons nous que les cellules déplétées en ADN_{mt} ont une concentration en calcium cytosolique libre plus élevée que les cellules parentales.

3.5.1 Le calcium et la caspase-3 : influence de l'ionomycine et du BAPTA-AM

La staurosporine est connue pour induire l'apoptose via différents mécanismes. Premièrement l'inhibition des PKB et PKC (Stoetzer et al., 2002; Thuret et al., 2003; Zhang et al., 2004a) qui sont, entre autres, des kinases responsables de la séquestration de la forme phosphorylée de la protéine pro-apoptotique Bad dans le cytosol médiée par la protéine 14-3-3 (Won et al., 2003). Deuxièmement, l'augmentation de la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Gil et al., 2003) qui provoquent la translocation du cytochrome c et des différentes protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol en déstabilisant les membranes mitochondriales. Troisièmement, la staurosporine conduit à l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique (Gil et al., 2003; Liu et al., 2004), capable d'activer différentes enzymes telles que la calpaïne, une protéase également capable d'induire l'activation des caspases (Neumar et al., 2003).

Comme il a été dit dans l'introduction, les cellules de mammifères présentant un dysfonctionnement mitochondrial suite à l'utilisation d'agents découplants, à la déplétion ou à des mutations dans leur ADN_{mt} ont une concentration en calcium cytosolique plus élevée provoquée par une diminution de l'import de l'ion dans la mitochondrie et/ou une réduction de son efflux dans le milieu extracellulaire altéré par la diminution de la production d'ATP (Amuthan et al., 2002; Biswas et al., 1999). Nous avons donc voulu tester l'effet de modifications de la concentration cytosolique en calcium sur l'activité de la caspase-3. Pour ce faire nous avons utilisé deux molécules perturbant l'homéostasie du calcium dans les cellules : l'ionomycine et le BAPTA-AM qui ont des effets inverses sur la concentration en calcium cytosolique libre.

L'ionomycine est un polyéther découvert dans les années 70 qui est connu comme un ionophore pour les cations divalents tels que le calcium (Kauffman et al., 1980). Nous avons utilisé cette molécule afin d'augmenter la concentration calcique cytosolique dans les cellules 143B et dosé l'activité de la caspase-3 en réponse à une stimulation à l'ionomycine en présence ou en absence de staurosporine. Les résultats présentés à la figure 3.13A montrent, qu'il n'y a pas d'augmentation de l'activité de la caspase-3 dans les cellules 143B en réponse à une incubation en présence d'ionomycine. Comme déjà montré précédemment, on constate bien une activation de la caspase-3 dans les 143B incubées pendant 4 h avec la staurosporine à 500 nM. Par contre, et de manière inattendue, l'activité de la caspase-3 est plus faible dans les cellules incubées en présence d'ionomycine et de staurosporine. Il semble donc que

l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique inhibe l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine 500 nM.

Afin de confirmer le rôle modulateur de la concentration en calcium sur l'activité de la caspase-3, nous avons utilisé le BAPTA-AM (ou 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), un agent chélateur du calcium intracellulaire (Jang et al., 2004) pour diminuer la concentration en calcium dans les cellules 143B rho⁰ dont la concentration en calcium est constitutivement plus élevée. On constate à la figure 3.11b que l'activité de la caspase-3 dans des cellules 143B rho⁰ incubées pendant 4 h en présence de BAPTA-AM augmente (environ trois fois). Nous confirmons également bien la forte augmentation de l'activité de la caspase-3 obtenue dans des cellules rho⁰ induite par la staurosporine. De plus, nous montrons qu'en présence de BAPTA-AM, l'augmentation de l'activité de la caspase-3 induite par la staurosporine est plus importante que l'activation observée pour une incubation en présence de staurosporine seule. Ces résultats renforcent l'idée d'un effet protecteur du Ca⁺⁺ sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine bien que le mécanisme ne soit pas établi à ce stade du travail.

Bien que ces résultats semblent à première vue surprenants quand on connaît le rôle pro-apoptotique d'une élévation de la concentration en calcium dans la cellule, il a déjà été montré dans la littérature que le calcium pouvait protéger de l'apoptose. Ainsi, dans les cellules neuronales, l'apoptose qui fait suite à la privation de facteurs de croissances peut être inhibée par l'élévation de la concentration en Ca⁺⁺ cytosolique (Franklin et al., 1992; Lampe et al., 1995). Cette inhibition du déclenchement de l'apoptose par le Ca⁺⁺ intracellulaire pourrait être le résultat de la modification de l'activité de diverses enzymes et/ou facteurs de transcription. Ainsi, le calcium intracellulaire activerait la calcineurine, une Ser/Thr phosphatase (Lotem et al., 1998). La calcineurine est connue pour avoir des effets pro- et anti-apoptotiques en fonction du « background » cellulaire et de l'activation de différentes voies de signalisation telle que la p38 MAPK (Gidon-Jeangirard et al., 1999; Kakita et al., 2001; Molkenin, 2001). Le Ca⁺⁺ libre cytosolique permettrait également l'activation de la voie de la PKB/Akt. La protéine PKB/Akt activée entraînent la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad qui est alors séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3 (Gidon-Jeangirard et al., 1999; Won et al., 2003). De plus, l'augmentation de la concentration en Ca⁺⁺ cytosolique pourrait entraîner la dégradation de l'inhibiteur I_κB et permettre l'activation du facteur de transcription NFκB, connu pour son rôle anti-apoptotique (Lotem et al., 1998; Papa et al., 2004).

Enfin, connaissant le mécanisme d'action de la staurosporine qui implique l'inhibition de PKC dont certaines isoformes sont activées par le calcium, il est également envisageable de considérer que la concentration plus élevée en calcium libre dans le cytosol des cellules 143B rho⁰ confère une résistance à l'induction de l'apoptose par la staurosporine en diminuant l'effet inhibiteur de la staurosporine sur les PKCα/β sensibles au calcium.

Après avoir analysé la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3 utilisées comme marqueurs de l'apoptose induite par la staurosporine dans les cellules 143B et 143B rho⁰, nous avons tenté d'approfondir les mécanismes impliqués dans les réponses cellulaires en étudiant les variations d'abondance et de localisation de plusieurs protéines de la famille Bcl-2 connues pour leur rôle pro- ou anti-apoptotique. Nous avons donc réalisé des marquages en immunofluorescence afin de rechercher des différences éventuelles de l'abondance et de la localisation de ces protéines dans les deux lignées cellulaires. Des analyses en Western blot sur des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires de cellules 143B et 143B rho⁰ préalablement incubées ou non en présence de staurosporine ont

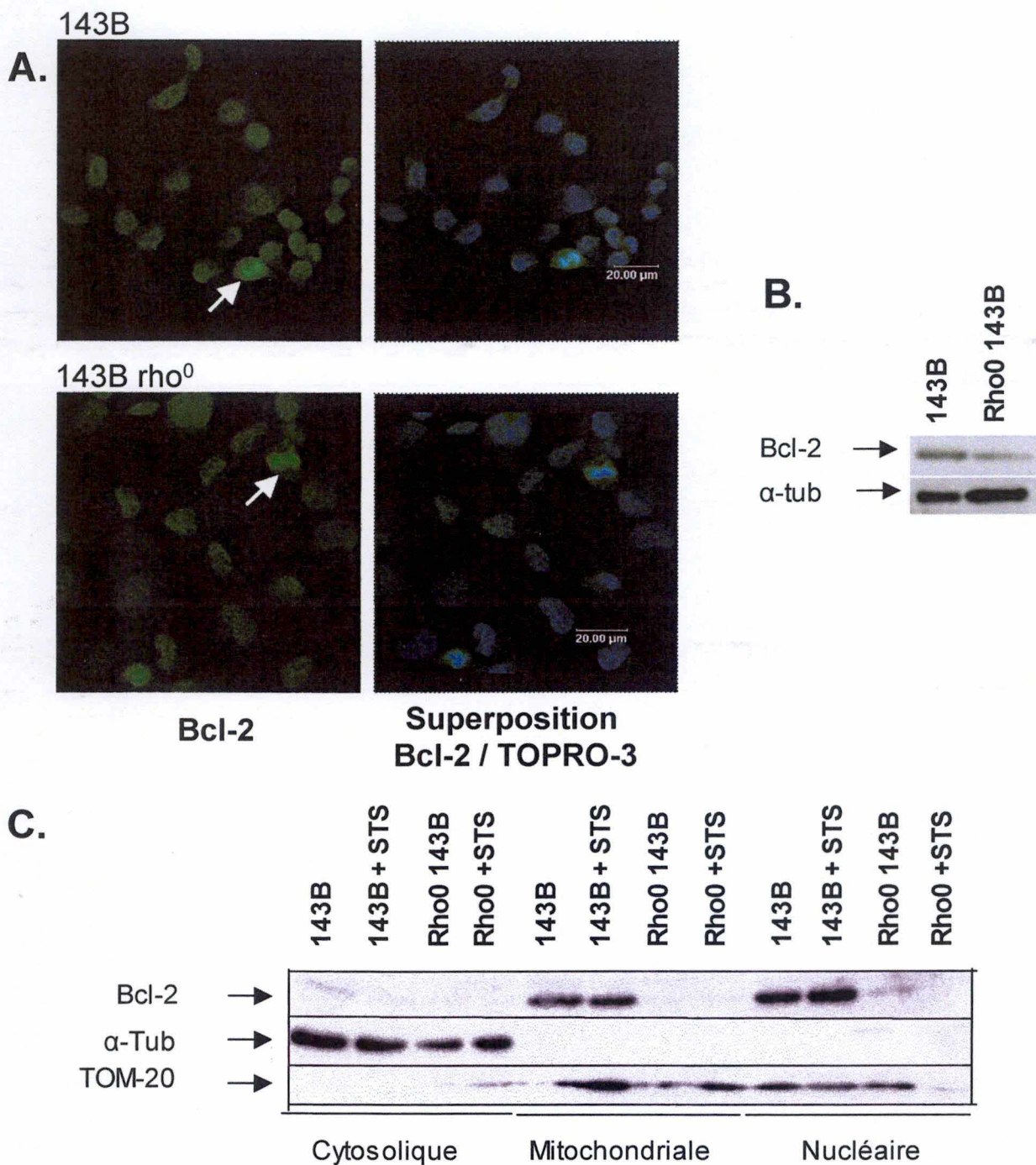


Figure 3.14 : (A.) Marquage en immunofluorescence suivi d'une visualisation en microscopie confocale et (B. et C.) analyse en Western blot de l'abondance et de la localisation de la protéine Bcl-2 : A. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ensemencées sur couvre-objets à raison de 50000 cellules par puits dans une boîte 24 puits ont été fixées à la PFA 4% et perméabilisées au TRITON X-100 avant d'être marquées par un anticorps primaire de souris anti-Bcl-2 révélé par un anticorps de chèvre anti IgG de souris couplé à l'Alexa-488. Un contre marquage au TOPRO-3 a été réalisé afin de visualiser les noyaux. Les cellules en division sont indiquées par une flèche. B. Analyse de l'abondance de la protéine Bcl-2 en Western blot réalisé sur des extraits totaux de cellules 143B et 143B rho⁰. Le contrôle de charge a été réalisé par immunodétection de l' α -tubuline. C. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées (+ STS) ou non durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM. 30 μ g de protéines des fractions cytosoliques et mitochondriales et 15 μ g de protéines de la fraction nucléaire sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 12 %) pour réaliser le western blot. Des contrôles de charge ont été réalisés par immunodétection de l' α -tubuline et de TOM 20.

également été réalisées afin de rechercher des modifications dans l'abondance et la localisation de ces protéines en réponse à la molécule apoptogène.

3.6. Localisation et 'abondance de différentes protéines pro- ou anti-apoptotiques dans les cellules 143B et 143B rho⁰ : influence de la staurosporine

Vu leur rôle clef dans la régulation de l'apoptose, nous avons également étudié, dans ce travail, l'abondance ainsi que la localisation de divers membres de la famille Bcl-2 dans les cellules 143B et 143B rho⁰. De plus, nous avons recherché l'effet d'un traitement des cellules à la staurosporine sur ces deux caractéristiques. Parmi les membres de cette famille, nous avons sélectionné les protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-X_L comme protéines anti-apoptotiques et Bax comme protéine pro-apoptotique.

3.6.1. Localisation et abondance des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 exercent leur action inhibitrice sur l'apoptose en s'hétérodimérisant avec les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et empêchant leur oligomérisation (Zimmermann et al., 2001).

Le marquage en immunofluorescence de la protéine Bcl-2 présenté à la figure 3.14a montre une localisation cytoplasmique et nucléaire de la protéine. La protéine semble de plus s'accumuler dans les noyaux de cellules en division. L'analyse de l'abondance et de la localisation de Bcl-2 par Western blot réalisé sur des extraits totaux et présenté à la figure 3.14b montre que la protéine Bcl-2 est moins abondante dans les cellules 143B déplétées en ADN_{mt} que dans les cellules parentales. Ce résultat est en accord avec le résultat obtenu pour l'analyse de l'expression de ce gène au niveau du transcrite réalisée à l'aide du damier à ADN « DC Human General ».

De plus, le Western blot présenté à la figure 3.14c montre une localisation mitochondriale et nucléaire de la protéine Bcl-2 pour les cellules 143B. Notons toutefois que les fractions nucléaires sont fortement contaminées par des mitochondries comme le montre l'immunodétection de Tom-20, un marqueur mitochondrial. Cependant, on constate bien une abondance beaucoup plus faible de la protéine dans les fractions mitochondriales et « nucléaires » préparées à partir de cellules 143B rho⁰. La préincubation des cellules avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 h ne modifie ni l'abondance, ni la distribution de la protéine.

La protéine Bcl-2 est connue pour son rôle protecteur contre l'apoptose qu'elle exerce notamment en interagissant avec les protéines pro-apoptotiques telles que Bax. Sa surexpression permet notamment d'inhiber la libération du cytochrome c dans le cytosol. Il a également été montré que la localisation nucléaire de Bcl-2 permet à cette protéine de modifier l'activité de certains facteurs de transcription comme les facteurs NFκB, AP-1, CREB et NFAT, qui pourrait être médiée par une inhibition de la translocation nucléaire comme démontré pour le facteur NFκB (Massaad et al., 2004). La localisation nucléaire de la protéine Bcl-2 n'est pas compatible avec sa fonction anti-apoptotique mitochondriale. L'abondance accrue de Bcl-2 dans le noyau des cellules en division est décrite dans la littérature et il semble que Bcl-2 joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Hoetelmans et al., 2003).

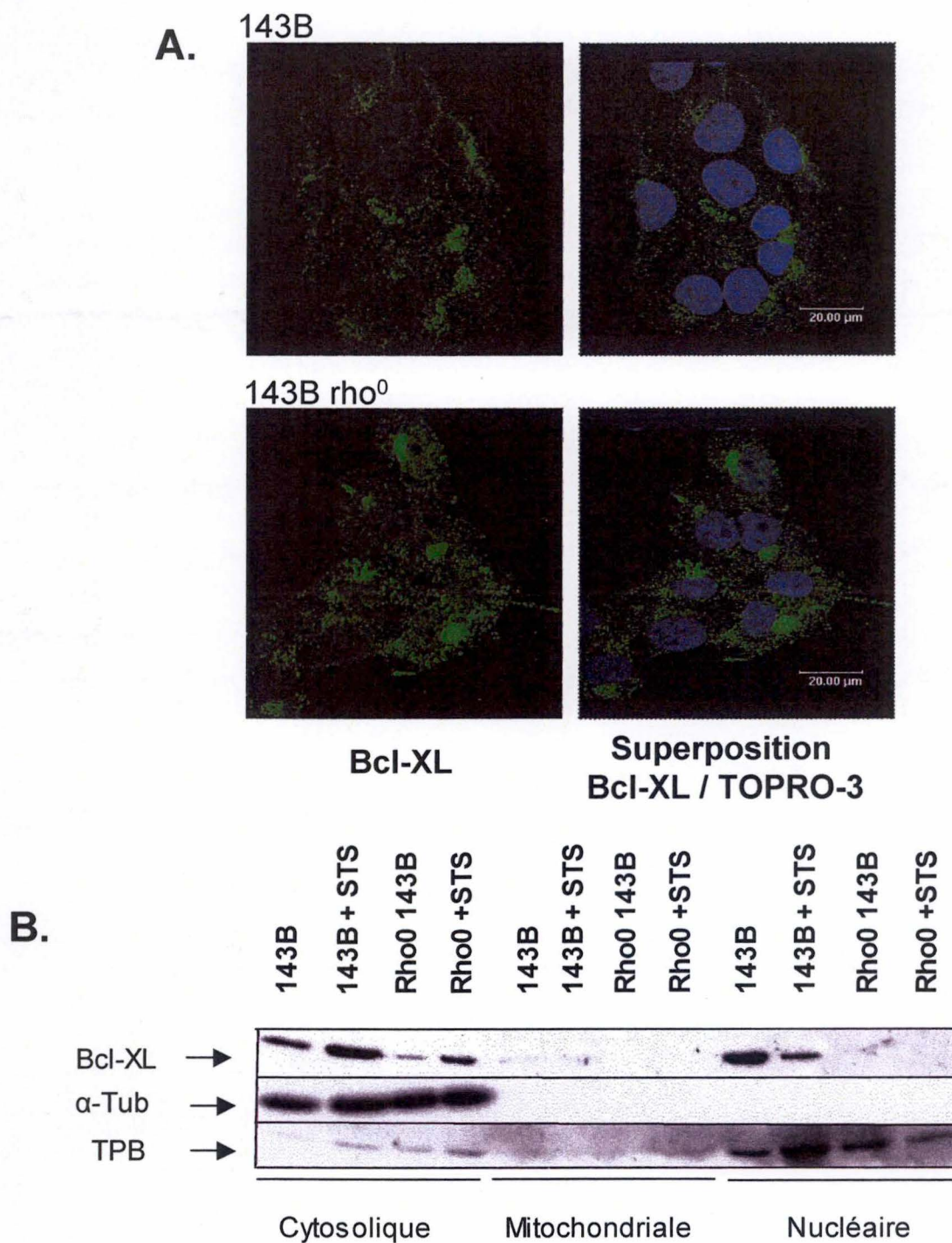


Figure 3.15 : (A.) Marquage en immunofluorescence suivi d'une visualisation en microscopie confocale et (B.) analyse en western blot de l'abondance et de la localisation de la protéine Bcl-XL : A. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ensemencées sur couvre-objets à raison de 50000 cellules par puits dans une boîte 24 puits ont été fixées à la PFA 4% et perméabilisées au TRITON X-100 avant d'être marquées par un anticorps primaire de souris anti-Bcl-XL révélé par un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à l'Alexa-488. Un contre marquage au TOPRO-3 a été réalisé afin de visualiser les noyaux. B. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM. 30 µg de protéines des fractions cytosoliques et mitochondriales et 15 µg de protéines de la fraction nucléaire sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 12 %) pour réaliser le western blot. Des contrôles de charge ont été réalisés par immunodétection de l'α-tubuline et de la TBP.

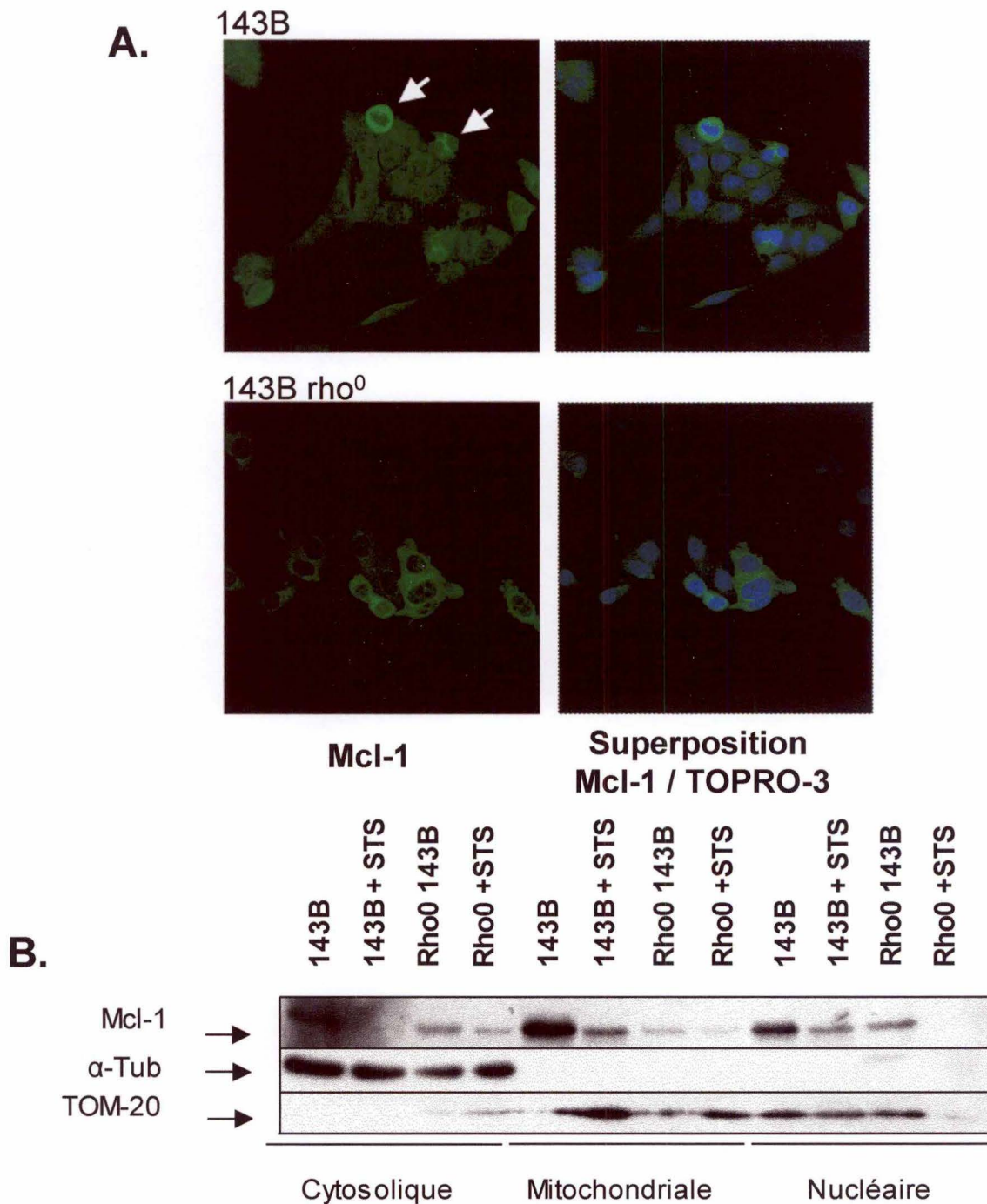


Figure 3.16 : (A.) Marquage en immunofluorescence suivi d'une visualisation en microscopie confocale et (B.) analyse en Western blot de l'abondance et de la localisation de la protéine Mcl-1 : A. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ensemencées sur couvre-objets à raison de 50000 cellules par puits dans une boîte 24 puits ont été fixées à la PFA 4% et perméabilisées au TRITON X-100 avant d'être marquées par un anticorps primaire de lapin anti-Mcl-1 révélé par un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa-488. Un contre marquage au TOPRO-3 a été réalisé afin de visualiser les noyaux. B. Les cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées (+ STS) ou non durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM. 30 µg de protéines des fractions cytosoliques et mitochondriales et 15 µg de protéines de la fraction nucléaire sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 12 %) pour réaliser le Western blot. Des contrôles de charge ont été réalisés par immunodétection de l'α-tubuline et de la TBP.

Le marquage en immunofluorescence de la protéine Bcl-X_L présenté à la figure 3.15a montre une localisation majoritairement périnucléaire de la protéine. Les résultats du Western blot présentés à la figure 3.14b montrent une plus faible abondance de la protéine dans les cellules 143B rho⁰. En effet, bien que la protéine soit détectée dans les fractions cytosoliques des deux lignées cellulaires, elle est moins abondante dans la fraction des cellules rho⁰. De plus, la protéine n'est pas détectée dans les fractions nucléaires de ces cellules et ce, contrairement aux fractions nucléaires de cellules 143B. On ne détecte pas la protéine dans la fraction mitochondriale. Enfin, soulignons encore qu'une incubation des cellules pendant 4 h en présence de staurosporine à 500 nM semble augmenter l'abondance de la protéine dans la fraction cytosolique et ce, pour les deux lignées cellulaires qui s'accompagne d'une diminution de la localisation nucléaire seulement identifiable dans les cellules 143B. Rappelons que Bcl-X_L était un gène fortement sous-exprimé dans les cellules 143B rho⁰, ce qui semble être confirmé au niveau protéique.

Le marquage en immunofluorescence de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 qui est présenté à la figure 3.16a, ne permet pas de mettre en évidence une différence d'abondance entre les deux lignées cellulaires étudiées mais on constate une plus forte abondance de la protéine dans le cytoplasme des cellules en division. Cette constatation correspond à ce qui est décrit dans la littérature, Mcl-1 étant également décrit pour jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Jamil et al., 2005). Le profil de marquage est cytoplasmique bien qu'on retrouve également la protéine dans le noyau. Mcl-1 est connue pour sa localisation en membrane mitochondriale, où elle joue son rôle anti-apoptotique, mais également dans le cytosol et le noyau (Jamil et al., 2005). Elle ne possède pas de domaine BH4 comme Bcl-2 et Bcl-X_L (Scorrano et al., 2003) mais est toutefois capable d'interagir avec les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et d'inhiber leur effet sur la libération du cytochrome c. L'analyse de l'abondance de la protéine Mcl-1 dans les différentes fractions est présentée à la figure 3.16b. Les résultats montrent une localisation principalement mitochondriale et nucléaire de Mcl-1 dans les cellules 143B et 143B rho⁰. On peut également observer que l'abondance mitochondriale de Mcl-1 est plus faible dans les cellules 143B rho⁰. On notera enfin une diminution de l'abondance de Mcl-1 dans les fractions mitochondriales des cellules préalablement incubées pendant 4 h en présence de staurosporine à 500 nM.

En conclusion, sur base de ces données encore fragmentaires, nous pouvons dire que l'abondance plus faible observée pour certaines de ces protéines anti-apoptotiques dans les cellules 143B rho⁰, est compatible avec la plus forte activation de la caspase-3 dans ces cellules en réponse à la staurosporine (surtout lorsque la diminution de l'abondance est observée dans les fractions mitochondriales comme pour Mcl-1) mais est difficilement interprétable par rapport aux résultats obtenus sur la fragmentation de l'ADN dans ces conditions, si l'on accepte le fait que la fragmentation est médiée indirectement par l'activation de la caspase-3, ce que nous n'avons pas démontré.

Nous allons terminer cette approche par l'étude de Bax, protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 afin de rechercher les variations éventuelles de localisation et d'abondance de cette protéine dans les cellules déplétées en ADN_{mt} incubées ou non en présence de staurosporine. En effet, rappelons que la modification de la perméabilité de la MME et donc, la libération de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie peut souvent résulter d'un déséquilibre dans l'abondance relative des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille des protéines Bcl-2.

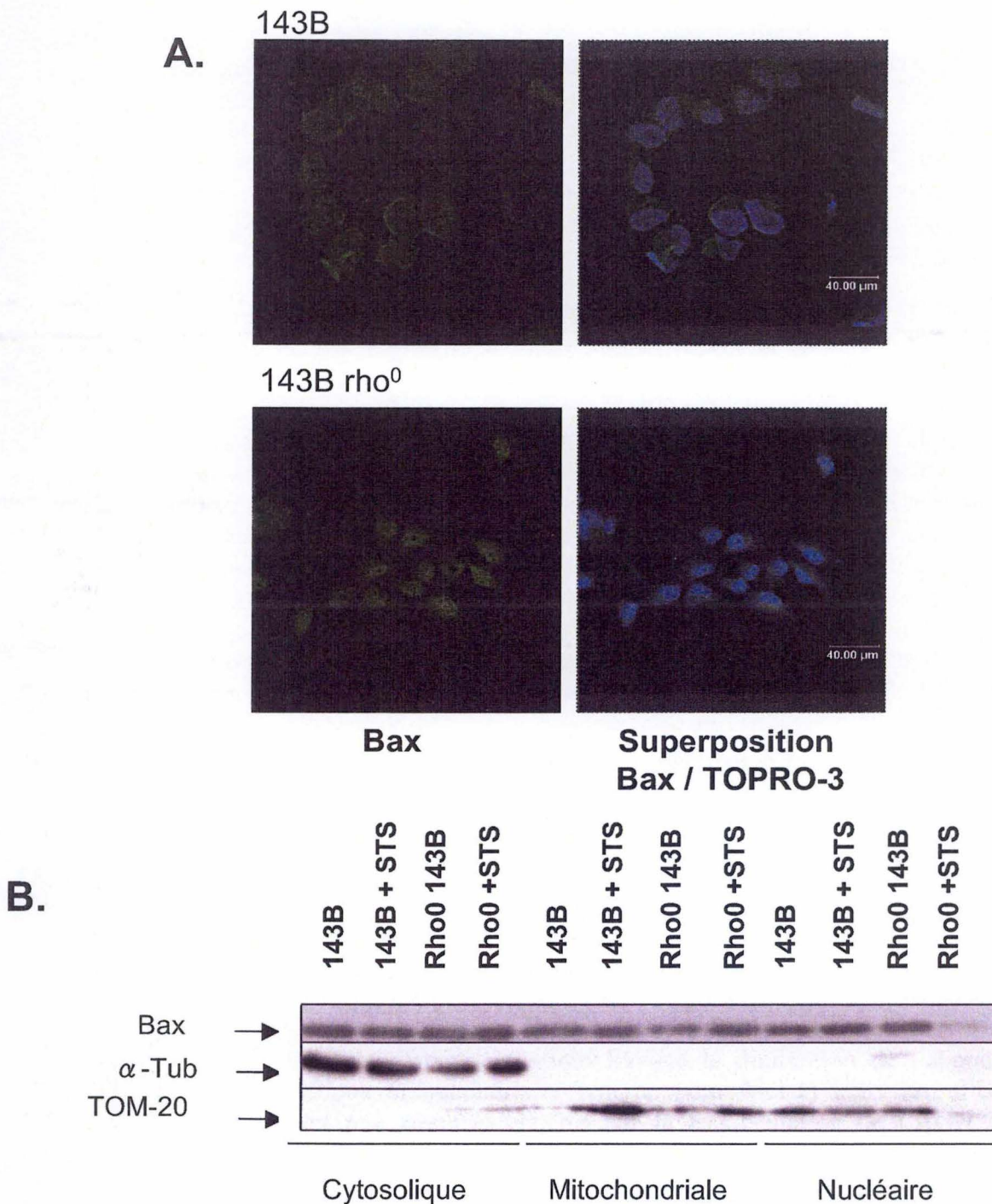


Figure 3.17 : (A.) Marquage en immunofluorescence suivi d'une visualisation en microscopie confocale et (B.) analyse en Western blot de l'abondance et de la localisation de la protéine Bax : A. Des cellules 143B et 143B rho⁰ ensemencées sur couvre-objets à raison de 50000 cellules par puits dans une boîte 24 puits ont été fixées à la PFA 4% et perméabilisées au TRITON X-100 avant d'être marquées par un anticorps primaire de lapin anti-Mcl-1 révélé par un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa-488. Un contre marquage au TOPRO-3 a été réalisé afin de visualiser les noyaux. B. Les cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées (+ STS) ou non durant 4 h avec de la staurosporine à 500 nM. 30 µg de protéines des fractions cytosoliques et mitochondriales et 15 µg de protéines de la fraction nucléaire sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 12 %) pour réaliser le Western blot. Des contrôles de charge ont été réalisés par immunodétection de l'α-tubuline et de la TBP.

3.6.2. Localisation et abondance de la protéine pro-apoptotique Bax

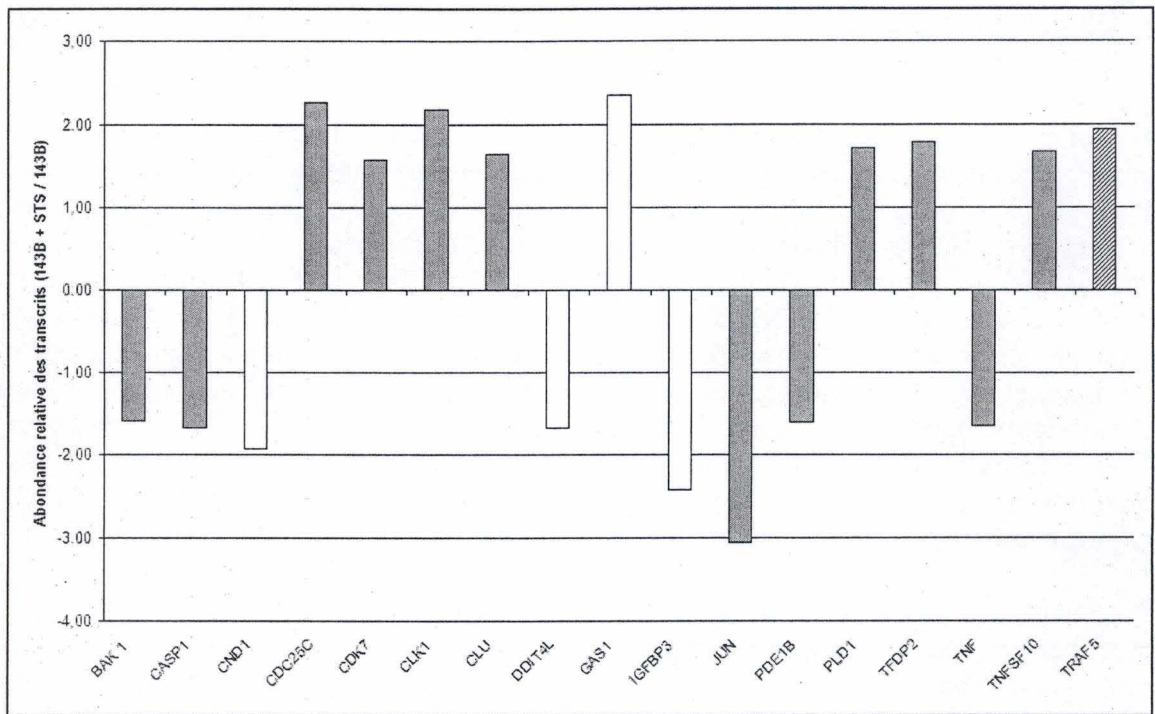
La protéine Bax est décrite comme étant impliquée dans la libération du cytochrome c soit en s'oligomérisant pour former un pore transitoire permettant la translocation des différentes protéines pro-apoptotiques présentes dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Scorrano et al., 2003) soit en interagissant avec des protéines de la membrane mitochondriale externe telle que VDAC pour moduler l'ouverture du PTP (Kroemer et al., 2000). L'activité pro-apoptotique de la protéine Bax est régulée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bcl-2 et Bcl-X_L. Ceux-ci vont pouvoir former des hétérodimères avec la protéine Bax, empêcher ainsi son oligomérisation et donc son activité pro-apoptotique (Hirotani et al., 1999). C'est le déséquilibre entre l'abondance des membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les membranes mitochondriales qui conduit, *in fine*, à la délocalisation du cytochrome c. Ce déséquilibre peut être provoqué par une modification dans la transcription des gènes codant pour les membres de la famille Bcl-2 et/ou par une modification de leur temps de demi-vie (Bouillet et al., 2002).

Le marquage en immunofluorescence suivi d'observations en microscopie confocale de la protéine Bax est présenté sur les micrographies de la figure 3.17a qui ne sont pas très informatives puisqu'elles montrent une localisation cytosolique et nucléaire de la protéine dans les cellules 143B et 143B rho⁰. On ne remarque pas non plus de différence d'abondance de la protéine entre les deux lignées cellulaires. Le Western blot réalisé sur des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires obtenues par centrifugations différentielles à partir de cellules 143B et 143B rho⁰ incubées ou non pendant 4 h en présence de staurosporine à 500 nM (figure 3.17b) montre que l'abondance de la protéine Bax est comparable dans les cellules déplétées en ADN_{mt} et dans les cellules parentales et ce, quelque soit la fraction considérée.

De manière générale, les analyses en Western blot ont parfois été réalisées sur la même membrane, ce qui explique qu'un même blot utilisé pour le contrôle de la charge et/ou de la contamination ait été utilisé plusieurs fois dans les figures relatives à des protéines d'intérêt différentes. De plus, l'absence de signal dans la dernière piste de la fraction nucléaire (rho⁰ + STS) provient probablement du fait d'un problème de charge et est donc inutilisable. Pour la localisation nucléaire du facteur, il faut cependant considérer la contamination de la fraction nucléaire par la fraction mitochondriale comme l'indique l'immunodétection de la protéine mitochondriale TOM-20 dans les fractions nucléaires. La contamination de fractions nucléaires par des mitochondries pourrait provenir de cellules non homogénéisées lors du passage au Dounce et qui sédimentent avec les noyaux.

Après ces différents dosages et analyses, et dans une expérience tout à fait préliminaire, nous avons tenté d'identifier les mécanismes qui pourraient être impliqués dans la diminution de la sensibilité des cellules 143B déplétées en ADN_{mt} à l'apoptose induite par la staurosporine. Nous avons donc terminé ce mémoire, comme nous l'avions commencé, par une approche transcriptomique. A l'aide d'un microdamier à ADN spécialement développé pour analyser les modifications d'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et le cycle cellulaire. Nous avons utilisé ce damier pour étudier les modifications d'expression de gènes induite par la staurosporine dans des cellules 143B et 143B rho⁰.

A.



B.

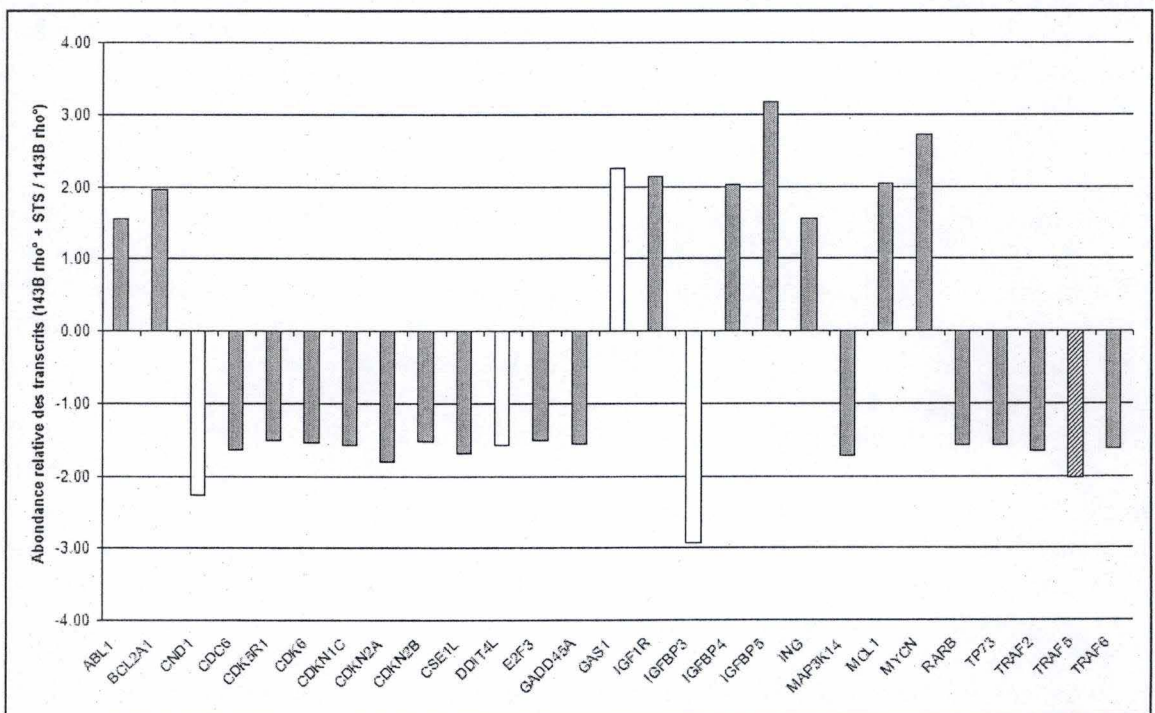


Figure 3.18 : Modification de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, dans la signalisation cellulaire et/ou dans la régulation du cycle cellulaire dans les cellules 143B (A.) et 143B rho⁰ (B.) incubées en présence de staurosporine. Les cellules 143B et 143B rho⁰ ont été incubées durant 6 h avec ou sans staurosporine à 100 nM. L'ARN total des cellules a été extrait et 20 µg ont été utilisés lors de la rétrotranscription (réalisées en présence de nucléotides biotinylés) permettant de générer de ADNc. Ceux-ci ont été hybridés sur le damier « DC Human Apoptosis ». Les résultats présentés ici correspondent aux gènes dont l'expression varie de façon quantitative et significative. On retrouve en gris les variations d'expression spécifiques à une lignées et en blanc les variations d'expression observées dans les deux lignées cellulaires.

3.5. Les effets de la staurosporine sur l'expression génique : analyse de l'expression différentielle de gènes dans les cellules 143B et 143B rho⁰ lors d'une stimulation à la staurosporine

Nous avons utilisé le microdamier à ADN « DC Human Apoptosis » qui permet d'analyser l'expression de 135 gènes impliqués dans la régulation, l'induction, la transduction du signal et d'autres mécanismes ayant trait à l'apoptose. On compte également parmi les gènes dont l'expression est analysable par ce damier, des gènes codant pour des protéines régulatrices et effectrices du cycle cellulaire (voir liste des gènes en Annexe IV), ces deux aspects, mort cellulaire et prolifération cellulaire, étant intimement liés.

Comme pour l'hybridation réalisée sur la « DC Human General », les résultats que nous allons présenter ici sont à prendre à titre purement indicatif puisque l'hybridation n'a été réalisée qu'en simple et que la validité et la reproductibilité des résultats ne sont pas confirmées. Cette confirmation ne pourra être obtenue qu'après deux hybridations supplémentaires réalisées sur des duplicats d'extraction.

Parmi les gènes dont l'expression est analysable par la « DC Human Apoptosis » nous avons sélectionnés quelques candidats dont l'expression est modifiée dans les cellules 143B et 143B rho⁰ lors d'une incubation des cellules en présence de staurosporine. Les résultats présentés à la figure 3.18 portant sur l'analyse de l'expression de gènes en réponse au traitement ont été obtenus après hybridation d'ADN_c marqués à la biotine sur la « DC Human Apoptosis » générés à partir d'ARN_m rétrotranscrits de cellules 143B et 143B rho⁰ incubées ou non pendant 6 h avec de la staurosporine à 100 nM. Ils montrent que dans les cellules 143B et 143B rho⁰, la présence de la molécule apoptogène entraîne la surexpression de 9 gènes dans les deux lignées cellulaires. Cependant, remarquons que ceux-ci ne sont pas les mêmes gènes qui sont différentiellement exprimés dans les cellules 143B et 143B rho⁰. Nous avons également obtenu des sous-expressions de 8 et 18 gènes dans respectivement les cellules 143B et 143B rho⁰. Parmi les gènes dont l'expression est modifiée par le traitement, 4 gènes (*CND1*, *DDIT4L*, *GAS1* et *IGFBP3*) présentent un profil d'expression comparable dans les cellules 143B et 143B rho⁰ incubées avec la staurosporine et un, codant pour la protéine TRAF5, impliquée dans la voie extrinsèque de l'apoptose, est surexprimé dans les cellules 143B et sous exprimé dans les cellules 143B rho⁰.

On constate dans les cellules 143B que le gène codant pour la protéine Bak est sous-exprimé lors d'une incubation des cellules pendant 6 h avec de la staurosporine à 100 nM. Cette protéine fait partie du groupe II de la famille Bcl-2 aux caractéristiques pro-apoptotiques et est localisée principalement en membrane mitochondriale externe (Bellosillo et al., 2002). La protéine aurait une action redondante avec celle de Bax (Lindsten et al., 2000) et permettrait l'induction de l'apoptose suite à un changement de conformation permettant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire dans le cytosol (Bellosillo et al., 2002).

On peut observer une diminution de l'expression du gène Gadd45a dans les cellules 143B rho⁰ suite à une incubation avec de la staurosporine. La protéine codée par ce gène est impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome probablement grâce au rôle régulateur qu'elle a sur le cycle cellulaire et l'apoptose (Tong et al., 2005). Lors de la perception de dommages à l'ADN par la cellule, il y a activation des mécanismes de réparation de l'ADN et arrêt du cycle cellulaire notamment via l'activation du facteur de transcription p53 qui a,

notamment sous son contrôle, l'expression du gène Gadd45a. La protéine Gadd45a est décrite comme étant capable de maintenir et d'amplifier l'activité de p53 par feedback positif en activant la voie des p38/JNK MAPK (Hildesheim et al., 2002). La protéine Gadd45a pourrait donc jouer un rôle dans l'apoptose par la régulation qu'elle exerce sur la protéine p53 et par l'induction de la dissociation de la protéine Bim (protéine pro-apoptotique du groupe des « BH3-only » de la famille Bcl-2), des microtubules permettant ainsi sa translocation dans la mitochondrie (Tong et al., 2005). Une fois dans l'organite, la protéine Bim peut interagir avec Bcl-2 et d'autres membres anti-apoptotiques de la familles Bcl-2 tels que Bcl-X_L, BclW et Mcl-1 et inhiber leur fonction anti-apoptotique (O'Connor et al., 1998).

La diminution de l'expression du gène codant pour la protéine Gadd45a pourrait, si elle est confirmée, participer à rendre les cellules 143B rho⁰ plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine. En effet, l'un des mécanismes de l'induction de l'apoptose par la staurosporine passe par une augmentation de la production des radicaux libres de l'oxygène dans la cellule qui vont pouvoir réagir avec les bases de l'ADN et y causer des dégâts. La protéine Gadd45a étant impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, l'expression moins importante de la protéine pourrait contribuer à expliquer la plus grande résistance des cellules 143B rho⁰ à l'apoptose induite par cette molécule.

On peut observer une surexpression des ARN_m transcrits à partir des gènes codant pour les protéines anti-apoptotique Bcl-2 et Mcl-1 dans les cellules 143B rho⁰ lorsque celles-ci sont incubées pendant 6 heures avec de la staurosporine à 100 nM. Ces deux protéines font partie de la famille anti-apoptotique des protéines « Bcl-2-like » et jouent un rôle important dans la régulation du processus apoptotique. Comme il a déjà été mentionné, Bcl-2 et Mcl-1 sont capable d'interagir avec les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bax et d'en inhiber l'action pro-apoptotique (Zimmermann et al. 2001). Si les résultats obtenus lors de l'hybridation sur la « DC Human Apoptosis » sont confirmés et corrélés avec une abondance plus importante de ces deux protéines, cela pourrait expliquer, au moins en partie, la plus grande résistance à l'induction de l'apoptose par la staurosporine à 100 nM que présentent les cellules 143B rho⁰. Il est également intéressant de constater que les gènes CDKN1C CDKN2A et CDKN2B codant des protéines inhibitrices des CDK sont tous sous-exprimés dans les cellules 143B rho⁰ incubées en présence de staurosporine 100 nM. Comme nous l'avons illustré dans le cadre de la réponse apoptotique médiée par p53 induite par les dommages à l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose sont deux processus opposés (Haupt et al. 2003). La diminution de l'abondance des protéines inhibitrices des CDKs dont nous venons de parler pourraient favoriser le cycle cellulaire et par la même occasion augmenter la résistance à l'apoptose induite par la staurosporine des cellules 143B rho⁰.

Enfin, même si nous nous éloignons un peu du sujet de ce mémoire, il est intéressant de constater que le gène codant pour la protéine TRAF5 est sous-exprimé dans les cellules 143B rho⁰ et sur-exprimé dans les cellules 143B. Cette protéine possède un rôle protecteur lors de l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose par les membres de la famille du TNF en permettant la phosphorylation d'IkB et donc l'activation du facteur de transcription anti-apoptotique NFkB (Sakurai et al., 2003; Tada et al., 2001). Les résultats que nous avons obtenus pourraient peut être expliquer une plus forte sensibilité des cellules 143B rho⁰ à l'induction de l'apoptose par le TNF lorsqu'elles ont été préalablement incubées avec de la staurosporine. De manière intéressante, soulignons encore que l'équipe de O'Connell a déjà montré que la staurosporine pouvait hypersensibiliser des cellules L929 à l'apoptose induite par le TNF α (O'Connell et al., 1997). Cependant, des investigations plus poussées seraient nécessaires à la confirmation de cette hypothèse.

En conclusion, les expériences que nous avons réalisées dans ce travail nous ont permis, de mettre en évidence que les cellules 143B rho⁰ semblent plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine et de débiter des recherches sur l'identification des mécanismes moléculaires sous-jacents à la différence de sensibilité observée dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial chronique.

Conclusions et perspectives

4. Conclusions et perspectives

De nombreuses maladies humaines ont pour origine des dysfonctionnements de l'activité bioénergétique de la mitochondrie qui peuvent être causés par des mutations et des réarrangements dans les ADN nucléaire et mitochondrial, vestige de l'origine endosymbiotique de l'organite. Ces dysfonctionnements vont engendrer une perturbation générale de la cellule et des tissus atteints en modifiant l'homéostasie du calcium, la production de l'ATP, la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène ou encore perturber le métabolisme des lipides et des stéroïdes. Parmi les pathologies causées par ou associées à des dysfonctionnements de la mitochondrie, on compte de nombreuses maladies neuro-dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, sujets d'étude à succès dans notre population vieillissante. Si le dysfonctionnement mitochondrial active de nombreuses voies de signalisation cellulaires participant à la communication moléculaire rétrograde, les maladies dégénératives causées par la perte de l'activité mitochondriale résultent souvent d'une mort par apoptose non régulée des cellules neuronales. De nombreuses études ont déjà été menées sur différentes lignées cellulaires afin de caractériser les processus apoptotiques des cellules présentant un dysfonctionnement de l'activité bioénergétique de la mitochondrie induit par des déplétions partielles, totales ou encore par des mutations ponctuelles dans l'ADN mitochondrial. Ces études soulèvent actuellement une controverse dans la littérature quant à la sensibilité de ces cellules à l'apoptose. En effet, deux hypothèses s'affrontent et il s'avère que, selon la lignée cellulaire étudiée, la méthode utilisée pour induire l'apoptose ou encore la nature et la sévérité de l'altération mitochondriale, on observe que les cellules sont plus sensibles ou plus résistantes à l'apoptose induite.

Dans ce travail, nous avons débuté l'étude de la sensibilité de cellules 143B rho⁰ (dérivées d'un ostéosarcome humain et déplétées en ADN_{mt}) à l'apoptose induite par la staurosporine et initié la recherche de mécanismes responsables de la résistance de ces cellules à l'apoptose. Nous avons donc mis au point un modèle d'induction de l'apoptose par la staurosporine, une molécule apoptogène qui modifie l'homéostasie du Ca⁺⁺, augmente la production des ROS et inhibe, de façon non spécifique, les PKB/Akt et PKCs connues pour leur(s) rôle(s) anti-apoptotique(s) (Won et al. 2003). Ce modèle cellulaire nous a permis de réaliser des dosages de la fragmentation de l'ADN et de l'activité de la caspase-3 au cours de l'induction de la mort cellulaire programmée des cellules 143B et 143B rho⁰ par la staurosporine. Nous avons également réalisé des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale et des Western blots sur différentes protéines anti- et pro-apoptotiques afin d'étudier les variations d'abondance et de localisation induites par la déplétion en ADN_{mt} ou par une incubation des cellules avec de la staurosporine. Enfin, nous avons réalisé des hybridations d'ADN_c, obtenus après rétrotranscription d'extraits d'ARN totaux des cellules 143B et 143B rho⁰, sur deux damiers à ADN : le « DC Human General » qui reprend des sondes de capture permettant l'analyse de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans différentes voies de synthèses, de régulation et de transduction du signal et le « DC Human Apoptosis » spécialement élaboré pour des recherches menées sur l'apoptose et le cycle cellulaire. Ces hybridations nous ont permis d'étudier des variations d'expression de gènes causées par la déplétion de l'ADN_{mt} dans les cellules 143B mais également de rechercher l'effet différentiel de la staurosporine sur l'expression génique des cellules 143B et 143B rho⁰.

Bien que ces résultats soient préliminaires et doivent être confirmés et/ou complétés, les dosages de la fragmentation de l'ADN ont montré une plus grande résistance des cellules

143B rho⁰ à l'apoptose induite par une incubation en présence de staurosporine à 100 nM. Ces dosages nous ont également montré que l'induction de l'apoptose passait par une voie dépendante de l'activation des caspases, comme l'atteste l'inhibition de la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine obtenue en présence de zVAD-fmk, un inhibiteur des caspases, et ce dans les deux lignées cellulaires. Rappelons que la fragmentation de l'ADN induite par l'exposition à la staurosporine n'est pas inhibée en présence de molécules qui inhibent l'ouverture du PTP. Ceci suggère que si la libération de cytochrome c par la mitochondrie se produit lors d'une incubation en présence de staurosporine (ce que nous devons encore mettre en évidence) le mécanisme pourrait être différent et lié à une modification de la perméabilité de la MME résultant de la perturbation de la bicouche lipidique. Rechercher l'effet de molécules antioxydantes adressées à la mitochondrie (MitoQ : un dérivé quinone) et/ou d'inhibiteurs de PLA₂ sur la libération du cytochrome c et la fragmentation de l'ADN pourrait donner des informations sur le mécanisme de libération du cytochrome c. Enfin, le dosage de l'activité de la caspase-3 nous a permis de montrer une plus forte activation de cette enzyme dans les cellules 143B rho⁰ incubées en présence de staurosporine. Il serait intéressant de confirmer et de compléter ces résultats par des dosages de la fragmentation de l'ADN, réalisés sur des cellules incubées en présence de staurosporine à deux concentrations (100 nM et 500 nM) et pendant différents temps (4, 6, 8, 12, 16 et 24 h) afin de suivre et de comparer l'état de la fragmentation de l'ADN nucléaire dans ces conditions. En parallèle, il serait impératif de doser l'activité de la caspase-3 dans les mêmes conditions afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation. Paradoxalement, nos résultats semblent suggérer que la caspase-3 pourrait ne pas être un effecteur important de la fragmentation de l'ADN en réponse à la staurosporine. En effet, si l'on compare l'état d'activation de cette protéase dans les cellules 143B et 143B rho⁰ en réponse à la staurosporine, on observe que l'activation de la caspase-3 est plus forte dans les cellules 143B rho⁰ qui présentent une fragmentation de l'ADN plus faible. Cette corrélation négative est également observée pour les cellules 143B qui montrent une faible activation de la caspase-3 en réponse à un traitement en présence de staurosporine alors que la fragmentation de l'ADN est plus élevée que dans les cellules rho⁰. Des dosages d'activité d'autres caspases effectrices comme les caspases-6 et -7 ainsi que la recherche de l'effet d'un inhibiteur spécifique de la caspase-3 comme le zDEVD-fmk pourraient nous aider à identifier la ou les caspase(s) responsables de la fragmentation de l'ADN et donc de l'induction de l'apoptose par la staurosporine.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin de tenter d'expliquer la plus grande résistance des cellules 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine. Tout d'abord, les résultats des hybridations sur les damiers à ADN « DC Human General » et « DC Human Apoptosis » nous ont montré une diminution de l'abondance des transcrits de nombreux gènes codant pour des protéines pro- et anti-apoptotiques. Nous avons également pu constater qu'une incubation des cellules avec la staurosporine provoquait, dans les cellules 143B rho⁰, une augmentation de l'abondance des transcrits codant pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1. Si ces résultats se confirment et se reflètent sur l'abondance des protéines qui serait également augmentée dans les cellules 143B rho⁰ incubées avec la staurosporine, l'effet anti-apoptotique potentiel de Bcl-2 et Mcl-1, tous deux capables d'interagir et de séquestrer les protéines pro-apoptotiques « Bax-like », pourrait expliquer, au moins en partie, la plus grande résistance des cellules 143B rho⁰ à l'apoptose induite par la staurosporine. Sur base de l'importance des translocations de protéines dans une réponse apoptotique, mentionnons que l'analyse de l'abondance et de la localisation des principaux acteurs de la « famille Bcl-2 » devra également être réalisée sur des fractions subcellulaires plus purifiées pour minimiser les contaminations et donc les difficultés d'interprétation des résultats. La variation de l'abondance relative des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourrait, en

effet, être un facteur important permettant d'expliquer la plus grande résistance des cellules 143B rho⁰ à l'apoptose induite.

Les résultats de l'hybridation sur la « DC Human Apoptosis » montrent de plus que l'incubation des cellules rho⁰ avec la staurosporine entraîne une sous-expression des gènes codant pour des protéines qui inhibent le cycle cellulaire et/ou favorisent l'apoptose. Parmi les gènes sous-exprimés dans les cellules 143B rho⁰, on peut citer les gènes codant pour le facteur de transcription p53 et Gadd45a qui pourraient également être impliqués dans la plus grande résistance de ces cellules à l'apoptose induite par la staurosporine. Deux hybridations d'ADN_c supplémentaires, faites à partir de doubles biologiques, et des validations par PCR en temps réel devront également être réalisées pour les deux damiers utilisés afin de confirmer les résultats obtenus lors des premières hybridations. Il serait également intéressant d'étudier l'abondance et/ou l'activité de protéines d'intérêt comme p53 et Gadd45a, de mesurer la production des ROS (par l'utilisation de sondes fluorescentes) dans les deux lignées cellulaires incubées en présence de staurosporine, et de rechercher leur implication éventuelle dans la fragmentation de l'ADN nucléaire.

Nous nous sommes également intéressés à l'implication du calcium sur l'activation de la caspase-3, un messager secondaire également décrit pour jouer un rôle dans l'apoptose induite par la staurosporine. Les dosages d'activité de la caspase-3 en présence d'un ionophore pour le Ca⁺⁺ ou d'un agent chélateur nous ont tous deux montré que le Ca⁺⁺ avait un effet protecteur sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine dans, respectivement, les cellules 143B et 143B rho⁰. Cet effet protecteur a déjà été décrit dans la littérature et pourrait passer par l'activation de la PKB/Akt qui phosphoryle et inhibe, entre autre, la protéine pro-apoptotique Bad ainsi que par l'activation de la calcineurine, tantôt pro- tantôt anti-apoptotique en fonction du contexte cellulaire (Lotem et al. 1998). La calcineurine activée pourrait avoir un effet protecteur contre l'apoptose en activant différents facteurs de transcription et protéines anti-apoptotiques (Lotem et al. 1998).

En conclusion, contrairement à ce qui a été montré précédemment dans la littérature, il semble que les cellules 143B déplétées totalement en ADN_{mt} soient plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine que les cellules parentales. Nous avons entamé la recherche des mécanismes sous-jacents à ces variations et avons émis l'hypothèse que l'expression différentielle de certains gènes dans les cellules 143B et 143B rho⁰ en réponse à une incubation en présence de staurosporine pourrait rendre compte de la différence de sensibilité observée. Ces études devront être poursuivies dans le futur et devraient conduire à améliorer les connaissances des mécanismes de la réponse apoptotique de cellules déficientes pour l'activité mitochondriale, une caractéristique de plus en plus suspectée dans de nombreuses maladies mitochondriales.

- Aggarwal, B. B. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* **59 Suppl 1**, i6-16 (2000).
- Allen, R. T., Hunter, W. J., 3rd & Agrawal, D. K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* **37**, 215-28 (1997).
- Amuthan, G. et al. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* **21**, 7839-49 (2002).
- Anderson, K. A., Noeldner, P. K., Reece, K., Wadzinski, B. E. & Means, A. R. Regulation and function of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV/protein serine/threonine phosphatase 2A signaling complex. *J Biol Chem* **279**, 31708-16 (2004).
- Appleby, R. D. et al. Quantitation and origin of the mitochondrial membrane potential in human cells lacking mitochondrial DNA. *Eur J Biochem* **262**, 108-16 (1999).
- Arnould, T. et al. mtCLIC is up-regulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells. *Faseb J* **17**, 2145-7 (2003).
- Arnould, T. et al. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J* **21**, 53-63 (2002).
- Bellosillo, B. et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 1810-6 (2002).
- Beneke, R. et al. DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53. *Mol Cell Biol* **20**, 6695-703 (2000).
- Biswas, G. et al. Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *Embo J* **18**, 522-33 (1999).
- Biswas, G., Anandatheerthavarada, H. K. & Avadhani, N. G. Mechanism of mitochondrial stress-induced resistance to apoptosis in mitochondrial DNA-depleted C2C12 myocytes. *Cell Death Differ* **12**, 266-78 (2005).
- Bouillet, P. & Strasser, A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**, 1567-74 (2002).
- Brodin, G., ten Dijke, P., Funahashi, K., Heldin, C. H. & Landstrom, M. Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* **59**, 2731-8 (1999).
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. & Sheu, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C817-33 (2004).
- Brown, M. D., Voljavec, A. S., Lott, M. T., MacDonald, I. & Wallace, D. C. Leber's hereditary optic neuropathy: a model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *Faseb J* **6**, 2791-9 (1992).
- Buchet, K. & Godinot, C. Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem* **273**, 22983-9 (1998).
- Butow, R. A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* **14**, 1-15 (2004).

- Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P. & Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* **115**, 4727-34 (2002).
- Cardoso, S. M., Rego, A. C., Penacho, N. & Oliveira, C. R. Apoptotic cell death induced by hydrogen peroxide in NT2 parental and mitochondrial DNA depleted cells. *Neurochem Int* **45**, 693-8 (2004).
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T. & Kroemer, G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **9**, 1287-93 (2002).
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S. & Chakraborti, S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* **11**, 77-85 (1999).
- Chen, H. W., Chien, C. T., Yu, S. L., Lee, Y. T. & Chen, W. J. Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70. *Br J Pharmacol* **137**, 771-81 (2002).
- Chua, B. H. & Shrago, E. Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation by long chain acyl-CoA esters in bovine heart mitochondria and inverted submitochondrial particles. Comparison with atractylate and bongkreikic acid. *J Biol Chem* **252**, 6711-4 (1977).
- Dan, H. C. et al. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* **279**, 5405-12 (2004).
- Danciu, T. E., Adam, R. M., Naruse, K., Freeman, M. R. & Hauschka, P. V. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett* **536**, 193-7 (2003).
- Delsite, R., Kachhap, S., Anbazhagan, R., Gabrielson, E. & Singh, K. K. Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells. *Mol Cancer* **1**, 6 (2002).
- DiMauro, S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* **1658**, 80-8 (2004).
- Dominguez-Sola, D. & Dalla-Favera, R. PINning down the c-Myc oncoprotein. *Nat Cell Biol* **6**, 288-9 (2004).
- Duan, S. et al. Mitochondrial outer membrane permeability change and hypersensitivity to digitonin early in staurosporine-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 1346-53 (2003).
- Duchen, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* **529 Pt 1**, 57-68 (2000).
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424 (1999).
- Enriquez, J. A., Chomyn, A. & Attardi, G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet* **10**, 47-55 (1995).
- Feng, G. & Kaplowitz, N. Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G825-34 (2002).
- Feng, Y. et al. Subcellular localization of caspase-3 activation correlates with changes in apoptotic morphology in MOLT-4 leukemia cells exposed to X-ray irradiation. *Int J Oncol* **27**, 699-704 (2005).
- Fernandez-Salas, E., Sagar, M., Cheng, C., Yuspa, S. H. & Weinberg, W. C. p53 and tumor necrosis factor alpha regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *J Biol Chem* **274**, 36488-97 (1999).
- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A. & Montoya, J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* **88**, 41-56 (2003).
- Ferri, K. F. & Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**, E255-63 (2001).

- Franklin, J. L. & Johnson, E. M., Jr. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci* **15**, 501-8 (1992).
- Giaccia, A. J. & Kastan, M. B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**, 2973-83 (1998).
- Gidon-Jeangirard, C. et al. Annexin V counteracts apoptosis while inducing Ca(2+) influx in human lymphocytic T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 709-15 (1999).
- Gil, J., Almeida, S., Oliveira, C. R. & Rego, A. C. Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* **35**, 1500-14 (2003).
- Gilkerson, R. W., Margineantu, D. H., Capaldi, R. A. & Selker, J. M. Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett* **474**, 1-4 (2000).
- Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* **2**, REVIEWS1018 (2001).
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A. & Salter, J. D. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* **567**, 96-102 (2004).
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**, 4077-85 (2003).
- Hildesheim, J. et al. Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res* **62**, 7305-15 (2002).
- Hirotsani, M., Zhang, Y., Fujita, N., Naito, M. & Tsuruo, T. NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 20415-20 (1999).
- Hoetelmans, R. W., Van de Velde, C. J. & Van Dierendonck, J. H. The presence of 19-kDa Bcl-2 in dividing cells. *Cell Prolif* **36**, 293-306 (2003).
- Iaccarino, I., Hancock, D., Evan, G. & Downward, J. c-Myc induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a Bid-dependent manner. *Cell Death Differ* **10**, 599-608 (2003).
- Jamil, S. et al. A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* **387**, 659-67 (2005).
- Jang, M. H. et al. 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA-AM) inhibits caffeine-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* **358**, 189-92 (2004).
- Jiang, S., Cai, J., Wallace, D. C. & Jones, D. P. Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J Biol Chem* **274**, 29905-11 (1999).
- Juin, P. et al. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**, 6158-69 (2002).
- Kakita, T. et al. Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ Res* **88**, 1239-46 (2001).
- Kauffman, R. F., Taylor, R. W. & Pfeiffer, D. R. Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **255**, 2735-9 (1980).
- King, M. P. & Attardi, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **246**, 500-3 (1989).
- Klefsstrom, J., Verschuren, E. W. & Evan, G. c-Myc augments the apoptotic activity of cytosolic death receptor signaling proteins by engaging the mitochondrial apoptotic pathway. *J Biol Chem* **277**, 43224-32 (2002).
- Kobayashi, N., Saeki, K. & Yuo, A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by

- internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood* **102**, 3186-95 (2003).
- Kothakota, S. et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-8 (1997).
- Kravchenko, J. E., Rogozin, I. B., Koonin, E. V. & Chumakov, P. M. Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin. *Nature* **436**, 735-9 (2005).
- Kroemer, G. & Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**, 513-9 (2000).
- Kujoth, G. C. et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481-4 (2005).
- Kumar, P., Miller, A. I. & Polverini, P. J. p38 MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway. *J Biol Chem* **279**, 43352-60 (2004).
- Kuwabara, M., Takahashi, K. & Inanami, O. Induction of apoptosis through the activation of SAPK/JNK followed by the expression of death receptor Fas in X-irradiated cells. *J Radiat Res (Tokyo)* **44**, 203-9 (2003).
- Laderman, K. A. et al. Aging-dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts transferred into mtDNA-less cells. *J Biol Chem* **271**, 15891-7 (1996).
- Lampe, P. A., Cornbrooks, E. B., Juhasz, A., Johnson, E. M., Jr. & Franklin, J. L. Suppression of programmed neuronal death by a thapsigargin-induced Ca²⁺ influx. *J Neurobiol* **26**, 205-12 (1995).
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A. & Rojo, M. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* **117**, 2653-62 (2004).
- Leibowitz, R. D. The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. *J Cell Biol* **51**, 116-22 (1971).
- Li, Q. et al. Smad4 inhibits tumor growth by inducing apoptosis in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cells. *J Biol Chem* **280**, 27022-8 (2005).
- Liang, B. C. & Ulliyatt, E. Increased sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis with mitochondrial DNA depletion. *Cell Death Differ* **5**, 694-701 (1998).
- Lindsten, T. et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**, 1389-99 (2000).
- Liu, C. Y., Lee, C. F., Hong, C. H. & Wei, Y. H. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1011**, 133-45 (2004).
- Liu, Z., Sekito, T., Spirek, M., Thornton, J. & Butow, R. A. Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol Cell* **12**, 401-11 (2003).
- Lotem, J. & Sachs, L. Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4601-6 (1998).
- Martins, L. M. et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* **277**, 439-44 (2002).
- Massaad, C. A., Portier, B. P. & Tagliatalata, G. Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2. *J Biol Chem* **279**, 54470-8 (2004).
- Miceli, M. V. & Jazwinski, S. M. Common and cell type-specific responses of human cells to mitochondrial dysfunction. *Exp Cell Res* **302**, 270-80 (2005).
- Miller, S. W., Trimmer, P. A., Parker, W. D., Jr. & Davis, R. E. Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties. *J Neurochem* **67**, 1897-907 (1996).

- Miranda, S., Foncea, R., Guerrero, J. & Leighton, F. Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 44-9 (1999).
- Molkentin, J. D. Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis. *Circ Res* **88**, 1220-2 (2001).
- Morais, R. Isolation of avian mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol* **264**, 296-304 (1996).
- Nanbru, C. et al. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* **272**, 32061-6 (1997).
- Nass, M. M. Abnormal DNA patterns in animal mitochondria: ethidium bromide-induced breakdown of closed circular DNA and conditions leading to oligomer accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1926-33 (1970).
- Neumar, R. W., Xu, Y. A., Gada, H., Guttmann, R. P. & Siman, R. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 14162-7 (2003).
- O'Connell, M. A. et al. TNF-mediated cytotoxicity of L929 cells: role of staurosporine in enhancement of cytotoxicity and translocation of protein kinase C isozymes. *Cytokine* **9**, 83-92 (1997).
- O'Connor, L. et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* **17**, 384-95 (1998).
- Omura, S. et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 275-82 (1977).
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C. & Franzoso, G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* **117**, 5197-208 (2004).
- Park, K. S. et al. Depletion of mitochondrial DNA alters glucose metabolism in SK-Hep1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E1007-14 (2001).
- Park, S. Y. et al. Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* **279**, 7512-20 (2004).
- Parker, W. D., Jr. & Swerdlow, R. H. Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **62**, 758-62 (1998).
- Peter, A. T. & Linde-Forsberg, C. Efficacy of the anticaspase agent zVAD-fmk on post-thaw viability of canine spermatozoa. *Theriogenology* **59**, 1525-32 (2003).
- Philchenkov, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* **8**, 432-44 (2004).
- Poyton, R. O. & McEwen, J. E. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 563-607 (1996).
- Qi, Y. et al. p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature* **431**, 712-7 (2004).
- Rozwodowska, M. et al. Mitochondrial diseases. *Med Sci Monit* **6**, 817-22 (2000).
- Sakurai, H. et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **278**, 36916-23 (2003).
- Salvioli, S. et al. Mitochondrial heterogeneity during staurosporine-induced apoptosis in HL60 cells: analysis at the single cell and single organelle level. *Cytometry* **40**, 189-97 (2000).
- Scorrano, L. & Korsmeyer, S. J. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 437-44 (2003).
- Sherer, T. B., Trimmer, P. A., Parks, J. K. & Tuttle, J. B. Mitochondrial DNA-depleted neuroblastoma (Rho degrees) cells exhibit altered calcium signaling. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 341-55 (2000).

- Skulachev, V. P. Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 214-37 (2002).
- Slee, E. A. et al. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J* **315** (Pt 1), 21-4 (1996).
- Stoetzer, O. J. et al. Modulation of apoptosis by mitochondrial uncouplers: apoptosis-delaying features despite intrinsic cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* **63**, 471-83 (2002).
- Stoner, C. D. & Sirak, H. D. Adenine nucleotide-induced contraction on the inner mitochondrial membrane. II. Effect of bongkrekic acid. *J Cell Biol* **56**, 65-73 (1973).
- Susse, S., Scholz, C. J., Burkle, A. & Wiesmuller, L. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res* **32**, 669-80 (2004).
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C. & Takahashi, R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* **276**, 27058-63 (2001).
- Szabo, C. Role of poly(ADP-ribose)synthetase in inflammation. *Eur J Pharmacol* **350**, 1-19 (1998).
- Tada, K. et al. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* **276**, 36530-4 (2001).
- Thomenius, M. J., Wang, N. S., Reineks, E. Z., Wang, Z. & Distelhorst, C. W. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins. *J Biol Chem* **278**, 6243-50 (2003).
- Thuret, G. et al. Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *Br J Ophthalmol* **87**, 346-52 (2003).
- Tong, T. et al. Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria. *Mol Cell Biol* **25**, 4488-500 (2005).
- Truscott, K. N., Brandner, K. & Pfanner, N. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* **13**, R326-37 (2003).
- Tsuruzoe, K. et al. Creation and characterization of a mitochondrial DNA-depleted pancreatic beta-cell line: impaired insulin secretion induced by glucose, leucine, and sulfonylureas. *Diabetes* **47**, 621-31 (1998).
- van Loo, G. et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**, 1136-42 (2001).
- Vergani, L. et al. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem* **271**, 3646-56 (2004).
- Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-8 (1999).
- Wolf, B. B., Schuler, M., Echeverri, F. & Green, D. R. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* **274**, 30651-6 (1999).
- Won, J. et al. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 19347-51 (2003).
- Xiong, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-4 (1993).
- Yaffe, M. P. Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol* **1**, E149-50 (1999).
- Yao, K. et al. Caspase-3 and its inhibitor Ac-DEVD-CHO in rat lens epithelial cell apoptosis induced by hydrogen in vitro. *Chin Med J (Engl)* **116**, 1034-8 (2003).
- Zhang, B. F. et al. Involvement of cyclin dependent kinase 5 and its activator p35 in staurosporine-induced apoptosis of cortical neurons. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 1105-11 (2004a).

Bibliographie

Zhang, X. D., Gillespie, S. K. & Hersey, P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* **3**, 187-97 (2004b).

Zimmermann, K. C., Bonzon, C. & Green, D. R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**, 57-70 (2001).

Annexe 1: Liste des gènes analysables avec le damier «DualChip Human General »

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
26S-proteasome-subunit-p44.5	PSMD11	PSMD11	AB003102	O00231	Proteasome	Proteasome 26S subunit,non ATPase
A disintegrin and metalloproteinase domain 1	ADAM1	ADAM1	Y09232	N.A.	Protein metabolism	Metalloprotease
Annexin A1	ANX1	ANXA1	NM_000700	P04083	Lipid metabolism	Phospholipid binding protein; PLA2 inhibitor
Anti-oxidant-protein2	ACP2	PRDX6	NM_004905	P30041	Stress response	Hydrolyse the fatty acyl or alkyl bonds of membrane phospholipids
Transcription factor AP-2 alpha	TFAP2A	TFAP2A	M36711	P05549	Transcription	Activator of transcription that binds to a cons. DNA-binding seq in the SV40 and metallothionein promoters
Transcription factor AP-2 beta	TFAP2B	TFAP2B	X95694	Q92481	Transcription	Regulate the expression of genes required for development of tissue of ectodermal origin
Transcription factor AP-2 gamma	TFAP2C	TFAP2C	NM_003222	Q92754	Transcription	Regulate the expression of genes required for development of tissue of ectodermal origin
Clusterin / Apolipoprotein J	APOJ	CLU/APOJ	J02908	P10909	Lipid metabolism	Complement lysis inhibitor; plasma glycoprotein
Ataxia telangiectasia mutated	ATM	ATM	U26455	Q13315	Cell cycle	regulator of p53 and BRCA1
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog-like2/ b-myb	MYBL2	MYBL2	X13293	P10244	Transcription	Transcription factor,plays an important role during cell cycleprogression; Oncoprotein
BCL2-antagonist of cell death	BAD	BAD	NM_004322	Q92934	Apoptosis	Pro-apoptotic; Bcl2-antagonist of cell death; BCL2 binding protein
Ribosomal protein L13a / 23kDa Highly basic protein	23kd	RPL13A/23kd	X56932	P39023	HouseKeeping gene	Component of the large 60S ribosomal subunit
BCL2-associated X protein	BAX	BAX	NM_004324	Q8WXU1	Apoptosis	Proapoptotic protein,induces cell death by acting on mitochondria,Release of cyt C, activation of caspase-3
B-cell lymphoma2	BCL2	BCL2	NM_000633	P10415	Apoptosis	Oncogene B-cell leukemia;interferes with normal apoptosis of B lymphocytes
BCL2-like1/BCLX	BCLX	BCL2L1	NM_001191	Q07817	Apoptosis	Induces or inhibits apoptosis according to the alternative form
Beta1-galactosidase	GLB1	GLB1	M34423	P16278	Intermediate metabolism	Catalyses cleavage of galactose
BH3 interacting domain death agonist	BID	BID	NM_001196	P55957	Apoptosis	Apoptotic mitochondrial changes; Death receptor ligand
Bridging integrator 1	BIN1	BIN1	NM_004305	O00499	Tumor suppressor	Tumor suppressor; Interact with c-myc
Bone morphogenetic protein2	BMP2	BMP2	NM_001200	P12643	Growth factors and cytokines	Skeletal development; Member of TGFβ family
Feline sarcoma oncogene	FES	FES	X52192	P07332	Oncogenesis	Tyrosine phosphorylation; Oncogene
c-fos/v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	FOS	NM_005252	P01100	Oncogenesis	Regulator of cell proliferation destined to form and maintain the skeleton; Oncogene
c-myc binding protein	myc	MYCBP	NM_012333	Q99417	Oncogenesis	Activation of E box-dependent transcription by MYC
c-rat-1 / v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	RAF1	X03484	P04049	Oncogenesis	Apoptosis regulation; Kinase
Cadherin1, type 1,E-cadherin	CDH1	CDH1	NM_004360	P12830	Cell adhesion	Ca2+-dependent cell adhesion molecule,role in food-borne infection with Listeria monocytogene
Cadherin11, type 2, OB-cadherin	CDH11	CDH11	NM_001797	P55287	Cell adhesion	Mediates cell-cell interactions; may have a role in bone formation
Cadherin13, H-cadherin	CDH13	CDH13	U59289	P55290	Cell adhesion	Tumor suppressor in breast cancer
Calnexin	CANX	CANX	NM_001746	P27824	Protein metabolism	High affinity for the binding of calcium ions; Chaperone
Calprotectin / S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100A8	S100A8	NM_002964	P05109	Cell cycle	Calcium binding
Aldolase A	Aldo	ALDOA	NM_000034	P04075	HouseKeeping gene	Reversibly cleaves FBP into DHAP and GAP
Caspase2	CASP2	CASP2	NM_001224	P42575	Apoptosis	Activated in cytotoxic stress,required for the permeabilization of mitochondria,required for stress-induced apoptosis
Caspase3	CASP3	CASP3	NM_004346	P42574	Apoptosis	Initiation of apoptotic cell death; PARP cleavage protease
Caspase7	CASP7	CASP7	NM_001227	P55210	Apoptosis	Proteolysis;apoptosis related cysteine protease
Caspase8	CASP8	CASP8	X98172	Q15519	Apoptosis	Thiol protease; PARP cleavage protease-signature apoptotic fragments
Alpha-tubulin	Tubu	K-ALPHA-1	NM_006082	P05209	HouseKeeping gene	Form the microtubule
Caspase9	CASP9	CASP9	NM_001229	P55211	Apoptosis	Participates in caspase-3 activation in vitro.
Catenin , beta 1	CATB	CTNWB1	NM_001904	P35222	Cell adhesion	Adherens junction protein;Links cadherins to the cytoskeleton
CathepsinB	CTSB	CTSB	NM_001908	P07858	Protein metabolism	Lysosomal cysteine (thiol) proteinase that cleaves APP
CathepsinD	CTSD	CTSD	M11233	P07339	Protein metabolism	Lysosomal aspartyl protease
CathepsinL	CTSL	CTSL	NM_001912	P07711	Protein metabolism	Lysosomal cysteine (thiol) protease that cleaves collagen and elastin
Caveolin1	CAV1	CAV1	NM_001753	Q03135	Cell cycle	Tumor suppressor and structural component of caveolar membranes
Cell division cycle42	CDC42	CDC42	NM_001791	P21181	Cell structure	GTP-binding protein
Cyclin-dependent kinase2	CDK2	CDK2	NM_001798	P24941	Cell cycle	Transferase;Ser/Thr protein Kinase; cell division kinase 2
Cyclin-dependent kinase4	CDK4	CDK4	U79269	P11802	Cell cycle	Phosphorylates pRb and inactivates its repressor function
Cyclin-dependent kinase6	CDK6	CDK6	NM_001259	Q00534	Cell cycle	Interacts with D-type cyclins and phosphorylates pRb in G1-phase
Collagen, type VI, alpha 2	COL6A2	COL6A2	NM_001849	P12110	Extracellular matrix	Muscle development; collagen
Cornifin/ small proline-rich protein 1B	SPRR1B	SPRR1B	NM_003125	P22528	Cell differentiation	Epidermal development
Prostaglandin-endoperoxidase synthase 2	COX2	PTGS2	NM_000963	P35354	Lipid metabolism	Regulation of prostaglandin synthesis,prostaglandin synthase
Creatin-kinase, brain	CKB	CKB	M16364	P12277	Intermediate metabolism	Creatin kinase,isoform
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant1	CROCI1A	UBE2V1	NM_003349	Q9GZ71	DNA repair / synthesis	DNA repair regulation; ubiquitinating conjugating enzyme
Colony stimulating factor 1	CSF1	CSF1	M37435	P09603	Growth factors and cytokines	Role in development of the placenta.Differentiation; plasma glycoprotein

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
Colony stimulating factor 1 receptor	CSF1R	CSF1R	NM_005211	P07333	Cell signalling / receptor	Anti-pathogen response; receptor for macrophage stimulating factor
Connective tissue growth factor	CTGF	CTGF	U14750	P29268	Growth factors and cytokines	Epidermal development; connective tissue growth factor
Beta-Actin	ACTB	ACTB	NM_001101	P02570	HouseKeeping gene	Major constituent of contractile apparatus
CyclinA1	CCNA1	CCNA1	NM_003914	P78396	Cell cycle	Regulators of CDK kinases
CyclinB1	CCNB1	CCNB1	NM_031966	P14635	Cell cycle	G2 mitotic specific cyclin
CyclinD1	CCND1	CCND1	NM_053056	P24385	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
CyclinD2	CCND2	CCND2	NM_001759	P30279	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
CyclinD3	CCND3	CCND3	NM_001760	P30281	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
CyclinE1	CCNE1	CCNE1	NM_001238	P24864	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK2
CyclinF	CCNF	CCNF	NM_001761	P41002	Cell cycle	Member of the F-box proteins
CyclinH	CCNH	CCNH	NM_001239	P51946	Cell cycle	Phosphorylates and activates cyclin-dependant protein kinases in the regulation of cell cycle progression
Dihydrofolate reductase	DHFR	DHFR	NM_000791	P00374	Cell cycle	Dihydrofolate reductase
Transcription factor Dp-1	DP1	TFDP1	NM_007111	Q00765	Transcription	Mediator of transcriptional activation by TGF-beta receptor; involved in the cell cycle; Pol II transcription
Transcription factor Dp-2	DP2	TFDP2	NM_006286	Q14188	Transcription	Transcription factor; Pol II transcription
E2F transcription factor2	E2F2	E2F2	NM_004091	Q14209	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein
E2F transcription factor3	E2F3	E2F3	NM_001949	Q00716	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein
E2F transcription factor4	E2F4	E2F4	NM_001950	Q16254	Transcription	DNA binding protein required for transcription; binds p107, p130 proteins
Cyclophilin 33A/peptidylprolyl isomerase E	cyc	cyc/ PPIE	AF042385	Q9UNP9	HouseKeeping gene	Accelerate the folding of proteins
Epidermal growth factor receptor	EGFR	EGFR	NM_005228	P00533	Cell signalling / receptor	Receptor for EGF-kinase that attaches phosphate groups to tyrosine residues in proteins
Early growth response1	EGR1	EGR1	NM_001964	P18146	Transcription	Early growth response gene; Tumor suppressor
Early growth response3	EGR3	EGR3	NM_004430	Q06889	Transcription	Transcription factor; contains zinc-finger DNA-binding domain
Eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4-E	EIF4E	NM_001968	Q9NRA8	Protein metabolism	Recognizes and binds the mRNA cap during an early step in the initiation of protein synthesis
Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	ETFBE	ETFBE	NM_001985	P38117	Intermediate metabolism	Mitochondrial fatty acid catabolism
Basigin	BSG	BSG	NM_001728	P35613	Extracellular matrix	Stimulates matrix metalloproteinase synthesis in fibroblasts; Tumor progression
Ems1 sequence	EMS1	EMS1	NM_005231	Q14247	Cell structure	Organisation of cytoskeleton and cell adhesion structures
Estrogen receptor 2	ESR2	ESR2	X99101	Q92731	Cell signalling / receptor	Regulation of reproduction; Steroid hormone receptor
von willebrand Factor	VWF	VWF	NM_000552	P04275	Circulation	Carrier for factor VIIIc and major mediator of platelet-vessel wall interaction
Fibroblast growth factor 8	FGF8	FGF8	U36223	P55075	Growth factors and cytokines	Stimulates growth of the cells in an autocrine manner, mediates hormonal action on the growth of cancer cells
Fibroblast growth factor 2	FGF2	FGF2	NM_002006	P09038	Growth factors and cytokines	Mitogenic, angiogenic, and neurotrophic factor
Fibroblast growth factor receptor 1	FGFR	FGFR1	NM_000604	P11362	Cell signalling / receptor	Glycosylated receptor tyrosine kinase that binds both acidic and basic fibroblast growth factors
Fragile histidine triad gene	FHIT	FHIT	NM_002012	P49789	DNA repair / synthesis	diadenosine 5',5'-P1,P3-triphosphate hydrolase
fibronectin 1	FN1	FN1	X02761	P02751	Extracellular matrix	Extracellular matrix; Glycoprotein
DNA-damage-inducible transcript3	GADD153	DDIT3	S40706	P35638	DNA repair / synthesis	DNA damage response; transcription co-repressor
Gelsolin	GSN	GSN	X04412	P06396	Cell structure	Calcium-dependent protein; modulates the actin
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	G6PD	NM_000402	P11413	Intermediate metabolism	Oxidoreductase; Dehydrogenase
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	GAPD	NM_002046	P04406	HouseKeeping gene	Catalyzes an important energy-yielding step in carbohydrate metabolism
Glutathione peroxidase 1	GPX	GPX1	M21304	P07203	Oxidative metabolism	selenium containing enzyme; function not defined
Growth factor receptor-bound protein2	GRB2	GRB2	NM_002086	P29354	Cell cycle	mitogenesis and cytoskeletal reorganization
Glutathione S-transferase pi	GSTP1	GSTP1	NM_000852	P09211	Oxidative metabolism	Important role in detoxification; Reduced glutathione
Heme oxygenase 1	HMOX	HMOX1	NM_002133	P09601	Stress response	Cleaves the heme ring to form biliverdin and carbon monoxide
Histone2b member B/S consensus/ Histone 1, H2bk	H2B/S	HIST1H2BK	NM_080593	P57053	Chromosomal processing	Nucleosome structure
Histone3 member F consensus/ Histone 1, H3l	H3FF	HIST1H3I	NM_003533	P16106	Chromosomal processing	Responsible for the nucleosome structure within chromosomal fiber in eukaryotes
Histone4 member M consensus/ Histone 1, H4l	H4FM	HIST1H4I	NM_003495	Q80WCB	Chromosomal processing	Nucleosome structure
Heat shock 27kDa protein1	HSP27	HSPB1	AB020027	P04792	Stress response	Drug resistance/thermotolerance
Heat shock 40kD protein1/ DnaJ/Hsp40/homolog	HSP40	DNAJB1	D49547	P25685	Stress response	Prevent aggregation of newly translated proteins
Heat shock 70kDa protein4	HSP70	HSPA4	AB023420	P34932	Stress response	ATP binding and heat shock protein
Heat shock 90kDa protein1.alpha	HSP90-a	HSPCA	X15183	P07900	Stress response	Molecular chaperon, ATPase activity
Heat shock 90kDa protein1, beta	HSP90-b	HSPCB	NM_007355	P08238	Stress response	Molecular chaperon, ATPase activity
Intracellular adhesion molecule1	ICAM-1	ICAM1	J03132	P05362	Cell adhesion	Surface glycoprotein; binds the Integrin LFA-1 (ITGB2) and promotes adhesion
Hexokinase 1	HK1	HK1	M75126	P19367	HouseKeeping gene	Catalyzes the first step in glucose metabolism(glucose-glucose-6-phosphate)

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
Insulin-like growth factor binding protein2	IGFBP2	IGFBP2	M35410	P18065	Growth factors and cytokines	Growth factor modulation
Insulin-like growth factor binding protein3	IGFBP3	IGFBP3	X64875	P17936	Growth factors and cytokines	Growth factor modulation
Insulin-like growth factor binding protein5	IGFBP5	IGFBP5	M65062	P24593	Growth factors and cytokines	Growth factor modulation
Insulin-like growth factor1	IGF1	IGF1	X57025	P01343	Growth factors and cytokines	Muscle/skeletal development; Growth factor
Insulin like growth factor1 receptor	IGF1R	IGF1R	NM_000875	P08069	Cell signaling / receptor	Anti-apoptotic; receptor
Interleukin1 alpha	IL1A	IL1A	NM_000575	P01563	Growth factors and cytokines	Amplify the immune and inflammatory responses
Interleukin1 beta	IL1B	IL1B	M15330	P01584	Growth factors and cytokines	Initiation and amplification of the immune and inflammatory responses
Interleukin 10	IL10	IL10	NM_000572	P22301	Growth factors and cytokines	Chemotaxis; Cytokine synthesis inhibitory factor
Interleukin 11	IL11	IL11	NM_000641	P20809	Growth factors and cytokines	Induces proliferation of human T-cells
Interleukin 11-receptor-alpha	IL11RA	IL11RA	U32324	Q16542	Cell signaling / receptor	Multiple biologic activities on lymphohematopoietic cells; Encodes the IL-11 receptor
Interleukin 15	IL15	IL15	NM_000585	P40933	Growth factors and cytokines	Affects T-cell activation and proliferation; Anti-pathogen response ; Cytokine
Interleukin 4	IL4	IL4	NM_000589	P05112	Growth factors and cytokines	T Cell proliferation; Cytokine
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT	HPRT1	NM_000194	P00492	HouseKeeping gene	Purine salvage pathway
Interleukin 6	IL6	IL6	NM_000600	P05231	Growth factors and cytokines	Induces the maturation of B cells into immunoglobulin-secreting cells
Interleukin 8	IL8	IL8	NM_000584	P10145	Growth factors and cytokines	Chemokine that regulate cell trafficking of various types of leukocytes; role in development, homeostasis, function in the immune system
Inhibitor of growth family, member 1	ING1	ING1	NM_005537	Q00532	Tumor suppressor	Growth regulator ; Tumor suppressor
Integrin alpha6	ITGA6	ITGA6	NM_000210	P23229	Cell adhesion	Receptor; signal transduction
Integrin alpha5	ITGA5	ITGA5	NM_002205	P08648	Cell adhesion	Fibronectin receptor; mediates the binding of cells to fibronectin substrata
Integrin beta1	ITGB1	ITGB1	NM_002211	P05556	Cell adhesion	Integrin; Fibronectin receptor
Mitogen activated protein kinase8	JNK1	MAPK8	L26318	P45983	Stress response	Mitogen-activated protein kinase, participates in signaling system
Mitogen activated protein kinase9	JNK2	MAPK9	U09759	P45984	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
Mitogen-activated protein kinase 10	JNK3	MAPK10	NM_002753	P53779	Stress response	Member of MAP kinase; activate the Jun transcription factor.
Jun D proto-oncogene	JUND	JUND	NM_005354	P17535	Transcription	RNA pol II transcription factor, Oncogene
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Ki-67	MKI67	NM_002417	P46013	Cell cycle	Required for maintaining cell proliferation
MAX protein	MAX	MAX	NM_002382	P25912	Transcription	Transcription factor; forms heterodimers with MYC, MAD and regulates gene expression
MDM2	MDM2	MDM2	NM_002392	Q00987	Cell cycle	Transcription factor; acts as a major regulator of the tumor suppressor p53
Mitogen activated protein kinase kinase1	MEK1	MAP2K1	L11284	Q02750	Growth factors and cytokines	Chemotaxis, Kinase
Malate dehydrogenase 1	MDH	MDH1	NM_005917	P40925	HouseKeeping gene	Catalyzes the reversible oxidation of malate to oxaloacetate
Mitogen activated protein kinase kinase2	MEK2	MAP2K2	NM_003662	P36507	Growth factors and cytokines	Chemotaxis, Kinase
Methionine-sulfoxide-reductase A/peptide	MSRA	MSRA	AF183420	Q9UJ68	Oxidative metabolism	Methionine metabolism, oxidoreductase
Mitotin, centromere protein F	CENPF	CENPF	U30872	P49454	Chromosomal processing	Control of mitosis
Mitose-centromere-associated-kinesin/ Kinesin family member 2C	KNSL6	KIF2C	NM_006845	Q99661	Chromosomal processing	Microtubule motor, Kinesin, implicated in intracellular transport events
Mitotic-kinesin-like-protein1 / kinesin family member 23	KNSL5	KIF23	NM_004856	Q02241	Chromosomal processing	Microtubule motor, Kinesin
Matrix metalloproteinase 1	MMP1	MMP1	NM_002421	P03956	Extracellular matrix	Interstitial collagenase, cleaves collagens (type I, II, III, VII and X)
Matrix metalloproteinase 2	MMP2	MMP2	NM_004530	P08253	Extracellular matrix	Gelatinase A (type IV collagenase); degrades gelatin, types IV, V, and VII collagen, and fibronectin
Matrix metalloproteinase 3	MMP3	MMP3	NM_002422	P08254	Extracellular matrix	Extracellular matrix, degrades fibronectin, collagens
Matrix metalloproteinase 7	MMP7	MMP7	NM_002423	P09237	Extracellular matrix	Matriysin 7, expressed during the migration/proliferation phase
Matrix metalloproteinase 9	MMP9	MMP9	NM_004994	P14780	Extracellular matrix	Type IV collagenase; digests type IV and type V collagen
Matrix metalloproteinase 11	MMP11	MMP11	NM_005940	P24347	Extracellular matrix	Stromelysin 3; involved in physiologic and pathologic processes associated with extracellular matrix remodeling.
Matrix metalloproteinase 12	MMP12	MMP12	NM_002426	P39900	Extracellular matrix	Extracellular matrix, degrades elastin, important in tissue remodeling and repair during development and inflammation
Matrix metalloproteinase 13	MMP13	MMP13	NM_002427	P45452	Extracellular matrix	Collagenase 3; degrades fibrillar collagens
Matrix metalloproteinase 14	MMP14	MMP14	NM_004995	P50281	Extracellular matrix	Transmembrane matrix metalloprotease 14; activates the collagenase gelatinase A
Matrix metalloproteinase 15	MMP15	MMP15	NM_002428	P51511	Extracellular matrix	Transmembrane matrix metalloprotease 15; activates the collagenase gelatinase A
NCK adaptor protein1	NCK1	NCK1	NM_006153	P16333	Cell signaling / receptor	Signal transduction; activate actin nucleation
Nuclear receptor co-repressor 1	NCOR1	NCOR1	NM_006311	Q75376	Cell signaling / receptor	Inhibits transcription by hormone receptors in the absence of ligand
Nuclear receptor co-repressor 2	NCOR2	NCOR2	NM_006312	Q9Y618	Cell signaling / receptor	Transcription co-repressor; important in development, differentiation and oncogenesis
Phospholipase A2/ tyrosine3-monooxygenase/typtophan5-monooxygenase activation prot	PLA2	YWHAZ	M86400	P04054	HouseKeeping gene	Kinase activating hydrolases tyr -ty; induces the phosphorylation of cytosolic substrates
Ornithine decarboxylase1	ODC	ODC1	NM_002539	P11926	Intermediate metabolism	Arginine synthesis; acts in polyamine biosynthesis
Osteonectin, secreted protein, acidic, cysteine-rich	ON	SPARC	NM_003118	P09486	Cell structure	Extracellular matrix, collagen binding, may be involved in cell proliferation, repair of tissue damage
Osteopontin/ secreted phosphoprotein 1	OPN	SPP1	NM_000582	Q961Z1	Extracellular matrix	Extracellular matrix

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
Ribosomal Protein S9	S9	RPS9	NM_001013	P46781	Housekeeping gene	Component of the small 40S ribosomal subunit
Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	p16	CDKN2A	L27211	Q8N726	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 2A, tumor suppressor gene
Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	p21	CDKN1A	U03106	P38936	Cell cycle	Inhibits cyclin-kinase activity, is regulated at the transcriptional level by p53
Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	p27	CDKN1B	NM_004064	P46527	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 1B, mediates TGFbeta-induced G1 phase arrest
Cyclin dependent kinase5 regulatory subunit1	p35	CDK5R1	NM_003885	P04083	Cell cycle	Kinase, role in the regulation of the eukaryotic cell cycle, required for development of the mammalian central nervous system
Tumor protein p53	p53	TP53	AF307851	P04637	Cell cycle	DNA-binding protein; tumor suppressor activity; role in DNA repair; induces apoptosis
Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	p57	CDKN1C	NM_000076	P49918	Cell cycle	Inhibits G1-specific CDK-cyclin complexes, negative regulator of cell proliferation.
Plasminogen activator inhibitor type1/serine proteinase inhibitor, clade E, member 1	PAI1	SERPINE1	M14083	P05121	Circulation	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor; Regulates fibrinolysis
Plasminogen activator inhibitor type2/serine proteinase inhibitor, clade B, member 2	PAI2	SERPINE2	J02685	P05120	Circulation	Serine protease inhibitor; Inhibits urokinase-type plasminogen activator
P21 activated kinase1	PAK	PAK1	NM_002576	Q13153	Cell structure	Target of CDC42; promotes the disassembly of stress fibers and focal adhesions
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	PCNA	NM_002592	P12004	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility; correlated with the proliferative state of the cell
Polo-like kinase	PLK	PLK	U01038	Q15153	DNA repair / synthesis	Ser/thr kinase; involved in mitosis
Polymerase alpha	POLA2	POLA2	NM_002689	Q14181	DNA repair / synthesis	DNA polymerase
Progesterone receptor	PGR	PGR	NM_000926	P09874	Cell signaling / receptor	Transcription activating factor, progesterone receptor
ADP-ribosyltransferase	ADPRT	ADPRT	J03473	P09874	DNA repair / synthesis	DNA repair, encodes a chromatin associated enzyme
Pyruvate kinase-muscle	PKM2	PKM2	M26252	P14618	Intermediate metabolism	Pyruvate kinase, muscle
Retinoblastoma1	RB1	RB1	NM_000321	P06400	Cell cycle	Interacts with histone deacetylase to repress transcription; tumor repressor
Ribonucleotide-reductase M1 polypeptide	RRM1	RRM1	NM_001033	P23921	DNA repair / synthesis	Ribonucleotide reductase essential for the production of deoxyribonucleotides before DNA synthesis in S phase
Serine Dehydratase	SDS	SDS	NM_006843	P20132	Housekeeping gene	Catalyzes the conversion of serine to pyruvate
S100 calcium binding protein A4	S100A4	S100A4	NM_002961	P26447	Cell cycle	Calycotin; interacts with targets to link extracellular stimuli and cellular responses
SHC transforming protein1	SHC	SHC	U73377	Q01973	Oncogenesis	EGFR modulation
Transgelin	SM22	TAGLN	M95787	Q01995	Cell structure	Involved in calcium interactions and contractile properties of the cell
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 1	SMAD1	MADH1	U59423	Q15797	Cell cycle	Tumor suppressor; regulates cell growth, differentiation, matrix production, apoptosis; role during the embryonal development
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 2	SMAD2	MADH2	U68018	Q15796	Cell cycle	Tumor suppressor; role in nuclear accumulation and initiation of signaling
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 3	SMAD3	MADH3	U68019	Q92940	Cell cycle	Tumor suppressor; effector of TGFbeta response
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4	SMAD4	MADH4	U44378	Q13485	Cell cycle	Tumor suppressor
Superoxide dismutase2	SOD2	SOD2	NM_000636	P04179	Oxidative metabolism	Oxidoreductase
Telomerase reverse transcriptase	TERT	TERT	AF018167	Q14746	DNA repair / synthesis	DNA polymerase, predicted to act as reverse transcriptase, may have a role in formation of telomeres
TGF-beta-R2	TGFBR2	TGFBR2	D50683	P37173	Tumor suppressor	Tumor suppressor, receptor; role in the signal transduction that leads to mitogenic responses
Thymidine-kinase 1	TK1	TK1	NM_003258	P04183	Cell cycle	Generates thymidylate for DNA synthesis
Thymosin beta 10	TB10	TMSB10	NM_021103	P13472	Cell structure	Organization of the cytoskeleton
Thymidylate synthetase	TYMS	TYMS	NM_001071	P04818	DNA repair / synthesis	Catalyzes reductive methylation of dUMP to dTMP
Tissue inhibitor of metalloproteinase1	TIMP1	TIMP1	NM_003254	P01033	Extracellular matrix	Inhibits type IV collagenase (MMP2) stimulates growth of erythroid cells
Tissue inhibitor of metalloproteinase2	TIMP2	TIMP2	NM_003255	P16035	Extracellular matrix	Inhibits MMP2, involved in homeostasis of the extracellular matrix
Tumor necrosis factor	TNFA	TNF	NM_000594	P01375	Growth factors and cytokines	Endotoxin; pathophysiology of sepsis; role in apoptosis
Topoisomerase2-alpha	TOP2	TOP2A	NM_001067	P11388	DNA repair / synthesis	Relax DNA torsion upon replication or transcription
Plasminogen activator tissue	TPA	PLAT	NM_000930	P00750	Circulation	Serine protease that converts inactive plasminogen to plasmin
Telomeric repeat binding factor1	TRF1	TRF1	U40705	Q9BS14	DNA repair / synthesis	Telomere binding
Thromboxane-A2-receptor	TBXA2R	TBXA2R	D38081	P21731	Cell signaling / receptor	Muscle contraction, receptor; stimulator of platelet aggregation
Thrombospondin 1	TSP1	THBS1	NM_003246	P07996	Cell adhesion	Adhesive glycoprotein; potent angiogenic activity
Thrombospondin 2	TSP2	THBS2	NM_003247	P35442	Cell adhesion	Adhesive glycoprotein; role in many cell adhesion and migration events
Ubiquitin conjugating enzyme E2C/ubiquitin carrier protein	UBE2C	UBE2C	NM_007019	Q00762	Proteasome	Proteolysis, ligase
Plasminogen activator, Urokinase	PLAU	PLAU	NM_002658	P00749	Circulation	Serine protease that cleaves plasminogen to form plasmin
Transferrin receptor	TFR	TFR	NM_003234	P02786	Housekeeping gene	Binds and internalizes the iron carrier transferrin
Plasminogen activator, Urokinase-receptor	uPAR	PLAUR	NM_002659	Q03405	Cell signaling / receptor	Key molecule in the regulation of cell-surface plasminogen activation
Vascular endothelial growth factor	VEGF	VEGF	AF022375	P15692	Growth factors and cytokines	Induces endothelial cell proliferation and vascular permeability
Vascular endothelial growth factor B	VEGFB	VEGFB	U43368	P49765	Growth factors and cytokines	Binds heparin and neuropilin-1, growth factor; MEN1 tumor suppressor gene
Vascular endothelial growth factor C	VEGFC	VEGFC	NM_005429	P49767	Growth factors and cytokines	Bind and activate VEGFR-2 receptors
Vascular endothelial growth factor D/ c-fos induced growth factor	VEGFD	FIGF	NM_004469	Q43915	Growth factors and cytokines	Bind and activate VEGFR-2 and VEGFR-3 receptors
Vascular endothelial growth factor receptor1/ fms-related tyrosine kinase 1	VEGFR1	FLT1	NM_002019	P17948	Cell signaling / receptor	Receptor tyrosine kinases; antagonist of vascular endothelial growth factor
Vascular endothelial growth factor receptor2/ Kinase insert domain receptor	VEGFR2	KDR	NM_002253	P35968	Cell signaling / receptor	Receptor for VEGF and VEGFC
Vascular endothelial growth factor receptor3/ fms-related tyrosine kinase 4	VEGFR3	FLT4	NM_002020	P35916	Cell signaling / receptor	Endothelial cell-specific receptor; regulator of blood vessel development in embryos and angiogenesis in adults tissues

Annexe II

Damier DualChip Human General

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	hyb ctl +	buffer	PSMD11	ADAM1	ANX1	AOP2	TFAP2A	TFAP2B	TFAP2C
2	APOJ	ATM	MYBL2	BAD	23kd	BAX	IS3 (RBCL)	BCL2	BCLX
3	GLB1	BID	IS4 (RCA)	BIN1	BMP2	FES	FOS	cmyc	RAF1
4	hyb Ctl -	CDH1	CDH11	CDH13	CANX	S100A8	Aldo	CASP2	CASP3
5	CASP7	CASP8	Tubu	CASP9	CATB	CTSB	CTSD	CTSL	CAV1
6	CDC42	CDK2	CDK4	CDK6	COL6A2 (993)	SPRR1B	COX2	CKB	CROC1A
7	CSF1	CSF1R	IS5 (TAPG)	CTGF	ACTB	CCNA1	IS1 (RBCS)	CCNB1	CCND1
8	CCND2	CCND3	CCNE1	CCNF	CCNH	DHFR	DP1	DP2	E2F2
9	E2F3	E2F4	cyc	EGFR	EGR1	EGR3	EIF4	ETFB	hyb Ctl -
10	BSG	EMS1	ESR2	VWF	FGF8	FGF2	FGFR (313)	FHIT	FN1
11	GADD153 (996)	GSN	IS2 (CAB)	G6PD	GAPD	GPX	GRB2	GSTPi	HMOX (998)
12	H2B/S	H3FF	H4FM	HSP27	HSP40	HSP70	IS6 (SIP)	HSP90-a	HSP90-b
13	hyb Ctl -	ICAM-1	HK1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP5	IGF1	IGF1R	IL1A
14	IL1B (423)	IL10	IL11	IL11RA	IL15	IL4	HPRT	IL6	IL8
15	ING1	ITGA6	ITGA5	ITGB1	JNK1	JNK2	JNK3 (511)	JUND	Ki-67
16	MAX	MDM2	IS3 (RBCL)	MEK1 (1004)	MDH	MEK2	IS6 (SIP)	MSRA	CENPF
17	KNSL6	KNSL5	MMP1	MMP2	MMP3	MMP7	MMP9	MMP11	MMP12
18	MMP13	MMP14	MMP15	NCK1	NCOR1	NCOR2	PLA2	ODC	hyb Ctl -
19	ON	OPN	S9	p16	p21	p27	p35	p53	p57
20	PAI1	PAI2	PAK	PCNA	PLK	POLA2	IS5 (TAPG)	PGR	ADPRT
21	PKM2	RB1	IS2 (CAB)	RRM1	SDS	S100A4	SHC	SM22	SMAD1
22	hyb Ctl -	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SOD2 (1007)	TERT	TGFBR2 (1013)	TK1	TB10
23	TYMS (829)	TIMP1	TIMP2	TNFa	TOP2	TPA	TRF1	TBXA2R	TSP1 (780)
24	TSP2	UBE2C	IS1 (RBCS)	PLAU	TFR	uPAR	IS4 (RCA)	VEGF	VEGFB
25	buffer	buffer	VEGFC	VEGFD	VEGFR1 (318)	VEGFR2 (463)	VEGFR3	buffer	buffer
26	hyb ctl +	buffer	buffer	buffer	buffer	1 ctl +	2 ctl +	3 ctl +	4 ctl +
27	hyb ctl +	buffer	5 ctl +	6 ctl +	7 ctl +	8 ctl +	9 ctl +	buffer	hyb ctl +

Annexe II : Design du « DualChip Human General ». Hyb ctl + : contrôles d'hybridation positifs, Hyb- : Contrôles d'hybridations négatifs, IS: standard interne, Buffer: contrôles négatifs de fixations, ctl + : contrôles positifs de fixation, en vert, les gènes de maintenance.

Gène	Ratio 1	Ratio 2	Gène	Ratio 1	Ratio 2	Gène	Ratio 1	Ratio 2	Gène	Ratio 1	Ratio 2	Gène	Ratio 1	Ratio 2
23kd	1,11	1,17	CENPF	0,59	-	GSTP1	0,56	-	MDM2	0,76	ND	RRM1	0,20	0,21
actb	1,12	1,17	CKB	0,34	0,58	H2B/S	0,52	0,47	MEK1	0,38	0,51	S100A	0,47	0,63
ADAM1	ND	ND	cmyc	0,35	0,52	H3FF	0,74	0,59	MEK2	0,32	0,31	S100A8	ND	ND
ADPRT	0,35	0,38	COL6A2	1,05	+	H4FM	0,45	0,50	MMP1	0,55	0,55	S9	0,73	0,73
aldo	0,56	0,55	COX2	+	+	HK1	0,60	0,62	MMP11	-	ND	SDS	ND	ND
ANX1	0,14	0,21	CROC1A	0,18	0,30	HMOX	+	+	MMP12	ND	ND	SHC	0,41	-
AOP2	0,38	0,52	CSF1	1,13	ND	HPRT	0,27	0,40	MMP13	ND	ND	SM22	0,45	-
APOJ	0,41	0,35	CSF1R	0,84	ND	HSP27	0,82	0,88	MMP14	4,84	4,50	SMAD1	0,42	0,50
ATM	-	ND	CTGF	0,51	0,64	HSP40	0,21	0,23	MMP15	ND	ND	SMAD2	0,32	0,37
BAD	0,45	0,84	CTSB	1,31	1,95	HSP70	0,29	0,37	MMP2	2,09	+	SMAD3	0,72	0,75
BAX	0,38	0,58	CTSD	0,33	0,43	HSP90-a	0,54	0,55	MMP3	ND	ND	SMAD4	0,24	0,28
BCL2	-	ND	CTSL	0,86	1,58	HSP90-b	0,34	0,27	MMP7	0,25	0,21	SOD2	1,01	1,25
BCLX	0,23	0,36	cyc	0,39	0,58	ICAM-1	+	+	MMP9	1,32	ND	SPRR1B	0,61	1,91
BID	0,31	0,45	DHFR	0,09	0,19	IGF1	ND	ND	MSRA	0,25	0,33	TB10	0,95	1,24
BIN1	0,54	0,74	DP1	0,19	0,31	IGF1R	0,84	0,86	MYBL2	0,21	0,25	TBXA2R	-	ND
BMP2	1,29	2,41	DP2	0,30	-	IGFBP2	0,60	0,54	NCK1	0,92	+	TERT	ND	ND
BSG	0,50	0,49	E2F2	0,59	ND	IGFBP3	0,13	0,17	NCOR1	0,29	-	TFAP2A	0,64	1,08
CANX	0,32	0,32	E2F3	-	ND	IGFBP5	0,26	-	NCOR2	0,32	0,19	TFAP2B	0,64	ND
CASP2	ND	ND	E2F4	0,27	-	IL10	ND	ND	ODC	0,86	1,23	TFAP2C	0,26	0,35
CASP3	-	ND	EGFR	0,32	0,70	IL11	0,59	0,56	ON	0,59	0,49	TFR	0,25	0,48
CASP7	0,29	0,48	EGR1	1,55	+	IL11RA	0,82	0,57	OPN	ND	ND	TGFR2	0,17	0,21
CASP8	0,52	0,80	EGR3	ND	ND	IL15	ND	ND	p16	-	-	TIMP1	0,72	1,25
CASP9	0,35	0,54	EIF4	0,19	0,39	IL1A	ND	ND	p21	0,61	ND	TIMP2	0,97	1,09
CATB	0,22	0,40	EMS1	0,26	0,21	IL1B	19,48	+	p27	0,44	0,81	TK1	0,33	0,36
CAV1	0,20	0,37	ESR2	ND	ND	IL4	ND	ND	p35	ND	ND	TNFa	ND	ND
CCNA1	0,73	+	ETFB	0,49	0,90	IL6	+	ND	p53	0,47	-	TOP2	0,50	0,89
CCNB1	0,15	0,29	FES	ND	ND	IL8	+	+	p57	ND	ND	TPA	0,09	0,19
CCND1	0,25	0,39	FGF2	-	ND	ING1	ND	ND	PAI1	0,93	0,50	TRF1	0,27	0,45
CCND2	0,18	0,24	FGF8	ND	ND	ITGA5	0,91	0,89	PAI2	ND	ND	TSP1	-	ND
CCND3	0,21	0,29	FGFR	0,29	-	ITGA6	1,77	+	PAK	0,79	1,20	TSP2	0,54	0,65
CCNE1	0,43	ND	FHIT	0,94	ND	ITGB1	0,83	0,93	PCNA	0,19	0,24	Tubu	1,02	0,81
CCNF	-	-	FN1	2,19	+	JNK1	0,55	ND	PGR	ND	ND	TYMS	0,40	0,43
CCNH	0,42	0,91	FOS	+	+	JNK2	0,36	0,48	PKM2	0,99	0,73	UBE2C	0,34	0,54
CDC42	0,52	0,94	G6PD	0,63	0,46	JNK3	ND	ND	pla2	0,53	1,12	uPAR	0,51	1,12
CDH1	ND	ND	GADD153	1,66	+	JUND	ND	-	PLAU	0,81	+	VEGF	0,65	ND
CDH11	0,09	0,15	GAPD	1,02	0,96	KI-67	0,36	0,29	PLK	0,22	0,16	VEGFB	0,42	0,60
CDH13	0,85	ND	GLB1	0,31	0,33	KNSL5	0,23	0,34	POLA2	0,39	-	VEGFC	0,23	0,44
CDK2	0,25	0,38	GPX	0,43	0,44	KNSL6	0,41	0,43	PSMD11	0,27	0,37	VEGFD	ND	ND
CDK4	0,20	0,28	GRB2	0,33	0,31	MAX	0,26	0,26	RAF1	0,34	0,37	VEGFR1	ND	ND
CDK6	0,64	0,66	GSN	1,83	+	MDH	0,56	0,89	RB1	0,35	0,48	VEGFR2	ND	ND
												VEGFR3	0,50	0,78
												VWF	ND	ND

Annexe III : Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes dans les cellules 143B rho⁰ analysée avec la « DualChip Human General ». Les valeurs se trouvant dans une case jaune représentent une variation quantitative de l'expression, dans une case verte une variation qualitative de l'expression et dans une case violette les « HKG ». ND = Non Détecté. L'analysé a été réalisée sur des doubles de RT-PCR (Ratio 1 et 2).

Annexe IV: Liste des gènes analysables avec le damier « DualChip Human Apoptosis »

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	ABL1	ABL1	X16416	P00519	Cell cycle	ATP binding; kinase activity
a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, convertin	ADAM 17	ADAM 17	U69611	P78536	Cell migration	Metalloendopeptidase activity
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	AKT1	NM 005163	P31749	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	AKT2	AKT2	NM 001626	P31751	Apoptosis	Protein amino acid phosphorylation
BCL2-antagonist of cell death	BAD	BAD	NM 004322	Q92934	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BCL2-associated athanogene	BAG	BAG1	AF022224	Q99933	Apoptosis	Interacts with Bcl2
BCL2-antagonist/killer 1	BAK 1	BAK 1	U16811	Q16611	Apoptosis	Accelerates programmed cell death by binding to BCL-2
BCL2-associated X protein	bax	BAX	NM 004324	Q8WXU1	Apoptosis	Induces the release of cyt C, activation of caspase-3
B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	BCL2	NM 000633	P10415	Apoptosis	Regulates the death cell
BCL2-related protein A1	BCL2A1	BCL2A1	NM 004049	Q16548	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BCLX protein	BclX	BclX	NM 001191	Q07817	Apoptosis	Induces or Inhibits apoptosis according to the alternative form
BH3 interacting domain death agonist	BID	BID	NM 001196	P55957	Apoptosis	Apoptotic mitochondrial changes; Death receptor ligand
23kDa Highly basic protein	23kd	RPL13A	X56932	P39023	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	BIK	BIK	NM 001197	Q13323	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
baculoviral IAP repeat-containing 2	BIRC2	BIRC2	NM 001166	Q13490	Apoptosis	Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
Aldolase A	Aldo	ALDOA	NM 000034	P04075	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	BIRC3	AF070674	Q13489	Apoptosis	Interacts with TNF receptor associated factors 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2)
baculoviral IAP repeat-containing 4	BIRC4	BIRC4	NM 001167	P98170	Apoptosis	Inhibitor of caspase -3, -7 and -9.
baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	BIRC5	NM 001168	Q15392	Apoptosis	Cysteine protease inhibitor activity
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	BNIP3	NM 004052	Q12983	Apoptosis	Binds to the adenovirus E1B 19 kDa protein or to BCL-2
caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	CASP1	M87507	P28906	Apoptosis	Caspase activity
caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed)	CASP2	CASP2	NM 001224	P42575	Apoptosis	Activated in cytotoxic stress, required for the permeabilization of mitochondria, required for stress-induced apoptosis
caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CASP3	CASP3	NM 004346	P42574	Apoptosis	Initiation of apoptotic cell death; PARP cleavage protease
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	CASP4	NM 001225	P49662	Protein binding	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution
caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	CASP8	CASP8	X98172	O15519	Apoptosis	Thiol protease; PARP cleavage protease=signature apoptotic fragments
cyclinD1	cnd1	CCND1	NM 053056	P24385	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
cyclinD2	cnd2	CCND2	NM 001759	P30279	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
Alpha-tubulin	Tabu	K-ALPHA-1	NM 006082	P78395	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
cyclin H	CCNH	CCNH	NM 001239	P51946	Cell cycle	Phosphorylates and activates cyclin-dependant protein kinases in the regulation of cell cycle progression
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDC2	CDC2	X05360	P06493	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
cell division cycle 25C	CDC25C	CDC25C	M34065	P30307	Cell cycle	Dephosphorylates CDC2 and
CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	CDC6	CDC6	NM 001254	Q99741	Cell cycle	Negative regulation of DNA replication
cyclin-dependent kinase 2	CDK2	CDK2	NM 001798	P24941	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
cyclin-dependent kinase 4	CDK4	CDK4	U79269	P11802	Cell cycle	The activity of this kinase is restricted to the G1-S phase; cell proliferation
cyclin-dependent kinase 5	CDK5	CDK5	NM 004935	Q00535	Cell cycle	Interacts with p35 which
cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	p35	CDK5R1	NM 003885	P04083	Cell cycle	Activates the kinase
cyclin-dependent kinase 6	cdk6	CDK6	NM 001259	Q00534	Cell cycle	Interacts with D-type cyclins and phosphorylate pRB in G1-phase
Beta-Actin	ACTB	ACTB	NM 001101	P02570	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	cdk7	CDK7	NM 001799	P50613	Cell cycle	Regulation of cyclin dependent protein kinase activity
cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	cdk9	CDK9	NM 001261	P50750	Cell proliferation	Regulation of cell cycle
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	p21	CDKN1A	U03106	P38936	Cell cycle	Inhibitor 1A of G1-specific CDK-cyclin complexes
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	p57	CDKN1C	NM 000076	P49918	Cell cycle	Inhibits G1-specific CDK-cyclin complexes, negative regulator of cell proliferation.
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	p16	CDKN2A	L27211	Q8N726	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 2A, tumor suppressor gene
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	p14-15	CDKN2B	U17075	Q8N1A6	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	CFLAR	NM 003879	O15519	Apoptosis	Caspase activity

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
CDC-like kinase 1	CLK1	CLK1	NM_004071	Q8N5V8	Cell cycle	Protein serine/threonine kinase activity
Apolipoprotein J	APOJ	CLU	J02908	P10909	Lipid metabolism	Activate its kinase activity
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD	CRADD	NM_003805	P78560	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	CSE1L	AF053641	P55060	Cell proliferation	Intracellular protein transport
Cyclophilin 33A	cyc	PPIE	AF042385	Q9UNP9	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
DDIT4L: DNA-damage-inducible transcript 4-like	REDD2	DDIT4L	NM_145244	Q96D03	/	/
DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	DFFA	DFFA	U91985	Q00273	Apoptosis	DNA fragmentation
E2F transcription factor 1	E2F1	E2F1	NM_005225	Q01094	Transcription	Tumor suppressor, Transcription factor
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	GAPD	GAPD	NM_002046	P04406	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
E2F transcription factor 3	E2F3	E2F3	NM_001949	Q00716	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein
E2F transcription factor 5, p130-binding	E2F5	E2F5	U31556	Q15329	Transcription	Transcription factor, DNA binding
Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	FADD	FADD	NM_003824	Q13158	Apoptosis	Active caspase-8 initiates the subsequent cascades of caspase mediating apoptosis
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	GADD45A	NM_001924	P24522	Stress response	Glutathione transferase activity
growth arrest-specific 1	GAS1	GAS1	NM_002048	P54826	DNA repair	Structural constituent of ribosome
glutathione peroxidase 1	GPX	GPX1	M21304	P07203	Oxidative metabolism	Protects the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown
growth factor receptor-bound protein 2	GRB2	GRB2	NM_002086	P29354	Cell cycle	Cell structure
glutathione S-transferase A1	GSA	GSA	NM_000846	P09210	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
glutathione S-transferase M1	GSM	GSM	NM_000561	P09488	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
glutathione reductase	GSR	GSR	NM_000637	P00390	Drug metabolism	Glutathione : Maintain high levels of reduced glutathione (phase II)
Glutathione S-transferase pi	GSTPi	GSTP1	NM_000852	P09211	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
Glutathione S-transferase theta1	GSTT1	GSTT1	NM_000853	P30711	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	IGF1	X57025	P01343	Growth factor and cytokines	Muscle/skeletal development; Growth factor
insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	IGF1R	NM_000875	P08069	Cell signaling / receptor	Anti-apoptotic; receptor
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	IGF2	IGF2	S77035	P01344	Skeletal development	Regulation of cell cycle; potent mitogens for cultured cells
insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	IGF2R	NM_000876	P11717	Receptor	Binds insulin growth factor II
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	IGFBP2	M35410	P18065	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
Hexokinase 1	HK1	HK1	M75126	P19367	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	IGFBP3	X64875	P17936	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	IGFBP4	NM_001552	P22692	Cell proliferation	Regulation of cell growth
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT	HPRT1	NM_000194	P00492	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	IGFBP5	M65062	P24593	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
insulin-like growth factor binding protein 6	IGFBP6	IGFBP6	M69054	P24592	Signal transduction	Signal transduction
inhibitor of growth family, member 1	ING1	ING	NM_005537	Q9UK53	Cell proliferation	Tumor suppressor; potent growth regulator in normal and in established cells
v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN	JUN	NM_002228	P05412	MAPK signaling pathway	RNA polymerase II transcription factor activity
lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	TNFB	LTA	NM_000595	P01374	Growth factor and cytokines	Induction of apoptosis
lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	LTB	L11015	Q06643	Growth factor and cytokines	Role in immune response
mitogen-activated protein kinase kinase 1	MEK1	MAP2K1	L11284	Q02750	Cell cycle	Kinase; Catalyzes the phosphorylation of a thr and a tyr in a thr-glu-tyr
mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	MAP2K5	BT006780	Q13163	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase kinase 6	MAP2K6	MAP2K6	NM_002758	P52564	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase kinase 14	MAP3K14	MAP3K14	NM_003954	Q99558	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 1	erk2	MAPK1	M84489	P28482	Apoptosis	Transferase activity
mitogen-activated protein kinase 10	JNK3	MAPK10	NM_002753	P53779	Stress response	Kinase
mitogen-activated protein kinase 12	MAPK12	MAPK12	NM_002969	P53778	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	MAPK14	AF100544	Q16539	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
Malate dehydrogenase 1	MDH	MDH1	NM_005917	P24347	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
mitogen-activated protein kinase 3	erk1	MAPK3	X60188	P27361	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 7	erk5	MAPK7	U29725	Q13164	Cell adhesion	Protein-tyrosine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 8	JNK1	MAPK8	L26318	P45983	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
mitogen-activated protein kinase 9	JNK2	MAPK9	U09759	P45984	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
Phospholipase A2	PLA2	YWHAZ	M86400	P04054	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	MCL1	AF118124	Q07820	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	MDM2	MDM2	NM_002392	Q00987	Oncogenesis	Transcription factor
microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	MGST1	J03746	P10620	Glutathione metabolism	Transferase activity
v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	MYCN	MYCN	NM_005378	P04198	Transcription factor	Transcription factor activity
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	NFATC1	U80917	Q95644	Wnt signaling pathway	Regulate the activation, proliferation, differentiation and programmed death of T-lymphocytes
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFKB	NFKB1	NM_003998	P19838	Transcription	Inflammatory response; antibacterial humoral response
nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	NOS2A	NOS2A	U31511	P35228	Electron transport	Nitric-oxide synthase activity
proliferating cell nuclear antigen	PCNA	PCNA	NM_002592	P12004	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility
phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	PDE1B	PDE1B	NM_000924	Q01064	Apoptosis	Calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
Ribosomal Protein S9	S9	RPS9	NM_001013	P46781	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	PLD1	PLD1	NM_002662	Q13393	Phospholipid metabolism	Phospholipase D activity
polo-like kinase (Drosophila)	PLK	PLK	U01038	Q15153	DNA repair / synthesis	Mitosis, kinase
P450 (cytochrome) oxidoreductase	POR	POR	NM_000941	P16435	Electron transport	Oxidoreductase activity
v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	RAF1	X03484	P04049	Oncogenesis	Apoptosis regulation, Kinase
retinoic acid receptor, beta	RARB	RARB	Y00291	P10826	Receptor activity	Receptor of retinoic acid
retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	RB1	RB1	NM_000321	P06400	Cell cycle	Interacts with histone deacetylase to repress transcription; tumor repressor
retinoblastoma-like 2 (p130)	RB2	RBL2	NM_005611	P61163	Cell cycle	Negative regulation of cell cycle
retinoblastoma binding protein 1	RBP1	RBP1	NM_002899	P29374	DNA binding / cell cycle	Chromatin binding
receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	RIPK1	RIPK1	NM_003804	Q13546	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
TRAF family member-associated NFKB activator	TANK	TANK	U59863	Q92844	Signal transduction	Protein binding
transcription factor Dp-1	DP1	TFDP1	NM_007111	Q00765	Transcription	Mediator of transcriptional activation by TGF-beta receptor; involved in the cell cycle ; Pol II transcription
transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	DP2	TFDP2	NM_006286	Q14188	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
Serine Dehydratase	SDS	SDS	NM_006843	P17026	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNFA	TNF	NM_000594	P01375	Apoptosis	Endotoxin; pathophysiology of sepsis
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	TNFRSF10A	TNFRSF10A	NM_003844	Q00220	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	TNFRSF10B	AF016266	Q14763	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFRSF1A	TNFRSF1A	NM_001065	P19438	Growth factor and cytokine	Receptor activity
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	TNFRSF1B	TNFRSF1B	NM_001066	P20333	Cell signaling / receptor	Receptor
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	TNFRSF6	NM_000043	P25445	Growth factor and cytokine	Transmembrane receptor activity
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	TNFSF10	NM_003810	P50591	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)	TNFSF5	TNFSF5	NM_000074	P29965	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	TNFSF6	TNFSF6	NM_000639	P48023	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
Transferrin receptor	TFR	TFR	NM_003234	P02786	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	TNFSF7	TNFSF7	NM_001252	P32970	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	p53	TP53	AF307851	P04637	Cell cycle	DNA-binding protein; tumor suppressor activity
tumor protein p73	TP73	TP73	NM_005427	Q15350	Transcription factor	Transcription factor activity
TNFRSF1A-associated via death domain	TRADD	TRADD	NM_003789	Q15628	Apoptosis	induction of apoptosis
TNF receptor-associated factor 2	TRAF2	TRAF2	NM_021138	Q12933	Signal transduction	Signal transducer activity
TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	TRAF3	U21092	Q13114	Apoptosis	Role in immune response
TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	TRAF5	AB000509	Q00463	Apoptosis	Signal transducer activity
TNF receptor-associated factor 6	TRAF6	TRAF6	U78798	Q9Y4K3	MAPK signaling pathway	Mediates activation of NF-kappa-B and JNK

Annexe V

DualChip Human Apoptosis									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Hyb +	buffer	ABL1	ADAM 17	AKT1	AKT2	BAD	buffer	BAG1
2	Semi	BAK 1	IS4(RCA)	BAX	Semi	BCL2	IS3(RBCL)	BCL2A1	Semi
3	BclX	buffer	BID	buffer	RPL13A (23Kd)	buffer	BIK	buffer	BIRC2
4	Hyb -	ALDOA (ALDO)	BIRC3	BIRC4	Semi	BIRC5	BNIP3	CASP1	CASP2
5	CASP3	CASP4	buffer	CASP8	CCND1	CCND2	buffer	K-ALPHA-1 (tubu)	CCNH
6	Semi	CDC2	CDC25C	CDC6	Semi	CDK2	IS5(TAPG)	CDK4	Semi
7	CDK5	CDK5R1	IS1(RBCS)	CDK6	ACTB (acti)	CDK7	CDK9	CDKN1A	CDKN1C
8	CDKN2A	CDKN2B	CFLAR	CLK1	CLU	CRADD	CSE1L	PPIE /cyc	Hyb -
9	DDIT4L	buffer	DFFA	E2F1	GAPD / GAPDH	E2F3	E2F5	buffer	FADD
10	Semi	GADD45A (997)	IS2(CAB)	GAS1	Semi	GPX1	IS6(SIP)	GRB2	Semi
11	GSA	buffer	GSM	buffer	GSR	buffer	GSTP1	buffer	GSTT1
12	Hyb -	IGF1	IGF1R	IGF2	Semi	IGF2R	IGFBP2	HK1	IGFBP3
13	IGFBP4	HPRT1 (HPRT)	buffer	IGFBP5	IGFBP6	ING	buffer	JUN	LTA (AF-1012)
14	Semi	LTB	IS3(RBCL)	MAP2K1 (1004)	Semi	MAP2K5	MAP2K6	MAP3K14	Semi
15	MAPK1	MAPK10 (511)	MAPK12	MAPK14	MDH1 (MDH)	MAPK3	IS6(SIP)	MAPK7	MAPK8
16	MAPK9	YWHAZ (PLA2)	MCL1	MDM2	MGST1	MYCN	NFATC1	NFKB1	Hyb -
17	NOS2A	buffer	PCNA	PDE1B	RPS9 (S9)	PLD1	IS5(TAPG)	buffer	PLK
18	Semi	POR	IS2(CAB)	RAF1	Semi	RARB	RB1	RBL2	Semi
19	RBP1	buffer	RIPK1	buffer	TANK	buffer	TFDP1	buffer	TFDP2
20	Hyb -	SDS(SDH)	TNF	TNFRSF10A	Semi	TNFRSF10B	TNFRSF1A (1011)	TNFRSF1B	TNFRSF6
21	TNFSF10	TNFSF5	buffer	TNFSF6	TFRC (TFR)	TNFSF7	buffer	TP53	TP73
22	Semi	TRADD	IS1(RBCS)	TRAF2	Semi	TRAF3	IS4(RCA)	TRAF5	Semi
23	Hyb +	buffer	TRAF6	buffer	buffer	1ctl +	2ctl +	3ctl +	4ctl +
24	Hyb +	buffer	5ctl +	6ctl +	7ctl +	8ctl +	9ctl +	buffer	Hyb +

Annexe V: Design du « DualChip Human General ». Hyb ctl + : contrôles d'hybridation positifs, Hyb- : Contrôles d'hybridations négatifs, IS: standard interne, buffer: contrôles négatifs de fixations, ctl +: contrôles positifs de fixation, en vert, les gènes de maintenance.

143B

Gène	Ratio	Gène	Ratio	Gène	Ratio	Gène	Ratio
ABL1	1,17	CDK5R1	1,00	IGF2R	1,01	PLK	1,20
ACTB	1,46	CDK6	0,79	IGFBP2	0,97	POR	0,81
ADAM 17	0,85	CDK7	1,58	IGFBP3	0,41	PPIE	0,96
AKT1	0,82	CDK9	1,08	IGFBP4	1,04	RAF1	0,81
AKT2	0,88	CDKN1A	0,80	IGFBP5	0,90	RARB	1,50
ALDOA	0,97	CDKN1C	0,82	IGFBP6	1,16	RB1	0,97
BAD	0,81	CDKN2A	0,83	ING	1,13	RBL2	1,36
BAG1	1,46	CDKN2B	0,86	JUN	0,33	RBP1	0,75
BAK 1	0,63	CFLAR	1,12	K-ALPHA-1	1,23	RIPK1	1,00
BAX	0,96	CLK1	2,18	LTA	0,90	RPL13A	1,00
BCL2	1,23	CLU	1,65	LTB	0,83	RPS9	1,06
BCL2A1	0,91	CRADD	1,00	MAP2K1	0,74	SDS	0,78
BdX	0,73	CSE1L	0,93	MAP2K5	1,35	TANK	1,49
BID	0,80	DDIT4L	0,60	MAP2K6	1,11	TFDP1	0,86
BIK	0,96	DFFA	0,81	MAP3K14	0,96	TFDP2	1,79
BIRC2	0,98	E2F1	0,89	MAPK1	0,75	TFRC	0,72
BIRC3	1,36	E2F3	0,76	MAPK10	0,75	TNF	0,61
BIRC4	0,97	E2F5	1,35	MAPK12	0,86	TNFRSF10A	1,18
BIRC5	0,91	FADD	0,87	MAPK14	0,77	TNFRSF10B	0,95
BNIP3	0,86	GADD45A	0,67	MAPK3	0,95	TNFRSF1A	0,85
CASP1	0,60	GAPD	0,98	MAPK7	0,91	TNFRSF1B	0,82
CASP2	0,97	GAS1	2,35	MAPK8	0,94	TNFRSF6	+
CASP3	0,94	GPX1	1,05	MAPK9	0,88	TNFSF10	1,67
CASP4	1,26	GRB2	0,89	MCL1	1,27	TNFSF5	ND
CASP8	1,24	GSA	0,97	MDH1	1,30	TNFSF6	0,70
CCND1	0,52	GSM	1,00	MDM2	1,11	TNFSF7	0,93
CCND2	1,40	GSR	0,85	MGST1	0,92	TP53	1,48
CCNH	0,95	GSTP1	1,05	MYCN	+	TP73	0,79
CDC2	1,33	GSTT1	0,92	NFATC1	1,38	TRADD	1,29
CDC25C	2,27	HK1	0,70	NFKB1	0,96	TRAF2	0,85
CDC6	0,81	HPRT1	0,84	NOS2A	0,97	TRAF3	0,81
CDK2	0,89	IGF1	ND	PCNA	0,77	TRAF5	1,94
CDK4	0,87	IGF1R	1,55	PDE1B	0,63	TRAF6	1,21
CDK5	1,10	IGF2	0,83	PLD1	1,71	YWHAZ	0,99

143B rho0

Gène	Ratio	Gène	Ratio	Gène	Ratio	Gène	Ratio
ABL1	1,55	CDK5R1	0,67	IGF2R	1,00	PLK	1,07
ACTB	ND	CDK6	0,65	IGFBP2	1,19	POR	0,83
ADAM 17	0,93	CDK7	1,06	IGFBP3	0,34	PPIE	0,67
AKT1	0,90	CDK9	0,75	IGFBP4	2,03	RAF1	0,81
AKT2	0,88	CDKN1A	0,96	IGFBP5	3,18	RARB	0,64
ALDOA	1,08	CDKN1C	0,64	IGFBP6	1,36	RB1	0,95
BAD	0,84	CDKN2A	0,56	ING	1,56	RBL2	1,05
BAG1	1,29	CDKN2B	0,66	JUN	0,89	RBP1	0,84
BAK 1	0,70	CFLAR	0,91	K-ALPHA-1	0,92	RIPK1	0,95
BAX	1,01	CLK1	1,14	LTA	0,91	RPL13A	1,02
BCL2	0,97	CLU	1,22	LTB	1,24	RPS9	1,08
BCL2A1	1,95	CRADD	0,82	MAP2K1	1,04	SDS	0,83
BdX	0,68	CSE1L	0,59	MAP2K5	1,43	TANK	1,39
BID	0,94	DDIT4L	0,64	MAP2K6	1,29	TFDP1	0,73
BIK	0,74	DFFA	0,90	MAP3K14	0,58	TFDP2	1,15
BIRC2	1,03	E2F1	0,82	MAPK1	0,98	TFRC	0,77
BIRC3	1,09	E2F3	0,67	MAPK10	0,79	TNF	1,04
BIRC4	1,20	E2F5	1,40	MAPK12	1,03	TNFRSF10A	0,96
BIRC5	1,00	FADD	0,85	MAPK14	0,99	TNFRSF10B	1,30
BNIP3	0,95	GADD45A	0,64	MAPK3	1,08	TNFRSF1A	1,05
CASP1	0,84	GAPD	1,05	MAPK7	0,83	TNFRSF1B	0,79
CASP2	0,72	GAS1	2,25	MAPK8	0,70	TNFRSF6	1,06
CASP3	0,72	GPX1	1,16	MAPK9	1,26	TNFSF10	0,83
CASP4	0,99	GRB2	0,79	MCL1	2,04	TNFSF5	ND
CASP8	1,21	GSA	ND	MDH1	1,11	TNFSF6	0,80
CCND1	0,44	GSM	0,94	MDM2	1,30	TNFSF7	0,87
CCND2	1,17	GSR	0,87	MGST1	1,04	TP53	1,29
CCNH	0,73	GSTP1	1,16	MYCN	2,73	TP73	0,63
CDC2	0,79	GSTT1	0,77	NFATC1	1,14	TRADD	1,14
CDC25C	1,31	HK1	0,83	NFKB1	1,12	TRAF2	0,61
CDC6	0,61	HPRT1	1,04	NOS2A	0,96	TRAF3	0,70
CDK2	0,77	IGF1	ND	PCNA	0,82	TRAF5	0,50
CDK4	0,80	IGF1R	2,14	PDE1B	0,76	TRAF6	0,62
CDK5	0,83	IGF2	1,12	PLD1	1,26	YWHAZ	1,27

Annexe VI :

Annexe VI : Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes dans les cellules 143B et 143B rho⁰ incubées en présence de staurosporine à 100 nM analysée avec la « DualChip Human Apoptosis ». Les valeurs se trouvant dans une case grise représentent une variation quantitative de l'expression et les « + » et « - » une variation qualitative de l'expression. ND = Non Détecté.