

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Etude de la réponse apoptotique de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial engendré par la mutation A8344G de l'ARNtLys mitochondrial

THIRY, Frédéric

*Award date:*  
2006

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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



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

**Faculté des Sciences**

**ETUDE DE LA REPONSE APOTOTIQUE DE CELLULES PRESENTANT UN  
DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL ENGENDRE PAR LA MUTATION  
A8344G DE L'ARNt<sup>Lys</sup> MITOCHONDRIAL**

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

Frédéric THIRY

Juin 2006

**Etude de la réponse apoptotique de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial engendré par la mutation A8344G de l'ARNt<sup>Lys</sup> mitochondrial**

THIRY Frédéric

Résumé

De nombreuses altérations du génome mitochondrial conduisent à des dysfonctionnements mitochondriaux synonymes de stress énergétiques et oxydatifs. Ceux-ci sont à l'origine de nombreuses pathologies neurodégénératives et neuromusculaires telles que le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy Ragged-Red Fibbers), causé par une mutation ponctuelle dans un gène mitochondrial codant pour un ARNt<sup>Lys</sup>. Une mortalité cellulaire par apoptose, probablement liée à la surexpression du récepteur Fas, semblerait survenir dans les muscles de patients atteints du syndrome MERRF. Afin d'étudier ce processus *in vivo*, nous utilisons des cellules cybrides porteuses de la mutation MERRF (A8344G) à l'état hétéroplasmique. Ces cellules présentent une hypersensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine, qui provoque une élévation du niveau de ROS (Reactive Oxygen Species) et du calcium intracellulaire. Dans un premier temps, nous avons précisé le rôle des ROS sur la sensibilité des cellules cybrides MERRF face à l'apoptose : (i) seules les cellules cybrides mutées présentent une activation de la caspase-3 en réponse à la menadione, molécule pro-oxydante, (ii) les cellules cybrides mutées présentent un niveau plus oxydant que les cybrides sauvages en absence et en présence de staurosporine, un phénomène susceptible d'accroître, ou d'accélérer, le processus apoptotique, (iii) un antioxydant spécifique de la mitochondrie, le MitoQ, ainsi qu'un chélateur calcique, diminuent l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine dans les cellules cybrides mutées. Ces résultats suggèrent que le potentiel oxydant élevé des cellules porteuses de la mutation est en partie responsable de leur sensibilité à l'apoptose. Dans un deuxième temps, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité caspase-3 suite à une activation du récepteur Fas, un résultat qui peut être dû au niveau d'expression (trop) faible de la protéine dans ce modèle cellulaire.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2006

**Promoteur:** P. Renard

## Remerciements

La rédaction de ce travail n'aurait pas été possible sans le concours de certaines personnes que je tiens à remercier très sincèrement :

Monsieur José Remacle et Madame Martine Raes de m'avoir accueilli au sein de l'URBC.

Patsy pour ta patience (il en faut parfois pour essayer de comprendre ce que je dis), ta disponibilité, tes conseils avisés, ton aide de dernière minute,... et à Thierry pour son point de vue critique et rigoureux apporté tout au long de mon parcours d'expérimentateur.

Les trois compères, ainsi que leur « victime », du bureau 435, pour les moments de détente apportés. Je remercie tout particulièrement Chouback pour son aide en tout point (et SuperPh pour le Bradford).

Mes compagnons de galère et plus particulièrement Ben (Yeah), Manu, Maha et Neil.

Mes parents pour m'avoir soutenu financièrement et moralement.

Ma fiancée, Marie, qui m'a supporté et toujours soutenu depuis le début de mes études.

Et tout ceux que j'ai oublié de citer mais qui se reconnaîtront.

Enfin, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de porter un regard critique sur ce travail. D'emblée, je vous souhaite à tous une agréable lecture...

## Abbreviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADP : Adénosine DiPhosphate  
AIF : Apoptosis Inducing Factor  
ANOVA : Analysis Of VAriance  
ANT : Adenine Nucleotide Translocase  
Apaf-1: Apoptotic Protease Activating Factor-1  
APS : Ammonium PerSulfate  
ARN : Acide RiboNucléique  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins  
BH : Bcl-2 Homology  
BSA : Bovine Serum Albumine  
CAD : Caspase-Activated Dnase  
CARD : CAspase-Recruitment Domain  
c-FLIP : Cellular FLICE Inhibitory Protein  
CREB : cAMP-Responsive Element-Binding protein  
CREB : cAMP-Responsive Element-Binding protein  
DD: Death Domain  
DED: Death Effector Domain  
DHG: Dulbecco's modified Eagle's medium-High Glucose  
DMSO : DiMéthylSulfOxyde  
DTT: DiThioThreitol  
EDTA : Ethylène DiamineTetraAcetic acid  
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting  
FAD: Flavin Adenin Dinucleotide  
FADD : Fas Associated Death Domain  
Gpx : Glutathione PeroXydase  
GSH : glutathion réduit  
GSSG : glutathion oxydé  
H<sub>2</sub>DCF-DA : 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate  
HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution  
HtrA2 : Hight temperature requirement protein A2  
IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins  
ICAD: inhibitor of CAD  
JNK : Jun N-terminal Kinase  
kDa : kilo dalton  
MELAS : Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like Episode  
MEN : menadione sodium bisulfite  
MERRF : Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers  
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymerase  
pb : paire de base  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PIB : Phosphatase Inhibitor Buffer  
PIC : Protease Inhibitor Cocktail  
PKC : Phospholipid/Ca<sup>++</sup>-dependent Protein Kinase

PTP : Permeability Transition Pore  
Puma : p53-upregulated modulator of apoptosis  
ROS : Reactive Oxygen Species  
RyR-1 : Ryanodine Receptor-1  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
Smac/DIABLO: Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein  
with LOw pI  
SOD : SuperOxyde Dismutase  
STS : staurosporine  
SVF : Sérum de Veau Fœtal  
TBS : Tris Buffer Saline  
TEMED : TEtraMéthylEthylèneDiamine  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TNFR Associated Death Domain  
TNFR1: TNF Receptor 1  
TRADD : TNFR Associated Death Domain  
TRAF2 : TNFR Associated Factor 2  
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel

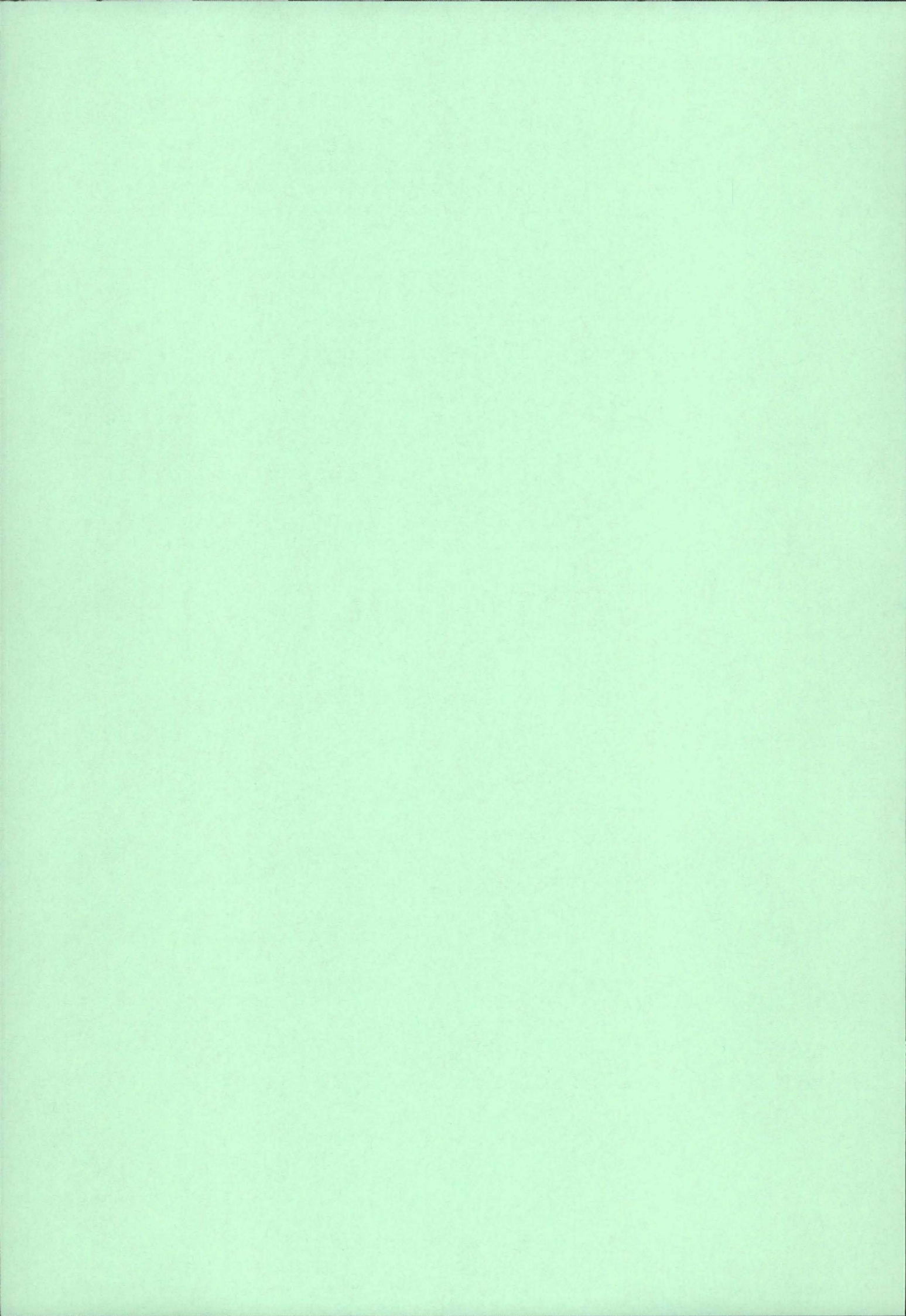
## Table des matières

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1	LA MITOCHONDRIE.....	1
1.1.1	<i>La mitochondrie : généralités</i> .....	1
1.1.1.1	Structure et fonctions.....	1
1.1.1.2	Le génome mitochondrial.....	2
1.1.2	<i>La mitochondrie et la phosphorylation oxydative</i> .....	2
1.1.2.1	La respiration cellulaire.....	2
1.1.2.2	Implications de la respiration cellulaire dans la production de ROS et leur détoxification.....	3
1.1.3	<i>La mitochondrie et l'homéostasie du calcium</i> .....	5
1.2	LES DYSFONCTIONNEMENTS MITOCHONDRIAUX.....	6
1.2.1	<i>Les dysfonctionnements mitochondriaux et leurs implications pathologiques</i> ..	6
1.2.2	<i>Le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibbers)</i> .....	7
1.3	LES MODELES CELLULAIRES.....	8
1.3.1	<i>Les cellules déplétées en ADN mitochondrial</i> .....	8
1.3.2	<i>Les cellules cybrides MERRF</i> .....	8
1.3.2.1	La synthèse protéique.....	9
1.3.2.2	Le potentiel de membrane.....	10
1.3.2.3	L'homéostasie du calcium.....	10
1.3.2.4	La communication rétrograde.....	11
1.3.2.5	Le potentiel oxydo-réducteur.....	11
1.4	L' APOPTOSE.....	12
1.4.1	<i>Acteurs moléculaires de l'apoptose</i> .....	12
1.4.1.1	Les caspases : structure, classes, activation et substrats.....	12
1.4.1.2	Les inhibiteurs de caspases.....	13
1.4.1.3	Les membres de la familles Bcl-2.....	13
1.4.2	<i>Perméabilisation de la membrane mitochondriale</i> .....	14
1.4.3	<i>L'apoptosome</i> .....	15
1.4.4	<i>Les voies d'activation de l'apoptose</i> .....	15
1.4.4.1	La voie intrinsèque.....	15
1.4.4.2	La voie extrinsèque.....	16
1.4.4.3	Les voies indépendantes des caspases.....	17
1.4.5	<i>Relation entre la mutation MERRF et le processus apoptotique</i> .....	17
<b>2</b>	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>21</b>
2.1	LA CULTURE CELLULAIRE.....	21
2.1.1	<i>Les types cellulaires étudiés</i> .....	21
2.1.2	<i>Maintien et stimulations des cultures</i> .....	21
2.1.3	<i>Congélation et décongélation des cellules</i> .....	21
2.2	MESURE DE L'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> INTRACELLULAIRE.....	22
2.2.1	<i>Incubation en présence de la sonde et lecture</i> .....	22
2.2.2	<i>Normalisation des valeurs</i> .....	22
2.3	DOSAGE DE PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD.....	22
2.4	DETECTION DES O <sub>2</sub> <sup>-</sup> MITOCHONDRIAUX.....	23
2.4.1	<i>Par spectrofluorimétrie</i> .....	23
2.4.1.1	Réactifs.....	23
2.4.1.2	Incubation en présence de la sonde et lecture.....	
2.4.1.3	Normalisation des valeurs.....	

2.4.2	<i>Par microscopie confocale à fluorescence</i> .....	24
2.4.2.1	Réactifs.....	24
2.4.2.2	Incubation en présence de la sonde et visualisation.....	24
2.5	MISE EN EVIDENCE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN GENOMIQUE.....	24
2.5.1	<i>Réactifs</i> .....	24
2.5.2	<i>Extraction d'ADN</i> .....	25
2.5.3	<i>Visualisation sur gel d'agarose</i> .....	25
2.6	DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA CASPASE-3.....	25
2.6.1	<i>Réactifs</i> .....	26
2.6.2	<i>Extraction protéique</i> .....	26
2.6.3	<i>Le dosage d'activité</i> .....	26
2.7	DETECTION DU RECEPTEUR FAS.....	27
2.7.1	<i>Préparation des échantillons</i> .....	27
2.7.1.1	Réactifs.....	27
2.7.1.2	Extraction protéique.....	27
2.7.2	<i>Préparation des gels, charge et migration des échantillons</i> .....	28
2.7.2.1	Réactifs.....	28
2.7.2.2	Préparation des gels, charge et migration.....	28
2.7.3	<i>Transfert des protéines sur membrane</i> .....	28
2.7.3.1	Réactifs.....	28
2.7.3.2	Traitement de la membrane et transfert.....	29
2.7.4	<i>Immunomarquage du récepteur Fas</i> .....	29
2.7.5	<i>Révélation</i> .....	29
2.8	ANALYSE STATISTIQUE.....	29
<b>3</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	<b>30</b>
3.1	L' APOPTOSE MEDIEE PAR LES ROS.....	30
3.1.1	<i>Le niveau basal en ROS dans les cellules cybrides sauvages et mutées</i> .....	30
3.1.2	<i>Etude de la réponse apoptotique, dans les cellules cybrides sauvages et mutées, en réponse à la menadione sodium bisulfite</i> .....	31
3.1.3	<i>Etude de la réponse apoptotique, dans les cellules cybrides sauvages et mutées, en réponse à la staurosporine</i> .....	33
3.1.3.1	Formation de ROS dans les cellules cybrides sauvages et mutées suite à des incubations en présence de 500 nM de staurosporine.....	34
3.1.3.2	Implication du MitoQ sur le potentiel oxydant des cellules cybrides sauvages et mutées stimulées ou non à la staurosporine.....	35
3.1.3.3	Implication des ROS dans la réponse apoptotique médiée par la staurosporine 500 nM dans les cellules cybrides sauvages et mutées.....	37
3.1.3.4	Implication de calcium dans la réponse apoptotique médiée par la staurosporine 500 nM dans les cellules cybrides sauvages et mutées.....	39
3.2	L' APOPTOSE ET LA VOIE FAS/FASL.....	41
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>47</b>



# 1. Introduction





# 1 Introduction

## 1.1 La mitochondrie

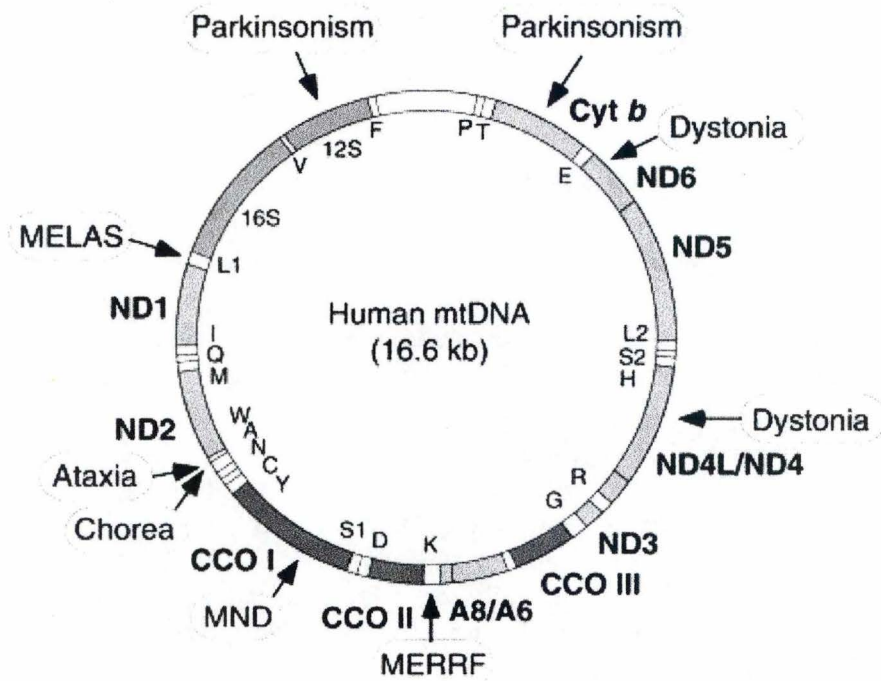
### 1.1.1 **La mitochondrie : généralités**

#### 1.1.1.1 **Structure et fonctions**

La mitochondrie est un organe des cellules eucaryotes qui se différencie des autres organites par l'existence en son sein d'ADN, d'ARN et de ribosomes qui lui sont propres. Ceci témoigne de l'origine endosymbiotique des mitochondries qui dériveraient d' $\alpha$ -protéobactéries intégrées dans des cellules primitives eucaryotes (Nelson et Cox 2000).

La mitochondrie est un organe multifonctionnel, lieu de nombreuses voies métaboliques comme la phosphorylation oxydative, le catabolisme des acides gras, le métabolisme de certains acides aminés, la synthèse des groupements porphyriques... Récemment, plusieurs aspects du métabolisme mitochondrial ont fait l'objet d'attentions particulières. Il s'agit notamment de la translocation des protéines à l'intérieur de la mitochondrie, de l'héritage de l'ADN mitochondrial, de la fusion/fission des mitochondries ou encore de l'implication des mitochondries dans l'apoptose, le vieillissement, le cancer et d'autres processus cellulaires (Reichert et Neupert 2002).

Cette multifonctionnalité se marque morphologiquement par une structuration en espaces distincts, visible en microscopie électronique à transmission (figure 1.1). La matrice, contenant notamment les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques, du cycle de l'urée et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras est pénétrée par des structures aplaties ou tubulaires dynamiques, les crêtes mitochondriales, formées par des expansions de la membrane mitochondriale interne. Cette dernière contient les complexes de la chaîne de transporteurs d'électrons, ainsi que la  $F_0F_1$  ATP synthase. Du côté cytosolique, la mitochondrie est délimitée par une membrane mitochondriale externe. L'espace engendré par ces deux membranes est appelé espace intermembranaire et contient de nombreuses protéines délocalisables telles que le cytochrome c, les procaspases 2, 3 et 9 ainsi que AIF (Apoptosis Initiating Factor). Les membranes mitochondriales interne et externe se distinguent notamment par des perméabilités fondamentalement différentes. La membrane interne, de par sa richesse en cardiolipines, est très imperméable en général et particulièrement aux protons, permettant ainsi de générer un potentiel de membrane d'environ  $-220$  mV suite à l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. Ce gradient électrochimique, rendu possible grâce aux complexes respiratoires pompant les  $H^+$  de la matrice vers cet espace, servira à la synthèse d'ATP par la  $F_0F_1$  ATP synthase. La membrane externe, quant à elle, est relativement perméable aux petites molécules (inférieures à 1000 Da) et ions en raison de l'abondante présence de VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Des points de contact existent entre ces deux membranes et sont formés par deux entités biochimiques différentes, à savoir, la machinerie de translocation protéique comprenant les complexes TIM (Translocase of the Inner Membrane) et TOM (Translocase of the Outer Membrane) et les composants du système de transport des nucléotides incluant VDAC, l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase) et la créatine kinase (figure 1.2). Ces trois derniers sont des constituants du PTP (Permeability Transition Pore), acteur important de l'apoptose (pour revue voir Gottlieb 2000).



**Figure 1.3 : Carte génétique de l'ADN mitochondrial.** Le génome mitochondrial code pour 13 polypeptides intervenant dans la chaîne de transporteurs des électrons (ND1 à ND6 et ND4L = sous-unités de la NADH déshydrogénase (complexe I); cyt b = cytochrome b (sous-unité du complexe III); CCO I, CCO II et CCO III = sous-unités de la cytochrome c oxydase (complexe IV); A6 et A8 = sous-unités de la  $F_0F_1$  ATP synthase (complexe V), 2 ARNr (12s et 16s) et 22 ARNt (indiqués par le code à une lettre correspondant à l'acide aminé porté). Des pathologies liées à des mutations dans le génome mitochondriale sont encadrées (Schon et Manfredi 2003).

### 1.1.1.2 Le génome mitochondrial

La mitochondrie dérive d'une  $\alpha$ -protéobactérie, endosymbionte de cellule eucaryote ancestrale voilà deux milliards d'années. De nombreux gènes de cet endosymbionte ont été transférés dans le génome nucléaire. De ce fait, 95 % des protéines mitochondriales sont encodées par le génome nucléaire. Bien que la taille, l'organisation des gènes et la transcription soient très différents d'un phylum à l'autre, le contenu et la fonction fondamentale des gènes de l'ADN mitochondrial sont extrêmement bien conservés. Ainsi, chez les mammifères, cet ADN contient 37 gènes (figure 1.3) correspondant aux ARN composant la machinerie de traduction mitochondriale (2 ARNr, 12s et 16s, et 22 ARNt) et à 13 polypeptides intervenant dans les complexes formant la chaîne de transporteurs d'électrons (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003).

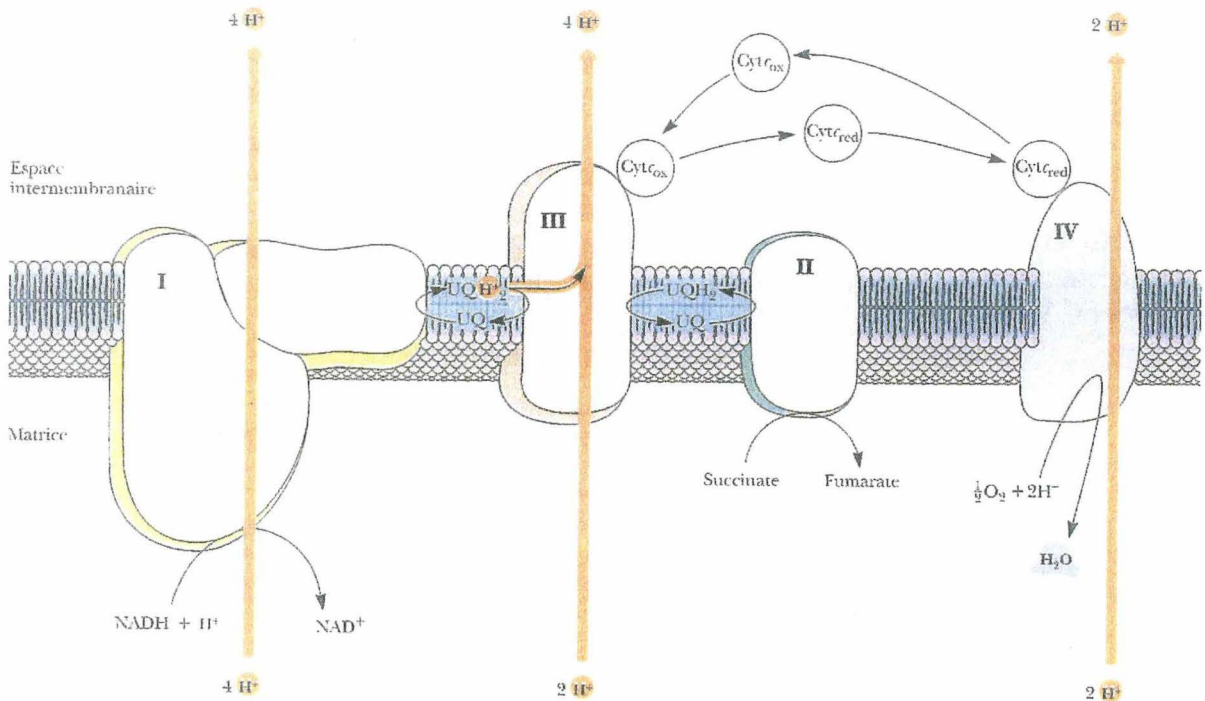
L'ADN mitochondrial se distingue de l'ADN génomique par sa circularité, son code génétique différent, son origine maternelle et sa polyploïdie. Ce dernier point est à l'origine du phénomène d'hétéroplasmie. La plupart des cellules mammaliennes contiennent en effet des dizaines ou des centaines de mitochondries (selon le type de cellule) qui à leur tour, contiennent deux à dix copies d'ADN mitochondrial. Dans une même cellule, toutes les molécules d'ADN mitochondrial ne sont pas nécessairement identiques : c'est le phénomène d'hétéroplasmie. En effet, de nombreuses altérations (mutations ou délétions) du génome mitochondrial ont déjà été décrites, pouvant entraîner l'apparition de maladies mitochondriales (voir point 1.2). Ces altérations doivent cependant toucher une certaine proportion de copies d'ADN mitochondriales (de l'ordre de 80 % et plus) pour que la pathologie se manifeste. Au-delà de ce seuil, la gravité des symptômes est généralement fonction du pourcentage de copies touchées (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003). Remarquons que le taux de mutations de l'ADN mitochondrial est beaucoup plus élevé (de 10 à 25 fois) que celui de l'ADN nucléaire et ce, pour plusieurs raisons. Outre l'absence d'histones protectrices, les mécanismes de réparation de l'ADN mitochondrial montrent une efficacité de réparation faible (Stuart, Karahalil et al. 2004; Malakhova, Bezlepkin et al. 2005).

La transcription requiert une ARN polymérase et des facteurs de transcription spécifiques de l'organelle : TFAM/mtTFA (MiTochondrial Transcription Factor A), mtTFB1 ou mtTFB2 (MiTochondrial Transcription Factors B1/B2) pour l'initiation et mTERF (Mitochondrial Transcription tERmination Factor) pour la terminaison. La réplication, quant à elle, est réalisée par une polymérase spécifique de la mitochondrie, la DNAPol  $\gamma$  (ADN polymérase  $\gamma$ ). Celle-ci se déroule indépendamment des phases du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN génomique (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003).

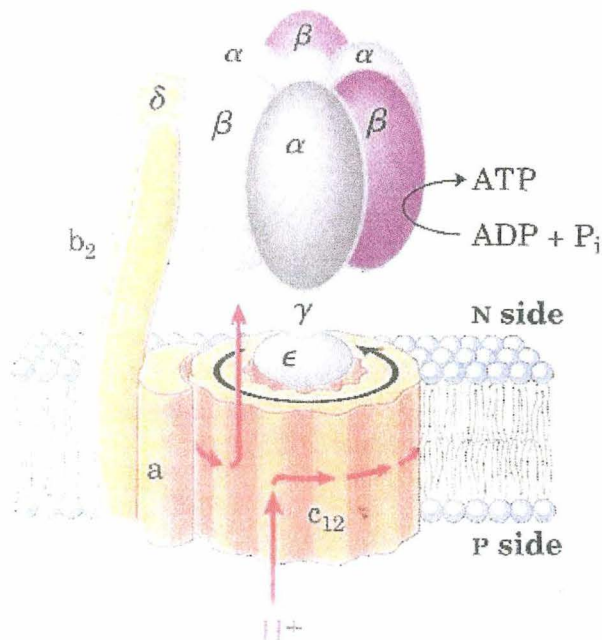
## 1.1.2 La mitochondrie et la phosphorylation oxydative

### 1.1.2.1 La respiration cellulaire (Nelson et Cox 2000; Schafer, Seelert et al. 2006)

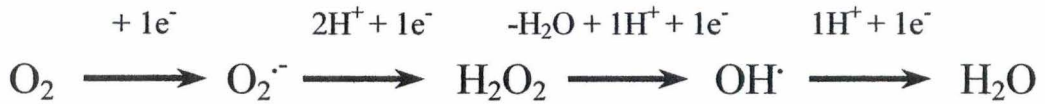
Comme précisé précédemment, la mitochondrie est le lieu de la phosphorylation oxydative qui permet de régénérer de l'ATP à partir d'ADP. La respiration cellulaire, par phosphorylation, permet donc de produire de l'énergie, indispensable pour la cellule. Ceci est rendu possible par une série de complexes protéiques ancrés en membrane mitochondriale interne. La chaîne respiratoire commence par le complexe I (NADH: ubiquinone oxydoréductase) ou le complexe II (succinate: ubiquinone oxydoréductase) qui captent, respectivement, les deux électrons apportés par le NADH ou le succinate provenant tous deux du cycle de Krebs. Ces électrons sont alors transportés via le coenzyme Q<sub>10</sub> (ubiquinone) au



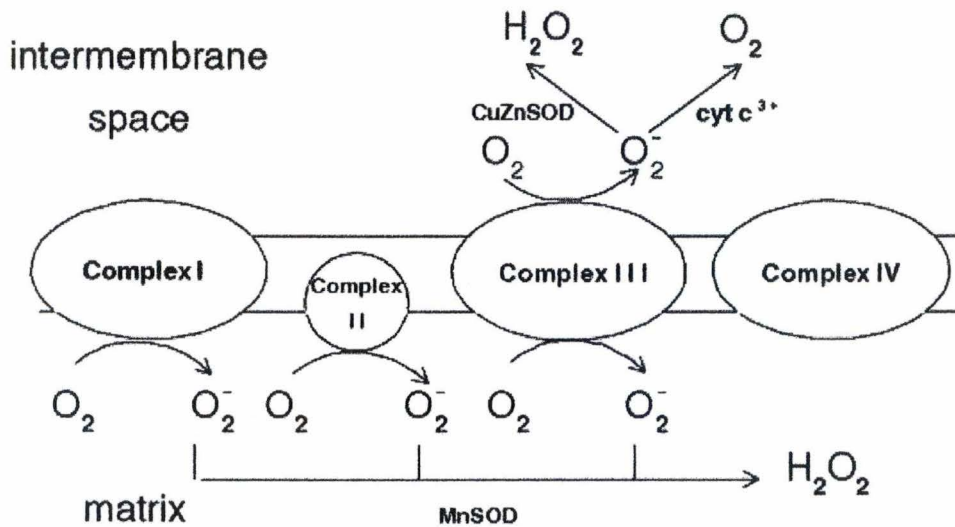
**Figure 1.4 : La chaîne de transporteurs d'électrons.** Les quatre complexes, permettant le transport des électrons sont situés en membrane mitochondriale interne. L'énergie libérée au cours de ce transport permet de générer un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane par transfert de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ces électrons, provenant du NADH ou du succinate, permettront le transfert de respectivement 10 ou 6 protons. L'accepteur final de ces électrons est une molécule d'O<sub>2</sub> qui, grâce à 4 H<sup>+</sup> et 4 électrons, donnera deux molécules d'H<sub>2</sub>O (Garrett et Grisham 2000).



**Figure 1.5 : La F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase.** La F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase est composée de deux sous-unités principales ; F<sub>0</sub> (en orange) et F<sub>1</sub> (en bleu, vert, violet et gris). Le gradient de protons, créé par les complexes de la chaîne respiratoire, par retour de l'espace intermembranaire (P side) vers la matrice mitochondriale (N side) va permettre la rotation de F<sub>0</sub>. Ceci permettra la transconformation des sous-unités composant F<sub>1</sub> et ainsi de catalyser la phosphorylation de l'ADP en ATP (Nelson et Cox 2000).



**Figure 1.6 : Réduction monovalente de l'oxygène.** Le dioxygène peut être réduit en anion superoxyde. Celui-ci par dismutation catalysée ou spontanée donne le peroxyde d'hydrogène. L' $H_2O_2$  quant à lui, par réaction de Fenton avec des ions métalliques de transition, engendre l'espèce la plus oxydante à savoir le radical hydroxyl. La réduction d'une molécule de dioxygène en deux molécules d'eau nécessite quatre électrons ( $e^-$ ) et quatre protons ( $H^+$ ) (Brookes, Yoon et al. 2004).



**Figure 1.7 : Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.** Les complexes III, I et II, pas ordre croissant de production en anions superoxydes, participent à la formation d' $O_2^{\cdot -}$  sur une (complexe I et II) ou deux faces (complexe III) de la membrane mitochondriale interne par transfert accidentel sur l' $O_2$  d'un électron. Ces  $O_2^{\cdot -}$  peuvent être réduits en oxygène par le cytochrome c (cyt c) ou convertits en peroxyde d'hydrogène et oxygène par les SOD (Turrens 2003).



**Figure 1.8 : Les réactions catalysées par les antioxydants enzymatiques.** Les  $O_2^{\cdot -}$  produits majoritairement au niveau de la chaîne respiratoire sont dismutés par la MnSOD, au niveau de la matrice mitochondriale, en  $H_2O_2$ . Cet  $H_2O_2$  peut être détoxifié via la catalase ou la Gpx qui, dans ce dernier cas utilise le GSH en tant que réducteur (Beal 2005).



complexe III (ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase) où ils seront ensuite acheminés par le cytochrome c, présent dans l'espace intermembranaire, au complexe IV (cytochrome c oxydase). Ce dernier complexe transférera les électrons sur l'accepteur terminal, une molécule d' $O_2$  qui formera, pour 4 électrons et 4 protons, deux molécules d'eau (figure 1.4).

Ce transport d'électrons permet aux complexes, organisés par potentiel standard oxydo-réducteur croissant, de suivre des cycles d'oxydoréduction exergoniques. Cette énergie perdue graduellement par les électrons provenant du NADH ou du succinate sert à générer un gradient de protons en transférant, au niveau des complexes I, III et IV, des  $H^+$  de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ceci permet de créer, non seulement un gradient chimique, mais également un gradient électronique de par la charge positive portée par le proton. Ce gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne s'élève à environ  $-220$  mV. Celui-ci pourra de la sorte fournir l'énergie nécessaire à la régénération d'ATP à partir d'ADP. Cette phosphorylation est rendue possible par le complexe V ( $F_0F_1$  ATP synthase) constitué de deux sous-unités principales. La sous-unité  $F_0$  forme le pore en membrane interne permettant aux protons de l'espace intermembranaire de regagner la matrice où se situe  $F_1$ . Ce passage s'accompagne d'une rotation de  $F_0$  qui entraîne un cycle de transconformation des sous-unités composant la partie  $F_1$  et la synthèse d'ATP (figure 1.5).

Afin de maintenir la phosphorylation oxydative, deux systèmes, ancrés en membrane mitochondriale interne, permettent le transport de l'ADP et du  $P_i$  vers la matrice et de l'ATP vers le cytosol. Les acteurs de ce transport sont l'adénine nucléotide translocase (ANT), protéine antiport de l' $ADP^{3-}$  cytosolique et de l' $ATP^{4-}$  matriciel, et la phosphate translocase, symporteurs d' $H_2PO_4^-$  et  $H^+$ .

### 1.1.2.2 Implications de la respiration cellulaire dans la production de ROS et leur détoxification

Les Reactive Oxygen Species (ROS ; figure 1.6), comprenant l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ), sont générés dans la cellule par différentes voies. Outre la NADPH cytochrome P450 réductase, la NADPH oxydase, la lipoxygénase, la cyclooxygénase, la monoamine oxydase, etc, le principal producteur d' $O_2^{\cdot-}$  est la chaîne de transporteurs d'électrons (Kamata et Hirata 1999; Turrens 2003).

Ce sont 1 à 3 % de l'oxygène consommé qui sont réduits en  $O_2^{\cdot-}$  au niveau du complexe I et III (figure 1.7 ; le complexe II y participe très faiblement) et qui, par dismutation catalysée ou spontanée, génèrent l' $H_2O_2$ . Ces deux molécules présentent une toxicité dont les caractéristiques diffèrent. Les anions superoxydes, bien que très réactionnels, ont une capacité de diffusion limitée (demi-vie de l'ordre de la milliseconde) et ne peuvent traverser les membranes biologiques, provoquant ainsi des réductions à proximité de la membrane mitochondriale interne. Cependant, une partie de ces anions produite dans l'espace intermembranaire mitochondriale peut être transportée dans le cytoplasme par VDAC (Turrens 2003). Le peroxyde d'hydrogène, quant à lui, n'étant pas chargé, peut diffuser à travers les membranes et interagir avec l'entièreté des constituants cellulaires. Le plus grand danger pour la cellule ne provient pas de ce dernier mais de l'espèce qui en dérive par réduction catalysée en présence de  $Fe^{++}$  ou  $Cu^+$ , le radical hydroxyl. Les  $OH^{\cdot}$  sont les espèces les plus réactionnelles (demi-vie de l'ordre de la micro à la nanoseconde). Ayant un rayon d'action d'environ un nanomètre, elles causent des dégâts à leur endroit de production, c'est à dire aléatoirement dans toute la cellule. Les  $O_2^{\cdot-}$  peuvent également former, par réaction avec l'oxyde nitrique, un autre oxydant très puissant, le peroxyde nitrite.

Les dommages causés par les ROS aux protéines, lipides et acides nucléiques, sont aléatoires et cumulatifs et participent de la sorte au vieillissement cellulaire, qui peut se marquer par des dysfonctionnements mitochondriaux croissants. En effet, le génome mitochondrial est fortement exposé aux ROS de par sa situation physique (associé à la membrane mitochondriale interne), sa moindre protection protéique et son mécanisme de réparation moins performant comparativement au génome nucléaire. Signalons cependant que les ROS ne sont pas que néfastes, ils peuvent également jouer des rôles essentiels dans les processus biologiques tels que la transduction du signal, la régulation de l'expression génique, la régulation du cycle cellulaire, la flambée respiratoire des neutrophiles ou encore l'apoptose (Simm et Brömme 2005).

Afin de maintenir la concentration en ces oxydants sous un seuil non toxique pour la cellule, une grande variété de défenses antioxydantes et d'enzymes de réparation existent. L'homéostasie oxydo-réductrice résulte d'un équilibre entre ces oxydants et les mécanismes de détoxification. Dans plusieurs pathologies, les défenses antioxydantes sont insuffisantes par rapport à la production de ROS, entraînant des stress oxydatifs conduisant souvent à l'apoptose et à la mort cellulaire (Turrens 2003). Ces défenses sont subdivisées en deux groupes principaux.

Premièrement, les antioxydants non-enzymatiques qui comprennent notamment, l'ascorbate, le glutathion (GSH), l' $\alpha$ -tocophérol, le  $\beta$ -carotène, les flavonoïdes, et l'ubiquinol. Les deux premiers, hydrophiles, permettent une défense cytoplasmique et du milieu extracellulaire tandis que les derniers, hydrophobes protègent les membranes lipidiques.

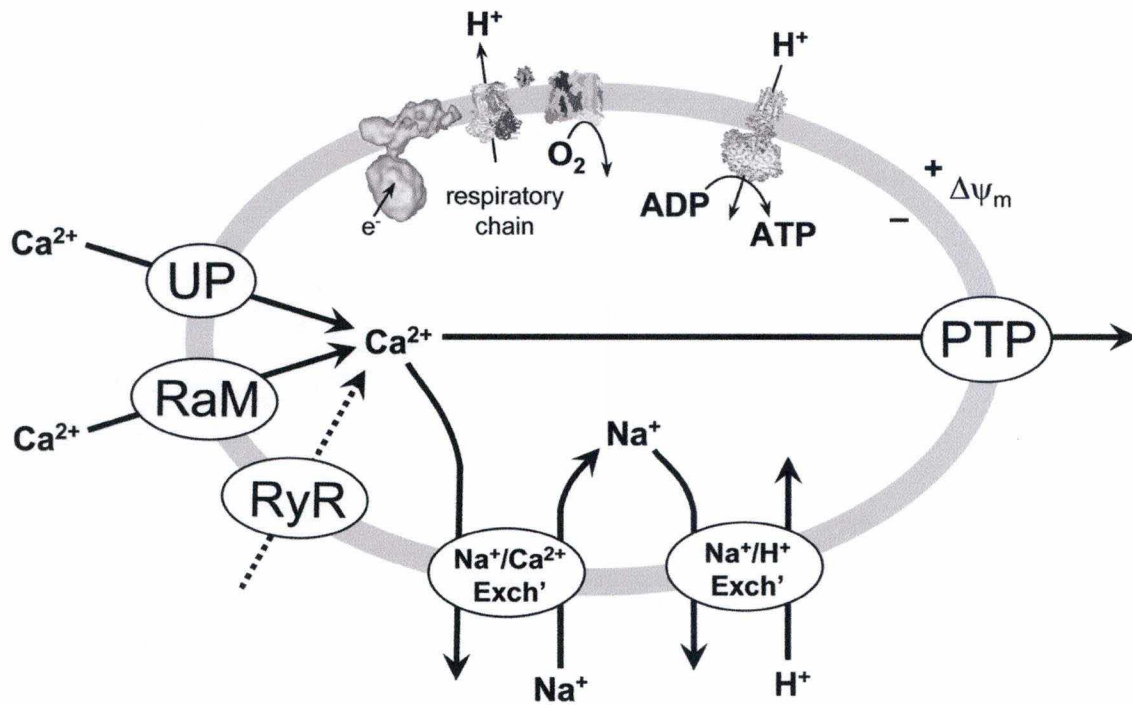
Dans les antioxydants enzymatiques (figure 1.8), nous retrouvons la SOD (SuperOxyde Dismutase), la Gpx (Glutathion PeroXydase) et la catalase.

Il existe différentes isoenzymes de la SOD ; deux CuZnSOD (SOD1 et SOD3) et une MnSOD (SOD2). La SOD 1 est située dans le cytosol, le noyau et l'espace intermembranaire mitochondrial, la SOD3 est extracellulaire et la SOD2 est localisée dans la matrice mitochondriale. Elles catalysent, par dismutation, la formation d' $H_2O_2$  à partir d' $O_2^{\cdot-}$ . Le cytochrome c peut également jouer le rôle d'antioxydant de l'espace intermembranaire de la mitochondrie car il est capable de se faire réduire, outre par le complexe III, par l'anion superoxyde. Cette forme réduite est ensuite régénérée par son accepteur naturel d'électron, la cytochrome c oxydase.

La catalase, présente dans le peroxysome et dans la mitochondrie de certains types cellulaires (tissu cardiaque), permet la conversion de l' $H_2O_2$  en  $H_2O$  lors de stress oxydatifs intenses.

Enfin, la Gpx, qui catalyse la même réaction que la catalase, se différencie d'elle par sa localisation cytoplasmique (et, dans une moindre mesure, matricielle) et par son mode d'action. La Gpx se sert du peroxyde d'hydrogène pour oxyder son substrat, le glutathion (GSH), régénéré par la Glutathione réductase. Une Gpx associée à la membrane mitochondriale existe également. Elle permet de lutter contre la peroxydation lipidique (Reichert et Neupert 2002; Turrens 2003; Andreyev, Kushnareva et al. 2005; Jezek et Hlavata 2005).

Notons qu'un autre facteur peut jouer sur la formation de ROS au niveau de la chaîne de transporteurs d'électrons. Il s'agit du découplage mitochondrial qui est le passage de protons de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale en court-circuitant le complexe V. Ce découplage se traduit par un cycle futile de dissipation de l'énergie et peut être provoqué par des transporteurs de protons logés en membrane mitochondriale interne, les UCPs (UnCoupling Proteins). La mieux connue, UCP1, présente dans les adipocytes, permet notamment la thermorégulation chez les rongeurs hibernant. UCP2, ubiquitaire, et UCP3, majoritaire dans les cellules musculaires squelettiques, semblent, quant à elles, impliquées, en tant qu'effecteurs, dans un mécanisme de défense antioxydant en permettant de diminuer la



**Figure 1.9 : Cycle mitochondrial du calcium.** Quels que soient les mécanismes d'entrée ou de sortie du calcium, il sont accompagnés d'une diminution du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ) et sont de ce fait dépendant du pompage de protons par la chaîne respiratoire qui leur apporte leur force motrice. Ces mécanismes sont, pour l'entrée de l'ion, un canal uniport (UP), un canal « Rapid Mode » (Lavrik, Golks et al.) et un récepteur à la ryanodine (RyR, uniquement présent dans les cellules excitables) et, pour la sortie, un canal antiport dépendant du sodium et le PTP. Un autre canal antiport proton-dépendant, non représenté, permet également la sortie du calcium matriciel (Brookes, Yoon et al. 2004).

formation d'anions superoxydes au niveau des complexes I et III (Rousset, Alves-Guerra et al. 2004). Ainsi, il a été montré qu'une chute de 10 mV du potentiel de membrane diminuait de 70 % la formation de ROS au niveau du complexe I (Miwa et Brand 2003). De plus, les ROS peuvent stimuler le découplage de la phosphorylation oxydative en activant les UCPs. Il existe donc une boucle de rétroaction entre le découplage respiratoire et la génération de ROS (Brookes 2005).

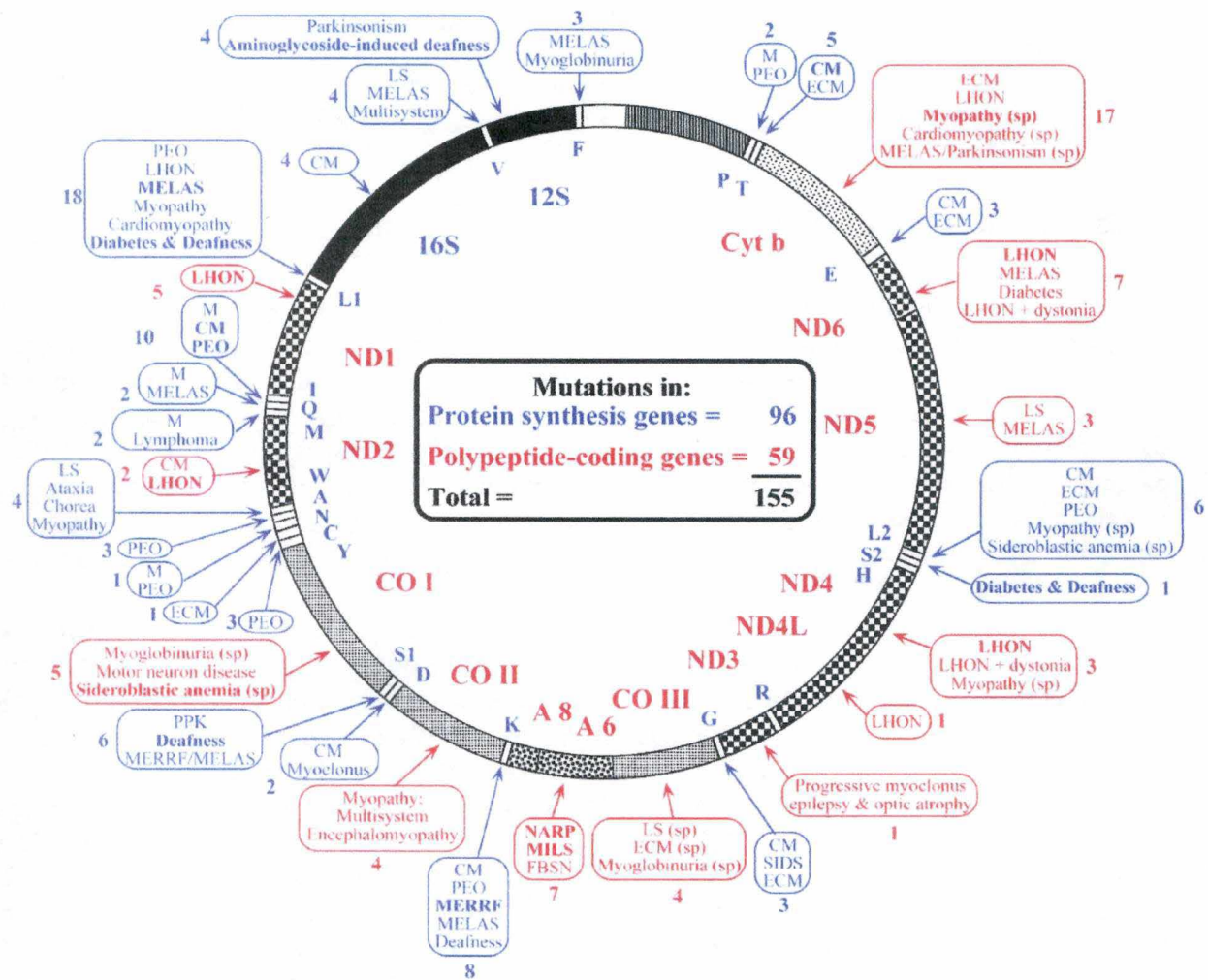
### 1.1.3 La mitochondrie et l'homéostasie du calcium

Outre les nombreuses implications de la mitochondrie dans les diverses fonctions métaboliques citées en début d'introduction, la mitochondrie joue également un rôle central dans l'homéostasie du calcium, qui affecte, en tant que messenger secondaire, bon nombre de voies de signalisation. Il est donc essentiel pour la cellule de réguler spatialement et temporellement sa concentration calcique. De plus, la séquestration intramitochondriale du calcium est également indispensable pour l'organelle lui-même car elle permet de remplir des fonctions physiologiques aussi variées que la stimulation et la régulation du taux de phosphorylation oxydative ou d'induire l'ouverture du PTP conduisant à la mort cellulaire (Gunter, Yule et al. 2004).

Le calcium rentre et sort continuellement de la mitochondrie. Il peut traverser la membrane interne mitochondriale et pénétrer dans la matrice par deux mécanismes : un canal unipore et un canal appelé « Rapid Mode » (Lavrik, Golks et al.). Le canal unipore utilise le potentiel de membrane en tant que force motrice ; il possède une forte affinité pour le calcium et est responsable de l'influx calcique mitochondrial dans la cellule au repos. Le deuxième, répond rapidement à des changements de concentrations calciques cytosoliques, permettant de la sorte d'ajuster la concentration en calcium matriciel sur la concentration en calcium cytosolique. Dans les cellules excitables, il existe, en plus, une isoforme du récepteur à la ryanodine (RyR). Le cycle du calcium (figure 1.9) s'achève par deux transporteurs, également logés en membrane mitochondriale interne, dédiés à la sortie de l'ion bivalent. Un transporteur antiport  $\text{Na}^+$ -dépendant échange un ion  $\text{Ca}^{++}$  contre 3 ions  $\text{Na}^+$  qui seront à leur tour expulsés dans le cytosol par échange de protons. Le deuxième transporteur antiport  $\text{Na}^+$ -indépendant, échange directement le calcium contre des protons. L'ouverture du PTP, induite par des concentrations physiologiques en calcium, serait également impliquée dans la fuite du calcium matriciel (Ganitkevich 2003; Brookes, Yoon et al. 2004).

Des surcharges mitochondriales en calcium peuvent engendrer l'ouverture du PTP ainsi qu'une production accrue de ROS qui peut également conduire à la mort cellulaire (figure 1.10). En effet, le calcium provoque l'activation allostérique de la pyruvate déshydrogénase, de l'isocitrate déshydrogénase et de l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase du cycle de Krebs entraînant une forte production de NADH matriciel. En conséquence, le transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire s'accélère, ce qui est renforcé par l'activation de  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATP synthase et de l'ANT par le calcium. Une partie des électrons transportés par la chaîne respiratoire, étant à l'origine des ROS mitochondriaux, ceci explique que l'élévation de calcium matriciel se traduise généralement par une augmentation de la production en ROS (Brookes, Yoon et al. 2004).

Enfin, signalons que dans certains types cellulaires, il a été montré que des interactions avaient lieu entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie et que celles-ci étaient impliquées dans la prise de calcium mitochondriale (Ganitkevich 2003)



**Figure 1.11 : Carte du génome mitochondrial détaillant les mutations décrites.** Les mitochondriopathies peuvent être provoquées par des mutations de l'ADN nucléaire ou de l'ADN mitochondrial. Dans ce dernier cas, elles peuvent toucher des gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales (en rouge ; ARN<sub>t</sub> et ARN<sub>r</sub>) ou codant pour des protéines de la chaîne respiratoire (en bleu). NARP : Neuropathy, Ataxia, Retinis Pigmentosa ; LHON : Leber Hereditary Optic Neuropathy ; MERRF : Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers ; MELAS : Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like Episode ; PEO : Progressive External Ophtalmoplegia (Dimauro et Davidzon 2005).

## 1.2 Les dysfonctionnements mitochondriaux

### 1.2.1 Les dysfonctionnements mitochondriaux et leurs implications pathologiques

L'intérêt porté aux pathologies mitochondriales ou mitochondriopathies est justifié par leur occurrence importante (un cas sur 5000). Celles-ci peuvent se subdiviser en deux groupes ; un premier engendré par des altérations du génome mitochondrial et un second, causé par des altérations touchant le génome nucléaire (Dimauro et Davidzon 2005).

Plus de 150 mutations ponctuelles et d'innombrables réarrangements génomiques (délétions, duplications) du génome mitochondrial sont responsables des mitochondriopathies (figure 1.11). Génétiquement, elles sont classés en deux sous-groupes principaux : les pathologies dues à des altérations de gènes impliqués dans la machinerie de synthèse de protéines mitochondriales et celles dues à des altérations de gènes encodant pour des protéines de la chaîne respiratoire. Signalons que déficits de constituants de la chaîne respiratoire peuvent également être causés par des altérations du génome nucléaire (Dimauro et Davidzon 2005). Dans les deux cas, l'altération génomique entraîne un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative ayant pour conséquence un stress énergétique. Il est donc tout à fait compréhensible que les tissus les plus touchés soient les plus demandeurs en énergie tels que les tissus nerveux, musculaires, hépatiques, cardiaques et rénaux. Comme mentionné au point 1.1.1.2, l'apparition ou la sévérité de la pathologie sera fonction du taux d'hétéroplasmie, dans le cas de mutations liées à l'ADN mitochondrial. De plus, en fonction de ce taux hétéroplasmique, une mutation peut engendrer divers phénotypes, tout comme un phénotype peut être causé par des mutations différentes. Ceci rend donc très difficile l'analyse des phénotypes associés aux maladies mitochondriales (Zeviani et Antozzi 1997; Wallace 1999). Par exemple, la mutation ponctuelle T8993C, qui substitue une leucine pour une arginine dans la sous unité 6 de la  $F_0F_1$  ATP synthase, peut provoquer deux phénotypes différents en fonction du taux d'hétéroplasmie. Si le taux de mutation est inférieur à 70 %, le patient est atteint du syndrome NARP (Neuropathy, Ataxia, Retinis Pigmentosa) alors qu'à un pourcentage supérieur à 90 %, la plupart des patients présentent l'encéphalopathie de Leigh. Le syndrome LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy) quant à lui, est caractérisé par un phénotype qui peut résulter de mutations diverses dans des gènes touchant les sous-unités de la NADH déshydrogénase (Sarnat et Marin-Garcia 2005).

Une autre classe de mutations ponctuelles consiste en la non-fonctionnalité d'un ARNt ou d'un ARNr mitochondrial entraînant un défaut dans la synthèse des protéines mitochondriales. Dans la mutation MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers) ou MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episode), ce sont respectivement un ARNt<sup>Lys</sup> et un ARNt<sup>Leu</sup> qui sont touchés. Dans le deuxième cas, les caractéristiques cliniques sont un diabète mellitus, une surdité, une myopathie, des anomalies cardiaques, etc. La pathologie MERRF sera détaillée dans le point suivant (Zeviani et Antozzi 1997; Wallace 1999; Sarnat et Marin-Garcia 2005).

Des dysfonctionnements peuvent également être causés par de larges réarrangements du génome mitochondrial. Des délétions de 5 à 7,5 kb sont fréquentes chez les patients atteints des syndromes de Kearns-Sayre et PEO (Progressive External Ophthalmoplegia). Un cinquième des malades touchés par le syndrome de Kearns-Sayre présente une délétion commune de 5 kb qui peut s'étendre, dans de plus rare cas, à 11 kb. Ces derniers se distinguent des autres par des manifestations musculaires, neurologiques et cardiaques plus sévères (Sarnat et Marin-Garcia 2005).

Enfin les mutations affectent le génome nucléaire qui encode près de 95 % des protéines mitochondriales. Ces mutations peuvent atteindre directement ou indirectement la

phosphorylation oxydative. En effet, dans le syndrome de Leigh, des gènes codant pour une sous-unité de la pyruvate déshydrogénase, du complexe I, II ou IV peuvent être non fonctionnels. Par contre, dans l'ataxie de Friedreich, c'est la frataxine qui est déficiente et qui ne permet pas l'exportation du fer de la mitochondrie avec pour conséquence, des enzymes à centre Fe-S non fonctionnelles (complexes I, II, III et aconitase) (Wallace 1999).

Bien que chacune de ces maladies métaboliques présente des caractéristiques propres, notamment au niveau clinique, des points communs peuvent être dégagés au niveau cellulaire, à savoir un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire provoquant une baisse du potentiel de membrane, une diminution de la production d'ATP, et des perturbations de l'homéostasie calcique et de l'équilibre oxydo-réducteur (Pallotti, Baracca et al. 2004). La réponse apoptotique des cellules caractérisées par un dysfonctionnement mitochondrial peut également être modifiée, comme nous le verrons plus loin.

### **1.2.2 Le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibbers)**

Le syndrome MERRF peut être engendré par différentes mutations ponctuelles dans le génome mitochondrial. La plus couramment observée réside dans une substitution, au locus 8344, d'une adénine par une guanine entraînant une perte de fonctionnalité de l'ARNt<sup>Lys</sup> normalement encodé. Cependant, la pathologie peut également être causée par la mutation T8356C, dans le même gène, et T7512C impliqué dans un ARNt<sup>Ser</sup> (Zeviani et Antozzi 1997). Une dernière mutation a été répertoriée récemment, il s'agit de la mutation G611A rendant non fonctionnel un gène codant pour un ARNt<sup>Phe</sup> (Mancuso, Filosto et al. 2004).

D'un point de vue biochimique, ces mutations se marquent par une synthèse protéique globale mitochondriale diminuée et, subséquentement, par une diminution d'activité des complexes I et IV de la chaîne de transporteurs d'électrons. Il a également été montré que le potentiel de membrane mitochondrial, suite à une diminution du transfert de protons dans l'espace intermembranaire, chutait de 20 % pour des fibroblastes possédant un taux de mutation de 80 % (Antonicka, Floryk et al. 1999). Tout ceci provoque des stress énergétiques surtout pour les cellules des tissus nerveux et musculaires. La respiration cellulaire étant diminuée, la production d'ATP est partiellement compensée par la glycolyse. La transformation du pyruvate en lactate permettant de régénérer du NAD<sup>+</sup> est donc indispensable au bon fonctionnement de cette dernière, ce qui explique que l'activité de la lactate déshydrogénase augmente dans de telles cellules. L'acidose lactique résultant de ce phénomène est utilisée en tant que moyen diagnostique (Zeviani et Antozzi 1997; Wallace 1999; Dimauro et Davidzon 2005). Outre les stress énergétiques résultant des dysfonctionnements des complexes I et IV, les cellules atteintes de la mutation subissent également des perturbations de l'équilibre oxydoréducteur. En effet, il a été montré que, pour des cellules sanguines provenant de patients atteints par le syndrome MERRF, l'activité de la CuZnSOD et de la MnSOD étaient diminuées. Des données similaires ont été obtenues sur des fibroblastes, également porteurs de la mutation MERRF, où l'expression et l'activité de la catalase et de la MnSOD étaient également en baisse par rapport à celles d'individus sains (Wei, Lu et al. 2001).

Phénotypiquement, le syndrome MERRF est une myopathie qui peut être combinée à une encéphalopathie myoclonique. Lorsque la pathologie se développe, avec l'âge du malade, des particularités apparaissent telle que des faiblesses musculaires, de la surdité et de la démence (Zeviani et Antozzi 1997). Il semblerait que les symptômes apparaissent lorsque le taux de mutation est supérieur à 90 % dans les de fibres musculaires (Huang, Kuo et al. 2002). Au niveau des neurones constituant le système nerveux central, ce taux de mutation ne semble

pas être corrélé directement aux particularités histopathologiques, incluant la perte de neurones (Zhou, Chomyn et al. 1997).

Histologiquement, on observe, en microscopie photonique, une transformation des fibres musculaires en « ragged-red fibers » qui sont dues à une accumulation de mitochondries, anormales en nombre et en taille, sous le sarcolemme. Cette particularité phénotypique est souvent à mettre en parallèle avec une inactivation ou une libération de la cytochrome c oxydase (Dimauro et Davidzon 2005).

### 1.3 Les modèles cellulaires

Les études réalisées à partir de cellules de patients sont relativement peu nombreuses car tributaires de la faible disponibilité du matériel cellulaire. Afin de pouvoir pallier à ce problème, des modèles cellulaires cybrides, présentant des dysfonctionnements mitochondriaux causés par des mutations similaires à celle rencontrées *in vivo*, ont été développés. Ceux-ci proviennent de la fusion de cellules déplétées en ADN mitochondrial (appelées rho<sup>0</sup>) avec des cellules énucléées issues de patients atteints de la mutation d'intérêt. De plus ces modèles permettent de faire abstraction de la variabilité interindividus (King et Attardi 1989), rencontré chez les différents patients.

#### 1.3.1 **Les cellules déplétées en ADN mitochondrial** (King et Attardi 1996)

Les cellules déplétées en ADN mitochondrial sont obtenues à partir de cellules traitées chroniquement avec un inhibiteur de la réplication de l'ADN mitochondrial, le bromure d'éthidium. Celui-ci, à des concentrations faibles (de 0,1 à 2 µg/ml), inhibe partiellement ou totalement la DNAPol  $\gamma$  sans affecter la réplication de l'ADN génomique, conduisant de génération en génération à une dilution de l'ADN mitochondrial d'un facteur  $1/2^n$  où n est le nombre de générations traitées au bromure d'éthidium. Une cellule comportant en moyenne 10000 molécules d'ADN mitochondrial, après 14 générations, le nombre de molécules restantes attendues ne s'élève donc plus qu'à 0,6 par cellule.

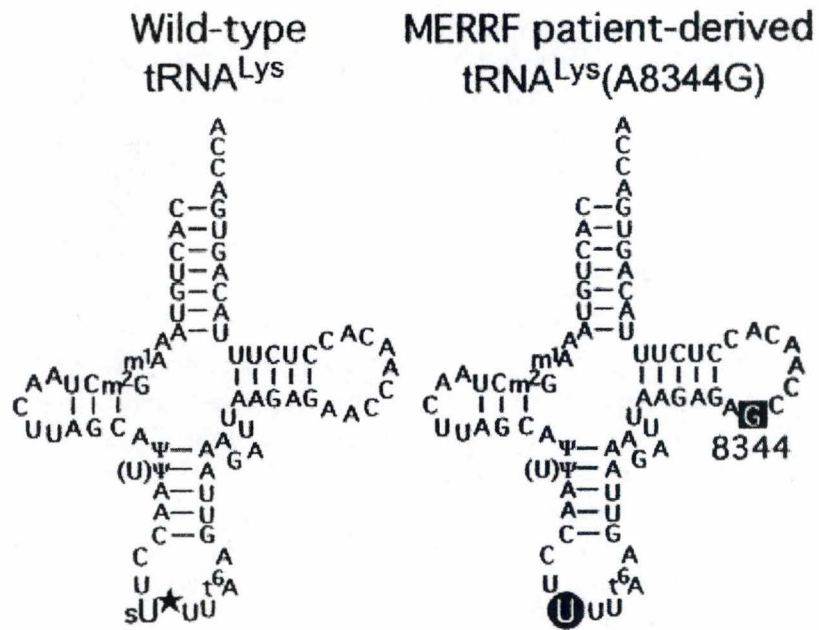
Afin de sélectionner les cellules déplétées, survivant grâce à un métabolisme glycolytique et non plus de type phosphorylation oxydative, un inhibiteur de cette dernière est supplémenté au milieu de culture (antymicine ou roténone par exemple). Suite à ce traitement, une population non clonale de cellules (rho<sup>-</sup>) est obtenue. Ces cellules rho<sup>-</sup> possèdent encore de faibles quantités de molécules d'ADN mitochondrial et doivent être continuellement traitées au bromure d'éthidium afin d'éviter la réversion du phénotype.

Les cellules rho<sup>0</sup> quant à elles résultent d'isolation de clones, par dilutions sériées, à partir de culture de cellules rho<sup>-</sup>. Ces cellules ne possédant plus d'ADN mitochondrial ne doivent plus être traitées au bromure d'éthidium et sont caractérisées de ce fait par une absence d'amplicon PCR (Polymerase Chain Reaction) réalisé à l'aide d'amorces spécifiques du génome mitochondrial.

#### 1.3.2 **Les cellules cybrides MERRF**

Les cellules utilisées au cours de ce travail proviennent de la fusion entre des cellules 143 rho<sup>0</sup> (cellules d'ostéosarcome humain 143B déplétées totalement en ADN mitochondrial) et des myoblastes énucléés de patients atteints du syndrome MERRF causé par la mutation A8344G dans leur ADN mitochondrial. Ces cellules ont été offertes par le Prof. G. Attardi (Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, USA).





**Figure 1.12 : Représentation bidimensionnelle de la structure et de la composition des ARN<sup>t<sup>Lys</sup></sup> de cellules sauvages ou porteuses de la mutation A8344G dans leur ADN mitochondrial. La mutation A8344G est représentée par le carré noir et provoque la non-modification post-transcriptionnelle de l'uridine (sU) représentée par le rond noir (Yasukawa, Suzuki et al. 2001).**

### 1.3.2.1 La synthèse protéique

La synthèse protéique diminuée provoquée par l'ARNt<sup>Lys</sup> muté s'explique comme suit. Bien que la mutation A8344G ne touche pas directement l'anticodon de l'ARNt (figure 1.12) mais la boucle t de ce dernier, ceci empêche la reconnaissance de l'ARNt par MTU1 (mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1), enzyme qui permet la thiolation sur le carbone 2' de l'uridine, base en première position dans l'anticodon. Dans des cellules HeLa, une inactivation partielle, par des siRNA (small interference RNA), de cette enzyme provoque un phénotype similaire à celui rencontré dans des cellules porteuses de la mutation MERRF (réduction de l'oxygène consommé, potentiel de membrane diminué). Une deuxième perte de modification sur le carbone 5' de la même uridine, a également été mise en évidence dans des cellules cybrides MERRF, il s'agit d'un taurinométhyl qui serait greffé par des enzymes encodées par les gènes MSS1 et MTO1 (Umeda, Suzuki et al. 2005). Chez la levure, les protéines Mss1 et Mto1 sont localisées dans la mitochondrie et semblent former un complexe impliqué dans la régulation de la traduction mitochondriale, par sélection de transcrits et optimisation de la fidélité traductionnelle, et cela par interaction avec l'ARNr 15S du mitoribosome de la levure (Towpik 2005).

Ces pertes de modifications de l'ARNt<sup>Lys</sup> entraînent une moins bonne liaison de l'ARNt au site A du mitoribosome, ainsi qu'une perte de stabilisation codon-anticodon, au niveau de l'uridine non modifiée. Ceci peut provoquer des arrêts de traduction prématurés ou des erreurs de lecture responsables éventuellement de changements de phase de lecture menant donc, dans un cas comme dans l'autre, à la formation de protéines tronquées (Masucci, Davidson et al. 1995; Umeda, Suzuki et al. 2005).

De manière similaire, la mutation A3243G, touchant un ARNt<sup>Leu</sup> et responsable de la pathologie MELAS, cause une absence de modification par une taurinométhyluridine du carbone 5' de la première base de l'anticodon de l'ARNt (Kirino, Yasukawa et al. 2006).

En plus de ces altérations qualitatives de la synthèse des protéines contenant des lysines, il semblerait que, quantitativement, tous les produits résultant de la traduction mitochondriale soient à la baisse (Schoeler, Szibor et al. 2005). Une explication possible est que ce phénomène soit analogue à la réponse stringente présente chez les bactéries et mitochondries de levures, où un haut niveau en un ARNt non chargé de l'acide aminé correspondant entraîne, indépendamment de son implication dans la traduction en cours, une synthèse protéique totale revue à la baisse. Enfin, il se pourrait que le pool de mitoribosomes libres soit déplété par la pause des ribosomes sur les codons lysines, engendrant donc une chute de la synthèse protéique totale (Masucci, Davidson et al. 1995).

La mutation MERRF affecte non seulement l'expression du génome mitochondrial, mais également celle du génome nucléaire, comme montré par une approche protéomique réalisée sur des cellules cybrides (Tryoen-Toth, Richert et al. 2003). Ces variations concernent aussi bien de nombreuses protéines cytosoliques, que des sous-unités de la chaîne respiratoire ou des enzymes participant au cycle de Krebs (comme la pyruvate déshydrogénase). L'abondance de ces deux derniers types de protéines étant diminuée dans les cellules cybrides présentant la mutation MERRF, ceci suggère une diminution d'activité du cycle de Krebs, liée à une activité également réduite de la chaîne respiratoire, et un mécanisme de compensation énergétique (Tryoen-Toth, Richert et al. 2003). Ceci démontre qu'il existe des modifications d'expression du génome nucléaire suite à des dysfonctionnements mitochondriaux. Ce processus est dénommé communication rétrograde (voir point 1.3.2.4).

### 1.3.2.2 Le potentiel de membrane

Tout comme pour les cellules issues de biopsies musculaires, les cellules cybrides porteuses de la mutation MERRF sont caractérisées par des dysfonctionnements conséquents de la chaîne respiratoire résultant d'une synthèse protéique mitochondriale diminuée: diminution sévère de l'oxygène consommé (jusqu'à 90 % pour des fibroblastes homoplasmiques A8344G), perte d'activité des complexes I et IV (Chomyn, Meola et al. 1991; Masucci, Davidson et al. 1995; James, Wei et al. 1996). Il en résulte une diminution du transfert de protons dans l'espace intermembranaire conduisant à une diminution du potentiel de membrane. Ainsi pour des fibroblastes cybrides ayant un taux de mutation MERRF compris entre 73 et 87 %, la diminution du potentiel de membrane mitochondrial est directement proportionnel à une perte du niveau d'activité de la cytochrome c oxydase, elle-même en rapport avec le taux de mutation (Antonicka, Floryk et al. 1999). La force motrice de la production en ATP étant diminuée provoque dès lors, pour des demandes élevées en ATP par rapport à celles requises pour des cellules MERRF quiescentes, une déficience du maintien du ratio ATP/ADP vis-à-vis de cellules non porteuses de la mutation (James, Sheard et al. 1999). Ces cellules cybrides afin de compenser cette production en ATP diminuée ont un métabolisme essentiellement glycolytique comme en témoigne une augmentation des concentrations en pyruvate et en lactate extracellulaire (Pallotti, Baracca et al. 2004).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le potentiel de membrane résiduel dans des cellules  $\rho^0$  où la chaîne respiratoire n'est plus du tout fonctionnelle. Il semblerait que la  $F_1$  ATPase (sous-unité formant la  $F_0F_1$  ATP synthase), hydrolyse l'ATP en  $ADP^{3-}$  qui est alors échangé contre de l' $ATP^{4-}$  cytosolique par l'ANT fonctionnant en antiport inverse. Ceci permettrait de conserver un certain potentiel de membrane, bien que moins élevé que pour des cellules sauvages et ce, au dépend d'une production en ATP déjà réduite (cellules exclusivement glycolytiques) (Buchet et Godinot 1998). Un second mécanisme de maintien d'un certain potentiel de membrane mitochondrial, dans des cellules déplétées totalement en ADN mitochondrial, dépendrait de la surexpression d'un canal chlorure ancré en membrane mitochondriale interne, mtCLIC (mitochondrial Chloride Intracellular Channel). Ce canal permettrait l'entrée d'ions  $Cl^-$  dans la matrice mitochondriale, créant un potentiel indépendant de la respiration mitochondriale. Cette surexpression a également été montrée pour des cellules cybrides MERRF (Arnould, Mercy et al. 2003).

### 1.3.2.3 L'homéostasie du calcium

La diminution du potentiel de membrane mitochondrial affecte gravement l'homéostasie du calcium. En effet, tous les transporteurs régulant les influx ou efflux en calcium mitochondrial sont dépendants du potentiel de membrane (voir point 1.1.3 et figure 1.9). De ce fait, la concentration en calcium intracellulaire est augmentée dans plusieurs modèles cellulaires de dysfonctionnement mitochondrial, dont des cellules  $\rho^0$  (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002) et des cellules porteuses de la mutation MELAS (Moudy, Handran et al. 1995). Dans le cas particulier des cellules porteuses de la mutation MERRF, on ne dispose pas encore de données concernant le niveau basal de concentration en calcium.

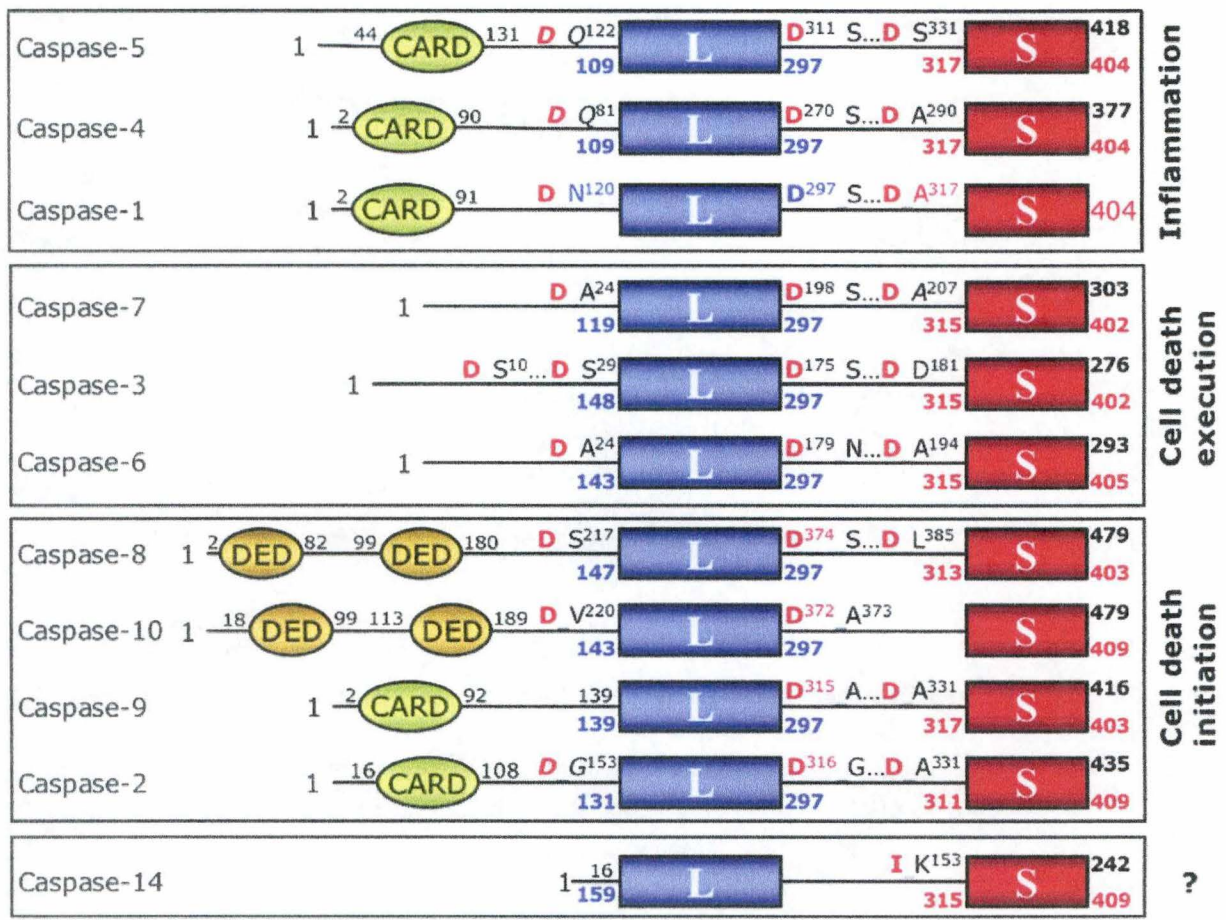
### 1.3.2.4 La communication rétrograde

La communication rétrograde est le processus par lequel la cellule peut moduler l'expression de gènes nucléaires en réponse à des changements de niveau d'activité des ses organelles (Parikh, Morgan et al. 1987). Le calcium intracellulaire constitue une pierre angulaire du phénomène de communication rétrograde entre la mitochondrie et le noyau de cellules présentant des déplétions partielles en ADN mitochondrial ou des inhibitions métaboliques mitochondriales engendrées par des traitements chimiques (au carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), à l'antimycine...). L'équipe de Biswas a montré, dans les deux types de modèles cités ci-dessus que, suite à une élévation en calcium cytosolique, ATF2 (Activated Transcription Factor 2) et NFATc (Nuclear Factor Activated T-cell) étaient activés respectivement par la JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et par la calcineurine et que NF- $\kappa$ B était inhibé (Biswas, Adebajo et al. 1999) Notre équipe a également mis en évidence dans des cellules 143 rho<sup>0</sup>, qu'une élévation du calcium libre intracellulaire engendrait une activation par phosphorylation du facteur de transcription nucléaire CREB (cAMP-Responsive Element-Binding protein) via la CaMKIV (Calcium/calModulin Kinase IV). Ce facteur de transcription est également activé dans des cellules cybrides MERRF. CREB phosphorylé, par recrutement de p53 et modification de son activité transcriptionnelle, augmente l'expression de p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, un inhibiteur du cycle cellulaire ; ce qui explique que les cellules rho<sup>0</sup> et cybrides mutées présentent une prolifération ralentie (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002).

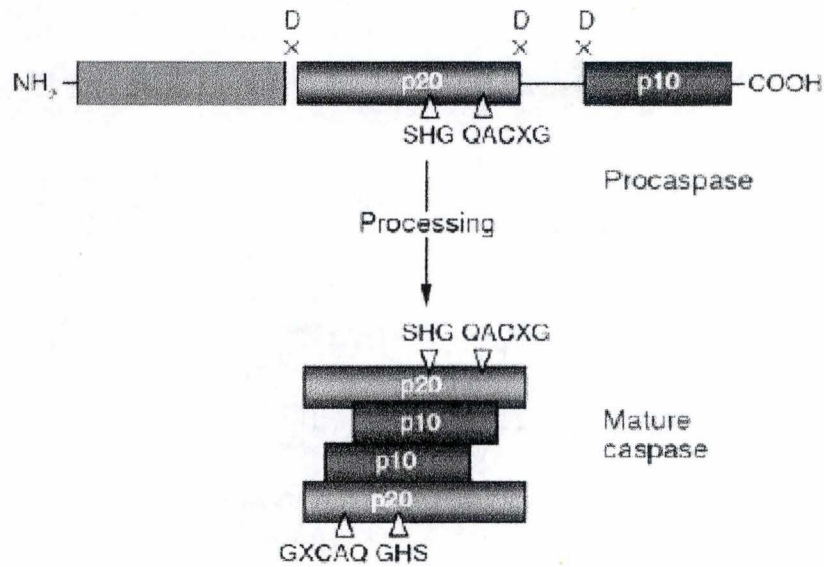
### 1.3.2.5 Le potentiel oxydo-réducteur

Le calcium joue également un rôle essentiel dans la production de ROS. Une élévation de sa concentration intracellulaire favorise la génération de ROS par les complexes de la chaîne respiratoire. Inversement, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire peut être stimulée par les ROS, notamment en agissant sur l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant, sur le RyR-1 et sur VDAC. De plus, il existe aussi une modulation d'activité des Ca<sup>2+</sup> ATPases et d'antiports Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> par les ROS (Gordeeva, Zvyagilskaya et al. 2003). Bien que les cellules comportant des dysfonctionnements mitochondriaux présentent généralement une production accrue de ROS, les stress oxydatifs réellement encourus par ces cellules dépendront de leur capacité à les détoxifier. C'est le déséquilibre production/détoxification (au profit de la production) qui sera nuisible pour la cellule. Or il a été observé pour des fibroblastes de patients atteints de la mutation MERRF que le niveau d'activité et d'expression de la MnSOD et de la catalase étaient largement diminués et que, dans des cellules sanguines, l'activité de la CuZnSOD et de la MnSOD étaient aussi diminuées (Wei, Lu et al. 2001). Cependant, dans des cellules rho<sup>0</sup>, la production de ROS et le niveau d'expression et d'activité des diverses enzymes antioxydantes varient en fonction des lignées. Une tendance commune à un niveau d'oxydation plus élevé se dégage cependant, marquée par une diminution du ratio GSH/GSSG et une baisse de l'activité SOD et Glutathione S-transférase dans plusieurs lignées. L'activité de la catalase est bien souvent inchangée et celle de la peroxydase, augmentée (Vergani, Floreani et al. 2004).

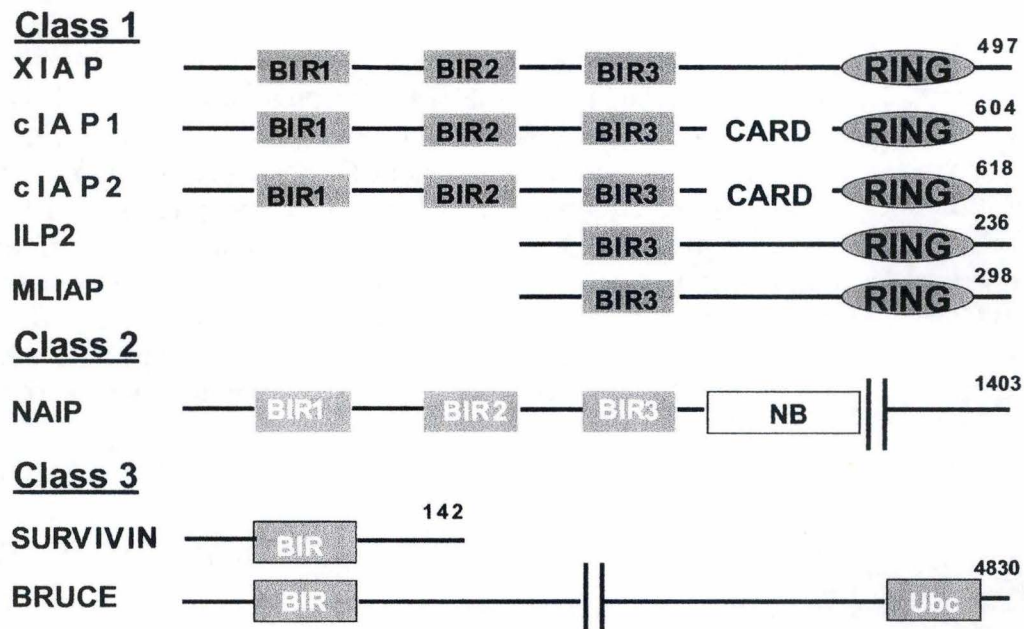
En résumé, les différents modèles cellulaires de dysfonctionnements mitochondriaux présentent des caractéristiques communes (diminution du potentiel de membrane, déséquilibre de la balance ROS/antioxydants, augmentation de la concentration calcique intracellulaire) et également des divergences (expression de gènes, dont ceux d'enzymes antioxydantes). Une caractéristique encore non abordée dans cette introduction est la susceptibilité de ces cellules métaboliquement déficientes à déclencher un programme de suicide cellulaire, ou apoptose. Il s'agit d'une question importante dans la mesure où, comme nous l'expliquons au point



**Figure 1.13 : Les différentes caspases et leur structure.** En ce qui concerne les cellules mammaliennes, les caspases sont au nombre de 14. Ces protéases forment deux groupes fonctionnels distincts, celles impliquées dans l'inflammation (caspases-1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14) et celles jouant un rôle dans le processus apoptotique (Fan, Han et al. 2005). Les caspases formant ce dernier ensemble peuvent encore être subdivisées en deux classes fonctionnelles, les effectrices, à court prodomaine, et les initiatrices, à long prodomaine permettant des interactions protéines-protéines par des domaines CARD ou DED. Les caspases possèdent également une grande sous-unité catalytique (L) et une petite sous-unité C-terminale (S). Celles-ci sont séparées par des interdomaines contenant des aspartates (D) également présentes après le prodomaine, sauf pour la caspase-9 (Fuentes-Prior et Salvesen 2004).



**Figure 1.14 : Activation des caspases.** Suite à deux clivages protéolytiques successifs après des résidus aspartate (Cote, Poirier et al.), deux petites (p10) et deux grosses (p20) sous-unités s'apparient pour former un hétérotétramère actif. GXCAQ et GHS sont les résidus du site actif impliqués dans l'activité catalytique (Lavrik, Golks et al. 2005).



**Figure 1.15 : Les 8 inhibiteurs de caspases de la famille des IAPs et leur structuration en domaines protéiques.** Les IAPs sont partagés en trois classes selon leur homologie de séquence pour le(s) domaine(s) BIR, permettant l'inhibition des caspases, et la présence ou absence de domaine RING, à fonction ubiquitine ligase E3. Des particularités sont présentes pour BRUCE, ayant un motif enzymatique ubiquitination E2 (Ubc), et NAIP, ayant un domaine de liaison pour les nucléotides (Wellington, Ellerby et al.) (Schimmer 2004).

suivant, l'apoptose fait intervenir les ROS, le calcium intracellulaire, la mitochondrie et met en place des acteurs consommateurs d'ATP.

## 1.4 L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. Elle est donc nécessaire au développement et au maintien de tout organisme vivant puisqu'elle joue un rôle important dans l'embryogenèse, les changements morphologiques, l'homéostasie cellulaire, le système immunitaire, la réparation des tissus,... Des perturbations de la mort cellulaire par apoptose (défaut ou excès) sont impliquées dans la physiopathologie de nombreuses maladies telles que les cancers et maladies neurodégénératives. Ce phénomène est à distinguer d'un autre processus de mort cellulaire qu'est la nécrose. Contrairement à l'apoptose, mécanisme séquentiel ATP-dépendant menant à des remaniements morphologiques et biochimiques précis de la cellule et finissant par la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques n'induisant pas de réponse inflammatoire, la nécrose est un processus passif et menant à la lyse complète de la cellule (Jacobson, Weil et al. 1997; Zimmermann, Bonzon et al. 2001; Bras, Queenan et al. 2005).

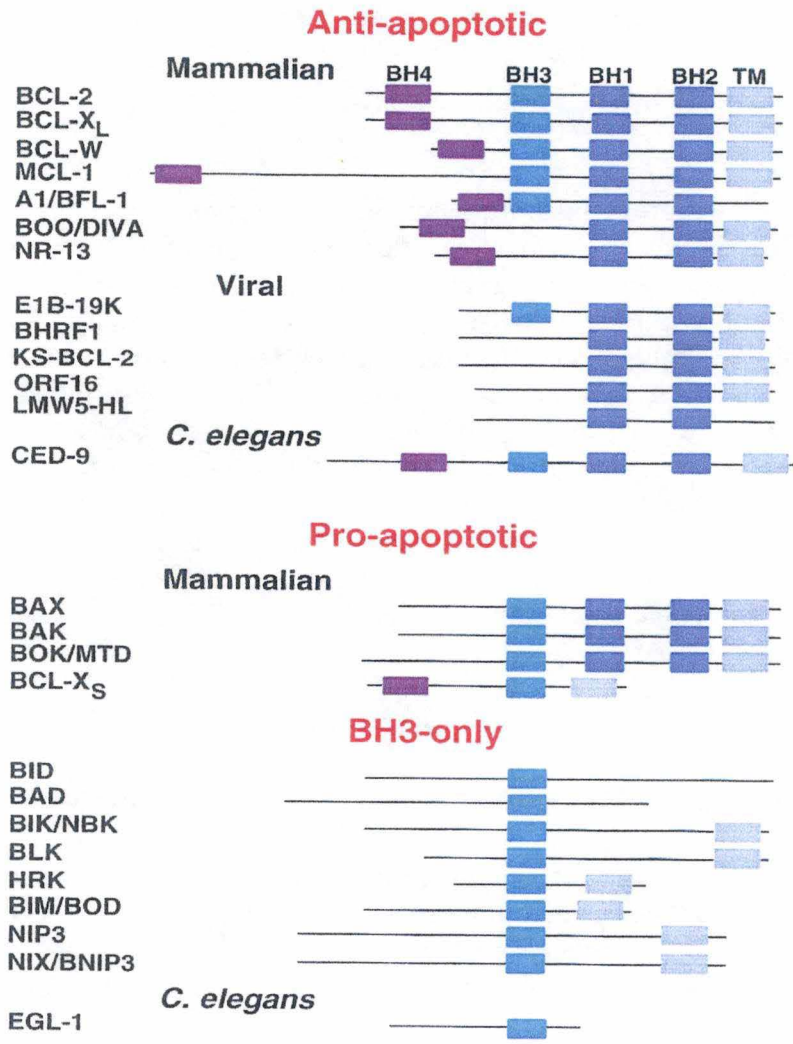
### 1.4.1 Acteurs moléculaires de l'apoptose

#### 1.4.1.1 Les caspases : structure, classes, activation et substrats

Les caspases sont des « aspartate-specific cysteine proteases » et forment un groupe de 14 membres partageant des similarités de séquence en acides aminés, de structure et de spécificité de substrats. Ce groupe peut être scindé en deux sur base de la fonction des membres le composant ; les caspases peuvent être impliquées dans l'apoptose ou l'inflammation (figure 1.13).

Initialement présentes dans la cellule sous forme de précurseurs inactifs ou procaspases, celles-ci sont structurées comme suit : un prodomaine N-terminal, une large sous-unité contenant le site actif puis une petite sous-unité C-terminale ; ces trois domaines étant séparés par des interdomaines contenant des résidus aspartate. Leur activation (figure 1.14) demandant deux clivages protéolytiques successifs des interdomaines et leur site de clivage étant situé après un aspartate, ceci explique la capacité des caspases à s'autoactiver en groupe ou à être activées par d'autres caspases actives et pouvant donc donner lieu à une cascade d'amplification. Ces deux clivages, bien que nécessaires, ne sont pas suffisants à leur activation mais permettent la tétramérisation de deux grands et deux petits domaines en un complexe actif (Zimmermann, Bonzon et al. 2001; Fan, Han et al. 2005).

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les caspases intervenant dans l'apoptose forment deux catégories. Les premières, intervenant dans l'initiation du processus apoptotique, sont dites initiatrices et comprennent les caspases 2, 8, 9 et 10. Leur long prodomaine leur permet d'être recrutées par d'autres protéines et d'interagir avec elles, d'intégrer et de propager le signal pro-apoptotique. Ces interactions sont rendues possibles par reconnaissance de motif CARD (CASPase-Recruitment Domain) ou DED (Death Effector Domain) par leur prodomaine. La deuxième catégorie est composée des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) au prodomaine plus court et dépendant pour leur activation des précédentes. Ce sont ces dernières qui sont responsables du phénotype apoptotique par clivage ou dégradation de substrats qui leurs sont propres (figure 1.13) (Zimmermann, Bonzon et al. 2001; Fan, Han et al. 2005). Ainsi, la caspase-3, caspase effectrice principale de la réponse apoptotique, est responsable de l'activation de nucléases provoquant la fragmentation de



**Figure 1.16 : Les protéines de la famille Bcl-2 et les domaines BH.** L'ensemble des protéines Bcl-2 est divisé en deux groupes selon leur action sur la réponse apoptotique. Le premier est composé des membres anti-apoptotiques et le second, des protéines pro-apoptotique. Ce dernier comprend les protéines pro-apoptotiques à domaine BH unique et appelés « BH3 only ». La plupart des protéines de la famille Bcl-2 possède également un domaine carboxy-terminal hydrophobe (Schoeler, Szibor et al.) permettant un ancrage en membrane (Gross, McDonnell et al. 1999).



l'ADN génomique selon des multiples de 180 pb, par clivage internucléosomal. Cette nucléase est nommée CAD (Caspase-Activated Dnase) et est inactivée, en condition basale, par complexation à une sous-unité inhibitrice iCAD (inhibitor of CAD). La caspase-3, par clivage de iCAD entraîne alors la fragmentation de l'ADN (Widlak 2000). La caspase-3 a de nombreux autres substrats, outre les procaspases effectrices, elle est capable d'inhiber des enzymes intervenant dans la réparation de l'ADN tel que PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase). La lamine A et la foldrine, constituants du cytosquelette et du squelette nucléaire sont également des cibles des caspases et seraient impliquées dans la condensation de la chromatine et la décomposition de la membrane nucléaire ainsi que dans la formation des corps apoptotiques (Fan, Han et al. 2005). Ces quelques exemples montrent la diversité des substrats des caspases.

### 1.4.1.2 Les inhibiteurs de caspases

Afin d'éviter une activation accidentelle des caspases, la cellule contient des inhibiteurs de caspases, les IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Cette famille contient huit membres : cIAP1, cIAP2, XIAP (X-linked mammalian IAP), ILP2, la livine, NAIP (neuronal AIP), la survivine et BRUCE (figure 1.15). Ils contiennent tous un ou trois domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat) qui leur permettent d'inhiber les caspases par liaison à leur site actif. Un deuxième type de domaine est également caractéristique des 5 premiers membres cités. Il s'agit de RING (Really Interesting New Gene) ayant une activité ubiquitine ligase E3 qui permettrait, par ubiquitination et liaison à la caspase, de mener la caspase lui étant associée à la dégradation par le protéasome. cIAP1 et 2 présentent, près de leur domaine RING, un domaine CARD suggérant que ces IAPs pourraient directement ou indirectement agir sur le recrutement des caspases. Notons que la survivine et BRUCE ne semblent pas être impliqués dans le processus apoptotique (Zimmermann, Bonzon et al. 2001; Schimmer 2004; Fan, Han et al. 2005).

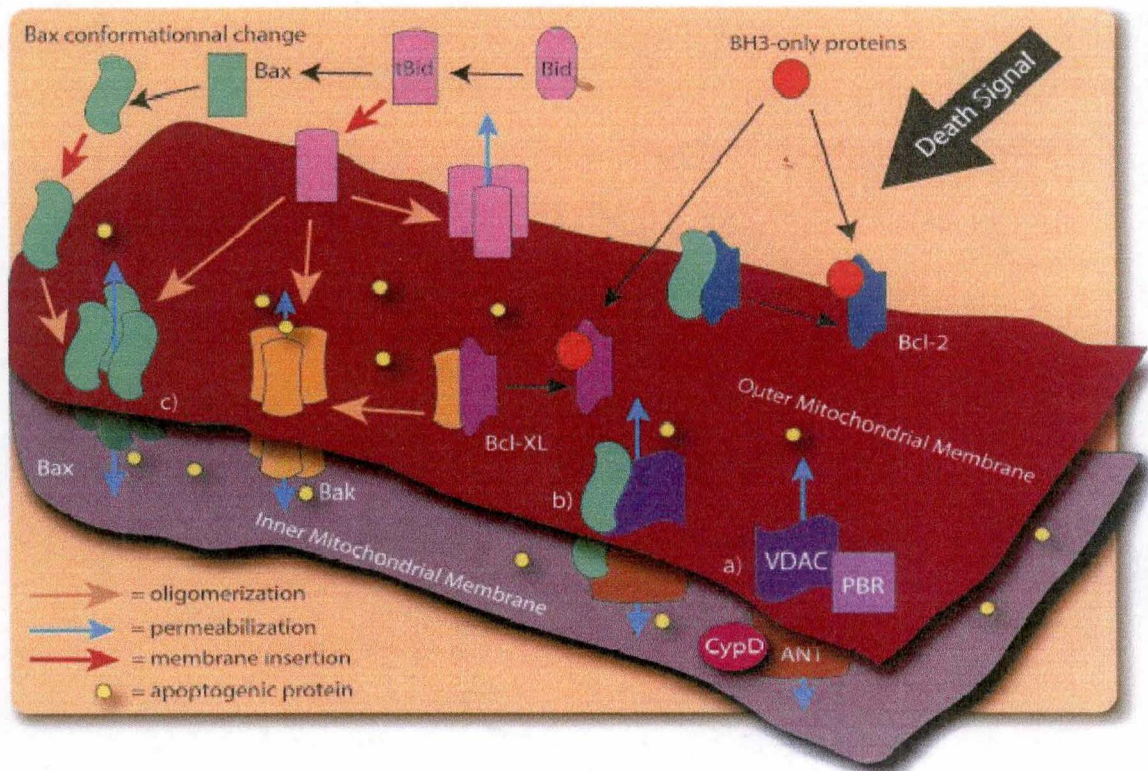
Lors de l'apoptose, ces IAPs sont inhibées par des facteurs solubles, libérés dans le cytosol suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale, comme Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with LOW pI) et la sérine protéase Omi/HtrA2 (High temperature requirement protein A2) (Martins, Iaccarino et al. 2002). Cette perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, quant à elle, est dépendante de protéines de la famille Bcl-2, du PTP,...(voir point 1.4.2)

### 1.4.1.3 Les membres de la familles Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins) sont des facteurs cruciaux tant dans l'initiation de l'apoptose que dans son inhibition. Les divers membres seront donc scindés en deux groupes selon leur type d'activité. Ces deux groupes, bien que de structures différentes, possèdent quatre régions communes et conservées, ce sont les domaines BH (Bcl-2 Homology ; figure 1.16) (Gross, McDonnell et al. 1999).

Le premier groupe est composé de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/BFL-1 et BOO/DIVA contenant les domaines BH1, 2, 3 et 4 pour la majeure partie. Le deuxième groupe, comprenant les protéines pro-apoptotiques est subdivisé en deux sous-familles, celles contenant les domaines BH1, 2 et 3 telles que Bax, Bak, Bok/MTD et celles ne possédant que le domaine BH3 (appelées BH3 only) telles que Bid, Bad, Bik/NBK, BLK, HRK, BIM/BOD, NIP3 et NIX/BNIP3. La plupart des ces facteurs présentent également un domaine carboxy-terminal hydrophobe permettant un ancrage en membrane. Le domaine BH4 des protéines anti-apoptotiques peut être phosphorylé et





**Figure 1.18 : Les différents modèles de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe suite à un stimulus de mort.** La libération des facteurs apoptogènes séquestrés dans l'espace intermembranaire mitochondrial peut s'expliquer hypothétiquement par l'ouverture du PTP (a), par interaction de protéines pro-apoptotiques telles que Bax avec l'ANT et/ou VDAC (b) ou encore par formation de pores résultant de l'oligodimérisation de Bax ou Bak dont l'activation par transconformation est réalisée par des protéines BH3-only (comme tBid, Bim, Puma et Noxa) (Bras, Queenan et al. 2005).

permettre ainsi leur régulation (Gross, McDonnell et al. 1999; Zimmermann, Bonzon et al. 2001).

Une portion considérable de protéines pro et anti-apoptotiques, en absence de signal de mort, se localisent dans des compartiments subcellulaires séparés. Les protéines anti-apoptotiques se trouvent, exception faite pour Mcl-1 (cytosolique), initialement ancrées dans les membranes de la mitochondrie (membrane externe), du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique (face interne) ou du noyau. A l'inverse, les protéines pro-apoptotiques sont majoritairement présentes dans le cytosol (Bax) et/ou ancrées au cytosquelette (Bim). Le signal de mort provoque la translocation en membrane mitochondriale externe des ces acteurs pro-apoptotiques qui homodimérisent et permettent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. La fonction des protéines anti-apoptotiques est de prévenir cette perméabilisation par liaison spécifique du domaine BH3 (segment d'hélice  $\alpha$ ) de protéines pro-apoptotiques actives grâce à une poche hydrophobe formées par les domaines BH1, 2 et 3 (figure 1.17) (Gross, McDonnell et al. 1999; Adams 2003).

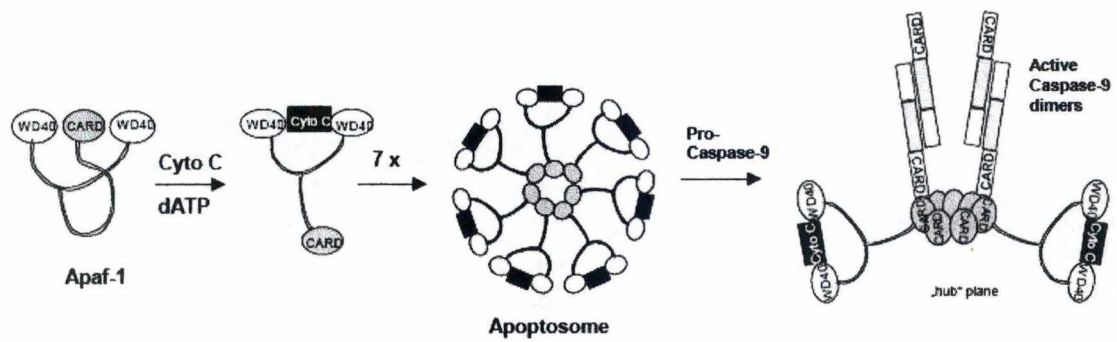
Outre les processus de dimérisation permettant aux protéines de s'activer (homodimérisation) ou de s'inhiber (hétérodimérisation), d'autres phénomènes comme des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations ou des protéolyse permettent de réguler l'activité de certains membres de cette famille. Ainsi, Bad pour pouvoir s'associer à Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, doit être déphosphorylé ; ceci lui permettant d'exposer son domaine BH3. Sa phosphorylation, effectuée par la PKA et Akt sur deux résidus différents, entraîne sa séquestration dans le cytosol par la protéine 14-3-3. Pour Bcl-2, une hyperphosphorylation lui fait perdre son pouvoir anti-apoptotique. Quant à la protéolyse, elle est nécessaire à la protéine Bid cytosolique, substrat de la caspase 8, pour que son extrémité C-terminale (tBid) puisse s'insérer en membrane mitochondriale externe et permettre l'activation de la voie apoptotique. De plus, une régulation transcriptionnelle s'opère également sur ces différentes protéines. Ainsi, la transcription des certains acteurs pro-apoptotiques, comme par exemple HRK qui est constitutivement actif, ne s'initie que suite à un stimulus de mort (Chang, Minn et al. 1997; Gross, McDonnell et al. 1999).

En résumé, suite à un stimulus de mort, l'accumulation des protéines pro-apoptotiques en membrane mitochondriale interne dépasse la capacité de séquestration des ces dernières par les protéines anti-apoptotiques et provoque une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Celle-ci donne lieu à une libération de facteurs apoptogènes tels que le cytochrome c, AIF (Apoptosis Inducing Factor), l'endonucléase G, Omi/HtrA2 et Smac/DIABLO.

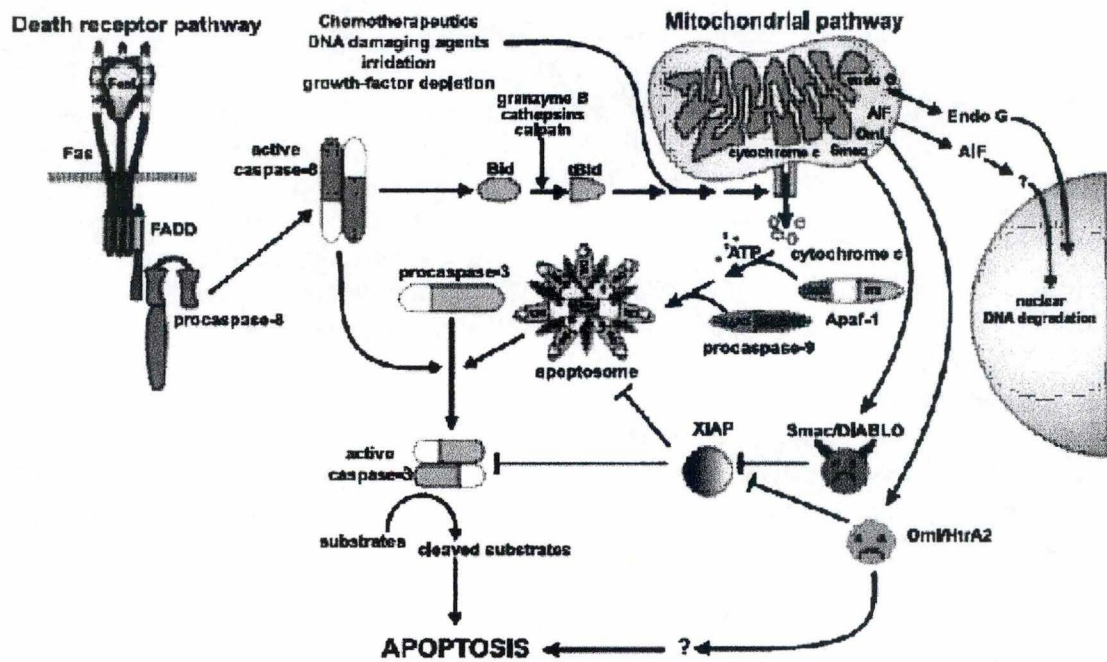
#### **1.4.2 Perméabilisation de la membrane mitochondriale** (Gottlieb 2000; Bras, Queenan et al. 2005)

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe requiert l'insertion de facteurs pro-apoptotiques en son sein mais plusieurs modèles (figure 1.18) existent quant à la mécanistique de la perméabilisation en tant que telle, permettant la libération cytosolique de facteurs apoptogènes.

Une première hypothèse suggère l'ouverture du PTP (figure 1.2), suite notamment à la perte de l'homéostasie calcique, qui entraînerait un gonflement de la matrice mitochondriale menant à une rupture de la membrane mitochondriale externe suivie de la libération non spécifique des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial. Notons que l'ouverture de ce pore est régulée par le potentiel de membrane, le pH matriciel, le niveau oxydo-réducteur et le flux électronique et que suite à son ouverture, il y a dépolérisation de la membrane et découplage de la phosphorylation oxydative.



**Figure 1.19 : Formation de l'apoptosome.** Apaf-1 s'associe dans le cytosol avec le cytochrome c via un domaine WD40, et avec de l'ATP ou dATP formant ainsi une sous-unité du futur apoptosome. La transconformation en résultant permet l'oligomérisation de sept sous-unités en un complexe et le démasquage des domaines CARD reconnus par la procaspase-9 qui sera activée en s'associant au complexe (Gewies 2003).



**Figure 1.20 : Résumé schématique des deux voies menant à l'apoptose.** Divers signaux de morts sont intégrés au niveau de la mitochondrie et entraînent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe permettant le relargage de protéines apoptogènes et induisant la fragmentation de l'ADN (AIF, endonucléase G), la formation de l'apoptosome (cytochrome c) ou encore l'inhibition d'inhibiteurs de caspases (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 inhibant XIAP). Ces deux derniers points mènent à l'activation de caspases, dont la caspase-3, principale caspase effectrice de la réponse apoptotique et clivant de nombreux substrats. Une autre voie, médiée par des récepteurs de mort (Fas) permet également l'activation des caspases (caspase-8). Cette voie peut être connectée à la précédente par clivage de Bid en tBid engendrant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Ce clivage peut également être caspase-indépendant (granzyme B, cathepsins, calpaïne) (van Loo, Saelens et al. 2002).

Une variante de ce modèle consiste en une interaction de protéines pro-apoptotiques comme Bax avec l'ANT et/ou VDAC qui sont tout deux des composants du PTP. Dans le cas d'une interaction avec l'ANT, la formation de pores non spécifiques serait invoquée. Dans le second cas, Bax provoquerait l'ouverture de VDAC, inhibé en condition basale par des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Un troisième modèle attribue la perméabilité accrue de la membrane mitochondriale externe à la seule oligomérisation de protéines pro-apoptotiques en membrane. Dans ce modèle, comme dans tous ceux faisant intervenir Bax et Bad, la perméabilisation n'est rendue possible que par activation de ces deux facteurs pro-apoptotiques par des protéines BH3-only (comme tBid, Puma, Noxa, Bim).

### **1.4.3 L'apoptosome (Hill, Adrain et al. 2003)**

La libération du cytochrome c dans le cytosol lui permet de jouer le rôle de cofacteur dans l'assemblage d'un grand complexe d'activation des caspases appelé l'apoptosome. Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), protéine cytosolique, par liaison au cytochrome c et au dATP ou ATP va former un complexe permettant de recruter et activer, par association, la procaspase-9 (figure 1.19). La caspase-9 active activera les caspases-3 et 7. A son tour, la caspase-3 activera les caspases-2 et 6. La caspase-6 pourra activer les caspases-8 et 10 initiateurs, ce qui donnera donc naissance à une boucle de rétroaction positive menant à une amplification du signal.

### **1.4.4 Les voies d'activation de l'apoptose**

Deux voies aboutissant à l'activation des caspases sont à distinguer. La voie intrinsèque (ou mitochondriale) repose sur l'intégration, au niveau de la mitochondrie, de stress cellulaires comme les dommages à l'ADN, les stress oxydatifs, la perte de signaux de survie, etc. La voie extrinsèque (ou des récepteurs de mort), quant à elle, est médiée par des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) (Gottlieb 2000).

#### **1.4.4.1 La voie intrinsèque**

Comme nous venons de le voir, des stress cellulaires intégrés au niveau de la mitochondrie peuvent mener à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et provoquer la libération de facteurs apoptogènes comme le cytochrome c, dont l'implication dans le processus apoptotique a été décrite dans le point 1.4.3. D'autres facteurs, tels que Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 permettent également l'activation des caspases par inhibition d'inhibiteurs de caspases que sont les IAP. Les derniers acteurs, relargués dans le cytosol, que nous détaillerons sont AIF et l'endonucléase G (figure 1.20).

AIF, effecteur de mort caspase-indépendant, est transloqué dans le noyau après sa libération dans le cytosol. AIF et l'endonucléase G, également relargués suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, provoquent la condensation de la chromatine et le clivage à large échelle de l'ADN génomique (50 kb) (Arnoult, Gaume et al. 2003). Lorsque la cellule n'est pas engagée dans un processus apoptotique, AIF, grâce à ses domaines de liaison au FAD et au NADH, semble agir en tant qu'antioxydant prévenant des dommages oxydatifs par les ROS (Bras, Queenan et al. 2005).

Divers facteurs physiologiques peuvent activer cette voie intrinsèque, il s'agit notamment de la disruption du flux électronique dans la chaîne de transporteurs des électrons provoqué par des dégâts dans ces mêmes transporteurs et entraînant une production accrue de

ROS, une perte du potentiel de membrane et une diminution subséquente de la production en ATP. Une augmentation de la concentration en ROS intramitochondriaux, notamment remarquée dans de nombreux cas de dysfonctionnements mitochondriaux, peut accroître la susceptibilité de la cellule face à l'apoptose. En effet, l'ouverture du PTP (ou la peroxydation des lipides de la membrane tels que les cardiolipines) est favorisée par les stress oxydatifs, libérant le cytochrome c dans le cytosol. Cette libération favorise la génération d'anions superoxydes, contribuant au processus apoptotique, par perte de la capacité antioxydante du cytochrome c et par réduction accrue de la chaîne de transporteurs des électrons provoquée par le blocage du flux électronique entre les complexes III et IV. De façon similaire, une augmentation de la concentration calcique matricielle entraîne une dissociation du cytochrome c des lipides (cardiolipines) de la membrane mitochondriale et favorise ainsi sa libération (Wei, Lu et al. 2001; Turrens 2003; Brookes, Yoon et al. 2004; Bras, Queenan et al. 2005).

Une autre situation de stress cellulaire pouvant déclencher l'apoptose par la voie intrinsèque est l'accumulation de dommages à l'ADN. En réponse à des dommages de l'ADN génomique, p53 active la transcription de gènes pro-apoptotiques comme Noxa, Puma et Bax, Fas et Apaf-1 et réprime la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et les IAPs. De plus, via p21, il permet l'arrêt du cycle cellulaire. Outre ces contrôles transcriptionnels, p53 est également capable d'activer directement Bax et de faciliter le relargage de protéines pro-apoptotiques séquestrées par Bcl-X<sub>L</sub> (Gross, McDonnell et al. 1999; Haupt, Berger et al. 2003).

#### **1.4.4.2 La voie extrinsèque**

La superfamille des récepteurs au TNF comprend un grand nombre de récepteurs et de ligands qui leur sont associés ayant diverses fonctions physiologiques. Nous ne nous pencherons que sur TNFR1 (TNF Receptor 1) et Fas/apo-1/CD95, deux récepteurs bien connus pour leur rôle joué dans l'apoptose. La liaison de leur ligand, respectivement TNF $\alpha$  et FasL, sur des régions extracellulaires riches en cystéines, entraîne l'homotrimérisation des récepteurs. Ceci permet de renforcer les interactions entre des domaines intracellulaires de mort, les Death Domain (DD), ce qui aura pour conséquence d'activer les caspases (figure 1.20).

Pour le TNFR1, la trimérisation du récepteur rend possible le recrutement de TRADD (TNFR Associated DD), protéine adaptatrice reconnaissant les DD du récepteur, qui recrutera à son tour, FADD (Fas Associated DD), protéine également adaptatrice possédant un DED (Death Effector Domain) qui permettra l'auto-activation de caspases-8 recrutées. La voie activée par FasL mène, de façon similaire, à l'activation de la caspase-8 mais ne demande pas l'intermédiaire TRADD. Cette caspase-8, déclenche non seulement l'activation de la caspase-3, mais peut aussi cliver Bid en tBid et donc relier la voie extrinsèque à la voie intrinsèque, permettant de la sorte l'amplification du signal de mort. Une inhibition du signal de mort peut se faire à différents niveaux grâce à c-FLIP (Cellular FLICE Inhibitory Protein) par liaison de FADD ou de la caspase-8 (Cho et Choi 2002; Lee et Lee 2002).

Notons que le complexe TNFR1-TRADD peut interagir avec TRAF2 (TNFR Associated Factor 2 ; qui peut également être inhibé par c-FLIP) et induire ainsi l'activation de voies de signalisation aboutissant à la JNK (Jun N-terminal Kinase) et à NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B). De façon similaire, Fas, par interaction avec Daxx, peut également aboutir à l'induction des voies de signalisation telles que celle des JNK menant à la mort cellulaire par apoptose (par phosphorylation JNK va permettre, entre autre, la libération de Bax de la protéine 14-3-3, l'activation de protéines pro-apoptotiques et l'inactivation de protéines anti-apoptotiques) contrairement à celle menant à NF- $\kappa$ B (notamment induction de la transcription

d'IAPs). L'activation de TNFR1 ou de Fas peut donc, selon le contexte cellulaire, déclencher une réponse pro- (activation de la caspase-8 et des JNK) ou anti- (NF- $\kappa$ B) apoptotique (Cho et Choi 2002; Lee et Lee 2002; Beere 2005).

#### **1.4.4.3 Les voies indépendantes des caspases** (Broker, Kruyt et al. 2005; Fan, Han et al. 2005; Kroemer et Martin 2005).

Bien d'autres événements caspases-indépendants peuvent se surimposer au processus apoptotique médié par les caspases. Signalons préalablement à leur présentation non exhaustive, que les effets des mécanismes apoptotiques indépendants des caspases sont variables selon les types cellulaires étudiés et les stimuli apoptotiques utilisés.

Les cathepsines D, aspartate protéases lysosomales, activées par des concentrations fortes en calcium intracellulaire, et les cathepsines B, cystéines protéases également lysosomales, pouvant être activées par des stress oxydatifs, peuvent participer directement à l'activation des caspases en les clivant, mais elles peuvent également jouer un rôle dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par clivage de Bid. Le relargage de ces protéases hors du lysosome reste peu connu mais pourrait résulter d'une perméabilisation de la membrane par les ROS. Remarquons qu'une perméabilisation complète de la membrane lysosomale est synonyme de nécrose, nécrose engendrée par la libération massive de protéases.

De fortes augmentations en calcium libre cytosolique peuvent aussi conduire à l'activation de protéases cytosoliques comme les calpaïnes (calcium-activated neutral proteases), inhibées en condition basale par la calpastatine. La calpastatine peut être clivée et ainsi inactivée par les calpaïnes après augmentation de la concentration calcique ou par les caspases. La calpaïne pourrait participer à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et provoquer la libération d'autres intervenants de la réponse apoptotique comme AIF et l'endonucléase G qui participent tous deux à la fragmentation de l'ADN génomique.

De nombreux autres acteurs de ce type de réponse, moins étudiés ou spécifiques de certains types cellulaires, tel que le granzyme B, sérine protéase jouant un rôle important dans la cytotoxicité des lymphocytes T, pourraient encore être cités mais ceci dépasse le cadre de cette introduction.

#### **1.4.5 Relation entre la mutation MERRF et le processus apoptotique**

Si l'on considère les modifications du potentiel de membrane et le déséquilibre ROS/antioxydants des cellules présentant la mutation MERRF, et si l'on considère de manière générale l'augmentation calcique cytosolique des cellules affectées par un dysfonctionnement mitochondrial, et l'intervention des ROS et du calcium dans le processus apoptotique, il pourrait paraître évident que de tels types de cellules présentent une susceptibilité accrue face à l'apoptose. Cependant, plusieurs écoles s'affrontent quant à l'éventuelle résistance ou sensibilité de ces cellules face à la réponse apoptotique induite par divers stress pro-apoptotiques. Cette hypersensibilité ou diminution de sensibilité pourraient être dépendante du type cellulaire, du dysfonctionnement mitochondrial et de la nature du stress apoptotique.

Ainsi dans des cellules NT2 rho<sup>+</sup>, non déplétées en ADN mitochondrial, il a été montré que le peptide  $\beta$ -amyloïd provoquait une chute du potentiel de membrane mitochondrial, une diminution de l'activité des complexes respiratoires ainsi qu'une synthèse en ATP également diminuée conduisant à la mort cellulaire. Ce peptide semblerait inhiber le complexe IV de la chaîne respiratoire et entraîner la production de ROS. Par contre, les cellules NT2 rho<sup>0</sup>, caractérisées comme toutes les cellules déplétées totalement en ADN



mitochondrial par une absence de transport des électrons par la chaîne respiratoire, ne semblent pas affectées par le peptide  $\beta$ -amyloïd. Il semblerait, en effet, que la toxicité de cet inducteur de la mort cellulaire, requière une mitochondrie fonctionnelle (Cardoso, Santos et al. 2001).

La survie de ces mêmes cellules NT2 rho<sup>0</sup>, non affectée par le peptide  $\beta$ -amyloïd, se trouve cette fois diminuée de façon similaire aux cellules NT2 rho<sup>+</sup> suite à des stimulations au peroxyde d'hydrogène, connu pour générer des ROS. La réponse apoptotique dans ces deux lignées cellulaires, dépendant de la libération du cytochrome c, de l'activation subséquente des caspases puis de la fragmentation de l'ADN, se trouve légèrement augmentée pour les cellules rho<sup>0</sup> à des concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 100  $\mu$ M (Cardoso, Rego et al. 2004).

Une absence de sensibilité différentielle entre des cellules rho<sup>0</sup> et rho<sup>+</sup> a également été rapportée dans des cellules issues d'une lignée lymphoïde (cellules WAL-2A) suite à des incubations en présence de la staurosporine. Le mécanisme apoptotique engendré par la staurosporine dépend classiquement de la libération du cytochrome c dans le cytosol, mais cette libération ne semble pas se produire dans les cellules rho<sup>0</sup> de cette lignée, contrairement à celle remarquée dans les cellules rho<sup>+</sup> où la production en ROS par la chaîne respiratoire, par disruption du flux électronique résultant de la libération du cytochrome c, est augmentée (Cai, Wallace et al. 2000).

Nous voyons donc que selon les types cellulaires et les molécules utilisées, les effets sur la réponse apoptotique divergent dans ces cellules rho<sup>0</sup> par rapport à leurs homologues non déplétés en ADN mitochondrial. Cependant qu'en est-il des cellules atteintes par la mutation MERRF ?

*In vivo*, dans des biopsies de muscles de patients possédant un taux de mutation MERRF supérieur à 73 %, plus de 50 % des fibres musculaires sont positives aux immunomarquages TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transférase-mediated dUTP Nick End Labeling), Fas et caspase-3 active. Ces caractéristiques étant d'autant plus marquées que le taux de mutation est élevé, il se pourrait donc que l'apoptose induite, par exemple, par Fas et menant à l'activation de la caspase-3 soit un mécanisme d'élimination de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial (Mirabella, Di Giovanni et al. 2000). De plus, des analyses histologiques *post mortem* étudiant plusieurs populations neuronales constitutives du système nerveux central de patients atteints de la pathologie MERRF, montrent une diminution significative, par rapport à des individus sains, du nombre de cellules présentes dans chacune des populations étudiées. Ainsi, au niveau du noyau dentelé, la perte neuronale s'élève à plus de 45 %. La vulnérabilité des cellules touchées par la mutation MERRF pourrait être la cause de cette perte prononcée de neurones.

*In vitro*, Liu et collaborateurs ont montré que des cellules 143B repeuplées avec des mitochondries portant la mutation MERRF, suite à des stress à la staurosporine et aux UV, montrent une réponse apoptotique accrue (libération accrue du cytochrome c, activité caspase-3 augmentée et fragmentation de l'ADN) par rapport à des cellules saines (Liu, Lee et al. 2004). De plus, Guillaume Rommelaere, au cours de son mémoire a également démontré cette sensibilité augmentée des cellules cybrides MERRF face à l'apoptose induite par la staurosporine (Rommelaere 2006). Au laboratoire, nous essayons actuellement de mettre en évidence les acteurs moléculaires responsables de cette hypersensibilité à l'apoptose des cellules cybrides MERRF. Afin de mieux comprendre les implications de la staurosporine, nous allons détailler quelque peu son mode d'action.

La staurosporine est un alkaloïde bactérien qui inhibe les PKC (phospholipid/Ca<sup>++</sup>-dependent Protein Kinase) et qui est fréquemment utilisé comme inducteur fort de l'apoptose. Bien que toutes les implications cellulaires de la staurosporine ne soient pas complètement identifiées, des études ont montré qu'elle induisait deux éléments-clés dans le déclenchement de la réponse apoptotique caractérisée par l'accumulation de ROS intracellulaires et

l'augmentation de la concentration calcique cytosolique, le relargage cytosolique du cytochrome c et l'activation des caspases (Tamaoki, Nomoto et al. 1986; Gil, Almeida et al. 2003). Passons en revue ces trois cibles de la staurosporine.

Premièrement, la staurosporine augmente la concentration cytosolique et mitochondriale en ROS permettant la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial et l'activation subséquente des caspases. La génération excessive de ROS semblerait directement liée à l'élévation en calcium provoquée par la staurosporine (Kruman, Guo et al. 1998; Gil, Almeida et al. 2003).

Deuxièmement, la staurosporine augmente la concentration calcique cytosolique en amont de l'activation des caspases et indépendamment de la production de ROS engendrée, bien que les ROS potentialisent cette augmentation calcique cytosolique (une boucle de rétroaction existe entre les ROS et le calcium comme expliqué au point 1.3.2.5) (Gil, Almeida et al. 2003; Brookes, Yoon et al. 2004). Le calcium cytosolique en excès provoque également l'activation d'enzymes calcium-dépendantes telles que les calpaïnes et les cathepsines (voir point 1.4.4.3). L'inhibition de la réponse apoptotique par des chélateurs calciques et des antioxydants prouve la nécessité de ces deux premiers événements dans l'induction de l'apoptose par la staurosporine (Kruman, Guo et al. 1998; Gil, Almeida et al. 2003).

Troisièmement, l'inhibition des PKC entraîne la non phosphorylation de Bad sur une sérine, ce qui empêche la protéine 14-3-3 de séquestrer Bad. Il en résulte donc une plus grande probabilité de libération de Bad et donc de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Zha, Harada et al. 1996).

## Objectifs de ce mémoire

Etant donné que:

- des données obtenues in vivo suggèrent qu'un processus apoptotique survient dans les cellules musculaires de patients atteints par la pathologie MERRF, éventuellement lié à la surexpression du récepteur Fas,
- des cellules cybrides porteuses de la mutation A83344G présentent une réponse apoptotique exacerbée en réponse à la staurosporine,
- les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial sont généralement caractérisées par une augmentation du niveau intracellulaire de ROS et de calcium,
- le processus apoptotique est sensible aux variations de la concentration en ROS et en calcium,

L'objectif de ce mémoire est de contribuer à caractériser la réponse apoptotique des cellules cybrides porteuses de la mutation MERRF :

- 1) En précisant le rôle des ROS dans la réponse apoptotiques de cellules cybrides. Dans un premier temps, nous comparerons les niveaux de ROS intracellulaire entre les deux lignées, au moyen de sondes fluorescentes spécifiques de  $H_2O_2$  (DCF-DA) et des  $O_2^-$  mitochondriaux (MitoSox Red). Dans un second temps, nous comparerons dans les deux lignées la réponse apoptotique induite par deux molécules connues pour générer des ROS : la ménadione et la staurosporine, et nous étudierons comment la réponse apoptotique peut être modulée par un antioxydant et un chélateur calcique. La réponse apoptotique sera évaluée en mesurant l'activité de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN.
- 2) En déterminant si les cellules cybrides mutées sont également plus sensibles à l'apoptose induite par Fas. Le cas échéant, nous déterminerons à l'aide d'antioxydants, si cette hypersensibilité peut être due à un niveau de ROS plus élevé dans les cellules cybrides mutées (en fonction des réponses apportées au point 1).

Molécule	Action	Référence	Stock	Concentration finale
Menadione sodium bisulfite	Production d'O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Sigma-Aldrich M2518	100 mM dans du DHG + 10 % SVF	10 – 500 µM
Peroxyde d'hydrogène	Augmentation de la concentration intracellulaire en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck 107209	30 % dans de l'eau	500 µM
Anticorps anti-Fas	Activateur de la voie Fas	Upstate 05-201	0,5 µg/µl dans du PBS + 50 % de glycérol *	1 µg/ml
Staurosporine	Inducteur d'apoptose	Sigma-Aldrich I0634	1mM dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) *	500 nM
Bapta AM	Chélateur du calcium intracellulaire	Molecular Probes B1205	40 mM dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) *	20 µM
MitoQ <sub>10</sub> OMs (méthanesulfonate)	Antioxydant (ubiquinone adressée dans la mitochondrie)	Don du Dr M. Murphy, MRC-Dunn Human Nutrition Unit, University of Cambridge, UK (Smith, Porteous et al. 1999)	196 mM dans de l'éthanol absolu	1 µM
Antimycine A	Inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire	Sigma-Aldrich A8674	1 mM dans de l'éthanol absolu *	1 µM

**Table 2.1 : Molécules utilisées au cours de ce travail.** Une \* indique que ces produits sont conservés sous forme de fractions à - 20°C.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 La culture cellulaire

#### 2.1.1 **Les types cellulaires étudiés**

Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux lignées de cellules cybrides. Celles-ci proviennent de la fusion de cellules 143B rho<sup>0</sup> (cellules d'ostéosarcome humain déplétées totalement en ADN mitochondrial) avec des myoblastes énucléés de patients atteints du syndrome MERRF ou d'individus sains. Nous avons donc à notre disposition des cellules 143B repeuplées en mitochondries portant ou non la mutation A8344G à l'état hétéroplasmique dans leur ADN. Ces cellules seront, par la suite, respectivement nommées cellules cybrides mutées et cellules cybrides sauvages. Ces cellules ont été généreusement offertes par le Prof. G. Attardi (Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, USA).

#### 2.1.2 **Maintien et stimulations des cultures**

Les lignées sont cultivées en boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (Costar) dans 15 ml de milieu DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose (4,5 g/l), Gibco 41966-029) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; Gibco 10270-106). Le milieu des cellules cybrides mutées est supplémenté par du pyruvate (1 mM ; Sigma-Aldrich P-2256). Les cultures sont incubées en étuve humide à 37°C et sous une concentration en CO<sub>2</sub> de 5 %.

Les cellules à confluence sont repiquées en moyenne trois fois par semaine. Ceci se déroule de la façon suivante. Les milieux de culture sont décantés et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline ; 150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH 7,4). Après avoir bien décanté le PBS, les cellules sont détachées du support à l'aide d'un ml de trypsine 0,25% (Gibco, 25050-014) puis resuspendues dans du milieu DHG contenant 10 % de SVF. La suspension cellulaire ainsi obtenue est répartie dans de nouvelles boîtes à des dilutions appropriées et portée à un volume final de 15 ml avec du DHG contenant 10 % de SVF. Le pyruvate est finalement ajouté aux cellules cybrides mutées.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé différentes molécules afin d'induire l'apoptose ou de moduler la réponse apoptotique. Ces molécules sont répertoriées dans la table 2.1. Les cellules traitées par ces dernières sont incubées pendant des temps et des concentrations indiqués dans la partie résultats. Les molécules sont diluées dans du milieu de culture DHG contenant 10 % de SVF et remplaçant le milieu de culture initial.

#### 2.1.3 **Congélation et décongélation des cellules**

Afin de pouvoir disposer de cellules en cas de besoin, les deux lignées cellulaires sont conservées par congélation dans de l'azote liquide. Celle-ci s'opère de la façon suivante : les cellules d'une boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> sont décrochées de leur support à l'aide d'un ml de trypsine, auxquels sont ajoutés 9 ml de DHG contenant 10 % de SVF, puis centrifugées 10 minutes à 1000 g. Les culots cellulaires resuspendus dans 400 µl de SVF sont alors transférés dans un cryotube contenant préalablement 400 µl de DHG et 10 % de DMSO (diméthylsulfoxyde). Ces tubes sont déposés dans un litre d'éthanol absolu et placé à - 70°C avant d'être conservés dans l'azote liquide. Ceci permet d'éviter un choc thermique brutal.

La décongélation, à température ambiante, est suivie d'une centrifugation de 5 minutes à 1000 g. Les culots obtenus sont ensuite resuspendus et déposés dans une boîte de 75 cm<sup>2</sup> avec 15 ml de DHG contenant 10 %.

## 2.2 Mesure de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire

Afin de pouvoir évaluer le niveau intracellulaire en ROS, tant au niveau basal qu'après stimulations par différentes molécules, la sonde fluorescente 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate (H<sub>2</sub>DCF-DA ; Molecular Probes D399, 5mM dans de l'éthanol 100 % conservée sous forme de fractions à - 20°C) a été utilisée. Celle-ci, après désestérification par les estérases cytoplasmiques, s'oxyde en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lui permettant ainsi de fluorescer. Donc, les valeurs de fluorescence émises seront proportionnelles aux niveaux intracellulaires en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le protocole a été adapté de Royall et Ischiropoulos (Arch Biochem Biophys 1993).

### 2.2.1 Incubation en présence de la sonde et lecture

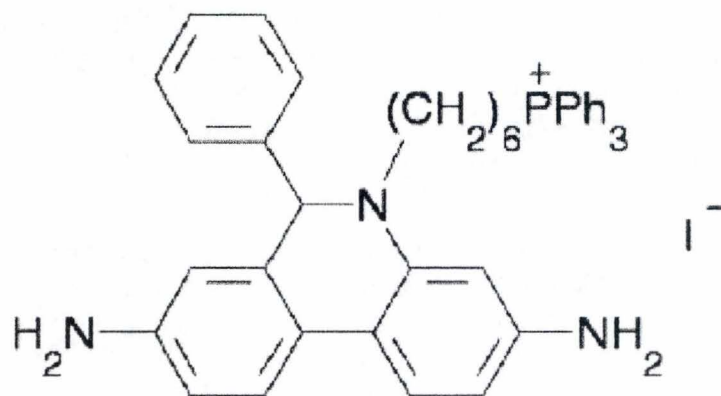
Les cellules confluentes sontensemencées, la veille des stimulations, en plaque 24 puits (Costar) à raison de 84000 et 120000 cellules par puits et ce respectivement pour les cybrides sauvages et mutées. Ceci permet d'obtenir, pour les deux lignées, une densité cellulaire identique (confluence de 90 %) lors des stimulations. Ces dernières sont effectuées dans 0,5 ou un ml de milieu DHG contenant 10 % de SVF. Quant aux temps d'incubations, concentrations et molécules utilisées, se référer à la partie résultats. A la fin des incubations, la sonde est ajoutée, aux milieux incubant les cellules, à une concentration finale de 5 µM. Après l'ajout de la sonde, les cellules sont placées à 37°C, à l'abri de la lumière. A la vingtième minute d'incubation, la fluorescence est lue au spectrofluorimètre (Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent) (excitation : 485 nm et émission : 520 nm). La valeur de fluorescence du tapis cellulaire sans sonde sert de « blanc ». D'autre part, des cellules incubées en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM constituent un contrôle positif.

### 2.2.2 Normalisation des valeurs

Après lecture, les puits sont rincés 2 fois avec du PBS et subissent un lyse alcaline au NaOH 0,5 N (150 µl/puits pendant 30 minutes sous agitation). Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford sur 10 µl de lysat. Les valeurs de fluorescence sont alors normalisées par la quantité de protéines totale présente dans un puits et exprimées en unités arbitraires de fluorescence/mg de protéines. La valeur moyenne des blancs (en unités arbitraires de fluorescence/mg de protéines) est déduite de chaque valeur de test.

## 2.3 Dosage de protéines par la méthode de Bradford

Tous les dosages protéiques réalisés au cours de ce mémoire sont basés sur la méthode de Bradford (Bradford 1976). Cette détermination de la concentration en protéines solubles implique une mesure d'absorbance à 595 nm. La densité optique mesurée résulte d'un shift d'absorbance maximale de la solution acide de bleu de Coomassie de 465 à 595 nm par fixation d'acides aminés basiques et aromatiques. Les mesures, en duplicat, sont effectuées, selon la provenance des échantillons, avec des volumes allant de 2 à 10 µl mis en présence d'un ml de solution Bio-Rad Protein Assay 500-0006 dilué cinq fois dans de l'eau. La lecture est réalisée après une incubation de 5 minutes. La valeur d'un blanc échantillon réalisée avec



**Figure 2.1: Structure chimique du MitoSox Red.** La structure représentée, après oxydation, s'insère dans les bases de l'ADN produisant ainsi une fluorescence rouge. Cette fonction quinone est adressée dans la mitochondrie grâce à sa liaison avec la fonction méthyltriphénylphosphonium (<http://probes.invitrogen.com/media/publications/509.pdf>).

la solution de lyse est alors déduite de la valeur de chaque échantillon. La valeur en résultant est ensuite comparée à celle obtenue avec un étalon de concentration connue (2,5 µl de Bovine Serum Albumine 2 µg/µl diluée dans de l'eau) dont le blanc est réalisé avec 2,5 µl d'eau.

## 2.4 Détection des O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitochondriaux

Afin de pouvoir évaluer le niveau d'anions superoxydes mitochondriaux, la sonde fluorescente MitoSox Red (Molecular Probes M36008, figure 2.1) a été utilisée. Celle-ci, après mise en présence des cellules, est rapidement et sélectivement accumulée dans la mitochondrie où son oxydation par des anions superoxydes provoque sa liaison aux acides nucléiques et lui permet ainsi d'émettre, suite à une excitation maximale à 510 nm, une fluorescence rouge maximale à 580 nm. Son utilisation n'étant possible que sur cellules vivantes, sa détection a été testée, au cours de ce travail, par deux approches différentes ; en spectrofluorimétrie et en microscopie confocale à fluorescence.

### 2.4.1 Par spectrofluorimétrie

#### 2.4.1.1 Réactifs

- Antimycine A (Sigma-Aldrich A8674) : stock 1 mM dans de l'éthanol absolu
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) : 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,493 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,407 mM MgSO<sub>4</sub>, 5,33 mM KCl, 0,441 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 137,93 mM NaCl, 0,338 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,56 mM dextrose; pH 7,6
- DMSO (diméthyl sulfoxyde ; Sigma-Aldrich)
- MitoSox Red (Molecular Probes M36008) : 50 µg

#### 2.4.1.2 Incubation en présence de la sonde et lecture

Les cellules sontensemencées, la veille des mesures, en plaque 24 puits (Costar) à raison de 84000 et 120000 cellules par puits et ce respectivement pour les cybrides sauvages et mutées.

La préparation de la sonde s'effectue comme suit : une fiole de 50 µg est resuspendue dans 13 µl de DMSO afin d'obtenir une concentration de 5 mM. Ces 13 µl de sonde sont ensuite dilués 1000 fois dans l'HBSS (préchauffé à 37°C) permettant ainsi d'obtenir la concentration en sonde adéquate à son utilisation, c'est à dire, 5 µM. La sonde, à raison de 1 ml par puits, sera administrée aux cellules après avoir décanté les milieux de stimulation et rincé avec de l'HBSS (préchauffé à 37°C). Après incubation de dix minutes à 37°C dans l'obscurité, la fluorescence est lue au spectrofluorimètre (Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent) (excitation : 518 nm et émission : 612 nm). La valeur de fluorescence du tapis cellulaire sans sonde sert de « blanc ». D'autre part, des cellules incubées en présence d'antimycine A 1 µM constituent un contrôle positif.

#### 2.4.1.3 Normalisation des valeurs

Après lecture, les puits sont rincés 2 fois au PBS et subissent un lyse alcaline au NaOH 0,5 N (150 µl/puits pendant 30 minutes sous agitation). Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford sur 10 µl de lysat. Les valeurs de fluorescence sont alors



normalisées par la quantité de protéines totale présente dans un puits et exprimées en unités arbitraires de fluorescence/mg de protéines.

## **2.4.2 Par microscopie confocale à fluorescence**

### **2.4.2.1 Réactifs**

- HBSS : 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,493 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,407 mM MgSO<sub>4</sub>, 5,33 mM KCl, 0,441 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 137,93 mM NaCl, 0,338 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,56 mM dextrose; pH 7,6
- DMSO (diméthyl sulfoxyde ; Sigma-Aldrich)
- MitoSox Red (Molecular Probes M36008) : 50 µg

### **2.4.2.2 Incubation en présence de la sonde et visualisation**

La veille du marquage, les cellules sontensemencées à une densité de 10000 cellules par cm<sup>2</sup> en plaques permettant de cultiver les cellules directement sur un support en verre de 0,13 mm d'épaisseur compatible avec l'observation en microscopie confocale (Lab-Tek II, Nunc 155379).

La préparation de la sonde s'effectue comme décrit au point 2.4.1.2. Les cellules, stimulées ou non, sont rincées à l'HBSS puis incubées 10 minutes, dans l'obscurité, en présence d'un ml de sonde à une concentration finale de 5 µM (dans de l'HBSS). Trois rinçages à l'HBSS (préchauffé à 37°C) feront suite à cette incubation. La visualisation en microscopie confocale à fluorescence (excitation : 488 nm et émission : 580 nm) se fera dans le ml d'HBSS du troisième rinçage.

## **2.5 Mise en évidence de la fragmentation de l'ADN génomique**

Un marqueur tardif de l'apoptose est la fragmentation internucléosomale de l'ADN génomique selon des multiples de 180 pb. Un moyen simple de visualiser cette fragmentation consiste en la migration sur gel d'agarose d'extraits d'ADN. Le protocole d'extraction a été adapté de Liu et al (Ann N Y Acad Sci 2004)

### **2.5.1 Réactifs**

- PBS (Phosphate Buffer Saline) : 150 mM NaCl , 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH 7,4
- Tampon de lyse : 1 % NP-40, 20 mM EDTA, 50 mM Tris HCl ; pH 7,5
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10 %
- RNase A (ou ribonucléase A ; Qiagen 19101) : 100 µg/µl dans de l'eau
- Protéinase K (ou endopeptidase K ; Sigma-Aldrich P6556) : 25 µg/µl dans de l'eau
- Acétate de sodium 3 M
- Ethanol 100 % et 70 %
- Tampon TBE : 1 mM EDTA, 0,1 M Tris, acide borique 90 mM ; pH 8,0
- Agarose (Invitrogen 15510-019)
- Gelstar (Cambrex 50535) : concentré 10000 fois dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde)
- Blue/Orange Loading Dye (Promega G1881) : concentré 6 fois
- 100 bp DNA Ladder (Promega G8291)
- 1 kb DNA ladder (Promega G7541)

## 2.5.2 Extraction d'ADN

Les cellules confluentes sont ensemencées en boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Costar) de telle façon à ce que les contrôles soient à une confluence d'environ 90 % lors de l'extraction. Quant aux temps d'incubations, concentrations et molécules utilisées, se référer à la partie résultats.

Les surnageants de culture ainsi que les 3 ml de PBS utilisés pour rincer les cellules sont collectés et centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes afin de récupérer les éventuels corps apoptotiques et les cellules détachées du support. Les culots sont resuspendus dans 50 µl de PBS et ajoutés aux microtubes qui auront servi préalablement à récolter le tapis cellulaire raclé dans 200 µl de PBS. Les microtubes sont centrifugés 5 minutes à 1000 rpm. Les culots cellulaires obtenus sont alors lysés par resuspension dans 100 µl de tampon de lyse et mise sur glace durant 20 secondes. Une centrifugation de 5 minutes à 900 g permet alors de sédimenter les débris cellulaires. Aux 95 µl de surnageant récupérés sont ajoutés la RNase A (concentration finale de 5 µg/µl) et le SDS (concentration finale de 1 %). Suite à une incubation de 2 heures à 56°C, la protéinase K (concentration finale de 2,5 µg/µl) est additionnée. Une nouvelle incubation de 4 heures à 37°C est lancée. A la fin de cette dernière, 2,5 volumes d'éthanol 100 % ainsi que 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M sont ajoutés. Les microtubes sont enfin stockés, au moins 8 heures, à -20°C pour précipiter l'ADN. Celui-ci est récupéré par sédimentation à 9000 g pendant 30 minutes et lavé par 1 ml d'éthanol 70 %. Afin d'éliminer cet éthanol ainsi que les sels qu'il a entraîné, une nouvelle centrifugation est effectuée selon les mêmes paramètres que la précédente. Les surnageants sont décantés et les culots séchés une heure à l'air libre. Les culots secs sont resuspendus dans 30 µl d'eau distillée et gardés deux heures à 65°C pour favoriser la solubilisation de l'ADN. Les échantillons sont enfin placés durant une nuit à 4°C avant le dosage de leur teneur en ADN.

## 2.5.3 Visualisation sur gel d'agarose

Afin de pouvoir charger sur gel d'agarose la même quantité d'ADN génomique dans chaque puits, la quantification d'ADN par échantillon se fait par lecture de l'absorbance à 260 nm (Eppendorf BioPhotometer). Un volume d'échantillon équivalent à 5 à 20 µg d'ADN (selon la quantité présente dans l'échantillon le moins concentré) est prélevé de chaque microtube. Tous les échantillons sont portés au même volume avec de l'eau distillée. Le bleu de charge (Loading Dye) est ajouté finalement à ces solutions d'ADN, à raison d'un sixième du volume total, avant d'être chargé sur gel d'agarose 2 %. Un ou deux puits seront réservés aux étalons de 100 et 1000 pb (12 µl). Le gel, qui consiste en la polymérisation d'agarose dans 100 ml de tampon TBE et 10 µl de gelstar (agent intercalant), est soumis à une différence de potentiel de 100 Volts pendant approximativement une heure. Il est ensuite placé sur un transilluminateur UV qui permettra de visualiser l'agent intercalant situé entre les bases de l'ADN et donc de mettre en évidence l'ADN génomique. Enfin, le profil de migration est photographié.

## 2.6 Dosage de l'activité de la caspase-3

La caspase-3 est la caspase effectrice principale de la réponse apoptotique. Elle joue notamment un rôle primordial dans la fragmentation de l'ADN génomique et ce, dans la plupart des modèles cellulaires. Un dosage de son activité a été adapté de Lozano et al. (J Biol Chem 2001) et de Wellington et al. (J Biol Chem 1998).

Les cellules sont incubées avec les molécules d'intérêts pendant des temps et des concentrations détaillés dans la partie résultats. Elles sont ensuite lysées. Ces lysats sont mis

en présence d'un substrat fluorescent (Ac-DEVD-AFC) clivable par la caspase-3. Si la protéase est active, elle clivera le motif DEVD et le groupement 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine (AFC) libéré, fluorescent, pourra être mesuré en fluorimétrie. La mesure de fluorescence sera donc proportionnelle à l'activité de la caspase-3.

### 2.6.1 Réactifs

- PBS (Phosphate Buffer Saline) : 150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH 7,4
- Tampon de lyse : 10 mM HEPES (N-2-HydroxyEthylPipérazine-N'-2-EthaneSulfonique)/KOH ; pH 7,0, 10 % saccharose, 2 mM EDTA, 0,1 % CHAPS, 5 mM DTT, 10 µg/ml aprotinine (Sigma-Aldrich A6279)
- Tampon de réaction : 40 mM PIPES ; pH 7,2, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 % CHAPS, 10 % sucrose, 10 mM DTT
- Substrat Ac-DEVD-AFC (BD Pharmingen 556574) : concentration stock de 1,37 mM dans du DMSO, conservé sous forme fractionnée à -20°C

### 2.6.2 Extraction protéique

Les cellules confluentes sont ensemencées, la veille des stimulations, en plaque 6 puits (Costar) à une densité de, respectivement, 420000 ou 210000 pour les cybrides sauvages et 600000 ou 300000 pour les cybrides mutées suivant les durées de traitement (6 ou 12 heures). Ceci permet d'obtenir des cellules à 90 % de confluence lors de l'extraction. Quant aux temps d'incubations, concentrations et molécules utilisées, se référer à la partie résultats.

Les surnageants de culture ainsi que le ml de PBS utilisé pour rincer les cellules sont collectés et centrifugés à 1000 rpm pendant 10 minutes afin de récupérer les éventuels corps apoptotiques et les cellules détachées du support. Les culots sont resuspendus dans 100 µl de PBS et ajoutés aux microtubes qui auront servi préalablement à récolter le tapis cellulaire raclé dans 200 µl de PBS. Les microtubes sont centrifugés 10 minutes à 1000 rpm. Les culots cellulaires obtenus sont alors lysés par resuspension dans 50 µl de tampon de lyse et agitation sur roue pendant 30 minutes à 4°C, température à laquelle toutes les centrifugations sont effectuées. Les lysats sont centrifugés 10 minutes à 10000 rpm. Les surnageants sont prélevés et fractionnés à raison de 10 µl pour le dosage protéique par la méthode de Bradford et 40 µl pour le dosage d'activité caspase-3. Les échantillons protéiques sont conservés à -20 °C.

### 2.6.3 Le dosage d'activité

Grâce au dosage protéique par la méthode de Bradford, le concentration en protéines pour chaque échantillon est connue. Une même quantité de protéines est prélevée pour chaque échantillon (5 à 20 µg, selon la quantité présente dans l'échantillon le moins concentré) et est portée à un volume final de 50 µl avec du tampon de lyse. A ces 50 µl, seront ajoutés 50 µl de tampon de réaction et 1 µl de substrat Ac-DEVD-AFC (concentration finale de 13,7 µM). Ce dernier étant ajouté de minute en minute. Les échantillons sont alors incubés 60 minutes à l'abri de la lumière. La fluorescence est lue à la soixantième minute au spectrofluorimètre (Kontron SFM 25) (excitation : 400 nm et émission : 505 nm). Les blancs utilisés sont les suivants :

- blanc échantillon (BE) : 50 µl de tampon de lyse + 50 µl de tampon de réaction + 1 µl de substrat
- blanc substrat (BS) : 50 µl d'échantillon protéique dans du tampon de lyse + 50 µl de tampon de réaction + 1 µl de DMSO

- blanc blanc (Vergani, Floreani et al.) : 50 µl d'échantillon protéique dans de tampon de lyse + 50 µl de tampon de réaction

Le calcul de la valeur de fluorescence vaudra : (test – BE) – (BS – BB). Les valeurs sont ensuite normalisées par la quantité de protéines impliquée dans le dosage et exprimées en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines.

## 2.7 Détection du récepteur Fas

La détection du récepteur Fas se fera par western blot. Le western blot est une technique qui comprend deux étapes. Dans un premier temps, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel. Dans notre cas, il s'agira d'un SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permettant une séparation protéique en fonction du poids moléculaire. Dans un deuxième temps, ces protéines, après transfert sur membrane, sont soumises à un immunomarquage révélé par chimiluminescence et impression d'un film photographique. Dans notre cas, nous nous intéresserons au récepteur Fas (43 kDa).

### 2.7.1 Préparation des échantillons

#### 2.7.1.1 Réactifs

- ASB-14 (Sigma-Aldrich A1346) 10 % dans du Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (Merck 1.08382)-HCl 10 mM ; pH 8
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich T9284) 2 % dans du Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane-HCl 10 mM ; pH 8
- Protease Inhibitor Cocktail (PIC ; Roche Diagnostics 12211300) : une tablette dans 2 ml d'H<sub>2</sub>O
- Phosphatase Inhibitor Buffer (PIB) : 125 mM NaF, 250 mM β-glycerophosphate, 250 mM para-nitrophenyl phosphate, 25 mM NaVO<sub>3</sub> dans de l'H<sub>2</sub>O
- PBS (Phosphate Buffer Saline) : 150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH 7,4

#### 2.7.1.2 Extraction protéique

L'extraction protéique est réalisée à partir de boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Costar) pour les deux lignées de cellules cybrides, elle se base sur l'utilisation de détergents (ASB-14 et triton) qui permettent de solubiliser les protéines membranaires.

L'extraction se déroule comme suit : après avoir décanté les milieux de culture, les cellules sont rincées avec 5 ml de PBS puis raclées dans un ml de PBS. Suite à une centrifugation de 10 minutes à 1000 rpm, les culots sont resuspendus dans 92 µl de solution d'ASB-14, 4 µl de PIC et 4 µl de PIB. Une sonication de 30 minutes à température ambiante est alors effectuée avant l'ajout de 368 µl de solution de triton X-100, 16 µl de PIC et 16 µl de PIB. Pour finir, les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est finalement aliquoté et conservé à – 20°C.

Afin de charger des quantités équivalentes de protéines sur gel, 2 µl d'échantillons dilué 4 fois dans de l'eau sont dosés selon la méthode de Bradford.

## 2.7.2 Préparation des gels, charge et migration des échantillons

### 2.7.2.1 Réactifs

- 30 % acrylamide/0,8 % bisacrylamide (Bio-Rad 161-0158)
- Ammonium persulfate (APS) (Amersham Biosciences 17-1311-01) : 25 %
- TEMED (Amersham Biosciences 17-1312-01)
- Tampon du gel de séparation (pour 200 ml) : 36,3 g de Tris, 0,8 g de SDS ; pH 8,9
- Mix pour le gel de séparation 10 % en acrylamide/bisacrylamide (pour 250 ml) : 60 ml de tampon du gel de séparation, 83 ml d'acrylamide/bisacrylamide (30/0,8), 107 ml H<sub>2</sub>O
- Tampon du gel de concentration (pour 100 ml) : 5,1 g Tris, 0,4 g SDS ; pH 6,8
- Mix pour le gel de concentration (pour 240 ml) : 60 ml tampon du gel de concentration, 40 ml d'acrylamide/bisacrylamide, 140 ml H<sub>2</sub>O
- Tampon d'électrophorèse concentré 10 fois (pour 1 l) : 63,2 g de Tris, 40 g de glycine, 10 g de SDS
- Bleu de charge concentré 5 fois : 10 ml de tampon du gel de concentration, 10 ml de SDS 20 %, 5 ml de β-mercaptoéthanol, 10 ml de glycérol, 17,5 mg de bleu de bromophénol

### 2.7.2.2 Préparation des gels, charge et migration

Après montage des plaques, 10,5 µl de TEMED et 175 µl d'APS 25 % sont ajoutés à 35 ml de mix pour gel de séparation. La solution est ensuite coulée entre les deux plaques du montage. Après une heure de polymérisation, le gel de concentration est déposé. Il est composé de 10 ml de mix pour gel de concentration, 3 µl de TEMED et 50 µl d'APS 25 %. Finalement, le peigne, permettant de former les futurs puits, est placé.

Après une heure de polymérisation, 60 µl d'échantillon, contenant 20 µg de protéines diluées dans du tampon de lyse additionné de bleu de charge et préalablement porté à ébullition 10 minutes, sont chargés dans chaque puits. 12 µl d'étalon marqueur de poids moléculaire (étalon See Blue ; Invitrogen LC5925) sont également déposés dans un puits adjacent. Le gel est ensuite soumis à un ampérage de 35 mA pendant une heure (passage des protéines dans le gel de concentration) puis de 45 mA jusqu'à migration complète.

## 2.7.3 Transfert des protéines sur membrane

### 2.7.3.1 Réactifs

- Tampon de transfert (pour 5 l) : 24 g de Tris, 115 g de glycine, 1 l de méthanol
- Méthanol
- TBS (Tris Buffer Saline) concentré 10 fois (pour 1 l) : 24,22 g de Tris, 80,06 g de NaCl; pH 7,6
- Agent bloquant: ECL blocking reagent (Amersham Biosciences RPN 2135)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich P1379)
- Membrane PVDF (PolyVinylDièneFluoride ; Amersham Biosciences RPN303F)

### **2.7.3.2 Traitement de la membrane et transfert**

Lorsque la migration est terminée et que la membrane de PVDF a été réhydratée une minute dans du méthanol puis 5 minutes dans du tampon de transfert, le gel est démoulé et la membrane déposée dessus. Le tout est placé entre deux papiers Whatman et deux éponges imbibées de tampon de transfert. Le « sandwich » est placé (membrane vers l'électrode positive) dans l'appareil de transfert semi-sec et soumis à un ampérage de 150 mA pendant deux heures. La membrane est ensuite récupérée et incubée deux heures dans du TBS auquel est rajouté 0,1 % de Tween et 2 % d'agent bloquant (tampon de blocage).

### **2.7.4 Immunomarquage du récepteur Fas**

Le blocage de la membrane terminé, le tampon de blocage est remplacé par l'IgM de souris anti-Fas (Upstate 05-201) dilué 5000 fois dans du tampon de blocage. Après incubation d'une nuit à 4°C, la membrane est rincée trois fois 15 minutes au TBS-Tween 2 % puis incubée une heure, à température ambiante, en présence de l'anticorps secondaire de chèvre biotinylé anti-IgM de souris (Amersham Biosciences RON 1176) dilué 100000 fois dans du tampon de blocage. Trois rinçages de 15 minutes au TBS Tween 2 % sont alors effectués avant l'incubation d'une heure, à température ambiante, de la streptavidine conjuguée à la HRP (Horse Raddish Peroxidase ; Biosource International SNN2004) diluée 5000 fois. Trois rinçages de 15 minutes au TBS-Tween 2 % sont enfin réalisés avant révélation (voir point 2.7.5). Avant de procéder à l'immunomarquage du contrôle de charge, l' $\alpha$ -tubuline, la membrane est rincée trois fois 5 minutes au TBS Tween 2 %.

Ce marquage est effectué selon le même protocole que pour le récepteur Fas. Seuls les anticorps, les dilution et temps d'incubation changent. L'anticorps primaire de souris (Sigma-Aldrich T5168) est dilué 60000 fois et incubé 45 minutes et l'anticorps secondaire, anti-IgG de souris couplé à la HRP (Amersham Biosciences RPN4201), est dilué 200000 fois et également incubé 45 minutes en présence de la membrane. Après révélation, la membrane est conservée à -20°C.

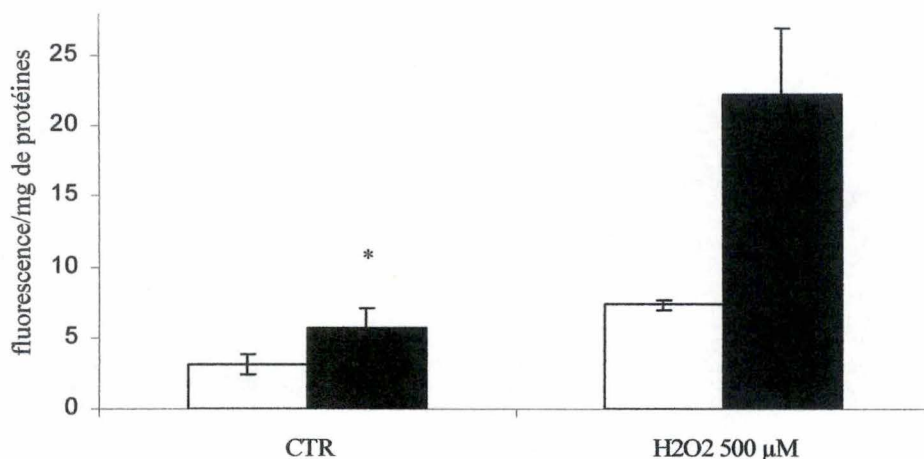
### **2.7.5 Révélation**

La face de la membrane sur laquelle sont adsorbées les protéines est déposée, durant 5 minutes, sur une solution de révélation ECL contenant le substrat de la HRP et du luminol. La révélation de la chimiluminescence est réalisée en chambre noire par dépôt d'un film de révélation (Amersham Biosciences RPN6K) sur la membrane pendant un temps d'exposition variable. Le film est ensuite passé successivement dans une solution de révélation (Ilford 1984565), de l'eau, un fixateur (Ilford 175806) et de l'eau pour le rinçage final.

## **2.8 Analyse statistique**

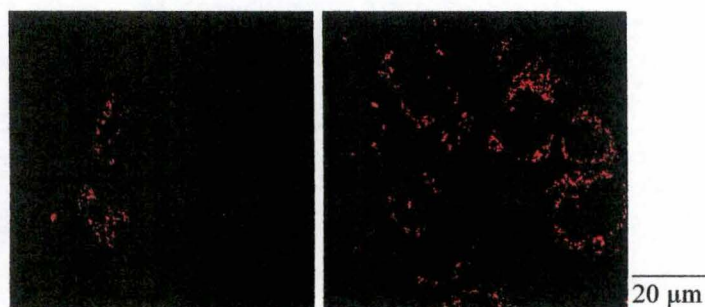
Afin de déterminer la pertinence statistique des divers résultats chiffrés, une analyse statistique adaptée à chaque test a été réalisée à l'aide du programme SigmaStat 3.1 de STATCON. En fonctions des expériences, et comme il sera spécifié dans les légendes, les différents tests statistiques utilisés sont : le test t de Student, l'ANOVA 1 et l'ANOVA 2 suivis de tests de comparaisons paires multiples.

# 3. Résultats et discussions



**Figure 3.1 : Mesure du niveau basal de peroxyde d'hydrogène intracellulaire, par la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA, dans des cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires).** Les cellules, non traitées, sont comparées à des cellules ayant subi une incubation de 6 heures en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM (contrôle positif). Les résultats représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/mg de protéines comme la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3. Signification statistique : \*p < 0,05 par test t de Student, comparativement aux cybrides sauvages.

Cell. cybrides sauvages    Cell. cybrides mutées



**Figure 3.2 : Visualisation en microscopie confocale à fluorescence des anions superoxydes mitochondriaux mis en évidence par la sonde MitoSox Red, dans des cellules cybrides sauvages (à gauche) et mutées (à droite) à l'état basal.** Les cellules vivantes et non stimulées sont incubées 10 minutes en présence de la sonde MitoSox Red. Les lectures sont réalisées sur une même plaque et pour des temps d'illumination comparables.



### 3 Résultats et discussions

#### 3.1 L'apoptose médiée par les ROS

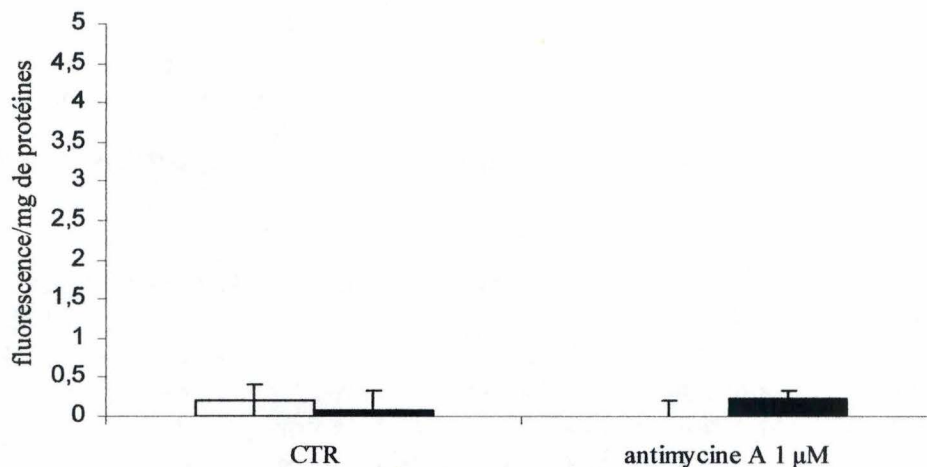
##### 3.1.1 **Le niveau basal en ROS dans les cellules cybrides sauvages et mutées**

Comme développé dans l'introduction, il est largement décrit dans la littérature qu'il existe, dans de nombreux cas de dysfonctionnements mitochondriaux, un déséquilibre entre la production et la détoxification des ROS, en faveur d'une abondance accrue de ROS. Ce facteur pourrait être un acteur important dans la susceptibilité de ces cellules face à l'apoptose. Afin de mesurer l'état d'oxydation des cellules cybrides porteuses de la mutation MERRF, nous avons mis au point une technique de mesure se basant sur l'utilisation la sonde fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate), couramment utilisée par de nombreuses équipes. Cette sonde, fluorescente après oxydation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire, permet la mesure de celui-ci par spectrofluorimétrie. Toutes les mesures ont été réalisées en parallèle sur les cellules cybrides sauvages et les cellules cybrides mutées (figure 3.1). Des contrôles positifs, attestant du bon fonctionnement de la manipulation, ont été réalisés sur les mêmes types cellulaires ayant subi des incubations préalables de 6 heures en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM.

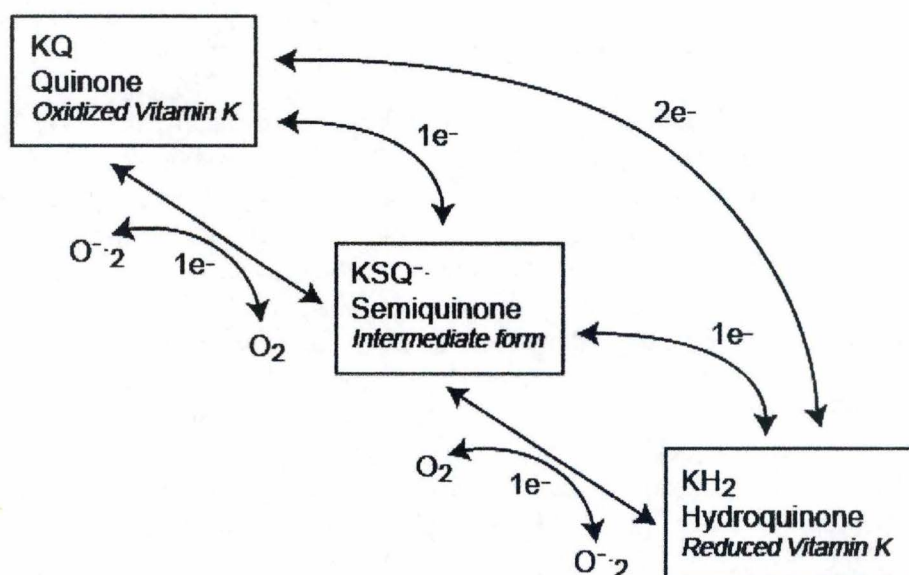
Les résultats montrés à la figure 3.1, représentatifs de cinq expériences indépendantes, indiquent que le niveau intracellulaire en peroxyde d'oxygène est plus important dans les cellules cybrides mutées, de l'ordre de 80 % par rapport à celui mesuré pour les cellules sauvages. Bien que de nombreux modèles cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial s'accompagnent d'une élévation du niveau de ROS intracellulaire, c'est la première fois que cette donnée est établie pour des cellules présentant la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial.

Une élévation du niveau de peroxyde d'hydrogène intracellulaire peut avoir deux origines : une diminution des capacités de la cellule à détoxifier les ROS et/ou une surproduction d'espèces radicalaires. En ce qui concerne le potentiel antioxydant des cellules présentant la mutation MERRF, l'équipe de Wei a montré, dans différents types cellulaires, une baisse du niveau d'activité de plusieurs enzymes antioxydantes : MnSOD, CuZnSOD et catalase (voir point 1.2.2). D'autre part, comme le transport des électrons par la chaîne respiratoire est fortement perturbé dans les cellules présentant la mutation MERRF, principalement au niveau des complexes I et IV, on peut s'attendre à une élévation de la production d'anions superoxydes au niveau de la mitochondrie. Afin de tester cette dernière hypothèse, nous avons eu recours à la sonde MitoSox Red, dérivée du dihydroéthidium. Cette sonde (figure 2.1) contient un groupement triphénylméthylphosphonium, cation lipophile non métabolisable (Cote, Poirier et al. 1988) qui permet l'adressage de la sonde dans la mitochondrie, et un groupement quinone, qui une fois oxydé par des anions superoxydes, engendre une fluorescence rouge lorsqu'il se lie à l'ADN.

La sonde MitoSox Red a d'abord été utilisée pour détecter les O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitochondriaux par microscopie confocale à fluorescence sur des cellules vivantes (figure 3.2). Nous pouvons observer, dans les deux lignées cellulaires, une fluorescence dont la distribution cellulaire correspond à une localisation mitochondriale. Cependant, cette technique ne permet pas de distinguer une différence d'intensité de fluorescence entre les deux lignées cellulaires. Si des variations de concentrations en O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitochondriaux existe, entre les cellules cybrides sauvages et mutées, elles sont probablement trop légères pour être mises en évidence par cette technique de microscopie. Nous avons donc testé cette sonde en spectrofluorimétrie afin de



**Figure 3.3 : Mesure du niveau basal en anions superoxydes mitochondriaux, par la sonde MitoSox Red, dans des cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires).** Les cellules, non traitées, sont comparées à des cellules ayant subi une incubation d'une heure en présence d'antimycine A 1  $\mu$ M (contrôle positif). A la fin de l'incubation, la sonde est mise en présence des cellules pendant 10 minutes puis la fluorescence est lue (excitation : 518 nm et émission : 612 nm). Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/mg de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n = 3.



**Figure 3.4 : Cycle d'oxydoréduction des vitamines K.** La vitamine K sous forme de quinone peut être réduite par un électron ou par deux électrons (consécutivement ou simultanément) en, respectivement, semiquinone ou hydroquinone. Celles-ci s'oxydent par réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde, redonnant ainsi les formes plus oxydées de la vitamine K qui peuvent refaire un nouveau cycle de réduction-oxydation (Lamson and Plaza 2003).

quantifier de légères différences de concentrations en anions superoxydes entre les deux lignées de cellules cybrides.

Comme le montre la figure 3.3, nous n'avons détecté aucun signal exploitable, que ce soit pour les cellules cybrides mutées ou sauvages, dans des conditions basales ou suite à une incubation d'une heure avec de l'antimycine A 1  $\mu$ M. Cette dernière condition aurait dû constituer un contrôle positif en permettant, via inhibition du complexe III de la chaîne respiratoire, d'augmenter la production mitochondriale en  $O_2^{\cdot-}$ . Il est possible que l'absence de signal détecté soit due au fait que le spectrofluorimètre dont nous disposons ne possède pas de filtres correspondant aux pics d'émission (580 nm) et d'excitation (510 nm) du MitoSox Red (les longueurs d'onde d'émission et d'excitation des filtres utilisés étaient de respectivement 612 nm et 518 nm).

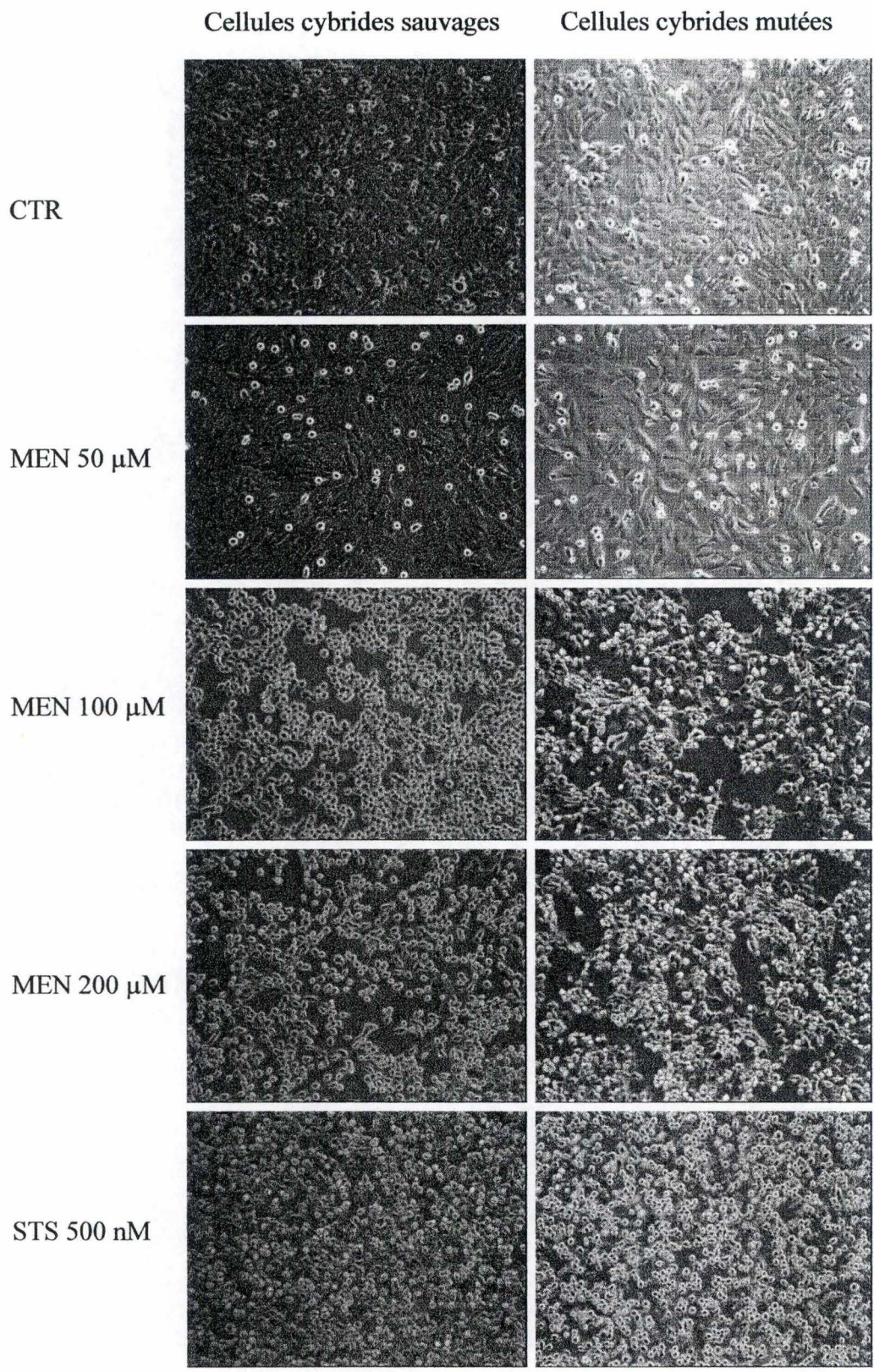
Signalons qu'à l'avenir, la fluorescence de la sonde MitoSox Red pourrait être évaluée au FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Cette technique pourrait être utilisée pour établir si le niveau d' $O_2^{\cdot-}$  est plus élevé dans les cellules cybrides mutées, en utilisant la sonde MitoSox Red pour cibler les  $O_2^{\cdot-}$  mitochondriaux, ou en utilisant une autre sonde fluorescente spécifique des anions superoxydes, le dihydroéthidium, qui n'est pas adressée dans la mitochondrie (Hallmann, Klimek et al. 2004).

Sur base des résultats obtenus avec la sonde  $H_2DCF-DA$ , nous pouvons conclure qu'une augmentation du potentiel oxydant est perceptible dans les cellules cybrides mutées vis-à-vis des cellules cybrides sauvages. Celle-ci résulte d'un déséquilibre entre les moyens de détoxification et de production des ROS. Une diminution d'activité de plusieurs enzymes antioxydantes a été rapportée dans d'autres types cellulaires touchés par la mutation MERRF (Wei, Lu et al. 2001). Des dosages d'activités enzymatiques et des mesures spécifiques des différentes espèces oxydantes permettraient d'identifier les origines de ce potentiel oxydant plus élevé.

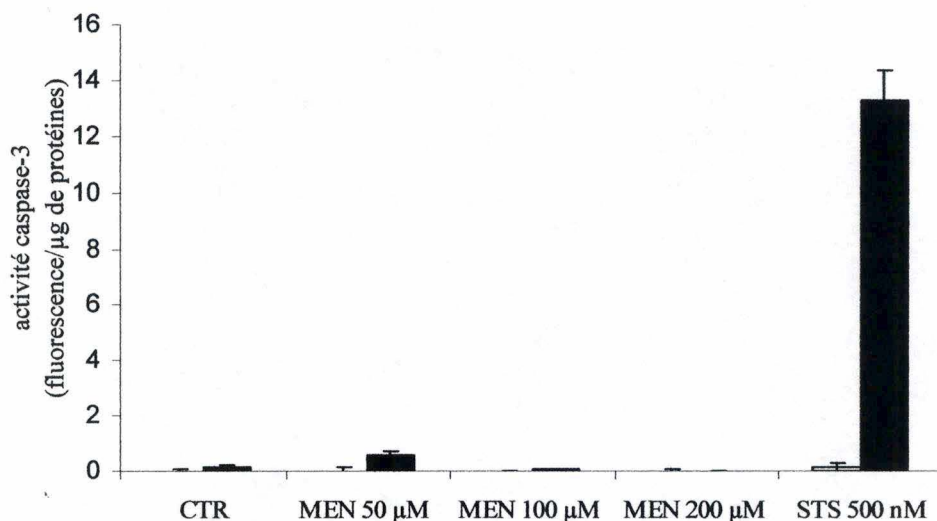
Puisque les cellules cybrides mutées ont un niveau oxydant plus élevé et qu'elles sont plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine (voir point 3.1.3), nous posons l'hypothèse que cette augmentation du niveau oxydant potentialise la réponse apoptotique des cellules cybrides mutées. Si cette hypothèse est exacte, les cellules cybrides mutées devraient également déclencher une plus forte réponse apoptotique lorsqu'elles sont soumises à une molécule pro-apoptotique connue pour générer des ROS intracellulaires, comme la menadione.

### **3.1.2 Etude de la réponse apoptotique, dans les cellules cybrides sauvages et mutées, en réponse à la menadione sodium bisulfite**

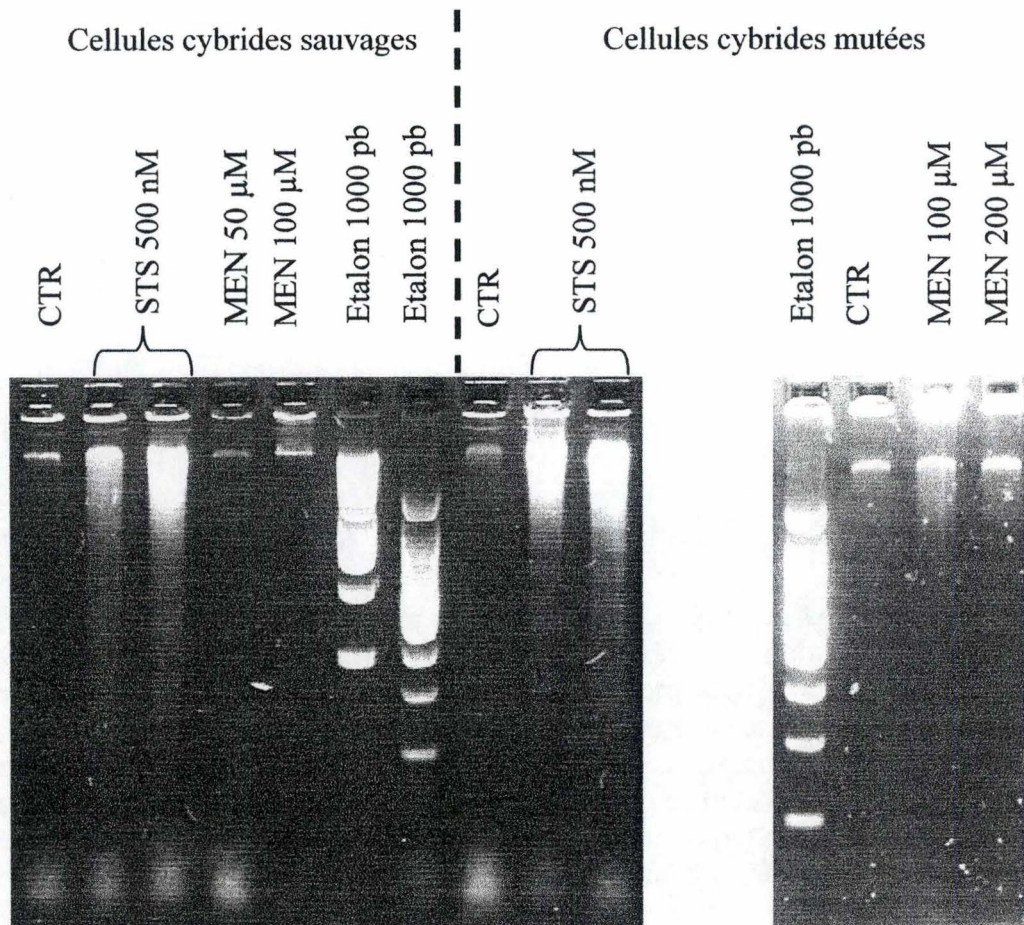
Au cours de ce travail, nous avons utilisé la forme hydrosoluble de la vitamine K3 (ou menadione), la menadione sodium bisulfite. La menadione est bien décrite pour augmenter le potentiel oxydant de la cellule en interagissant, par sa fonction naphthoquinone, au niveau des transporteurs d'électrons de la membrane mitochondriale interne. La réduction (figure 3.4) de la fonction quinone en semi puis en hydroquinone s'opère par capture d'électrons transitant dans la chaîne respiratoire. Ces espèces réduites peuvent alors céder un électron à l'oxygène moléculaire, le réduisant en anion superoxyde. De plus, outre sa participation à la formation de ROS, la menadione, par arylation des groupements thiols, intervient également dans la déplétion des stocks intracellulaires en glutathion (Lamson et Plaza 2003). Ainsi, il a été montré que dans des cellules 143B traitées par 100  $\mu$ M de menadione, la concentration en  $O_2^{\cdot-}$  intracellulaires atteignait un pic après une incubation de six heures (Hallmann, Klimek et al. 2004; Niemczyk, Majczak et al. 2004). Les cellules ont donc, dans un premier temps, été incubées six heures en présence de menadione, dont la gamme de concentrations utilisée oscillera autour de 100  $\mu$ M. La morphologie des cellules est affectée par les traitements,



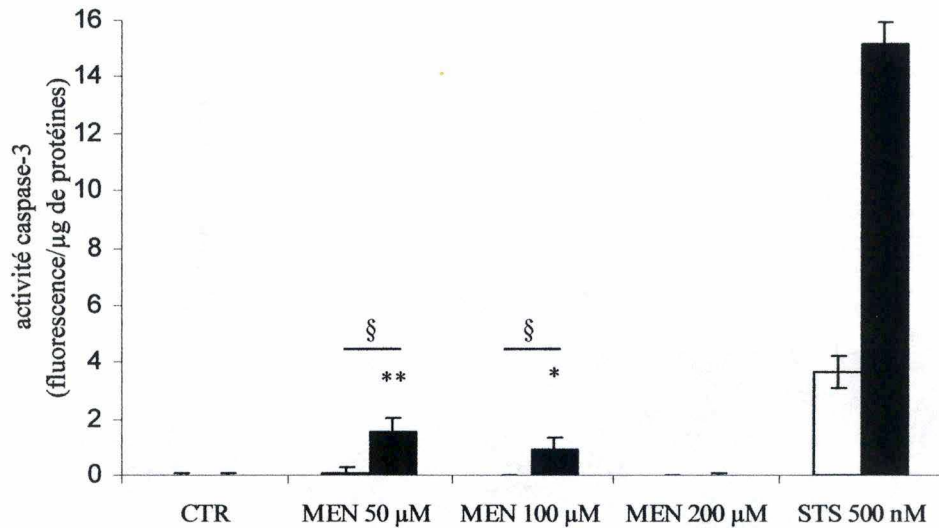
**Figure 3.5 : Micrographies prises en microscopie à contraste de phase illustrant la morphologie de cellules cybrides sauvages (à gauche) et mutées (à droite) incubées en présence de menadione. Les cellules cybrides sauvages et mutées ont été incubées ou non avec de la menadione (MEN) 50, 100 ou 200  $\mu$ M ou de la stauroporine (STS) 500 nM pendant six heures.**



**Figure 3.6 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 6 heures par la menadione. Les deux lignées de cellules cybrides ont été incubées 6 heures en présence de menadione (MEN) 50, 100 ou 200 µM ou de staurosporine (STS) 500 nM (contrôle positif). Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n = 3$ . Signification statistique : aucune entre les cellules contrôles (CTR) et stimulées à la menadione (pour toutes les concentrations), ni entre les deux lignées pour la stimulation à la menadione 50 µM. Les résultats ont été traités par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak.**



**Figure 3.7 : Détection de la fragmentation de l'ADN après migration électrophorétique dans un gel d'agarose de l'ADN génomique extrait de cellules cybrides sauvages (à gauche) et mutées (à droite) mises en présence de menadione durant 6 heures.** Les cellules cybrides sauvages sont incubées ou non pendant 6 heures en présence de menadione 50 μM ou 100 μM. Quant aux cellules cybrides mutées, elles sont incubées ou non, également durant 6 heures, en présence de menadione 100 μM ou 200 μM. Des contrôles positifs sont réalisés dans les deux lignées de cellules cybrides par stimulations de 6 heures à la staurosporine (STS) 500 nM. Au terme des incubations, l'ADN génomique est extrait et soumis à une migration électrophorétique dans un gel d'agarose 2,0 % contenant un agent intercalant (gelstar). Un étalon commercial de 100 et/ou 1000 pb est également chargé permettant d'évaluer la taille des fragments obtenus dans les différentes conditions.



**Figure 3.8 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 12 heures par la menadione.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été incubées 12 heures en présence de menadione (MEN) 50, 100 ou 200 µM ou de staurosporine (STS) 500 nM (contrôle positif). Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n = 3$ . Signification statistique : §, \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$  par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak, comparativement au contrôle interne de la lignée (\*) ou entre lignées dans une même condition (§).

comme l'indique la figure 3.5. La réponse apoptotique des cellules a été évaluée par dosage de l'activité caspase-3 ainsi que par une estimation de la fragmentation de l'ADN.

La caspase-3 est une caspase effectrice de la réponse apoptotique qui est responsable du clivage de nombreux substrats et dont le niveau d'activité est fonction de l'état d'avancement du processus apoptotique. Le dosage de son activité s'effectue en spectrofluorimétrie grâce à l'ajout, dans l'extrait protéique provenant de cellules stimulées ou non, d'un tampon de réaction contenant un substrat synthétique de la caspase-3 active qui, quand il est clivé, devient fluorescent. Les cellules cybrides sauvages et mutées ont été stimulées avec de la menadione à une concentration de 50, 100 ou 200  $\mu\text{M}$  ou de la staurosporine (contrôle positif) à une concentration de 500 nM pendant six heures. Les résultats présentés à la figure 3.6 indiquent que les plus faibles concentrations en ménadione (50 et 100  $\mu\text{M}$ ) provoquent une faible activité caspase 3, et ce uniquement dans les cellules mutées. Cependant, cette activation n'est pas significativement différente du signal détecté dans les cybrides mutées non stimulées. L'activation induite par la staurosporine, constituant un contrôle positif dans cette manipulation, sera détaillée au point 3.1.3.

Parallèlement au dosage de l'activité caspase-3, nous avons voulu évaluer un second marqueur de la réponse apoptotique, à savoir la fragmentation de l'ADN génomique. Les cellules ont été incubées en présence de menadione, dans les mêmes conditions que pour les tests d'activité caspase-3, c'est à dire durant six heures en présence de menadione 50, 100 et 200  $\mu\text{M}$ . Après ces incubations, l'ADN des cellules est extrait et soumis à une migration électrophorétique dans un gel d'agarose en présence d'un agent intercalant permettant, par illumination UV, de révéler le profil de migration. Dans des cellules ayant subi une fragmentation apoptotique, ce profil se présente sous la forme d'une échelle (ou DNA ladder) où les différents fragments sont distants d'environ 180 pb.

La figure 3.7 montre que suite à des stimulations de 6 heures par la menadione, à des concentrations de 50 ou 200  $\mu\text{M}$  et de 100 ou 200  $\mu\text{M}$ , respectivement pour les cellules cybrides sauvages et mutées, aucun profil de fragmentation apoptotique de l'ADN n'est détecté (les échantillons correspondant aux cellules cybrides sauvages incubées en présence de menadione 100  $\mu\text{M}$  et aux cellules cybrides mutées incubées en présence de menadione 50  $\mu\text{M}$  ont été perdus au cours de l'extraction d'ADN).

Vu cette absence de fragmentation de l'ADN et la faible activité caspase-3 dans les cellules cybrides mutées pour des concentrations en menadione de 50 et 100  $\mu\text{M}$ , nous pouvons penser que les durées d'incubations sont trop faibles et/ou que les concentrations ne sont pas adaptées à l'activation du processus de fragmentation de l'ADN. Remarquons cependant qu'un lien direct activation de la caspase-3/fragmentation de l'ADN ne semble pas obligatoire. Il suffit de comparer ces deux événements, dans les cellules cybrides sauvages incubées six heures en présence de staurosporine, pour se rendre compte qu'une fragmentation de l'ADN (figure 3.7) apparaît même en l'absence d'activité de la caspase (figure 3.6). Afin de rechercher des conditions d'incubation en présence de menadione qui induiraient une réponse apoptotique plus forte, nous avons augmenté le temps d'incubation en présence de menadione, et porté celui-ci à douze heures.

La figure 3.8 montre que douze heures de traitement par la menadione, par rapport aux cellules non stimulées, active la caspase-3 dans les cellules cybrides mutées uniquement, de façon significative, pour une concentration de 100  $\mu\text{M}$  et de façon très significative pour une concentration de 50  $\mu\text{M}$ . De plus, ces deux niveaux d'activation, présents dans les cellules cybrides mutées, sont significativement plus élevés que ceux obtenus, dans des conditions identiques, pour les cybrides sauvages.

Ces résultats sont en concordance avec ceux décrits dans la littérature où des concentrations faibles en menadione mènent au processus apoptotique et où des concentrations plus élevées conduisent, par diminution drastique de la production en ATP



résultant de l'oxydation et de l'arylation exacerbée des constituants cellulaires, à la mort par nécrose (pour revue Lamson et Plaza 2003). Cette nécrose étant indépendante des caspases, ceci pourrait expliquer la non détection d'activité caspase-3 pour la concentration de 200  $\mu\text{M}$  utilisée. Clairement, les conditions expérimentales d'utilisation de la ménadione, en terme de timing et de concentration, sont difficiles à définir pour observer un processus apoptotique important.

Bien qu'une activation de la caspase-3 ait été détectée pour des durées d'incubation de douze heures et des concentrations de 50  $\mu\text{M}$  (la plus importante) et 100  $\mu\text{M}$  en menadione dans les cellules cybrides mutées, elle reste minime face à celle obtenue pour la staurosporine. Afin d'atteindre un niveau d'activité de la caspase plus élevé, correspondant à une réponse apoptotique accrue, nous aurions pu augmenter le temps d'incubation. Cependant, Hallmann et ses collaborateurs ont montré, sur des cellules 143B, qu'au delà d'une mise en présence de six heures avec de la menadione 100  $\mu\text{M}$ , une transition apoptose/nécrose s'opérait avant même l'achèvement du processus apoptotique. Donc, mesurer une activité caspase-3 au delà de douze heures ne nous permettrait probablement pas d'augmenter fortement l'activité de cette dernière puisque son activité est quand même vouée à disparaître lors de la nécrose (Hallmann, Klimek et al. 2004).

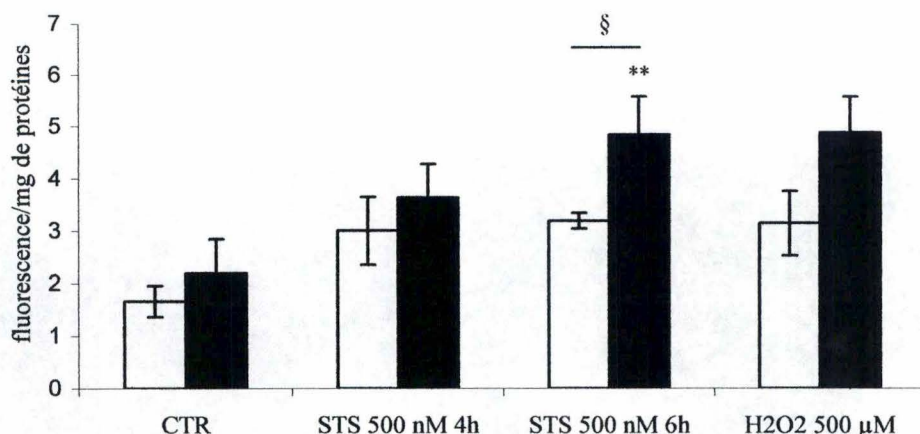
Nous pouvons donc conclure que la menadione, connue pour augmenter la production de ROS intracellulaires, provoque une activation plus importante de la caspase-3 dans les cellules cybrides mutées par rapport aux cellules sauvages, un résultat en faveur de notre hypothèse de départ. Afin d'étayer cette hypothèse, il faudrait montrer que cette hypersensibilité des cellules mutées se marque également au niveau de la fragmentation de l'ADN. Cependant, comme d'une part ce marqueur tardif de l'apoptose risque d'être masqué par le phénomène de nécrose attendu (Hallmann, Klimek et al. 2004), et que d'autre part l'activation de la caspase-3 que nous mesurons reste relativement faible, nous avons choisi, pour la suite de ce travail, d'utiliser un autre inducteur de l'apoptose faisant également intervenir la génération de ROS : la staurosporine.

Signalons enfin que la technique utilisée pour la détection de la fragmentation de l'ADN n'étant pas aisément reproductible (cfr perte d'échantillon lors de l'extraction), ni quantifiable, nous avons planifié d'utiliser, dans la suite de ce travail, un kit ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) permettant le dosage de la fragmentation de l'ADN. Cependant, pour cause de contaminations bactériennes par des mycoplasmes, ces expérimentations n'ont pu être réalisées.

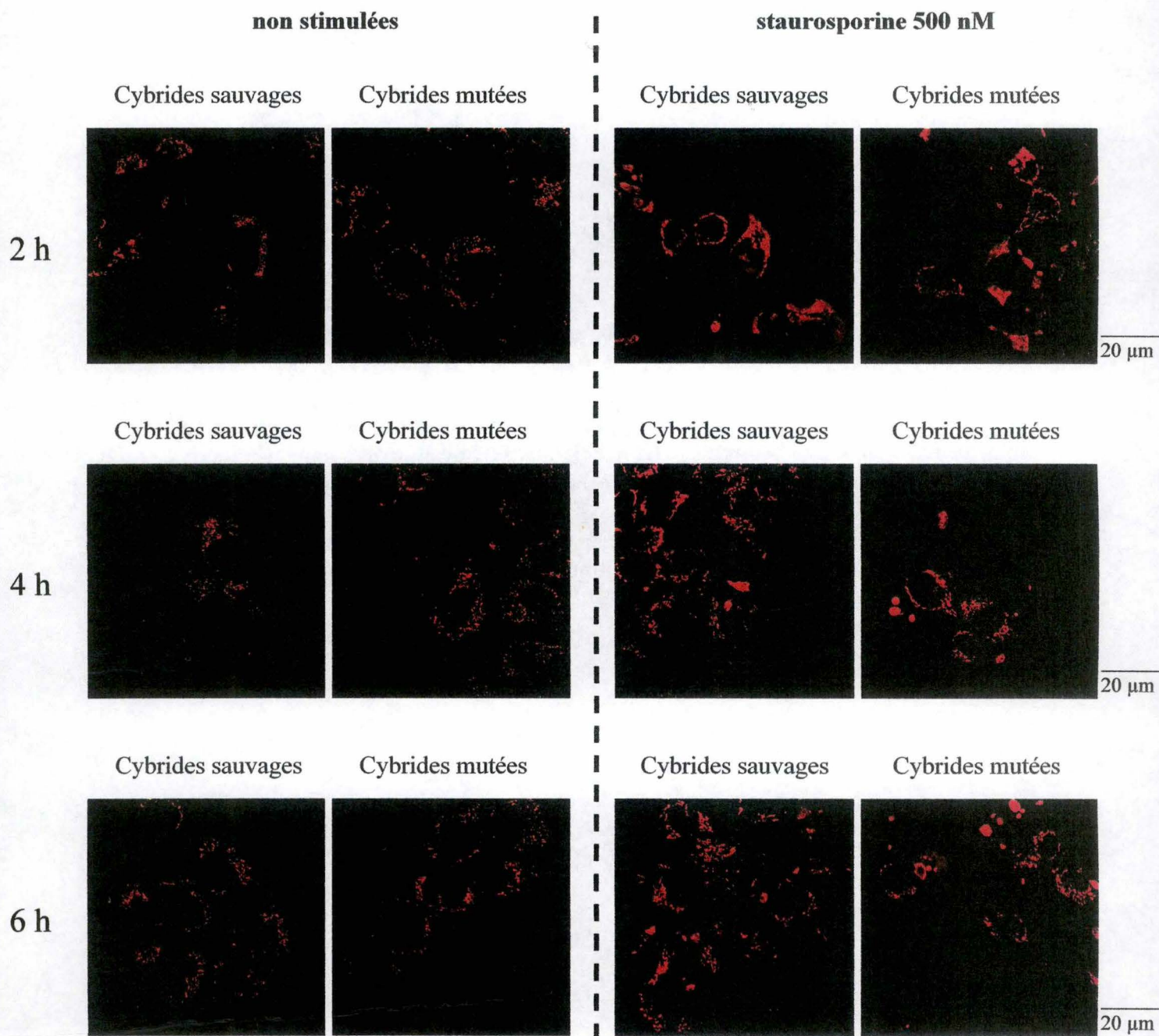
### **3.1.3 Etude de la réponse apoptotique, dans les cellules cybrides sauvages et mutées, en réponse à la staurosporine**

La réponse apoptotique accrue, face à des stimulations à la staurosporine, des cellules cybrides mutées par rapport aux cellules cybrides sauvages, a été démontrée au laboratoire (Rommelaere 2006) tant au niveau de l'activation de la caspase-3 qu'au niveau de la fragmentation de l'ADN. Ceci est par ailleurs confirmé par les figures 3.6, 3.7 et 3.8 dans lesquelles nous avons utilisé la staurosporine comme contrôle positif. L'activité caspase-3 mesurée est effectivement beaucoup plus importante dans les cellules cybrides mutées que dans les cybrides sauvages, tant après six heures qu'après douze heures d'incubation en présence de staurosporine 500 nM.

Les mécanismes décrits par lesquels la staurosporine induit l'apoptose sont au nombre de trois (voir point 1.4.5). Tout d'abord, la staurosporine, par inhibition des PKC, ne permet plus la phosphorylation de Bad qui lui permettait d'être séquestré, dans le cytosol, par la protéine adaptatrice 14-3-3. Ensuite, elle provoque l'augmentation de la concentration cytosolique et mitochondriale en calcium libre ainsi que celle en ROS.



**Figure 3.9 : Mesure du niveau de peroxyde d'hydrogène intracellulaire, par la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA, dans des cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation en présence de 500 nM de staurosporine. Les deux lignées de cellules cybrides ont été incubées 4 ou 6 heures en présence de staurosporine (STS) 500 nM ou non (CTR), et 6 heures en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM pour le contrôle positif. Les résultats représentent les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/mg de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n = 3. Signification statistique : §p < 0,05 et \*\*p < 0,01 par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak, comparativement au contrôle interne de la lignée (\*) ou entre lignées dans une même condition (§).**



**Figure 3.10 :** Visualisation en microscopie confocale à fluorescence des anions superoxydes mitochondriaux mis en évidence par la sonde MitoSox Red, dans des cellules cybrides sauvages et mutées suite à une stimulation par 500 nM de staurosporine. Les cellules cybrides sauvages et mutées stimulées, 2, 4 ou 6 heures à la staurosporine 500 nM et leur contrôle non stimulés correspondant sont observés après mise en présence, de dix minutes, de la sonde MitoSox Red avec les cellules, au terme du traitement.

Notre hypothèse de travail est la suivante : comme les cellules cybrides présentent un niveau de ROS plus élevé que les cellules cybrides sauvages et que la staurosporine provoque une augmentation de ROS, le niveau augmenté de ROS des cellules cybrides mutées pourrait être en partie responsable de l'hypersensibilité de ces cellules face à la staurosporine.

### **3.1.3.1 Formation de ROS dans les cellules cybrides sauvages et mutées suite à des incubations en présence de 500 nM de staurosporine.**

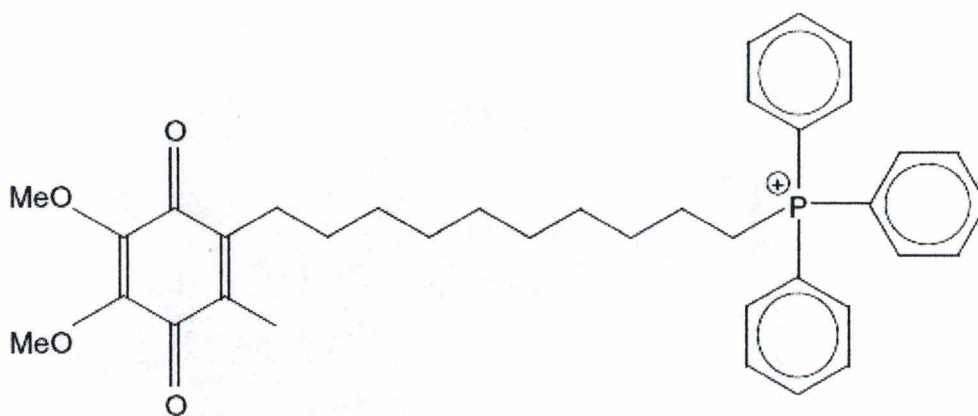
Pour pouvoir étudier l'influence des ROS provoqués par des stimulations à la staurosporine, il est avant tout nécessaire de vérifier si cette dernière participait bien, dans le modèle cellulaire étudié, à une élévation du potentiel oxydant dans les cellules.

Pour ce faire, nous avons, en premier lieu, mesuré le niveau en peroxyde d'hydrogène intracellulaire par la même technique que celle décrite au point 3.1.1 à l'aide de la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA, suite à quatre ou six heures d'incubation en présence de staurosporine 500 nM (figure 3.9). Nous remarquons, tout d'abord, un profil comparable à celui illustré à la figure 3.1 pour le niveau basal en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire dans les deux lignées de cellules cybrides, ce qui confirme le niveau oxydant plus élevé des cellules cybrides mutées. Après quatre heures d'incubation en présence de staurosporine 500 nM, la concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène s'élève de façon similaire dans les deux lignées (augmentation d'environ 80 et 65 % respectivement pour les cellules cybrides sauvages et mutées par rapport aux cellules non stimulées), mais pas de façon significative. Après une incubation de six heures, le niveau en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire n'évolue pas dans les cellules cybrides sauvages par rapport à la stimulation de 4 heures (augmentation d'environ 90 % par rapport aux cellules non stimulées) mais, en revanche, celui des cellules cybrides mutées se trouve augmenté (augmentation d'environ 120 % par rapport aux cellules non stimulées), et ce de façon très significative, par rapport au niveau basal de cellules de cette même lignée. La staurosporine provoque donc un stress oxydatif beaucoup plus intense dans les cellules cybrides mutées que dans les cybrides sauvages, ce qui pourrait contribuer à l'hypersensibilité des cellules cybrides mutées face à l'apoptose.

Afin de confirmer ce résultat et d'essayer d'apporter des précisions sur l'origine de cette forte augmentation en peroxyde d'hydrogène intracellulaire dans les cellules cybrides mutées, nous avons étudié le niveau d'anions superoxydes dans la mitochondrie suite à une incubation en présence de staurosporine, grâce à la sonde MitoSox Red précédemment décrite au point 3.1.1.

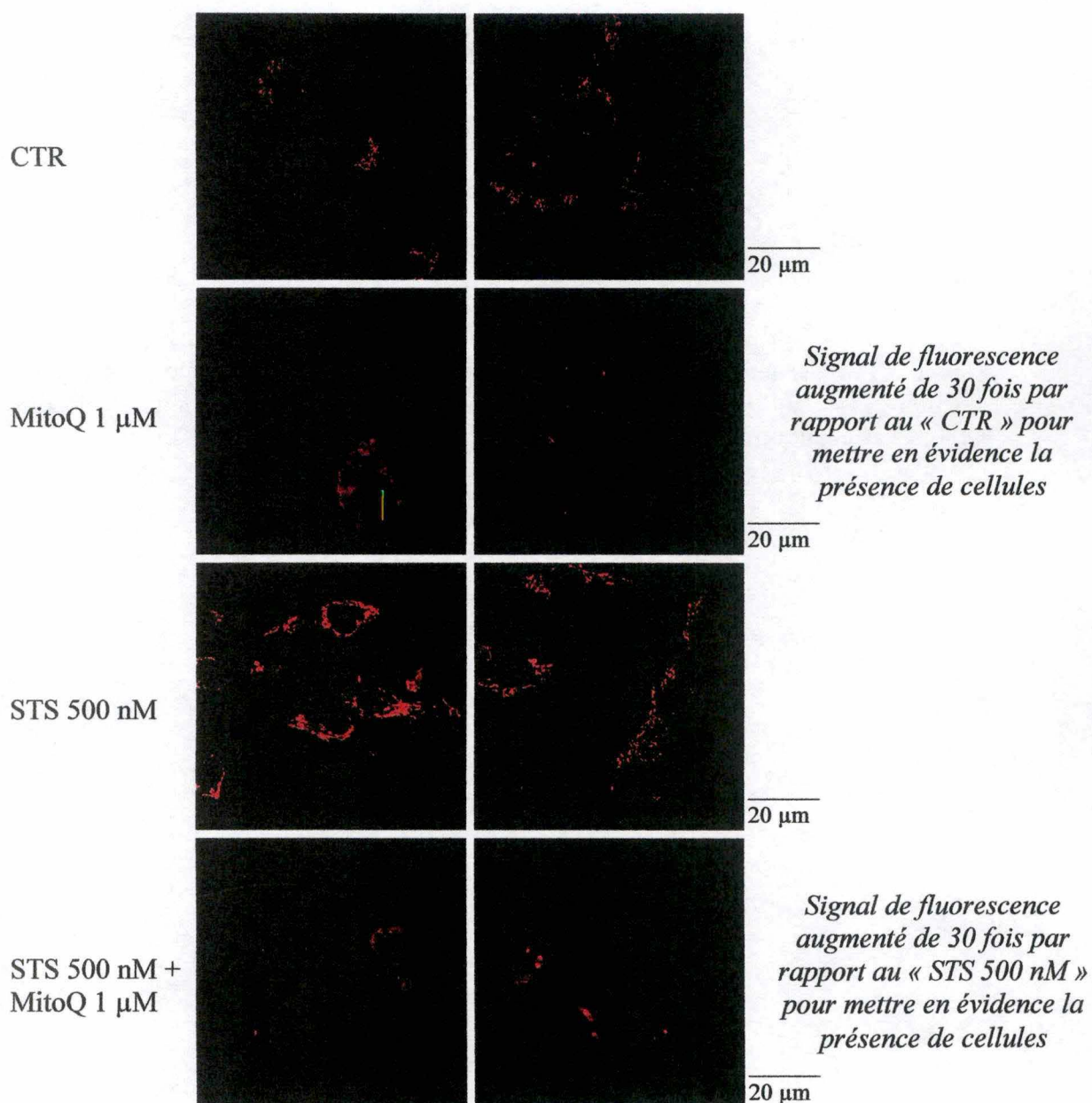
Les résultats exposés à la figure 3.10 montrent que la staurosporine provoque une augmentation de la production en anions superoxydes au niveau de la mitochondrie pour des temps de stimulations de 2, 4 et 6 heures, par rapport aux cellules non stimulées. La visualisation en microscopie confocale à fluorescence ne nous permet toutefois pas de détecter de différence de fluorescence entre les deux lignées cellulaires, tant au niveau basal qu'au niveau des cellules stimulées. Une analyse au FACS, devrait permettre de quantifier cette fluorescence et, ainsi, de mettre en évidence ou non une production accrue en ROS par les cellules cybrides mutées suite à des incubations à la staurosporine.

En conclusion des résultats obtenus grâce à l'utilisation des sondes H<sub>2</sub>DCF-DA et MitoSox Red, nous pouvons dire que la staurosporine induit une augmentation de la production en anions superoxydes au niveau de la mitochondrie, décrite dans la littérature (Krohn, Preis et al. 1998; Wei, Lu et al. 2001), ainsi qu'à une élévation de la concentration en peroxyde d'hydrogène intracellulaire. Cette augmentation en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire plus marquée dans les cellules cybrides mutées, pourrait provenir d'une diminution globale de l'activité catalase, décrite dans des cellules de patients atteints de la pathologie MERRF, et/ou d'un renforcement, par la staurosporine, de la production en O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la chaîne respiratoire qui



**Figure 3.11 : Structure chimique du MitoQ<sub>10</sub> Oms.** Le MitoQ<sub>10</sub> Oms est composé d'une fonction ubiquinol attachée au cation lipophile triphénylphosphonium via une chaîne carbonée aliphatique de dix carbones (Asin-Cayuela, Manas et al. 2004).

Cell. cybrides sauvages Cell. cybrides mutées



**Figure 3.12 :** Visualisation en microscopie confocale à fluorescence des anions superoxydes mitochondriaux mis en évidence par la sonde MitoSox Red, dans des cellules cybrides sauvages (à gauche) et mutées (à droite) suite à une préincubation en présence de MitoQ 1  $\mu$ M suivie d'une stimulation par 500 nM de staurosporine. Les cellules cybrides sauvages et mutées sont préincubées une heure ou non en présence de MitoQ 1  $\mu$ M puis stimulées ou non deux heures par la staurosporine 500 nM, ajoutée dans le milieu de préincubation. La fluorescence du MitoSox Red est observée sur les cellules vivantes, comme décrit dans la partie matériel et méthodes.

présente des dysfonctionnements. Signalons que Gil et collaborateurs suggèrent également une participation cytosolique dans la production en anions superoxydes induite par la staurosporine par l'intermédiaire de la xanthine oxydase et de la phospholipase A2 (Gil, Almeida et al. 2003).

Remarquons qu'il est également possible qu'une partie des anions superoxydes générés par la mitochondrie soit non seulement une cause mais aussi une conséquence de la réponse apoptotique engendrée par la staurosporine. En effet, la libération du cytochrome c est connue pour entraîner une augmentation de production en  $O_2^-$  mitochondriaux par disruption du flux électronique au niveau de la chaîne respiratoire (figure 1.10). Ceci pourrait être étayé par des mesures de libération du cytochrome c.

En résumé :

- Le niveau basal en ROS (peroxyde d'hydrogène intracellulaire) est plus élevé dans les cellules cybrides mutées comparativement aux cellules cybrides sauvages.
- La staurosporine engendre une augmentation du niveau oxydant intracellulaire dans les deux lignées cellulaires ( $H_2O_2$  intracellulaire et  $O_2^-$  mitochondriaux). Pour le peroxyde d'hydrogène intracellulaire, cette augmentation est nettement plus forte dans les cellules cybrides mutées par rapport aux cybrides sauvages.
- La staurosporine provoque une réponse apoptotique accrue dans les cellules cybrides mutées.

Nous pouvons donc penser que le potentiel oxydant plus élevé dans les cellules cybrides mutées participe à la susceptibilité accrue de ces cellules face à l'apoptose induite par la staurosporine. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons examiné l'effet d'un antioxydant (le MitoQ<sub>10</sub> Oms) sur la réponse apoptotique induite par la staurosporine dans les deux lignées de cellules cybrides. Avant toutes choses, nous avons d'abord vérifié si le MitoQ<sub>10</sub> Oms jouait bien un rôle d'antioxydant en diminuant le potentiel oxydatif des cellules.

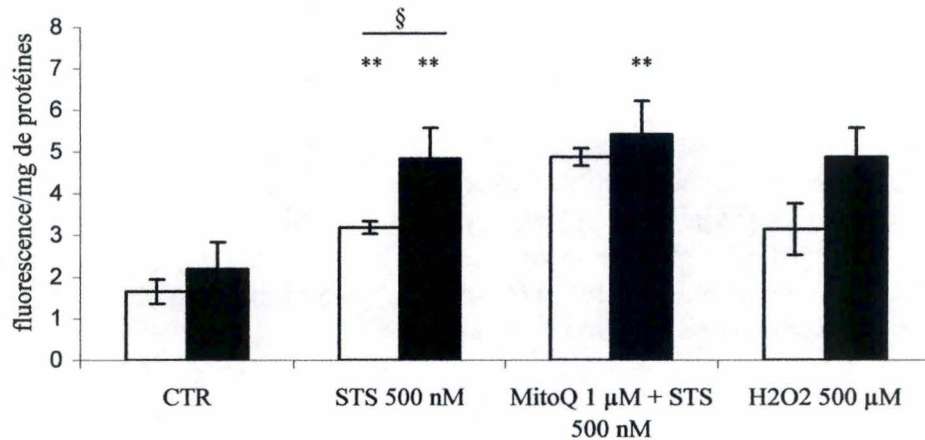
### **3.1.3.2 Implication du MitoQ sur le potentiel oxydant des cellules cybrides sauvages et mutées stimulées ou non à la staurosporine**

Etant donné l'implication probable de la chaîne respiratoire dans la surproduction d'anions superoxydes induite par la staurosporine, notre choix d'antioxydant s'est porté sur le MitoQ<sub>10</sub> Oms (MitoQ ; figure 3.11). Cette molécule, récemment synthétisée par l'équipe du Pr. Murphy (MRC-Dunn Human Nutrition Unit, University of Cambridge, UK), est composée d'une fonction ubiquinol attachée au cation lipophile triphénylphosphonium via une chaîne carbonée aliphatique de dix carbones. L'alkyltriphénylphosphonium permet de combiner les caractéristiques du cation lipophile et de la chaîne hydrocarbonée, à savoir :

- la pénétration de la double membrane mitochondriale et l'accumulation, dans la matrice mitochondriale, de la structure chimique de façon dépendante du potentiel de membrane grâce au cation triphénylphosphonium
- une rétention de la molécule au niveau de la membrane mitochondriale interne grâce à la chaîne hydrocarbonée.

La fonction ubiquinol quant à elle permet la capture des électrons provenant des anions superoxydes (Asin-Cayueta, Manas et al. 2004). Cet antioxydant est donc spécifique des  $O_2^-$  générés au niveau de la membrane mitochondriale interne. Dans un premier temps, l'effet antioxydant de cette molécule a été vérifié sur notre modèle cellulaire en évaluant le niveau d'anions superoxydes mitochondriaux et de peroxyde d'hydrogène intracellulaire.

Comme l'indiquent les résultats obtenus en microscopie confocale à fluorescence repris à la figure 3.12, une incubation de trois heures en présence de MitoQ 1  $\mu$ M dans les deux lignées de cellules cybrides non stimulées provoque une chute spectaculaire de la fluorescence émise par la sonde MitoSox Red, dans les deux lignées. Le MitoQ à une



**Figure 3.13 : Mesure du niveau de peroxyde d'hydrogène intracellulaire, par la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA, dans des cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation par de la staurosporine 500 nM en présence ou non de MitoQ 1 µM.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été incubées 6 heures en présence de staurosporine (STS) 500 nM ou non (CTR), et 6 heures en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM pour le contrôle positif. Une condition consiste également en une préincubation d'une heure en présence de MitoQ, à une concentration de 1 µM, avant ajout dans le milieu de staurosporine à une concentration finale de 500 nM. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/mg de protéines comme la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3. Signification statistique : §,\*p < 0,05 et \*\*p < 0,01 par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak, comparativement au contrôle interne de la lignée (\*) ou entre lignées dans une même condition (§).



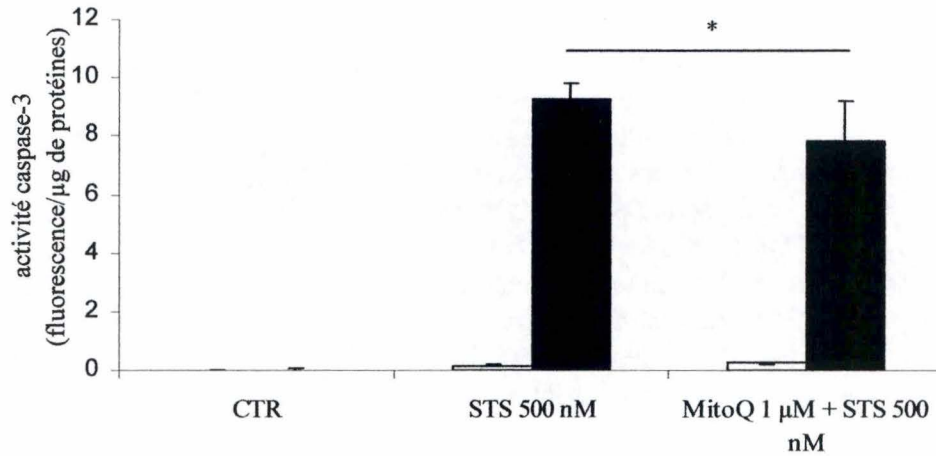
concentration de 1  $\mu\text{M}$  joue donc son effet d'antioxydant annoncé. D'autre part, ces résultats nous montrent que la génération accrue en anions superoxydes mitochondriaux, induite par la staurosporine 500 nM durant deux heures, est complètement inhibée dans les deux lignées, suite à une préincubation d'une heure en présence de MitoQ 1  $\mu\text{M}$ .

Afin d'étudier cet effet antioxydant du MitoQ sur le niveau en  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire, nous avons mesuré la fluorescence de la sonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  sur les deux lignées cellulaires préincubées une heure en présence de MitoQ 1  $\mu\text{M}$  et stimulées durant six heures en présence de staurosporine 500 nM (temps auquel le niveau en peroxyde d'hydrogène est très significativement plus élevé dans les cellules cybrides mutées suite à l'effet de la staurosporine ; figure 3.9). Les manipulations réalisées ayant été effectuées en même temps que celles ayant permis d'obtenir les résultats illustrés à la figure 3.9, les conditions contrôles et stimulées à la staurosporine 500 nM sont reprises.

La figure 3.13 montre des résultats surprenants puisque les niveaux de fluorescence mesurés, pour les cellules cybrides, tant sauvages que mutées, prétraitées au MitoQ 1  $\mu\text{M}$  puis stimulées à la staurosporine, sont très significativement plus élevés que ceux des cellules correspondantes incubées en présence de staurosporine seule. S'il est compréhensible qu'une production accrue d'anions superoxydes par la chaîne respiratoire induite par la staurosporine provoque l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène intracellulaire, il est difficilement explicable qu'une inhibition totale de cette production par le MitoQ provoque une élévation du niveau en peroxyde d'hydrogène.

Dans le but de vérifier la validité de ces résultats et l'éventuelle fluorescence intrinsèque du MitoQ, susceptible de biaiser l'évaluation de la mesure en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nous avons renouvelé la manipulation avec des contrôles internes supplémentaires. Cette deuxième expérience (résultats non montrés) n'a pas révélé de variations du signal de fluorescence entre des cellules incubées ou non sept heures en présence de MitoQ 1  $\mu\text{M}$ . De plus, afin de vérifier que le Mito Q seul n'interfère pas avec la fluorescence attribuée à la sonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , nous avons incubé des cellules avec le Mito Q et la sonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  durant 20 minutes, temps normal d'incubation de la sonde. La fluorescence de ces puits montre une augmentation de 40 et 60 % respectivement pour les cellules cybrides sauvages et mutées, par rapport à un tapis cellulaire sans MitoQ. Ceci nous laisse penser que le Mito Q possède, dans le milieu de culture, une fluorescence intrinsèque détectable à la même longueur d'onde d'émission que celle permettant la détection de la sonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  oxydée. L'apparente augmentation de fluorescence avec le MitoQ montrée à la figure 3.13 serait donc provoquée par une interférence de fluorescence de la molécule antioxydante. Il est évident que de nouvelles manipulations sont à réaliser pour confirmer cette hypothèse, par exemple en utilisant d'autres moyens de détection des ROS intracellulaires tels que la mesure en fluorescence de l'oxydation de la sonde dihydroéthidium permettant d'évaluer la concentration en anions superoxydes cytosoliques.

En conclusion, bien que les résultats obtenus grâce à la sonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  suite à des traitements faisant intervenir le MitoQ ne soient pas exploitables, la visualisation en microscopie confocale à fluorescence permet d'affirmer que la production exacerbée d'anions superoxydes induite par la staurosporine, au niveau de la mitochondrie, est inhibée par une préincubation d'une heure en présence de MitoQ 1  $\mu\text{M}$  (figure 3.12). On peut donc supposer que, de manière générale, l'élévation du potentiel oxydant des cellules provoqué par la staurosporine est également diminué suite à des prétraitements en présence de MitoQ, puisque les ROS formés par la mitochondrie contribuent fortement au niveau de ROS cytosoliques (Brookes, Yoon et al. 2004). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres sources cytosoliques de ROS (phospholipase A2, xanthine oxydase) puissent être activées par la staurosporine, participant à l'augmentation du potentiel oxydant cellulaire sans être inhibés par le MitoQ.



**Figure 3.14 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 6 heures par la staurosporine 500 nM en présence ou non de MitoQ 1 µM.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été préincubées une heure ou non en présence de MitoQ 1 µM puis stimulées durant 6 heures par la staurosporine (STS) 500 nM ajoutée au milieu baignant les cellules. Un contrôle (CTR) non stimulé, ni préincubé, est également réalisé. Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines comme la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3. Signification statistique : \*p < 0,05 par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak, comparativement à la condition staurosporine seule.

Ayant un moyen d'annihiler l'augmentation en ROS mitochondriaux induite par la staurosporine, molécule déclenchant une réponse apoptotique accrue dans les cellules cybrides mutées, nous pouvons nous pencher sur l'implication de ces ROS dans la réponse apoptotique induite par la staurosporine. Cette réponse apoptotique sera étudiée par des dosages d'activité de la caspase-3 et des mises en évidence de la fragmentation de l'ADN génomique.

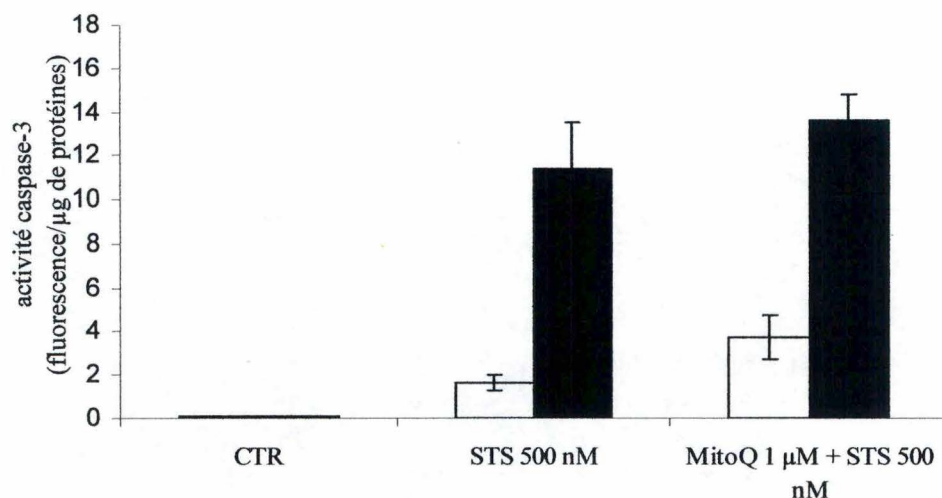
### **3.1.3.3 Implication des ROS dans la réponse apoptotique médiée par la staurosporine 500 nM dans les cellules cybrides sauvages et mutées**

La figure 3.14 montre qu'une préincubation d'une heure en présence de MitoQ 1  $\mu$ M ne modifie pas l'activité de la caspase-3 induite par un traitement de six heures en présence de staurosporine dans les cellules cybrides sauvages. Concernant les cellules cybrides mutées, pour de même conditions de préincubation et de stimulation, le MitoQ diminue faiblement mais significativement le niveau d'activité de la caspase-3 (diminution de 16 % par rapport aux cellules traitées par la staurosporine seule).

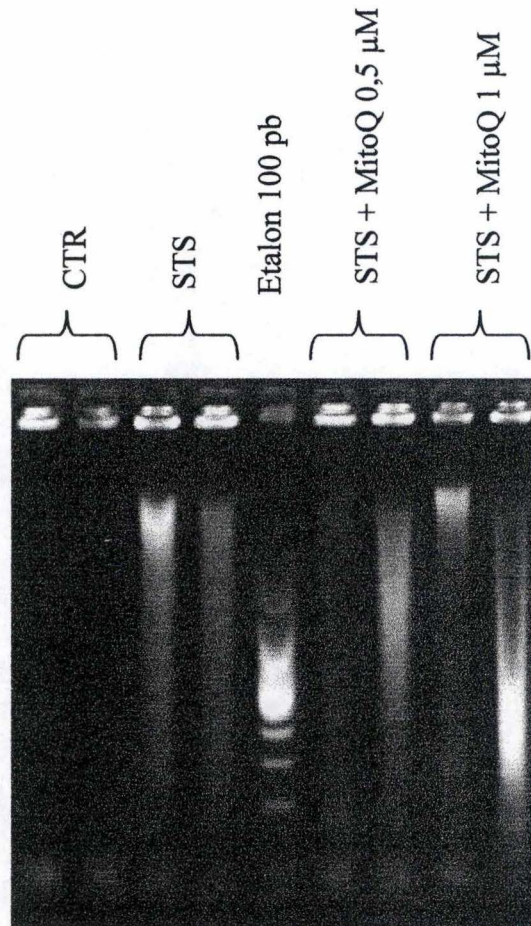
Ces résultats concordent avec des diminutions de l'activité de cette protéase provoquées par le traitement avec divers antioxydants (ciblant les ROS cytosoliques et/ou mitochondriaux), suite à des stimulations par la staurosporine, décrites dans la littérature pour des cultures de neurones rétiniens et hippocampaux (Krohn, Preis et al. 1998; Gil, Almeida et al. 2003). Il serait intéressant de déterminer si des antioxydants ciblant les ROS cytosoliques sont également capables de modifier l'activation de la caspase 3 induite par la staurosporine dans les cellules cybrides. Ceci permettrait de dégager le niveau d'implication de ces ROS cytosoliques, vis-à-vis des ROS mitochondriaux, dans l'activation de la caspase-3.

Selon les équipes de Gil et de Liu, l'activation de la caspase-3 (et des autres caspases) par la staurosporine serait provoquée par une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, favorisée par les ROS, permettant la libération du cytochrome c et ainsi la formation de l'apoptosome (Gil, Almeida et al. 2003; Liu, Lee et al. 2004). En effet, les ROS sont connus pour oxyder les cardiolipines de la membrane mitochondriale interne permettant de maintenir, par association directe, le cytochrome c dans l'espace intermembranaire. Cette oxydation, à partir d'un certain seuil, entraîne la dissociation du cytochrome c de ces phospholipides, conduisant à sa libération cytosolique, via VDAC, et ainsi à l'apoptose (Petrosillo, Ruggiero et al. 2003). Les cardiolipines étant des acides gras polyinsaturés facilement oxydables par les anions superoxydes générés par la chaîne respiratoire, il serait probable qu'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, augmente la susceptibilité de dissociation du cytochrome c des ces lipides (Seleznev, Zhao et al. 2006). De plus, il a été suggéré que la peroxydation des cardiolipines pourrait également favoriser l'insertion de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bax (Kuwana, Mackey et al. 2002; Manon 2004).

Si ce modèle de perméabilisation s'applique aux cellules cybrides étudiées, cela signifie que les cellules cybrides MERRF, présentant un niveau oxydatif plus élevé que les cybrides sauvages (figure 3.1), sont susceptibles de perméabiliser davantage la membrane mitochondriale externe suite à la production d'anions superoxydes mitochondriaux induite par la staurosporine (figure 3.10). De plus, rappelons qu'il existe une boucle d'amplification de la production de ROS suite à la libération du cytochrome c, comme décrit au point 3.1.3.1 ; dans une première phase, lors de l'établissement de la réponse apoptotique, la staurosporine augmenterait la production d'anions superoxydes mitochondriaux et, deuxièmement, suite à la libération du cytochrome c, une nouvelle surproduction d'anions superoxydes serait générée par la mitochondrie (Tan, Sagara et al. 1998). Ceci expliquerait que l'augmentation du niveau d' $H_2O_2$  intracellulaire induite par la staurosporine soit détectée uniquement dans les cellules



**Figure 3.15 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 16 heures par la staurosporine 500 nM en présence ou non de MitoQ 1 μM.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été préincubées 8 heures ou non en présence de MitoQ 1 μM puis stimulées durant 16 heures par la staurosporine (STS) 500 nM ajoutée au milieu baignant les cellules. Un contrôle (CTR) non stimulé, ni préincubé, est également réalisé. Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/μg de protéines comme la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3. Signification statistique : aucune par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak, comparativement à la condition staurosporine seule.



**Figure 3.16 : Détection de la fragmentation de l'ADN après migration électrophorétique dans un gel d'agarose de l'ADN génomique extrait de cellules cybrides mutées stimulées par de la staurosporine 500 nM durant 6 heures et préincubées ou non en présence de MitoQ 0,5 ou 1  $\mu$ M. Les cellules cybrides mutées ont été préincubées une heure ou non en présence de MitoQ 0,5 ou 1  $\mu$ M puis stimulées durant 6 heures à la staurosporine (STS) 500 nM ajoutée au milieu baignant les cellules. Un contrôle (CTR) non stimulé, ni préincubé, est également réalisé. Au terme des incubations, l'ADN génomique est extrait et soumis à une migration électrophorétique dans un gel d'agarose 2,0 % contenant un agent intercalant (gelstar). Un étalon commercial de 100 pb est également chargé permettant d'évaluer la taille des fragments obtenus dans les différentes conditions.**

cybrides mutées, du moins après six heures d'incubation. Afin de confirmer ces hypothèses, des mesures de libération du cytochrome c, en présence et en absence d'antioxydants, ainsi que des mesures quantitatives de fluorescence de la sonde MitoSox Red devraient être effectuées.

Les résultats présentés à la figure 3.14 mettent en évidence un effet inhibiteur du MitoQ sur l'activité caspase-3 induite par la staurosporine, uniquement dans les cellules cybrides mutées. En réalité, après six heures d'incubation en présence de staurosporine, l'activité caspase-3 est très faible dans les cellules sauvages, ce qui implique que même si le MitoQ inhibe également l'activité caspase-3 dans les cellules sauvages, ce ne serait pas mis en évidence après six heures d'incubation en présence de staurosporine. C'est pourquoi nous avons répété la manipulation en allongeant à seize heures le temps de stimulation par la staurosporine.

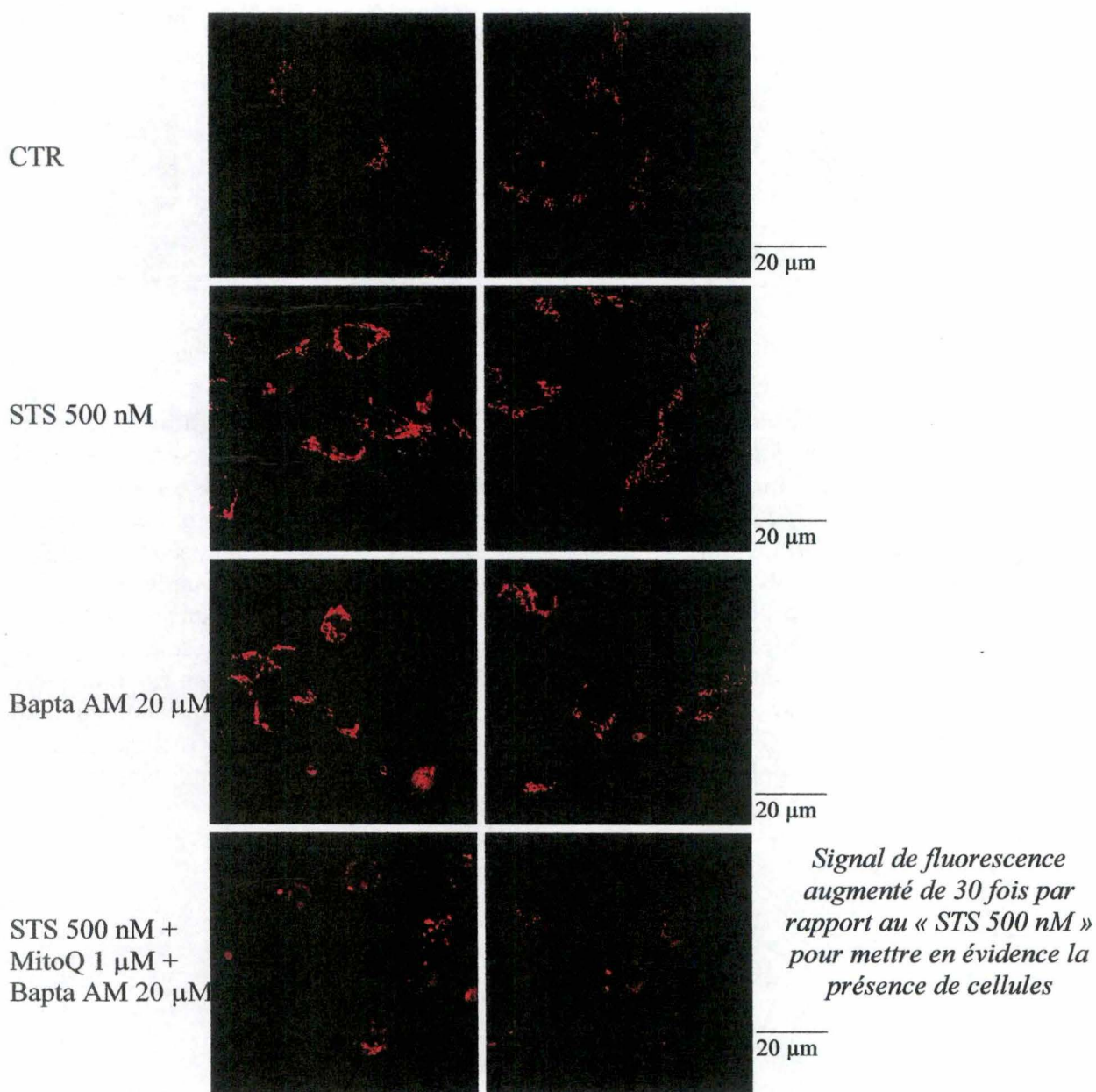
Les résultats présentés à la figure 3.15, ne montrent pas d'effet significatif du MitoQ sur l'activité de la caspase-3 induite par seize heures de traitement à la staurosporine, et ce pour les deux lignées considérées. Nous observons donc, dans les cellules cybrides mutées, un effet inhibiteur du MitoQ sur l'activité caspase-3 induite par six heures de traitement à la staurosporine mais pas par seize heures de traitement. Ceci peut s'expliquer par le fait que lorsque l'activité de la caspase-3 atteint un certain seuil, elle devient indépendante des ROS car elle subit une boucle de d'autoamplification. Nous ne pouvons pas dire si pour les cellules cybrides sauvages, l'absence d'effet du MitoQ sur l'activation de la caspase-3 est due au même phénomène (lecture réalisée trop tard dans la cinétique d'activation de la caspase-3) ou si l'activation de la caspase-3 est indépendante des ROS mitochondriaux. En effet, d'autres processus induits par la staurosporine agissent sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, citons, à titre d'exemple, les PKC, qui inhibées par la staurosporine, entraînent la libération cytosolique facilitée de Bad (voir point 1.4.5). Cependant une confirmation de la manipulation s'impose après différents temps de stimulation par la staurosporine.

En conclusion, bien que plusieurs mécanismes se surimposent dans le processus de perméabilisation de la membrane mitochondriale induit par la staurosporine et pouvant conduire à l'activation de la caspase-3, il semblerait que le niveau élevé de ROS mitochondriaux dans les cellules cybrides mutées potentialise l'activation de la caspase-3. Ceci pourrait expliquer, en partie, la susceptibilité accrue des cellules cybrides mutées, vis-à-vis des cellules cybrides sauvages, face à l'apoptose induite par la staurosporine.

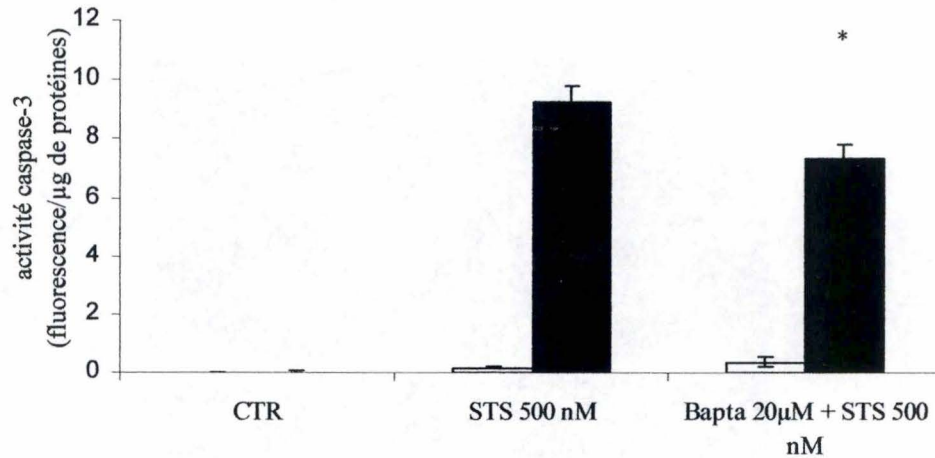
Afin de confirmer ce résultat sur un autre marqueur apoptotique plus tardif, des visualisations de la fragmentation de l'ADN sur gels d'agarose ont été réalisées. Comme l'indique la figure 3.16, la staurosporine provoque une fragmentation de l'ADN dans les cellules cybrides mutées après six heures de traitement (confirmé par la figure 3.7). Cependant le manque de reproductibilité de la technique ne permet pas de déterminer si une préincubation d'une heure en présence de MitoQ 0,5 ou 1  $\mu$ M affecte cette fragmentation. Nous avons planifié des dosages de fragmentation de l'ADN par kit ELISA. Cependant, pour cause de contaminations générales, au laboratoire, par des bactéries intracellulaires de type mycoplasme, ces tests n'ont pu être exécutés.

La staurosporine étant également décrite pour augmenter les concentrations cytosolique et mitochondriale en calcium libre et étant donné que les composantes calcium et ROS sont intimement liées (voir point 1.3.2.5), nous avons étudié de façon préliminaire les éventuelles implications de l'augmentation de calcium induite par la staurosporine sur le potentiel oxydant et la réponse apoptotique des cellules cybrides.

Cell. cybrides sauvages Cell. cybrides mutées



**Figure 3.17 :** Visualisation en microscopie confocale à fluorescence des anions superoxydes mitochondriaux mis en évidence par la sonde MitoSox Red, dans des cellules cybrides sauvages (à gauche) et mutées (à droite) suite à une préincubation en présence de MitoQ 1 μM et/ou de Bapta AM 20 μM suivie d'une stimulation par de la staurosporine 500 nM. Les cellules cybrides sauvages et mutées sont préincubées une heure ou non en présence de MitoQ 1 μM et Bapta AM 20 μM puis stimulées ou non deux heures par la staurosporine 500 nM, ajoutée dans le milieu de préincubation. La fluorescence du MitoSox Red est observée sur les cellules vivantes, comme décrit dans la partie matériel et méthodes.



**Figure 3.18 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 6 heures par la staurosporine 500 nM en présence ou non Bapta AM 20 µM.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été préincubées une heure ou non en présence de Bapta AM 20 µM puis stimulées durant 6 heures par de la staurosporine (STS) 500 nM ajoutée au milieu baignant les cellules. Un contrôle (CTR) non stimulé, ni préincubé, est également réalisé. Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n = 3$ . Signification statistique : \* $p < 0,05$  par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak, comparativement à la condition staurosporine seule.



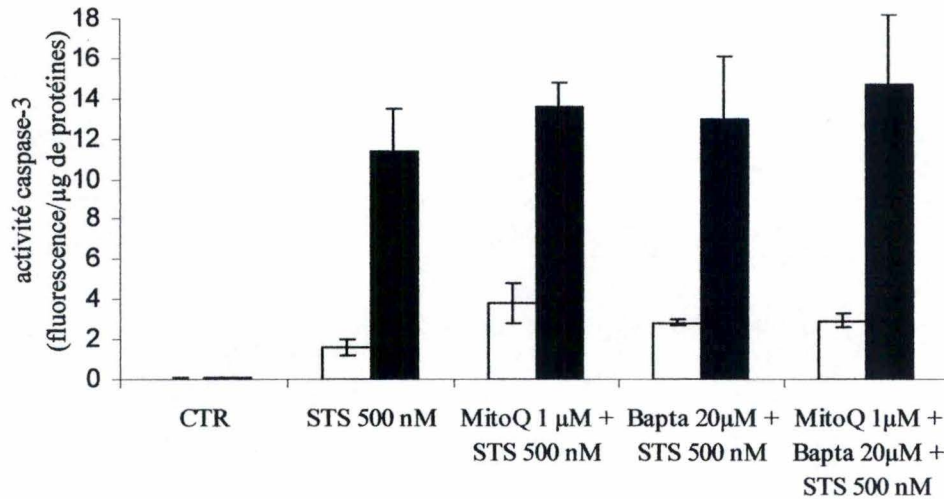
### **3.1.3.4 Implication de calcium dans la réponse apoptotique médiée par la staurosporine 500 nM dans les cellules cybrides sauvages et mutées**

Rappelons tout d'abord que de manière générale, les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial possèdent une concentration en calcium intracellulaire plus élevée que les cellules non atteintes de ces dysfonctionnements (voir point 1.3.2.3). Bien que les concentrations calciques cytosolique et mitochondriale restent à être déterminées dans les deux lignées de cellules cybrides, il est probable que l'homéostasie du calcium soit perturbée dans les cellules cybrides mutées. Ensuite, des augmentations en calcium libre cytosolique et mitochondrial provoquées par la staurosporine ont été démontrées, notamment, dans des neurones rétiniens (Gil, Almeida et al. 2003). Enfin, il est possible que ces augmentations en calcium soient intimement liées aux augmentations en ROS provoquées par la staurosporine, que nous avons mises en évidence dans les cellules cybrides. Il est donc envisageable que la sensibilité accrue des cellules cybrides à l'apoptose induite par la staurosporine résulte de perturbations calciques engendrant et/ou résultant d'un potentiel oxydant plus élevé par rapport à des cellules ne présentant pas la mutation MERRF.

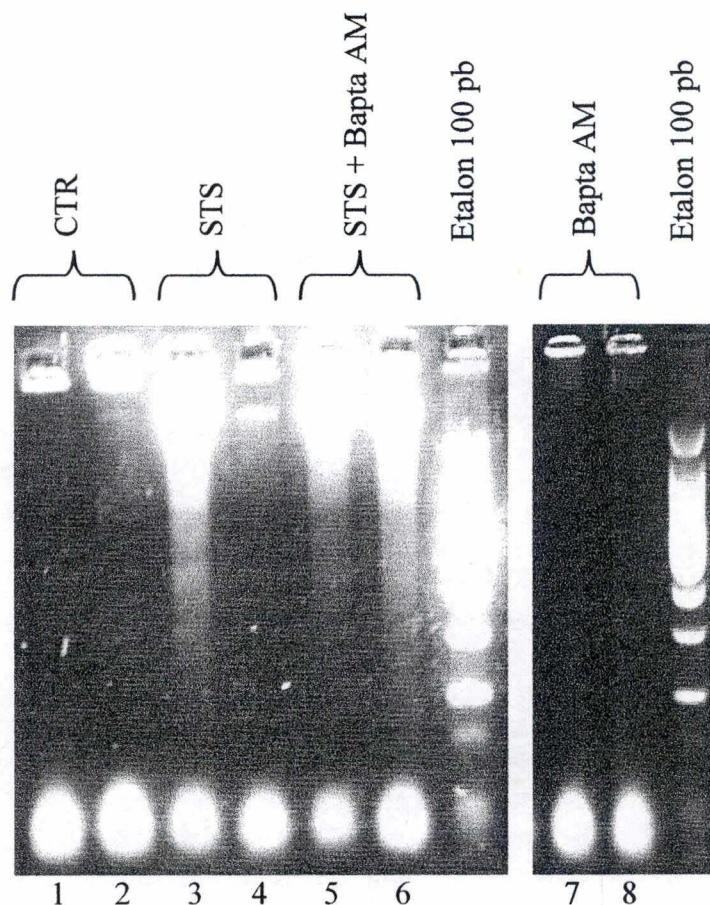
En premier lieu, nous avons déterminé si une diminution du calcium intracellulaire pouvait modifier la surproduction en anions superoxydes par la mitochondrie induite par la staurosporine (figure 3.10). Pour ce faire, nous avons préincubé les cellules cybrides en présence de Bapta AM 20  $\mu$ M, chélateur du calcium intracellulaire, et/ou de MitoQ 1  $\mu$ M, puis nous les avons incubées deux heures en présence de staurosporine 500 nM avant d'examiner, par microscopie confocale, la fluorescence de la sonde MitoSox Red par la mitochondrie. La figure 3.17 montre que la fluorescence de la sonde MitoSox Red n'est pas influencée par une préincubation avec le chélateur de calcium, dans les deux lignées de cellules cybrides, car nous obtenons un niveau de fluorescence similaire pour les cellules prétraitées ou non par le Bapta AM puis incubées en présence de staurosporine. Cette figure confirme également le rôle antioxydant du MitoQ en présence de Bapta AM. Cependant, la visualisation de la sonde MitoSox Red par microscopie confocale donne uniquement des renseignements qualitatifs et ne permet pas de mettre en évidence de faibles variations de niveau de ROS (voir point 3.1.1). Avant de pouvoir confirmer que l'augmentation d'anions superoxydes induite par la staurosporine n'est pas dépendante du niveau calcique intracellulaire, il serait nécessaire de confirmer ces résultats en réalisant des mesures FACS avec la sonde MitoSox Red. De plus, afin de déterminer d'éventuelles implications du calcium cytosolique en amont de la production d' $H_2O_2$  intracellulaire, des mesures grâce à la sonde  $H_2DCF$ -DA devraient être réalisées pour des cellules préincubées en présence de Bapta AM puis traitées par de la staurosporine. Enfin, il reste à déterminer si les concentrations calciques cytosolique et mitochondriale diffèrent entre les deux lignées cellulaires cybrides, tant à l'état basal que suite à divers traitements combinant la staurosporine, le Bapta AM et le MitoQ.

Tout comme les ROS qui par peroxydation des cardiolipines, engendrent la libération du cytochrome c (voir point 3.1.3.3), le calcium, à forte concentration, peut également provoquer cette libération par rupture des interactions cardiolipines/cytochrome c (Brookes, Yoon et al. 2004). Ces deux facteurs, augmentés par la staurosporine, peuvent donc conduire à l'apoptose par activation des caspases.

Afin d'étudier l'effet du calcium sur cette activation, nous avons réalisé des dosages de l'activité caspase-3, dans les deux lignées de cellules cybrides, suite à des préincubations ou non d'une heure en présence de Bapta AM 20  $\mu$ M suivies de stimulations de six heures par de la staurosporine 500 nM. Les résultats illustrés à la figure 3.18 montrent une diminution significative du niveau d'activité de la caspase-3, pour les cellules cybrides mutées traitées par la staurosporine, préincubées en présence de Bapta AM. Dans les cellules cybrides



**Figure 3.19 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 16 heures par la staurosporine 500 nM en présence ou non de MitoQ 1 µM ou de Bapta AM 20 µM.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été préincubées huit heures ou non en présence de MitoQ 1 µM ou de Bapta AM 20 µM puis stimulées durant 16 heures à la staurosporine (STS) 500 nM ajoutée au milieu baignant les cellules. Un contrôle (CTR) non stimulé, ni préincubé, est également réalisé. Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n = 3$ . Signification statistique : aucune par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak, comparativement à la condition staurosporine seule.



**Figure 3.20 : Détection de la fragmentation de l'ADN après migration électrophorétique dans un gel d'agarose de l'ADN génomique extrait de cellules cybrides mutées stimulées par de la staurosporine 500 nM durant 6 heures et préincubées par le Bapta AM 20  $\mu$ M.** Les cellules cybrides mutées ont été préincubées une heure ou non en présence de 20  $\mu$ M puis stimulées ou non durant 6 heures par de la staurosporine (STS) 500 nM ajoutée au milieu baignant les cellules. Au terme des incubations, l'ADN génomique est extrait et soumis à une migration électrophorétique dans un gel d'agarose 2,0 % contenant un agent intercalant (gelstar). Un étalon commercial de 100 pb est également chargé permettant d'évaluer la taille des fragments obtenus dans les différentes conditions.

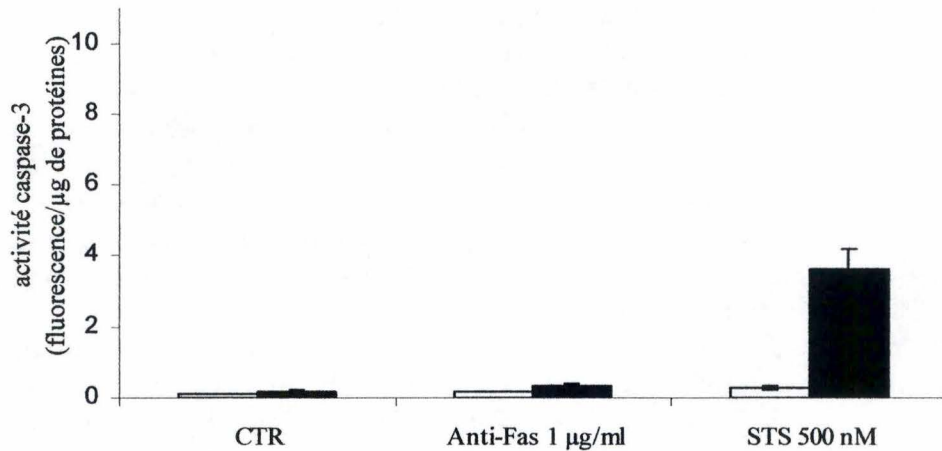
sauvages, aucune activation de la caspase-3 n'est détectée, quel que soit le traitement. Ceci révèle donc pour les cellules mutées, une implication du calcium cytosolique dans le processus apoptotique comme attendu. Remarquons que cette diminution d'activité partielle, tout comme celle rencontrée avec le MitoQ (diminution de 16 % avec le MitoQ et de 21 % avec le Bapta AM par rapport aux cellules traitées par la staurosporine seule). Ceci montre que d'autres mécanismes agissent en parallèle de l'augmentation de la concentration calcique et du potentiel oxydant, induites par la staurosporine, et conduisant à l'apoptose. Il serait intéressant de comparer les conditions testées à une condition de préincubation reprenant le MitoQ et le Bapta AM simultanément, dans le but de voir si les effets sont cumulatifs ou indépendants sur l'activation de la caspase-3.

Comme mentionné précédemment, il est nécessaire d'utiliser des temps de stimulation par la staurosporine plus longs (seize heures) pour étudier l'effet du Bapta AM dans les cellules sauvages. Les résultats exposés à la figure 3.19 ne montrent pas d'effet significatif du Bapta AM sur le niveau d'activité de la caspase-3, après seize heures de traitement par la staurosporine, tant pour les cellules cybrides sauvages que pour les cybrides mutées. De plus, une préincubation en présence de MitoQ, dont les résultats ont été présentés en figure 3.15, et en présence de MitoQ combiné au Bapta AM, ne montrent pas non plus d'effet significatif dans les deux lignées, sur le niveau d'activation de la caspase-3 par rapport aux cellules incubées en présence de staurosporine seule. Ceci peut paraître surprenant étant donné le caractère important du calcium et des ROS dans la réponse apoptotique induite par la staurosporine décrit dans la littérature (Wei, Lu et al. 2001; Gil, Almeida et al. 2003). Cependant, cette absence d'effet pourrait s'expliquer par la cinétique des événements intracellulaires conduisant à l'apoptose. En effet, on peut penser que les ROS et le calcium participent à la phase d'initiation de l'activation des caspases, ce qui explique que nous observions un effet du MitoQ (figure 3.14) et du Bapta AM (figure 3.18) sur l'activité de la caspase-3 induite par six heures de staurosporine, mais qu'au delà d'un certain seuil d'activité caspase, les boucles d'autoamplification des caspases prennent le dessus.

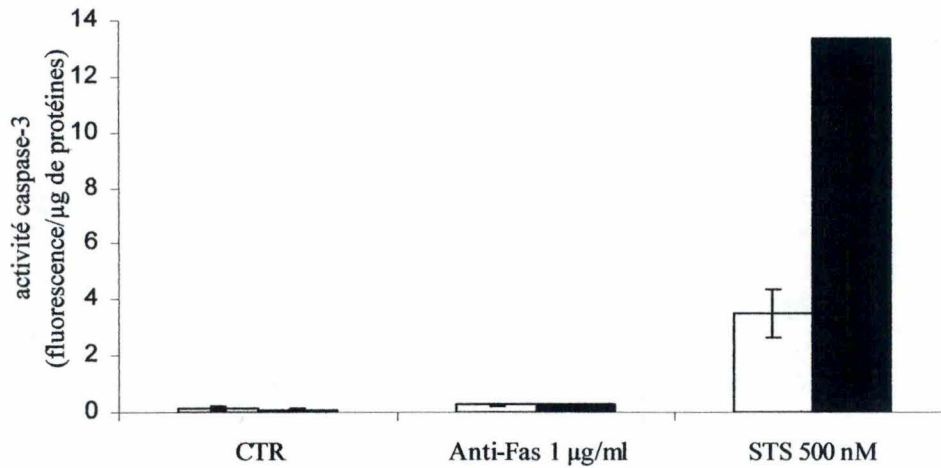
Afin de vérifier l'effet du Bapta AM sur la réponse apoptotique induite par la staurosporine dans les cellules cybrides mutées, des visualisations de la fragmentation de l'ADN génomique ont été réalisées. La figure 3.20 indique que les cellules contrôles ou incubées en présence de Bapta AM seul durant six heures ne présentent pas de fragmentation de l'ADN (piste 1 et 2, 7 et 8). Les cellules incubées en présence de staurosporine sont caractérisées par une fragmentation de l'ADN (piste 3 et figure 3.8), l'échantillon déposé au niveau de la piste 4 étant artéfactuel. La préincubation en présence de Bapta AM 20  $\mu$ M pendant une heure (piste 5 et 6) ne modifie pas (ou très peu ?) le profil de fragmentation de l'ADN causé par la staurosporine.

Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le Bapta AM ne diminue que de 21 % le niveau d'activité de la caspase-3 dans les cellules cybrides mutées pour des stimulations de six heures en présence de staurosporine (figure 3.18). Or cette technique de visualisation sur gel de la fragmentation de l'ADN est peu reproductible et non quantitative. Une diminution partielle de la fragmentation de l'ADN par le Bapta AM serait plus facilement mise en évidence en utilisant un kit ELISA. Nous n'avons pu le tester par manque de temps.

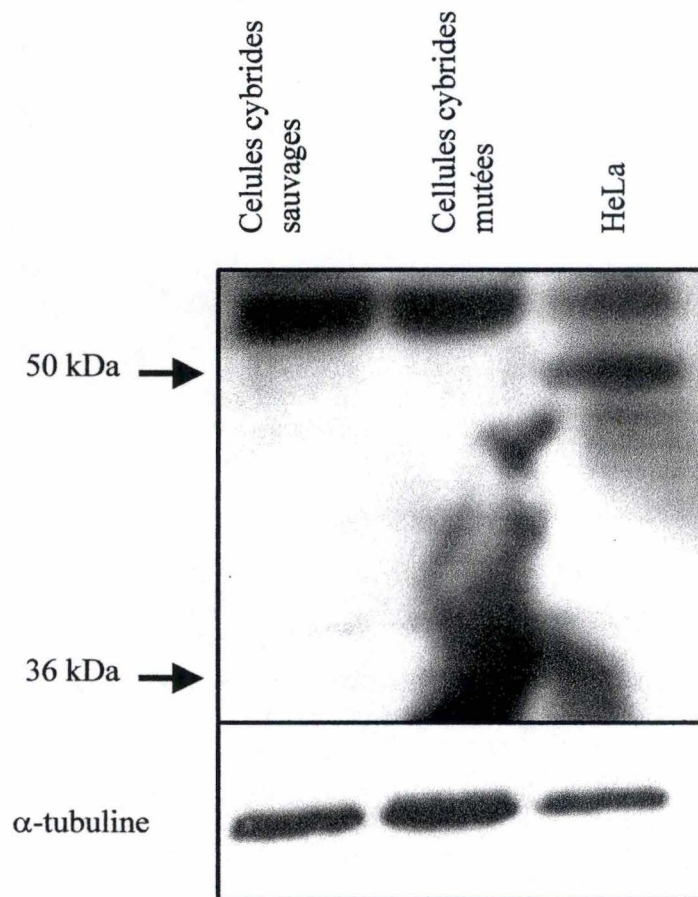
Une autre explication pourrait s'expliquer par le fait que la fragmentation de l'ADN génomique peut être indépendante des caspases et faire intervenir d'autres acteurs comme les calpaïnes, les cathepsines, ... (voir point 1.4.4.3).



**Figure 3.21 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 6 heures par un anticorps anti-Fas.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été incubées 6 heures en présence d'un anticorps anti-Fas à une concentration de 1 μg/ml ou de staurosporine (STS) 500 nM (contrôle positif). Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/μg de protéines comme la moyenne ± 1 S.D. pour n = 3. Signification statistique : aucune entre les cellules contrôles (CTR) et stimulées avec l'anticorps anti-Fas. Les résultats ont été traités par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak.



**Figure 3.22 : Mesure de l'activité de la caspase-3, en spectrofluorimétrie, dans les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) suite à une stimulation de 12 heures par un anticorps anti-Fas.** Les deux lignées de cellules cybrides ont été incubées 12 heures en présence d'un anticorps anti-Fas à une concentration de 1 µg/ml ou de staurosporine (STS) 500 nM (contrôle positif). Les dosages d'activité sont réalisés à l'aide du substrat synthétique Ac-DEVD-AFC comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats, représentant les valeurs de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines totale présente par puits, sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n = 3$ . Signification statistique : aucune entre les cellules contrôles (CTR) et stimulées avec l'anticorps anti-Fas. Les résultats ont été traités par ANOVA 2 suivie d'un test de comparaisons multiples de Holm-Sidak.



**Figure 3.23 : Analyse par Western blot de l'abondance du récepteur Fas dans des extraits protéiques totaux obtenus à partir de cellules cybrides sauvages et mutées non stimulées.** Des extraits protéiques totaux ont été réalisés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées et des cellules HeLa (contrôle positif) et analysés par Western blot comme indiqué dans la partie matériel et méthodes afin de mettre en évidence la présence de Fas (43 kDa) grâce à l'anticorps monoclonal de type IgM (clone CH11). L'abondance de la tubuline a également été mise en évidence afin de contrôler la charge.

### 3.2 L'apoptose et la voie Fas/FasL

Mirabella et ses collaborateurs ont montré que le récepteur Fas était surexprimé dans des fibres musculaires squelettiques de patients porteurs de la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial. Cette équipe suggère que le taux élevé de fibres musculaires entrant en apoptose, par rapport à celui d'individus sains, serait provoqué par l'activation de la voie Fas conduisant à l'activation des caspases et ainsi à l'apoptose (Mirabella, Di Giovanni et al. 2000).

Le modèle de cellules cybrides dont nous disposons nous semblait donc une excellente opportunité pour tester cette hypothèse *in vitro*. Cependant, les cellules que nous utilisons dérivent de la lignée 143B, provenant d'un ostéosarcome humain, et les résultats obtenus *in vivo* proviennent de cellules musculaires squelettiques. La question de savoir si le récepteur Fas était exprimé dans les cellules cybrides dérivant des 143B s'est donc posée. D'après la littérature, d'autres lignées de cellules provenant d'ostéosarcomes humains telles que les 143N2 (Decaudin, Castedo et al. 2002), OST et U-2 OS (Watanabe, Okamoto et al. 2005; Rommelaere 2006) expriment le récepteur Fas en membrane plasmique, bien que l'activation de ce récepteur dans ce type de cellules ne déclenche qu'une réponse apoptotique modérée (Inaba, Glibetic et al. 2004). De plus, des résultats d'analyse transcriptomique obtenus au laboratoire par Guillaume Rommelaere, grâce au damier « DualChip Human Apoptosis » (EAT), indiquent que le transcrite du récepteur Fas est à la limite de détection dans les cellules cybrides sauvages, alors qu'il est détecté de manière tangible dans les cellules cybrides mutées, bien que le niveau d'expression reste faible. Ces données au niveau du transcrite nous ont donc encouragé à rechercher une réponse apoptotique induite par l'activation du récepteur Fas, est déclenchée par un anticorps monoclonal de type IgM (clone CH-11), dans les cellules cybrides sauvages et mutées, en analysant l'activation de la caspase-3.

Les résultats obtenus, illustrés à la figure 3.21, ne montrent pas d'augmentation significative du niveau d'activité de la caspase-3 dans les deux lignées de cellules cybrides incubées en présence de l'anti-Fas par rapport aux cellules non stimulées. Bien que les concentrations en cet anticorps détaillées dans la littérature s'accordent et soient de l'ordre de celle que nous avons utilisée, les temps d'incubation sont divergents (Decaudin, Beurdeley-Thomas et al. 2001; Danielson, Wong et al. 2002; Watanabe, Okamoto et al. 2005). Au vu de la littérature et de la non détection d'activité caspase-3 à six heures d'incubation, nous avons renouvelé la manipulation pour un temps de stimulation de douze heures. Ces résultats, montrés à la figure 3.22, ne mettent toujours pas en évidence d'élévation du niveau d'activité de la caspase-3.

Au vu de ces résultats, nous avons voulu déterminer si le récepteur Fas était bien exprimé dans les cellules cybrides au niveau protéique, bien que les résultats obtenus précédemment au laboratoire indiquent que le transcrite est exprimé, au moins dans les cellules mutées. Nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-Fas pour rechercher par Western Blot l'expression du récepteur dans les deux lignées de cellules cybrides, ainsi que dans des cellules HeLa, qui devraient constituer un contrôle positif (Sun and Chao 2005; Watanabe, Okamoto et al. 2005). L'anticorps provoquant l'activation du récepteur Fas étant de type IgM, nous avons dû adapter la procédure traditionnelle du Western Blot, en incubant la membrane d'abord avec l'IgM murin anti-Fas, ensuite avec des anticorps biotinylés anti-IgM de souris, et enfin avec un conjugué streptavidine-peroxydase (voir point 2.7.4).

Le Western Blot (figure 3.23) ne montre pas de bande au poids moléculaire attendu (43 kDa), ni dans les cellules cybrides, ni dans les cellules HeLa. Deux explications peuvent être proposées pour expliquer ce résultat :



- les conditions de révélation du récepteur Fas que nous avons utilisées ne sont pas optimales et ne permettent pas de mettre en évidence une expression, peut-être faible, de la protéine. Des mises au point techniques seront réalisées dans un avenir proche, en utilisant éventuellement un anticorps primaire qui ne soit pas de type IgM. L'expression du récepteur Fas sera également recherchée par immunocytochimie.
- Le récepteur Fas, n'est pas exprimé au niveau protéique, bien que son transcrit soit détecté au moins dans les cellules mutées. Il semblerait effectivement que l'expression du récepteur Fas fasse l'objet de régulations post-transcriptionnelles, comme le suggère une étude réalisée par Decaudin et collaborateurs, sur la mort cellulaire induite par l'activation du récepteur Fas dans cinq lignées cellulaires dérivées de types de tumeurs différentes. Si l'ARNm codant pour le récepteur Fas est détecté dans chacune des lignées testées, en revanche, l'expression protéique du récepteur, et donc la réponse apoptotique déclenchée par l'anticorps monoclonal anti-Fas, est très variable d'une lignée à l'autre (Decaudin, Beurdeley-Thomas et al. 2001).

Bien que les résultats que nous avons obtenus ne permettent pas de mettre en évidence une apoptose induite par l'activation du récepteur Fas dans les cellules cybrides dérivées des 143B, cette étude mérite d'être poursuivie pour plusieurs raisons. Tout d'abord parce que la surexpression du récepteur Fas dans les biopsies musculaires de patients atteints du syndrome MERRF représente, à l'heure actuelle, la seule donnée physiologique permettant de fournir une piste susceptible d'expliquer le phénomène de dégénérescence musculaire observé chez ces patients. Ensuite parce que des cellules cybrides constituant un modèle pour une autre pathologie mitochondriale, le syndrome LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy), présentent une hypersensibilité à l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas (Danielson, Wong et al. 2002). Les cellules cybrides utilisées dans cette étude dérivent également de la lignée 143B, et portent une mutation ponctuelle ciblant le complexe I de la chaîne respiratoire. L'expression protéique du récepteur Fas, bien que très faible, est comparable dans les cellules cybrides LHON et dans leur équivalent sauvage, mais l'activation de la caspase-3 induite par l'anticorps monoclonal anti-Fas (clone CH-11, 1µg/ml durant six heures) n'est observable que dans les cellules porteuses de la mutation LHON. Ces résultats suggèrent que la mutation LHON entraîne une augmentation de la réponse apoptotique induite par l'activation du récepteur Fas, indépendamment du niveau d'expression du récepteur. L'origine de cette réponse accrue n'est pas connue actuellement, et pourrait par exemple être liée à un niveau d'expression différent d'un des composants de la cascade d'activation induite par Fas. En effet, Watanabe et ses collaborateurs ont montré que des lignées de cellules dérivées d'ostéosarcomes humains (lignées OST et U-1 OS) ne déclenchent pas de réponse apoptotique suite à l'activation du récepteur Fas, à moins d'être sensibilisées à celle-ci par une sous-expression du régulateur FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein), un inhibiteur de l'activation de la caspase-8 induite par Fas (Watanabe, Okamoto et al. 2005).

<b>Inducteur apoptotique et molécules</b>	<b>Paramètre analysé</b>	<b>Sauvages</b>	<b>Mutées</b>	<b>Commentaires</b>
<b>CTR</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracellulaire		niveau basal plus élevé que dans les sauvages	
	O <sub>2</sub> <sup>°</sup> - mitochondriaux	niveau basal identique		
<b>Menadione</b>	activité caspase-3	pas d'augmentation	faible augmentation	augmentation uniquement lorsque les temps d'incubation sont longs
	fragmentation de l'ADN	pas de fragmentation		
<b>Staurosporine 500 nM</b>	activité caspase-3	faible augmentation	augmentation importante	Résultats obtenus avant le mémoire
	fragmentation de l'ADN	faible fragmentation	fragmentation importante	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracellulaire	pas d'augmentation	augmentation	
	O <sub>2</sub> <sup>°</sup> - mitochondriaux	augmentation		
<b>Staurosporine 500 nM + MitoQ 1µM</b>	activité caspase-3	pas d'effet du MitoQ	diminution	diminution après 6 heures, pas après 12 heures
	fragmentation de l'ADN	pas interprétable		
<b>Staurosporine 500 nM + Bapta AM 20 µM</b>	activité caspase-3	pas d'effet du Bapta AM	diminution	diminution après 6 heures mais pas après 12 heures
	fragmentation de l'ADN	pas interprétable		
<b>FAS</b>	activité caspase-3	pas d'activation		Expression du récepteur?

**Table 4.1: Tableau récapitulatif des résultats obtenus au cours du mémoire.**

## 4 Conclusions et perspectives

Bon nombre de maladies neurodégénératives résultent de dysfonctionnements mitochondriaux causés par des altérations du génome mitochondrial ou nucléaire. Ces dysfonctionnements se marquent surtout au niveau des tissus qui consomment beaucoup d'énergie, comme le cerveau et les muscles, et peuvent se traduire par une perte de cellules neuronale et/ou musculaires. Quelques données indiquent que pour certaines maladies mitochondriales, cette perte cellulaire pourrait être la conséquence d'un processus apoptotique.

Le dysfonctionnement mitochondrial étudié, lors de ce travail, est causé par une mutation ponctuelle, A8344G, dans un gène de l'ADN mitochondrial codant pour l'ARNt<sup>Lys</sup>. Ceci provoque sa perte de fonctionnalité et engendre le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibbers), caractérisé, *in vivo*, par des myopathies qui peuvent être combinées à des encéphalopathies myocloniques. Les cellules de patients atteints par cette maladie se caractérisent par une baisse de la synthèse protéique mitochondriale, qui engendre une diminution du fonctionnement de la chaîne respiratoire, de la synthèse d'ATP mitochondriale et du potentiel de membrane. Au laboratoire, nous utilisons, pour des facilités d'approvisionnement, des modèles cellulaires issus de la fusion de cellules 143 rho<sup>0</sup> (cellules provenant d'un ostéosarcome humain totalement déplétées en ADN mitochondrial) avec des myoblastes énucléés provenant de patients atteints de la mutation MERRF à l'état hétéroplasmique dans leur ADN mitochondrial (appelées cellules cybrides mutées) ou avec des myoblastes énucléés d'individus sains (appelé cellules cybrides sauvages). Ces dernières étant utilisées en tant que référence.

Des données obtenues à partir de biopsies musculaires de patients atteints du syndrome MERRF indiquent une augmentation de plusieurs marqueurs apoptotiques, ainsi qu'une élévation du niveau d'expression protéique du récepteur Fas (Mirabella, Di Giovanni et al. 2000). D'autre part, les cellules cybrides porteuses de la mutation MERRF présentent une réponse apoptotique accrue en réponse à la staurosporine, comme l'indiquent un niveau élevé d'activité caspase-3 et une importante fragmentation de l'ADN (Liu, Lee et al. 2004; Rommelaere 2006). Comme la staurosporine est connue pour induire une augmentation de la concentration calcique et du niveau de ROS intracellulaires, et que la plupart des modèles cellulaires de dysfonctionnement mitochondrial sont caractérisés par un niveau élevé de ces deux paramètres, nous avons amorcé une étude visant à préciser le rôle des ROS d'abord, et du calcium ensuite, dans la réponse apoptotique des cellules cybrides mutées (table 4.1).

Dans un premier temps, nous avons étudié le niveau basal en ROS dans les deux lignées cellulaires, étude non réalisée auparavant sur des cellules cybrides MERRF. Les résultats obtenus, montrant une abondance accrue en peroxyde d'hydrogène intracellulaire, de l'ordre de 80 %, dans les cellules cybrides mutées par rapport aux cellules sauvages, mettent en évidence un potentiel oxydant augmenté dans les cellules cybrides mutées. A partir de cette donnée, deux questions peuvent se poser :

- quelle est l'origine de cette élévation de potentiel oxydant dans les cybrides mutées ?
- ce potentiel oxydant élevé contribue-t-il – et si oui, comment ? – à l'hypersensibilité des cybrides mutées à l'apoptose ?

Ce potentiel oxydant plus élevé pourrait résulter d'une diminution des moyens de détoxifications des ROS, comme l'ont montré Wei et ses collaborateurs dans des cellules issues de patients atteints de la pathologie MERRF (Wei, Lu et al. 2001), et/ou d'une production accrue en ROS, notamment au niveau de la chaîne respiratoire, perturbée par le dysfonctionnement des complexes I et IV. La sonde fluorescente MitoSox Red, spécifique des anions superoxydes localisés dans la mitochondrie a été utilisée en microscopie confocale à fluorescence, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'abondance d'anions superoxydes mitochondriaux entre les deux lignées par cette approche exclusivement

qualitative. Des mesures de fluorescence de cette sonde par FACS devraient être réalisées afin de détecter des différences peut-être faibles du niveau des anions superoxydes mitochondriaux. De même, l'utilisation de la sonde dihydroéthidium, permettrait d'évaluer l'abondance des anions superoxydes dans l'ensemble de la cellule, puisque cette sonde n'est pas adressée dans la mitochondrie, contrairement au MitoSox Red. De plus, des dosages d'activités catalase, SOD et Gpx seraient nécessaires pour déterminer le niveau d'implication des enzymes antioxydantes dans l'élévation du potentiel oxydant des cellules mutées.

Dans un second temps, nous avons envisagé l'implication de ce potentiel oxydant augmenté dans les cellules cybrides mutées, comme pouvant participer à l'hypersensibilité de ces cellules face à l'apoptose. Nous avons tout d'abord utilisé la ménadione, molécule connue pour générer des ROS intracellulaires, afin de déterminer si les cellules cybrides mutées, caractérisées par un niveau oxydant plus élevé dès le départ, déclenchaient plus facilement un processus apoptotique que les cybrides sauvages, en réponse à la ménadione.

Nous avons enregistré, à de faibles concentrations (50  $\mu\text{M}$  et 100 $\mu\text{M}$ ) et pour des temps d'incubation de douze heures, un niveau d'activité caspase 3 significativement augmenté vis-à-vis des cellules non stimulées, et ce uniquement pour les cellules mutées. D'autres marqueurs de l'apoptose pourraient être testés pour confirmer ce résultat. Cependant, au vu du faible niveau d'activité caspase-3 mesuré et des propriétés nécrosantes décrites pour la menadione, pouvant expliquer l'absence d'activation de la caspase-3 pour des concentrations plus élevée (200  $\mu\text{M}$ ), nous avons, pour la suite de ce travail, utilisé un autre inducteur de ROS, la staurosporine.

Grâce à l'utilisation de la sonde MitoSox Red en microscopie confocale à fluorescence, nous avons pu confirmer une forte augmentation de l'abondance d'anions superoxydes mitochondriaux en réponse à un traitement par la staurosporine, une donnée déjà établie dans la littérature (Krohn, Preis et al. 1998; Wei, Lu et al. 2001). Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence, entre les deux lignées, dans l'amplitude de cette augmentation, une donnée qui pourrait éventuellement être établie grâce à des analyses par FACS. Remarquons qu'il est également possible qu'une partie des anions superoxydes générés par la mitochondrie soit non seulement une cause mais aussi une conséquence de la réponse apoptotique engendrée par la staurosporine. En effet, la libération du cytochrome c est connue pour entraîner une augmentation de production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  mitochondriaux par disruption du flux électronique au niveau de la chaîne respiratoire. Ceci pourrait être étayé par des mesures de libération du cytochrome c.

En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène intracellulaire, par contre, une élévation significative, par rapport au niveau basal, a été enregistrée uniquement pour les cellules cybrides mutées traitées six heures à la staurosporine. Ce résultat important signifie que non seulement les cellules cybrides mutées présentent un niveau plus oxydant que les cybrides sauvages en absence de stimulation, mais aussi qu'elles subissent un stress oxydatif plus élevé en réponse à la staurosporine, un phénomène susceptible d'accroître, ou d'accélérer, le processus apoptotique.

Afin de déterminer si la surproduction d'anions superoxydes par la mitochondrie, induite par la staurosporine 500 nM, pourrait participer à la réponse apoptotique accrue des cellules cybrides mutées, nous avons utilisé un antioxydant, le MitoQ, adressé à la membrane mitochondriale interne. Nous avons montré qu'il provoquait une chute de l'abondance des anions superoxydes mitochondriaux au niveau basal et ainsi que son augmentation provoquée par la staurosporine. Des préincubations en présence de MitoQ suivies de stimulations de six heures par la staurosporine montrent une faible, mais significative, diminution du niveau d'activité de la caspase-3 dans les cellules cybrides mutées. Celle-ci n'est pas retrouvée pour des temps d'incubations plus longs. Le fait que l'inhibition de l'activité de la caspase-3 par le MitoQ ne soit que partielle et temporaire peut s'expliquer de plusieurs manières :

- la mesure de l'activité caspase-3 a été réalisée après six heures de traitement, à un stade de la réponse apoptotique où les caspases sont peut-être déjà dans une boucle d'autoamplification masquant l'effet des ROS (Yasukawa, Suzuki et al.). Des mesures plus précoces devraient être réalisées.
- d'autres sources de ROS, non mitochondriales, telles que la phospholipase A2 ou la xanthine oxydase, pourraient être activées par la staurosporine (Gil, Almeida et al. 2003) sans être inhibées par le MitoQ. L'utilisation d'antioxydants ciblant les ROS cytosoliques permettrait de répondre à cette éventualité.
- d'autres processus déclenchés par la staurosporine participent à l'activation des caspases, comme l'inhibition des PKC, influençant l'activité de Bid, ou encore l'augmentation de calcium intracellulaire.

En effet, un chélateur du calcium, ion bivalent en relation étroite avec le niveau des ROS, provoque une faible diminution de l'activité caspase-3 induite par six heures de traitement par la staurosporine, et ce uniquement dans les cellules mutées. Pour les mêmes raisons d'autoamplification des caspases citées précédemment, il se peut qu'un examen de l'activité de la caspase-3 après une incubation moins longue en présence de staurosporine permette de mettre en évidence une plus forte inhibition de l'activation de la caspase-3 suite à une préincubation en présence de chélateur calcique. D'autre part, si des élévations de la concentration calcique intracellulaire ont été rapportées dans plusieurs modèles de dysfonctionnement mitochondrial, ceci n'a pas encore été établi pour les cellules cybrides portant la mutation A8344G. Des mesures de niveaux calciques cytosoliques et mitochondriaux, à l'état basal et en réponse à la staurosporine permettraient de préciser le rôle du calcium dans ce processus.

Ces deux résultats impliquant les ROS et le calcium sur le niveau d'activité de la caspase-3 pourraient justifier, au moins en partie, la susceptibilité des cellules cybrides mutées face à l'apoptose induite par la staurosporine. En effet, il est décrit que ces deux facteurs, en concentration élevée, participent à la libération du cytochrome c dans le cytosol et ainsi à l'activation des caspases (Petrosillo, Ruggiero et al. 2003; Brookes, Yoon et al. 2004). Cependant, pour pouvoir tirer cette conclusion, les effets inhibiteurs du MitoQ et du BAPTA-AM devraient être établis sur d'autres marqueurs apoptotiques que l'activation de la caspase-3, comme la fragmentation de l'ADN génomique. En effet, l'activité de la caspase-3 n'est pas responsable de la fragmentation de l'ADN génomique dans tous les modèles cellulaires, d'autres protéases comme la calpaine ou les cathepsines pouvant jouer un rôle décisif dans le processus apoptotique (voir point 1.4.4.3). Il serait instructif de déterminer si ces protéases sont activées suite à un traitement par la staurosporine dans les cellules cybrides, et le cas échéant, si leur activité est sensible aux antioxydants et/ou au chélateurs calciques.

En résumé, bien que plusieurs éléments doivent encore être confirmés, particulièrement en analysant la fragmentation de l'ADN, notre travail indique clairement que les cellules cybrides portant la mutation A8344G présentent un niveau oxydant plus élevé que les cybrides sauvages, et qu'elles sont plus sensibles à l'activation de la principale caspase effectrice déclenchée par deux molécules différentes connues pour générer des ROS, la ménadione et la staurosporine. De plus, le stress oxydant engendré par la staurosporine est plus marqué dans les cellules cybrides mutées, ce qui pourrait expliquer que dans ces cellules l'activité de la caspase-3 induite par la staurosporine est partiellement inhibée par un antioxydant spécifique de la mitochondrie, et par un chélateur calcique. Le couple ROS-calcium constitue probablement une clé de la réponse apoptotique dans les cellules cybrides mutées.

Cependant, les molécules inductrices de l'apoptose que nous avons utilisées jusqu'alors sont loin d'être physiologiques, et même si nous sommes conscients des limites des modèles cellulaires utilisés, nous avons voulu aborder l'apoptose des cellules porteuses de

la mutation MERRF sous un angle plus proche de la pathologie. En effet, une surexpression du récepteur Fas a été rapportée dans des biopsies musculaires de patients (Mirabella, Di Giovanni et al. 2000). C'est pourquoi nous avons tenté de déterminer si les cellules cybrides mutées déclenchaient une réponse apoptotique plus importante que les cellules sauvages, suite à une activation du récepteur Fas. Comme nous n'avons pas pu montrer d'activation de la caspase-3 consécutive à une activation du récepteur Fas, et ce dans les deux lignées cellulaires, on peut donc se demander si cette absence de réponse n'est pas provoquée par l'absence du récepteur Fas en membrane.

Le manque d'expression de Fas peut paraître surprenant puisqu'un transcrit lui correspondant a été mis en évidence au laboratoire, au moins pour les cellules cybrides mutées, et que d'autres lignées cellulaires issues d'ostéosarcomes présentent une expression protéique du récepteur (Decaudin, Beurdeley-Thomas et al. 2001; Watanabe, Okamoto et al. 2005). Cependant, l'expression du récepteur Fas dans les lignées issues d'ostéosarcome est toujours très faible, par rapport à d'autres types cellulaires. Le western blot que nous avons réalisé ne met pas en évidence l'expression de Fas. Cette absence de détection pourrait être provoquée par un manque de sensibilité de la technique utilisée, devant encore être mise au point, et reste, dans tout les cas, à être confirmé notamment par immunofluorescence. Une autre explication possible à ce manque de détection, en accord avec le résultat de transcriptomique, pourrait provenir d'une régulation post-transcriptionnelle de Fas comme suggéré par Decaudin (Decaudin, Beurdeley-Thomas et al. 2001).

Cependant, une étude approfondie de la voie Fas mérite d'être poursuivie. Tout d'abord parce que la surexpression du récepteur Fas dans les biopsies musculaires de patients atteints du syndrome MERRF représente, à l'heure actuelle, la seule donnée physiologique permettant de fournir une piste susceptible d'expliquer le phénomène de dégénérescence musculaire observé chez ces patients. Ensuite parce que des cellules cybrides constituant un modèle pour une autre pathologie mitochondriale, le syndrome LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy), présentent une hypersensibilité à l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas (Danielson, Wong et al. 2002). Il semblerait donc qu'un lien puisse exister entre un dysfonctionnement mitochondrial et une éventuelle susceptibilité face à l'apoptose induite par Fas. Toutefois, comme nous l'avons décrit au point 1.4.5, la sensibilité des cellules à l'apoptose dépend de la nature du stimulus pro-apoptotique ainsi que du type cellulaire étudié ; une participation du background nucléaire n'est donc pas à exclure. De ce fait, il serait très intéressant d'étudier l'implication de Fas dans des modèles cellulaires cybrides plus représentatifs physiologiquement de ce qui est décrit *in vivo*. Pour cette raison, nous travaillons au laboratoire sur la construction d'une lignée de cellules cybrides MERRF dont les cellules receveuses des mitochondries mutées dans leur ADN, seraient des myocytes (cellules RD de rhabdomyosarcome).

En étudiant la réponse apoptotique des cellules cybrides porteuses de la mutation A8344G, particulièrement s'il s'agit de cellules d'origine musculaire ou neuronale, nous espérons mieux comprendre les mécanismes par lesquels s'installe la dégénérescence cellulaire dans les tissus musculaires et nerveux, et, à long terme, pouvoir éventuellement dégager de nouvelles pistes thérapeutiques.

# 5. Bibliographie

## 5 Bibliographie

- Adams, J. M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." Genes Dev **17**(20): 2481-95.
- Andreyev, A. Y., Y. E. Kushnareva, et al. (2005). "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 200-14.
- Antonicka, H., D. Floryk, et al. (1999). "Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt." Biochem J **342 Pt 3**: 537-44.
- Arnould, T., L. Mercy, et al. (2003). "mtCLIC is up-regulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells." Faseb J **17**(14): 2145-7.
- Arnould, T., S. Vankoningsloo, et al. (2002). "CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation." Embo J **21**(1-2): 53-63.
- Arnoult, D., B. Gaume, et al. (2003). "Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization." Embo J **22**(17): 4385-99.
- Asin-Cayuela, J., A. R. Manas, et al. (2004). "Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant." FEBS Lett **571**(1-3): 9-16.
- Beal, M. F. (2005). "Less stress, longer life." Nat Med **11**(6): 598-9.
- Beere, H. M. (2005). "Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways." J Clin Invest **115**(10): 2633-9.
- Biswas, G., O. A. Adebajo, et al. (1999). "Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk." Embo J **18**(3): 522-33.
- Boehning, D., D. B. van Rossum, et al. (2005). "A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1466-71.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Bras, M., B. Queenan, et al. (2005). "Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 231-9.
- Brini, M., P. Pinton, et al. (1999). "A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency." Nat Med **5**(8): 951-4.
- Broker, L. E., F. A. Kruyt, et al. (2005). "Cell death independent of caspases: a review." Clin Cancer Res **11**(9): 3155-62.
- Brookes, P. S. (2005). "Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple." Free Radic Biol Med **38**(1): 12-23.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, et al. (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-33.
- Buchet, K. et C. Godinot (1998). "Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells." J Biol Chem **273**(36): 22983-9.
- Cai, J., D. C. Wallace, et al. (2000). "Separation of cytochrome c-dependent caspase activation from thiol-disulfide redox change in cells lacking mitochondrial DNA." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 334-42.



- Cardoso, S. M., A. C. Rego, et al. (2004). "Apoptotic cell death induced by hydrogen peroxide in NT2 parental and mitochondrial DNA depleted cells." Neurochem Int **45**(5): 693-8.
- Cardoso, S. M., S. Santos, et al. (2001). "Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity." Faseb J **15**(8): 1439-41.
- Chang, B. S., A. J. Minn, et al. (1997). "Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2." Embo J **16**(5): 968-77.
- Cho, S. G. and E. J. Choi (2002). "Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases." J Biochem Mol Biol **35**(1): 24-7.
- Chomyn, A., G. Meola, et al. (1991). "In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria." Mol Cell Biol **11**(4): 2236-44.
- Cote, C., J. Poirier, et al. (1988). "Structural identity between the NH2-terminal domain of the rat and human ornithine carbamyltransferase "targeting" sequences." J Biol Chem **263**(12): 5752-6.
- Danielson, S. R., A. Wong, et al. (2002). "Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-Induced apoptosis." J Biol Chem **277**(8): 5810-5.
- Decaudin, D., A. Beurdeley-Thomas, et al. (2001). "Distinct experimental efficacy of anti-Fas/APO-1/CD95 receptor antibody in human tumors." Exp Cell Res **268**(2): 162-8.
- Decaudin, D., M. Castedo, et al. (2002). "Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells in vitro and in vivo." Cancer Res **62**(5): 1388-93.
- Dimauro, S. et G. Davidzon (2005). "Mitochondrial DNA and disease." Ann Med **37**(3): 222-32.
- Fan, T. J., L. H. Han, et al. (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**(11): 719-27.
- Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez, et al. (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." Exp Physiol **88**(1): 41-56.
- Fuentes-Prior, P. et G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**(Pt 2): 201-32.
- Ganitkevich, V. Y. (2003). "The role of mitochondria in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> cycling." Exp Physiol **88**(1): 91-7.
- Garrett, R. H. et C. M. Grisham (2000). Biochimie, De Boek Universit .
- Gewies, A. (2003). "Introduction to apoptosis." ApoReview.
- Gil, J., S. Almeida, et al. (2003). "Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis." Free Radic Biol Med **35**(11): 1500-14.
- Gordeeva, A. V., R. A. Zvyagilskaya, et al. (2003). "Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells." Biochemistry (Mosc) **68**(10): 1077-80.
- Gottlieb, R. A. (2000). "Mitochondria: execution central." FEBS Lett **482**(1-2): 6-12.
- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-911.
- Gunter, T. E., D. I. Yule, et al. (2004). "Calcium and mitochondria." FEBS Lett **567**(1): 96-102.
- Hallmann, A., J. Klimek, et al. (2004). "Partial characterization of human choriocarcinoma cell line JAR cells in regard to oxidative stress." Acta Biochim Pol **51**(4): 1023-38.
- Haupt, S., M. Berger, et al. (2003). "Apoptosis - the p53 network." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4077-85.
- Hill, M. M., C. Adrain, et al. (2003). "Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." Mol Interv **3**(1): 19-26.

- Huang, C. C., H. C. Kuo, et al. (2002). "Clinical phenotype, prognosis and mitochondrial DNA mutation load in mitochondrial encephalomyopathies." J Biomed Sci **9**(6 Pt 1): 527-33.
- Inaba, H., M. Glibetic, et al. (2004). "Interferon-gamma sensitizes osteosarcoma cells to Fas-induced apoptosis by up-regulating Fas receptors and caspase-8." Pediatr Blood Cancer **43**(7): 729-36.
- Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- James, A. M., P. W. Sheard, et al. (1999). "Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations." Eur J Biochem **259**(1-2): 462-9.
- James, A. M., Y. H. Wei, et al. (1996). "Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations." Biochem J **318** (Pt 2): 401-7.
- Jezeq, P. et L. Hlavata (2005). "Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism." Int J Biochem Cell Biol **37**(12): 2478-503.
- Kamata, H. et H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.
- King, M. P. et G. Attardi (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." Science **246**(4929): 500-3.
- King, M. P. et G. Attardi (1996). "Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA." Methods Enzymol **264**: 304-13.
- Kirino, Y., T. Yasukawa, et al. (2006). "Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect." Hum Mol Genet **15**(6): 897-904.
- Kroemer, G. et S. J. Martin (2005). "Caspase-independent cell death." Nat Med **11**(7): 725-30.
- Krohn, A. J., E. Preis, et al. (1998). "Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector." J Neurosci **18**(20): 8186-97.
- Kruman, I., Q. Guo, et al. (1998). "Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells." J Neurosci Res **51**(3): 293-308.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-42.
- Lamson, D. W. et S. M. Plaza (2003). "The anticancer effects of vitamin K." Altern Med Rev **8**(3): 303-18.
- Lavrik, I. N., A. Golks, et al. (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." J Clin Invest **115**(10): 2665-72.
- Lee, N. K. et S. Y. Lee (2002). "Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)." J Biochem Mol Biol **35**(1): 61-6.
- Liu, C. Y., C. F. Lee, et al. (2004). "Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1011**: 133-45.
- Lozano, J., S. Menendez, et al. (2001). "Cell autonomous apoptosis defects in acid sphingomyelinase knockout fibroblasts." J Biol Chem **276**(1): 442-8.
- Malakhova, L., V. G. Bezlepkin, et al. (2005). "The increase in mitochondrial DNA copy number in the tissues of gamma-irradiated mice." Cell Mol Biol Lett **10**(4): 721-32.
- Mancuso, M., M. Filosto, et al. (2004). "A novel mitochondrial tRNA<sup>Phe</sup> mutation causes MERRF syndrome." Neurology **62**(11): 2119-21.

- Manon, S. (2004). "Utilization of yeast to investigate the role of lipid oxidation in cell death." Antioxid Redox Signal **6**(2): 259-67.
- Martins, L. M., I. Iaccarino, et al. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif." J Biol Chem **277**(1): 439-44.
- Masucci, J. P., M. Davidson, et al. (1995). "In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: two genotypes produce similar phenotypes." Mol Cell Biol **15**(5): 2872-81.
- Mathews, C. K. et K. E. Van Holde (1996). Biochemistry, Benjamin/Cummings Publishing Co.
- Mirabella, M., S. Di Giovanni, et al. (2000). "Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism." Brain **123** (Pt 1): 93-104.
- Miwa, S. et M. D. Brand (2003). "Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1300-1.
- Moudy, A. M., S. D. Handran, et al. (1995). "Abnormal calcium homeostasis and mitochondrial polarization in a human encephalomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 729-33.
- Nelson, D. L. et M. M. Cox (2000). Lehninger – Principles of Biochemistry, Worth Publishers.
- Niemczyk, E., A. Majczak, et al. (2004). "A possible involvement of plasma membrane NAD(P)H oxidase in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis in menadione-induced cell injury." Acta Biochim Pol **51**(4): 1015-22.
- Pallotti, F., A. Baracca, et al. (2004). "Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations." Biochem J **384**(Pt 2): 287-93.
- Parikh, V. S., M. M. Morgan, et al. (1987). "The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast." Science **235**(4788): 576-80.
- Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, et al. (2003). "Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria." Faseb J **17**(15): 2202-8.
- Porta, C., M. Moroni, et al. (1996). "Antioxidant enzymatic system and free radicals pathway in two different human cancer cell lines." Anticancer Res **16**(5A): 2741-7.
- Reichert, A. S. et W. Neupert (2002). "Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 41-9.
- Ricci, J. E., C. Munoz-Pinedo, et al. (2004). "Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain." Cell **117**(6): 773-86.
- Rommelaere, G. (2006). "Mémoire de licence 2005 (Etude de la réponse apoptotique de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial)."
- Rousset, S., M. C. Alves-Guerra, et al. (2004). "The biology of mitochondrial uncoupling proteins." Diabetes **53** Suppl 1: S130-5.
- Royall, J. A. et H. Ischiropoulos (1993). "Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells." Arch Biochem Biophys **302**(2): 348-55.
- Sarnat, H. B. et J. Marin-Garcia (2005). "Pathology of mitochondrial encephalomyopathies." Can J Neurol Sci **32**(2): 152-66.
- Schafer, E., H. Seelert, et al. (2006). "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes." J Biol Chem.
- Schimmer, A. D. (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice." Cancer Res **64**(20): 7183-90.
- Schoeler, S., R. Szibor, et al. (2005). "Mitochondrial DNA deletions sensitize cells to apoptosis at low heteroplasmy levels." Biochem Biophys Res Commun **332**(1): 43-9.

- Schon, E. A. et G. Manfredi (2003). "Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction." J Clin Invest **111**(3): 303-12.
- Seleznev, K., C. Zhao, et al. (2006). "Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine." J Biol Chem.
- Simm, A. et H. J. Brömme (2005). "Reactive oxygen species (ROS) and aging: Do we need them - can we measure them - should we block them?" Signal Transduction **5**: 115-25.
- Smith, R. A., C. M. Porteous, et al. (1999). "Selective targeting of an antioxidant to mitochondria." Eur J Biochem **263**(3): 709-16.
- Stuart, J. A., B. Karahalil, et al. (2004). "Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction." Faseb J **18**(3): 595-7.
- Sun, C. L. et C. C. Chao (2005). "Cross-resistance to death ligand-induced apoptosis in cisplatin-selected HeLa cells associated with overexpression of DDB2 and subsequent induction of cFLIP." Mol Pharmacol **67**(4): 1307-14.
- Tamaoki, T., H. Nomoto, et al. (1986). "Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependent protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **135**(2): 397-402.
- Tan, S., Y. Sagara, et al. (1998). "The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death." J Cell Biol **141**(6): 1423-32.
- Towpik, J. (2005). "Regulation of mitochondrial translation in yeast." Cell Mol Biol Lett **10**(4): 571-94.
- Tryoen-Toth, P., S. Richert, et al. (2003). "Proteomic consequences of a human mitochondrial tRNA mutation beyond the frame of mitochondrial translation." J Biol Chem **278**(27): 24314-23.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-44.
- Umeda, N., T. Suzuki, et al. (2005). "Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases." J Biol Chem **280**(2): 1613-24.
- van Loo, G., X. Saelens, et al. (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet." Cell Death Differ **9**(10): 1031-42.
- Vergani, L., M. Floreani, et al. (2004). "Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines." Eur J Biochem **271**(18): 3646-56.
- Wallace, D. C. (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." Science **283**(5407): 1482-8.
- Watanabe, K., K. Okamoto, et al. (2005). "Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP." Cell Death Differ **12**(1): 10-8.
- Wei, Y. H., C. Y. Lu, et al. (2001). "Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system." Chin J Physiol **44**(1): 1-11.
- Wellington, C. L., L. M. Ellerby, et al. (1998). "Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract." J Biol Chem **273**(15): 9158-67.
- Widlak, P. (2000). "The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis." Acta Biochim Pol **47**(4): 1037-44.
- Yasukawa, T., T. Suzuki, et al. (2001). "Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease." Embo J **20**(17): 4794-802.

- Zeviani, M. et C. Antozzi (1997). "Mitochondrial disorders." Mol Hum Reprod **3**(2): 133-48.
- Zha, J., H. Harada, et al. (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." Cell **87**(4): 619-28.
- Zhou, L., A. Chomyn, et al. (1997). "Myoclonic epilepsy and ragged red fibers (MERRF) syndrome: selective vulnerability of CNS neurons does not correlate with the level of mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> mutation in individual neuronal isolates." J Neurosci **17**(20): 7746-53.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.