## THESIS / THÈSE

#### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de la réponse apoptotique de cellules cybrides portant la mutation A8344G (MERRF) ou A3243G (MELAS) dans l'ADN mitochondrial

Malaisse, Jérémy

Award date: 2009

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?

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.

Download date: 19. May. 2024



## FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

#### ETUDE DE LA REPONSE APOPTOTIQUE DE CELLULES CYBRIDES PORTANT LA MUTATION A8344G (MERRF) OU A3243G (MELAS) DANS L'ADN MITOCHONDRIAL

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Jérémy MALAISSE

Janvier 2009

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

Secrétariat du Département de Biologie Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20 E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

# Etude de la réponse apoptotique de cellules cybrides portant la mutation A8344G (MERRF) ou A3243G (MELAS) dans l'ADN mitochondrial

#### MALAISSE Jérémy

#### Résumé

De nombreuses maladies dégénératives qui sont liées à un dysfonctionnement mitochondrial peuvent avoir pour origine une mutation dans le génome mitochondrial. C'est notamment le cas du syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy Ragged Red Fibers) et du syndrome MELAS (Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) provoquées par des mutations ponctuelles dans le gène mitochondrial codant pour respectivement l'ARNt<sup>Lys</sup> et l'ARNt<sup>Leu</sup> (UUR). Il semblerait que ce type de pathologie soit associé à une accumulation excessive de mitochondries au niveau des muscles qui entraîneraient une mortalité cellulaire importante par apoptose. L'étude de ce processus d'apoptose étant difficile à réaliser in vivo, des cellules cybrides proyenant de cellules d'ostéosarcome déplétées en ADN mitochondrial (rho<sup>0</sup>) repeuplées avec des mitochondries de portant la mutation A8344G (MERRF) ou A3243G (MELAS) sont souvent utilisées. Des études antérieures menées au laboratoire ont mis en évidence une hypersensibilité des cellules cybrides mutées MERRF à l'apoptose induite par la staurosporine, par un mécanisme apoptotique non canonique. Cette étude a pour but de déterminer si cette hypersensibilité se limite ou non à ce dysfonctionnement mitochondrial particulier et à cet inducteur apoptotique précis.

A l'aide de dosages d'activité de la caspase-3 et de mesures de fragmentation internucléosomale de l'ADN, nous avons montré que des cellules cybrides MELAS mutées (A3243G) étaient également plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine ainsi que les cellules cybrides MERRF mutées (A8344G) incubées en présence de TRAIL ou d'étoposide.

Les recherches de l'abondance et/ou de la localisation de plusieurs acteurs apoptotiques (cytochrome c, SMAC/DIABLO, c-IAP1, c-IAP2, XIAP et caspase 9) suggèrent que les mécanismes déclencheurs de l'apoptose dans ces différents modèles cellulaires ne provoquent pas de perméabilisation de la mitochondrie mise en évidence par une absence de libération du cytochrome c, sauf dans le cas des cellules cybrides MERRF confrontées à l'étoposide. En effet, la délocalisation du cytochrome c n'a été observée que dans ce dernier modèle cellulaire.

Dans ce travail, nous avons contribué à caractériser la réponse à différents stimuli proapoptotiques de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial ayant pour origine une mutation ponctuelle dans l'ADN mitochondrial. La suite de cette étude devra rechercher parmi les diverses caspases initiatrices, entre autres, l'origine des mécanismes responsables de l'augmentation de la sensibilité des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial à l'apoptose.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

**Promoteur:** Patricia Renard **Co-promoteur:** Thierry Arnould

#### Remerciements

Je ne pouvais commencer ces remerciements sans dire merci à ma promotrice, Patsy, qui a su faire preuve de patience face à ma rédaction de mon mémoire mais je voudrais la remercier aussi pour ses encouragements, ses conseils et surtout sa motivation

Un tout grand merci au Maître (Guillaume ;)), à ce supporter du Standard de liège, qui m'a initié aux joies de la micropipette et qui s'est toujours tenu disponible pour mes « petites » questions. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse durant ces onze mois passés ensemble.

Merci à Madame Martine Raes de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire.

Merci à toute l'équipe Dyso et aux membres de l'URBC pour leurs conseils sur la paillasse et pour leur gentillesse. Un merci tout particulier à Edouard pour ses conseils éclairés, qui m'ont permis de présenter des résultats qui, je l'espère, seront satisfaisants pour le monde scientifique.

Merci à mes compagnons de route, les mémorants cobayes de l'URBC 2008 avec qui ce fut très agréable de partager ce bureau. Malgré certaines périodes tendues, nous avons passé de très bons moments ensemble. Un merci tout particulier à Sébastien, pour avoir endurer et écouter à maintes reprises mes élucubrations et mes délires scientifico-maniaques.

Un tout grand merci à ces futurs biologistes de talent que sont Boris, Stéphanie, Alexendra et Ludmilla, avec qui j'ai partagé beaucoup de beaux moments durant ces quelques années passées aux FUNDP. J'adresse un remerciement tout particulier à Boris, pour avoir été un ami d'une présence forte durant ces cinq ans.

Je n'oublie pas ces gens de l'ombre qui ont fait que chaque journée de travail a pu être entamée avec bonne humeur : je parle bien évidemment de mes amis. Merci dans le désordre à Allack, Rédunka, Guanaco, Lemming, Courlis, Hérisson, Hémione et Kudu. Un tout grand merci à Fabi, qui a su trouver les mots à chaque petit coup de blues et sans qui ces derniers mois auraient été très très très différents.

Merci à ceux qui ont su me refiler le virus de la biologie : Madame Moyno, Philippe Tenret et Hémione ( je ne t'avais pas oublié).

Je remercie toute ma famille qui a cru en moi et qui m'a permis d'arriver jusque ici.

Merci aussi à tous ceux que j'oublie et qui ont participé de près ou de loin à la réussite de ce travail et merci également à Fungus Shark.

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

#### **Abréviations**

**AIF** Apoptosis-Inducing Factor Apoptotic Protease Activating Factor-1 Apaf1 **APS** Ammonium Persulfate **ATP** adenosine triphosphate Bcl-2 B-Cell Lymphoma-2 BH domain Bcl-2 Homology domain Bovine Serum Albumine **BSA** CAD casapse-activated Dnase **CARD** Caspase-Recruitement Domain common deletion CD **CPEO** Chronic progressive external ophthalmoplegia **CPEO** Chronic Progressive External Ophthalmopelia DD Death Domain DED Death Effector Domain Dulbecco Modified Eagle's Medium-High Glucose DHG **Death-Inducing Signaling Complex** DISC Acide désoxyribonucléique ADN endonuclease G Endo G Fas-associated death domain **FADD** Glutathion Peroxydase Gpx Inhibitor of Apoptose Protein **IAP** inhibitor of caspase-activited DNAse iCAD **JNK** Jun N terminal Kinase **KSS** Kearnes-Sayre Syndrome leucine leu lysine lvs mitochondrial encephalomyopathy and lactic acidosis with stroke-like **MELAS** episodes Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers **MERRF** 

MME Membrane Mitochondriale Externe MMI Membrane Mitochondriale Interne

ARN mt mitochondrial tRNA ADN mt mitochondrial DNA

NARP neurogenic ataxia retinitis pigmentosa)

ND6 NADH dehydrogenase 6

NFAT Nuclear Factor of Activated T cells

NF-kB Nuclear Factor kappa B Omi Mamalian serine protease

OXPHOS odfhghghg

PARP-1 Poly ADP-ribose polymerase PBS Phosphate Buffer Saline

PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen

Pi3K PhosphoInositide-3 Kinase PIB Phosphatase Inhibitor Buffer

PIC Protease Inhibitor Cocktail

PKC Protein Kinase C

PPARalpha Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha

PTP Permeability Transition Pore

RNA ribonucleic Acid

ROS radical oxygen species

RRF ragged red fibers

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

Smac second mitochondrial activator of caspase

STS Staurosporine

SVF Sérum de Veau Foetal

TGF-b Transforming Growth Factor Beta

tm5s2U 5-taurinomethyl2-thiouridine

TNF Tumeur necrosis factor

TNFR1 TNF Receptor 1

TOM 40 Transporter of Outer Membrane
TRADD TNFR-1 Associated Death Domain

TRAIL Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing-ligand

trm5U 5-taurinemethyluridine

tRNA Transfert RNA UV Ultra Violets

VDAC Voltage Dependent Anion Channel
XIAP X-linked Inhibitor of Apoptose Protein

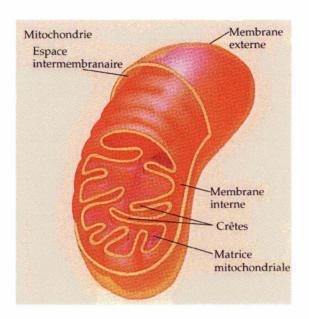
### Table des matières

1.1 LA MITOCHONDRIE	1
1.2 LA RESPIRATION CELLULAIRE	
1.3 L'APOPTOSE	3
1.3.1 LES CASPASES ET LEURS INHIBITEURS	2 3 3 5 5
1.3.2 L'APOPTOSE : LES DIFFERENTES VOIES DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE	5
1.3.2.1 L'apoptose : les voies canoniques	
1.3.2.1.1 La voie intrinsèque	5 7
1.3.2.1.2 La voie extrinsèque	
1.3.2.2 L'apoptose non-canonique	8
1.4 LES DYSFONCTIONNEMENTS MITOCHONDRIAUX	9
1.4.1.1 Le syndrome MERRF	10
1.4.1.2 Le syndrome MELAS  1.4.2 Dygrovycztowycznym MENER METOCHOWNOM A FET A POPTOSE	11 12
1.4.2 DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIALE ET APOPTOSE	13
1.5 LE MODELE CELLULAIRE 1.5.1 LES CELLULES CYBRIDES	13
1.5.1 APOPTOSE INDUITE DANS DES CELLULES CYBRIDES PORTEUSES DE LA MUTATION ASSOCIEE	
SYNDROME MERRF OU MELAS	14
1.5.2.1 Staurosporine	14
1.5.2.2 TNF alpha et TRAIL	15
1.5.2.3 Etoposide	15
2 MATERIELS ET METHODES	16
MATERIES ET METHODES	10
2.1 Cut tube cell ut albe et thattement avec diesebents inducteins de l'abortose	16
2.1 CULTURE CELLULAIRE ET TRAITEMENT AVEC DIFFERENTS INDUCTEURS DE L'APOPTOSE  DOSAGE DE PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD	17
<ul> <li>DOSAGE DE PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD</li> <li>DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA CASPASE-3</li> <li>MARQUAGES EN IMMUNOFLUORESCENCE ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCA</li> </ul>	18
2.4 MARQUAGES EN IMMUNOFLUORESCENCE ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCA	
19	
2.5 FRACTIONNEMENT CELLULAIRE ET PREPARATION DES LYSATS	20
2.6 WESTERN BLOT	21
2.6.1 ELECTROPHORÈSE	21
<u>2.6.1.1</u> <u>Tris-Glycine</u> :	
2.6.1.2 Nu-page:	21
	21 22
2.6.2 TRANSFERT DES ECHANTILLONS SUR UNE MEMBRANE DE PVDF	21 22 22
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION	21 22 22 23
	21 22 22
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION	21 22 22 23
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION	21 22 22 23
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION  DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA	21 22 22 23 <b>23</b>
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION 2.7 DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA  3 RESULTATS ET DISCUSSION	21 22 22 23 <b>23</b> <b>25</b>
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION 2.7 DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA  3 RESULTATS ET DISCUSSION  5.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES CELLULES PORTEUSES OU NO	21 22 23 23 23 25
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION 2.7 DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA  3 RESULTATS ET DISCUSSION  3.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES CELLULES PORTEUSES OU NO D'UNE MUTATION DANS L'ADN MITOCHONDRIAL.	21 22 22 23 <b>23</b> <b>25</b>
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION 2.7 DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA  3 RESULTATS ET DISCUSSION  5.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES CELLULES PORTEUSES OU NO	21 22 23 23 23 25
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION  2.7 DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA  3 RESULTATS ET DISCUSSION  3.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES CELLULES PORTEUSES OU NO D'UNE MUTATION DANS L'ADN MITOCHONDRIAL.  3.1.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE PAR LA STAUROSPORINE DANS DES CELLULES PORTEUSES DE LA MUTATION A3243G (MELAS).	21 22 23 23 23 25 ON 26
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION 2.7 DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA  3 RESULTATS ET DISCUSSION  3.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES CELLULES PORTEUSES OU NO D'UNE MUTATION DANS L'ADN MITOCHONDRIAL. 3.1.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE PAR LA STAUROSPORINE DANS DES CELLULES PORTEUSES DE LA MUTATION A3243G (MELAS).	21 22 23 23 23 25 ON 26
2.6.3 INCUBATION ET REVELATION 2.7 DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR UN KIT ELISA  3 RESULTATS ET DISCUSSION  3.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES CELLULES PORTEUSES OU NO D'UNE MUTATION DANS L'ADN MITOCHONDRIAL. 3.1.1 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE PAR LA STAUROSPORINE DANS DES CELLULES PORTEUSES DE LA MUTATION A3243G (MELAS). 3.1.1.1 Dosage de l'activité caspase 3 dans les cellules cybrides MELAS en réponse à la	211 222 232 233 235 25 260 260 260

<u>3.1.1.3</u> Etude de la fragmentation de l'ADN genomique dans les cellules cybrides MELAS en	
réponse à la staurosporine.	27
3.1.1.4 Conclusion	28
3.1.2 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE PAR LE TNFA, TRAIL OU L'ETOPOSIDE	
DANS DES CELLULES PORTEUSES DE LA MUTATION A8344G (MERRF).	29
3.1.2.1 Dosage de l'activité caspase 3 dans les cellules cybrides MERRF en réponse au TNFα,	
TRAIL ou l'étoposide.	29
3.1.2.2 Etude de la fragmentation de l'ADN génomique dans les cybrides MERRF en réponse au	
TNFα, TRAIL ou l'étoposide.	30
3.1.2.3 Conclusion	31
3.2 RECHERCHE DES MECANISMES DE L'HYPERSENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES	
CELLULES PORTEUSES D'UNE MUTATION DANS L'ADN MITOCHONDRIAL.	32
3.2.1 RECHERCHE DES MECANISMES SOUS-TENDANT L'HYPERSENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE	
DANS DES CELLULES CYBRIDES MELAS.	32
3.2.1.1 Étude de la localisation et de l'abondance du cytochrome c et de SMAC/DIABLO dans le	
cellules cybrides sauvages et mutées MELAS en réponse à la staurosporine.	32
3.2.1.2 Étude des inhibiteurs de caspases (IAPs) dans les cellules cybrides sauvages et mutées	
MELAS en réponse à la staurosporine.	34
3.2.1.3 Recherche de l'activation des caspases initiatrices dans les cellules cybrides sauvages et	
mutées MELAS en réponse à la staurosporine.	34
3.2.2 RECHERCHE DES MECANISMES DE L'HYPERSENSIBILITE A L'APOPTOSE INDUITE DANS DES	
CELLULES CYBRIDES MERRF.	35
3.2.2.1 Étude de la localisation et de l'abondance du cytochrome c et de SMAC/DIABLO dans le	
cellules cybrides sauvages et mutées MERRF en réponse à TRAIL et à l'étoposide.	36
3.2.2.2 Étude des inhibiteurs de caspases (IAPs) dans les cellules cybrides sauvages et mutées	2.7
MERRF en réponse à TRAIL et à l'étoposide.	37
4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
5 BIBIOGRAPHIE	_45

# 1. Introduction

# 1. Introduction



**Figure 1.1 : Structure de la mitochondrie.** La mitochondrie est délimitée par une double membrane. La membrane externe est très perméable contrairement à la membrane interne, qui est très imperméable. Elle est composée de nombreuses protéines dont les protéines de la chaîne de phosphorylation oxydative qui permet la synthèse d'ATP. A l'intérieur des membranes mitochondriales se trouve la matrice dans laquelle se situe l'ADN mitochondrial, des ribosomes, mais également de nombreuses enzymes. (Campbell and Reece 2004)

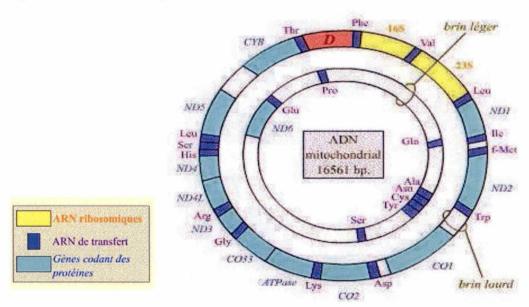


Figure 1.2.: Carte du génome mitochondrial humain. Cette carte du génome mitochondrial reprend les différentes protéines codées par le génome mitochondrial. Le génome code pour des ARN de transfert, les ARN ribosomiques et quelques protéines, comme le Cytochrome b (CYB) et l'ATP synthase (ATPase). Les deux brins complémentaires de l'ADN mitochondrial sont représentés par convention, et en référence à une légère différence de poids moléculaire, comme "brin léger" et "brin lourd"). En violet sont indiqués les gènes codant les ARNt noté par l'acide aminé qu'ils transportent. (www.snv.jussieu.fr)

#### 1 Introduction

#### 1.1 La mitochondrie

Une des différences les plus significatives entre les eucaryotes et les procaryotes est la présence de mitochondries (figure 1.1). Chaque cellule humaine contient en moyenne 1 500 mitochondries. Leur forme est variable, la plupart du temps régulière, soit cylindrique soit sphérique. Différentes études ont permis de montrer que la mitochondrie était loin d'être un organelle statique. Les mitochondries sont déformées par les courants cytoplasmiques qui les déplacent dans la cellule, mais elles peuvent également augmenter ou diminuer de volume, fusionner entre elles pour donner de longues mitochondries qui se fragmentent ensuite en mitochondries plus globulaires. Tous ces changements surviennent dans un laps de temps n'excédant pas quelques minutes. Ces changements sont fréquents: certains sont liés à la physiologie cellulaire, d'autres sont programmés et surviennent au cours du développement et de la différenciation cellulaire, et d'autres sont associés à certaines pathologies. La variabilité structurale des mitochondries est conditionnée par leurs rapports avec le cytosquelette. C'est pourquoi il est relativement vain de décrire avec précision la forme des mitochondries, tout comme il est illusoire de chercher à dénombrer exactement les mitochondries d'une cellule (Westermann 2008).

La mitochondrie aurait une origine endosymbiotique et serait le reliquat d'une bactérie Gram - ; ce qui expliquerait pourquoi cet organite possède son propre génome. En fonction des espèces, le génome mitochondrial peut coder un nombre variable d'ARN messagers, de transferts ou ribosomiaux. Chez l'homme, le génome mitochondrial est circulaire, il est composé de 16 569 paires de bases (Wallace 1982). Le génome de la mitochondrie est un génome réduit, si bien qu'il ne contient que 37 gènes chez l'homme (figure 1.2). La plupart des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale sont formés par la juxtaposition de polypeptides codés par de l'ADN mitochondrial et par l'ADN du noyau. Les protéines codées par l'ADN nucléaire sont synthétisées dans le cytosol, et possèdent une séquence d'adressage d'environ 15 à 30 acides aminés situés à leur extrémité N-terminale. Dans le génome mitochondrial, 13 gènes codent des protéines de la chaîne respiratoire dont sept sous-unités du complexe I (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5, 6), trois sous-unités du complexe IV (COI, II, III), deux sous-unités de l'ATPsynthase (ATPase 6 et 8) et une du complexe II (Chinnery et Schon 2003).

Dans le règne animal, l'ADN mt est transmis exclusivement de façon maternelle (Birky 2001). Toutes les copies d'ADN mt (polyplasmie) dans chacune des cellules d'un organisme possèdent généralement une séquence nucléotidique identique, une situation nommée homoplasmie (Ballard et Whitlock 2004). Cet ADN mt est caractérisé par un taux de mutation environ 10 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire. Ce phénomène est dû à l'absence de mécanisme efficace de réparation de l'ADN mt et éventuellement à des lésions provoquées par les radicaux libres dérivés de l'oxygène libérés au cours du processus de phosphorylation oxydative (Bohr et Anson 1999). Lorsque l'un de ces évènements survient, une des copies de ce génome peut être mutée, il existera donc à l'intérieur de la mitochondrie un mélange d'ADN mt sauvage (non muté) et d'ADN mt muté, en proportions variables : ce phénomène est appelé l'hétéroplasmie (Ballard et Whitlock 2004). Pour qu'une mutation affecte le phénotype, il faut qu'il y ait un nombre critique minimum d'ADN mt muté, au sein d'une cellule ou d'un tissu, pour restreindre sévèrement le métabolisme mitochondrial ; c'est ce qu'on désigne par 'l'effet seuil'. Le pourcentage seuil d'une mutation (situé généralement

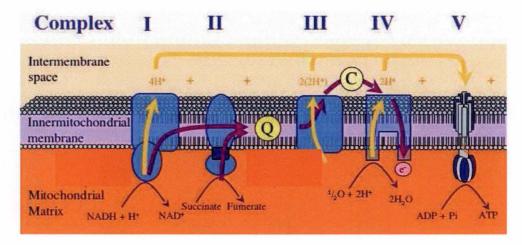


Figure 1.3 : OXPHOS. Le NADH véhicule les électrons de haute énergie issus de la glycolyse et du cycle de Krebs vers la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane mitochondriale interne. Les flèches mauves indiquent le trajet des électrons qui aboutissent à l'oxygène permettant la formation d'une molécule d'eau. La plupart des transporteurs d'électrons de la chaîne se trouvent réunis en 4 complexes (NADH-coenzyme Q oxydoréductase (I), succinate-coenzyme Q oxydoréductase (II), coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase (III), cytochrome c oxydase (IV)). Chacun est représenté par une forme irrégulière en bleu. Les électrons sont relayés entre ces complexes par deux transproteurs mobiles, l'ubiquinone (Q) et le cytochrome c, qui se déplacent rapidement dans le plan de la membrane. Lorsque les complexes I, III et IV de la chaîne acceptent puis cèdent des électrons, des protons sont prélevées dans la matrice et transportés dans l'espace intermembranaire; le nombre total de moles de protons ainsi prélevés varie de 8 à 10 pour chaque mole de NADH, selon les auteurs. L'énergie chimique est donc transformée en une force proton motrice sous la forme d'un gradient de H<sup>+</sup> à travers la membrane. Tout en suivant leur gradient électrochimique, les protons refluent dans un canal formé dans l'ATP synthétase, un autre complexe protéique situé dans la membrane. L'ATP synthétase exploite la force proton motrice pour phosphoryler l'ADP, ce qui produit de l'ATP. (http://billb.babs.unsw.edu.au.jpg)

entre 60 et 90%) désigne le niveau à partir duquel le nombre de copies d'ADN mt sauvages ne suffit pas à compenser les ADN mt mutés défectueux, engendrant alors de graves troubles mitochondriaux (Brown et Wallace 1994).

La mitochondrie est un organite qui assure beaucoup de réactions importantes pour la cellule : la respiration, le cycle de Krebs, le cycle de l'urée, la synthèse des stéroïdes et des groupements porphyriques des clusters Fe-S ou la  $\beta$ -oxydation des acides gras, mais nous ne détaillerons dans ce document que la fonction la plus connue de la mitochondrie ; la respiration cellulaire (Chinnery et Schon 2003).

#### 1.2 La respiration cellulaire

La mitochondrie est le siège de la phosphorylation oxydative. Elle fait intervenir des réactions d'oxydation qui aboutissent à une consommation d'oxygène et à la phosphorylation de l'ADP mitochondrial en ATP. La chaîne respiratoire est située dans la membrane mitochondriale interne. Cette chaîne de transport d'électrons est constituée de quatre complexes protéiques (figure 1.3).

La respiration cellulaire est un processus par lequel la mitochondrie permet la production d'énergie sous forme d'ATP. Le NADH produit lors du cycle de Krebs apporte deux électrons au complexe I, les électrons sont alors transportés vers le complexe III via le coenzyme Q10, et sont ensuite acheminés vers le complexe IV via le cytochrome c. Enfin, ce dernier complexe transfère ses électrons sur une molécule d'O<sub>2</sub>, ce qui permet la constitution d'une molécule d'H<sub>2</sub>O. Outre les électrons apportés par le NADH, des électrons peuvent également être cédés à la chaîne directement au niveau du complexe II par le succinate pour rejoindre ensuite le complexe III. Le complexe III quant à lui est capable de capter des électrons provenant du NADH cytosolique produit lors de la glycolyse à l'aide de la navette du glycérol phosphate, mais le complexe III peut aussi récupérer les électrons générés lors de la β-oxydation (Jakubowski, 2008).

Au cours de leur transport dans la chaîne respiratoire, les électrons perdent graduellement leur énergie. Cette énergie est récupérée par les différents complexes de la chaîne de phosphorylation oxydative pour permettre un transport de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce déplacement de protons génère un gradient électrochimique permettant le fonctionnement F1-F0 ATPsynthase. Ce complexe protéique a la capacité de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP en se servant du retour des protons dans la matrice. Fo est un canal transmembranaire qui laisse passer sélectivement les protons, F1 contient le site catalytique responsable de la synthèse de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (figure 1.4) (Chinnery et Schon 2003).

#### 1.3 L'apoptose

Jusqu'au début des années 70, la mort cellulaire par nécrose était la seule connue et considérée comme la conséquence de modifications délétères survenues dans l'environnement cellulaire. Depuis, on sait qu'il existe d'autres formes de mort cellulaire telles que l'autophagie ou l'apoptose).

L'autophagie est un processus durant lequel les organites et autres constituants cellulaires sont séquestrés dans une vacuole puis dégradés lorsque cette vacuole fusionne avec

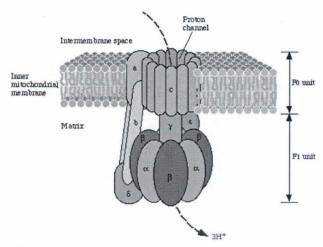


Figure 1.4 : Modèle représentant les structures de l'ATP synthase. Les sous-unités a, b,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ , constituent le stator du moteur et les sous-unités c,  $\gamma$  et  $\epsilon$  forment le rotor. Le flux des protons à travers la structure fait tourner le rotor; sa rotation entraı̂ne un cycle de modification de conformations des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et la synthèse de l'ATP. ( www.biologie.uni-hamburg.de)

les lysosomes. Ce processus est notamment déclenché lorsque la cellule est mise en situation de carence nutritionnelle, ce qui constitue un mécanisme de survie cellulaire. Poussée à l'extrême, l'autophagie peut entraîner la mort cellulaire (pour une revue, voir Hetz 2008).

C'est à un autre type de mort cellulaire que nous nous intéresserons dans cette introduction : l'apoptose. Celle-ci joue un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire et pendant toute la vie de l'organisme, dans l'homéostasie tissulaire et la destruction des cellules potentiellement dangereuses pour la survie de l'organisme. Une dérégulation de ce processus peut engendrer des pathologies telles que des cancers, des maladies neuro-dégénératives, cardiovasculaires ou encore immunologiques. L'apoptose fait appel à de nombreux effecteurs dont les plus connus sont les caspases (protéases à cystéine) (Zimmermann, Bonzon et al. 2001).

#### 1.3.1 Les caspases et leurs inhibiteurs

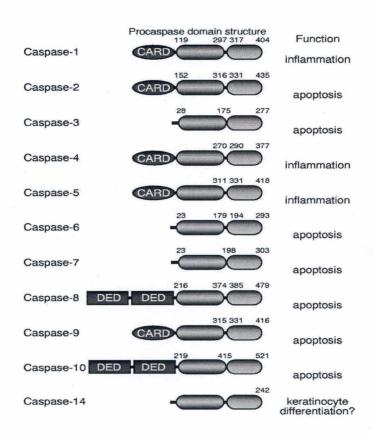
A ce jour, 14 caspases ont été référencées chez les mammifères, et 11 d'entre elles se retrouvent chez l'homme. Les caspases peuvent avoir principalement 2 fonctions : elles interviennent soit dans l'apoptose (caspase 2, 3, 6, 7, 8, 9, et 10), soit dans un processus inflammatoire (caspases 1, 4 et 5) (**figure 1.5**). Dans le cadre de cette introduction, seules les caspases qui jouent un rôle dans l'apoptose seront abordées.

Les caspases sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs, appelée procaspases, contenant trois domaines : le pro-domaine N-terminal, suivi de la large sous-unité contenant le site actif et le domaine C-terminal, plus petit. Les pro-caspases peuvent être converties en protéases matures sous l'effet du stimulus apoptotique par deux événements de clivage protéolytique au niveau de deux résidus aspartate. Tout d'abord, un premier clivage sépare la large et la petite sous-unité, ensuite, un second clivage sépare le prodomaine de la large sous-unité (**figure 1.6**). Des études cristallographiques ont montré que la caspase active était un tétramère composé de 2 petites et 2 grosses sous-unités et contenant donc 2 sites actifs (Hashimoto 1996).

Ces protéases clivant leurs substrats après un résidu aspartate (Asp). Il est important de souligner que les caspases possèdent dans leur séquence primaire des aspartates entre les différents domaines, ce qui peut expliquer les phénomènes d'activation en cascades et d'auto-activation des caspases lorsque les pro-caspases sont à proximité l'une de l'autre (figure 1.6).

Les caspases intervenant dans l'apoptose peuvent être classées selon leur intervention durant le processus de mort. Les premières sont les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) qui possèdent le plus souvent un long pro-domaine leur permettant d'interagir avec d'autres protéines. Leur activation est généralement déclenchée par leur oligomérisation après interaction avec une protéine adaptatrice. Ces interactions se font par des domaines nommés CARD (caspase-recruitement domain) et DED (death effector domain) (figure 1.5). Les caspases initiatrices n'induisent pas directement l'apoptose, mais agissent en amont de la deuxième classe de caspases nommées caspases effectrices (caspase-3; -6; -7). Celles-ci sont pourvues d'un pro-domaine plus court. Le clivage protéolytique par les caspases effectrices de substrats cellulaires au niveau d'un résidu aspartate est à l'origine de la plupart des caractéristiques phénotypiques de l'apoptose. Ainsi elles clivent les composants structuraux du cytosquelette et de la membrane nucléaire tels que l'actine, les cytokératines et les lamines.

Figure 1.5 : Les caspases humaines. Les caspases sont un groupe de protéases à cystéine. 11 membres sont connus chez l'homme, certaines interviennent dans le processus inflammatoires, d'autre ont un rôle l'apoptose. Les caspases-8 et -10 possèdent un motif DED (death effector domain) permettant leur recrutement dans le DISC au niveau de récepteurs de mort. Les caspases-2 et -9 possèdent quant à elles, un motif CARD (caspase recruitement domain) qui permet leur recrutement au niveau de l'apoptosome. Il est à noter que domaines CARD sont également présents chez les caspases inflammatoires (Fuentes-Prior P et Salvesen GS 2004



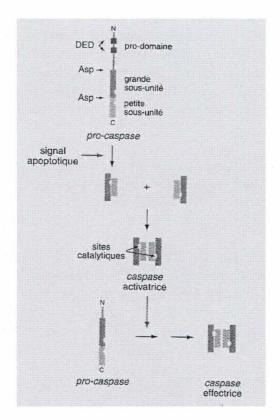


Figure 1.6 : Schéma reprenant le mode d'activation des caspases. Les caspases sont présentes dans cytoplasme sous forme inactive: les procaspases. Les procaspases peuvent ensuite être clivées et se dimériser pour former les caspases actives. Cette activation s'effectue d'abord par deux clivages protéolytiques successifs après un résidu aspartate (Asp), ensuite les sous unités s'assemblent en tétramères composés de deux petites et deux grandes sous-unités. (Moussard, 2005)

Les caspases sont aussi responsables de l'exposition des phosphatidylsérines à la surface de la membrane cellulaire permettant la phagocytose de la cellule apoptotique par les macrophages et les cellules voisines. De plus, les caspases inactivent des enzymes responsables de la stabilité, de l'intégrité et de la réparation de l'ADN, telles que la poly-(ADPribose) polymérase (PARP). Elles peuvent aussi cliver l'inhibiteur ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) et activer la nucléase CAD (caspase-activated DNAse) responsable de la fragmentation internucléosomale caractéristique de la chromatine. Il semblerait que plus de 400 protéines puissent faire l'objet d'un clivage par les caspases au cours du processus d'apoptose (Taylor, Cullen et al. 2008).

Bien que les caspases soient exprimées sous forme de pro-caspases inactives, il existe aussi des inhibiteurs endogènes de caspases, dénommés IAP (inhibitors of apoptosis protein) capables de réprimer leur activation dans la cellule. Les IAPs constituent une famille de protéines anti-apoptotiques initialement décrites dans le baculovirus. Actuellement huit IAPs ont été identifiées chez l'homme : c-IAP1, c-IAP2, NAIP (neuronal apoptosis IAP), survivine, XIAP (« X-linked IAP »), Bruce (BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme), ILP2 (Insulin-related peptide) et livine (figure 1.7). Les membres de la famille des IAP sont définis par une ou plusieurs répétitions d'un domaine de 70 acides aminés hautement conservés et organisés autour d'un atome de zinc, nommé BIR (Baculovirus IAP repeat) riche cystéines et histidines. À l'exception de NAIP et survivine, les IAPs humaines contiennent aussi une séquence RING à l'extrémité C-terminale, ayant une fonction E3 ubiquitine ligase. Le domaine RING est à l'origine du mode d'action principal des IAPs, puisque celles-ci se lient à leur substrat par leur(s) domaine(s) BIR et ensuite sont ubiquitinées. Cette ubiquitination engendre la dégradation des IAPs par le protéasome, mais également la dégradation des caspases qui leur sont associées (Wei, Fan et al. 2008). Cette inhibition directe de l'activité des caspases permet d'empêcher toute induction d'apoptose inappropriée : il s'agit d'une régulation supplémentaire de l'apoptose une fois que la cascade d'activation des caspases a été initiée. En effet, les cIAP1 et 2 ne peuvent pas se lier aux précurseurs des caspases 3 et 7, mais uniquement à leur forme active. Il n'est pas exclu que les IAPs puissent aussi inhiber une caspase initiatrice responsable de l'activation de la caspase 3 puisqu'il a été montré que ces deux IAPs étaient capables de bloquer le clivage de la pro-caspase 3 (Roy, Deveraux et al. 1997).

Les IAPs peuvent elles-mêmes être régulées par des protéines mitochondriales, Smac/Diablo et Omi/HtrA2 qui, une fois libérées dans le cytosol, régulent l'action inhibitrice des IAPs. En se fixant directement sur les IAPs, SMAC/DIABLO et Omi/HtrA2 empêchent les IAPs de se fixer les caspases (Srinivasula et Ashwell 2008).

Les cIAP1 et 2 peuvent avoir une autre fonction, car celles-ci sont reconnues pour se lier au domaine cytosolique du récepteur II au TNF (TNFRII) à l'aide de protéines adaptatrices TRAFI et TRAF2 (TNF-Receptor-Associated Factor). Le recrutement des IAPs par TRAF 1 et 2 en cas de stimulus apoptotique les empêcherait d'atteindre leurs caspases cibles (Roy, Deveraux et al. 1997).

#### 1.3.2 L'apoptose : les différentes voies de la mort cellulaire programmée

On peut distinguer deux types de processus menant à l'apoptose : les voies canoniques ou les voies non-canoniques. Les voies canoniques sont les voies les plus connues qui sont caractérisées par un déclanchement directement dépendant de la mitochondrie (la voie

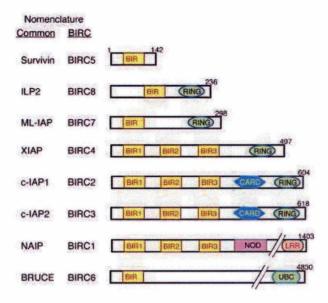


Figure 1.7 : Schéma représentant les domaines protéiques présents dans les inhibiteurs de caspases chez l'homme. Les IAPs (inhibitor of apoptosis protein) sont des protéines qui inhibent l'apoptose en se liant directement aux caspases (aussi bien activatrices, qu'effectrices) empêchant ainsi leur clivage et leur activité .Les IAPs possèdent des domaines BIR permettant l'interaction avec les caspases, tandis que le domaine RING a une fonction d'ubiquitine ligase. Ainsi, en se liant aux caspases, ces inhibiteurs engendrent leur dégradation par le protéasome. Les c-IAPs1 et 2 possèdent également un domaine CARD (caspase-recruitement domain) (Srinivasula 2008).

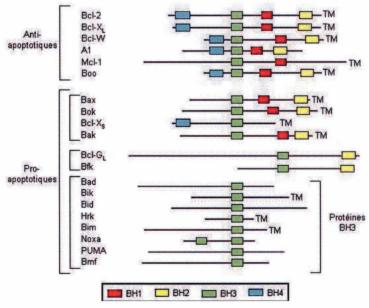


Figure 1.8.: Les protéines de la famille Bcl-2. Les protéines de la famille Bcl-2 sont subdivisées en 3 catégories : les anti-apoptotiques, les pro-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques dites BH3-only ne présentant que le domaine BH3 (N Mohammad et al, 2005).

intrinsèque) ou activée par la liaison de cytokines sur leurs récepteurs membranaires (la voie extrinsèque). Les voies non canoniques, plus récemment décrites elles, sont caractérisées par un déclanchement de la voie par le réticulum endoplasmique ou du lysosome. Ces voies non canoniques peuvent elles-mêmes être divisées en deux catégories; les voies qui font intervenir les caspases et celles complètement indépendantes des caspases.

#### 1.3.2.1 L'apoptose : les voies canoniques

De manière canonique, les cellules peuvent rentrer en apoptose par la voie intrinsèque, directement dépendante de la mitochondrie, et la voie extrinsèque, activée par la liaison de cytokines sur leurs récepteurs membranaires.

#### 1.3.2.1.1 La voie intrinsèque

La mitochondrie joue un rôle déterminant dans le déroulement de l'apoptose et dans sa régulation, en particulier dans la voie intrinsèque. Lors d'un stimulus apoptotique perçu, une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial est observée suite à l'ouverture de pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPT ou Mitochondrial Permeability Transition). Cette ouverture, qui entraîne la libération de protéines apoptogènes dans le cytosol, est finement régulée par les protéines de la famille Bcl-2.

Les membres de la famille Bcl-2 sont définis par la présence d'au moins un domaine BH (Bcl2-homology domain). Cette famille se divise en deux groupes : les membres anti-apoptotiques qui contiennent quatre domaines BH (dont Bcl2, BclxL, Mcl1 et Bclw) et les membres pro-apoptotiques qui eux-mêmes sont subdivisés en deux groupes, les membres pro-apoptotiques à domaines BH multiples (dont Bax et Bak), dépourvus de domaine BH4, et les membres pro-apoptotiques, appelés BH3 only, ne contenant que le domaine BH3 (dont Bid, Bad et Bim). Ce domaine BH3 est nécessaire et suffisant pour leur action pro-apoptotique. Il interagit avec la poche hydrophobe constituée par les domaines BH1, BH2 et BH3 des membres anti-apoptotiques (figure 1.8) (Zimmermann, Bonzon et al. 2001).

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, soit par la formation de canaux, soit par la formation de pores lipidiques, soit par la formation de canaux chimériques et par l'ouverture de pores existants. La première hypothèse suggère que les protéines pro-apoptotiques telles que Bax puissent s'oligomériser et engendrer la formation d'un pore non spécifique (figure 1.9 A). La seconde hypothèse serait que l'insertion de Bax en membrane, son oligomérisation et l'interaction éventuelle avec tBid engendrerait la formation d'un pore, augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale externe (figure 1.9 B). La troisième hypothèse propose l'ouverture du canal anionique VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), suite à l'interaction de ses constituants avec Bax. VDAC est un canal ionique situé en membrane mitochondriale externe où il est très abondant (figure 1.9 C). Le dernier modèle quant à lui propose la formation qu'un complexe protéique en membrane interne et externe, appelé le « permeability transition pore » (PTP) qui résulterait de l'interaction de Bax avec VDAC. L'ouverture de ce pore permettrait l'entrée de solutés et d'eau dans la mitochondrie, ce qui conduirait au démantèlement de la membrane externe, augmentant ainsi la perméabilité de cette membrane (figure 1.9 D) (Kroemer et Reed 2000; Bolduc, Ouellet et al. 2003).

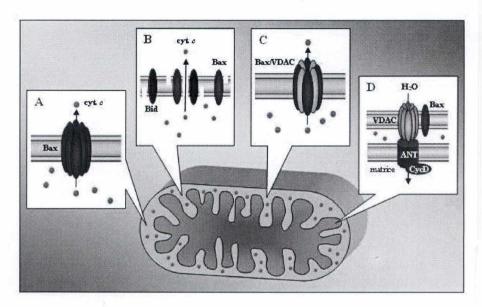


Figure 1.9: Mécanismes de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2. (A) Formation de canaux par Bax ou Bak. (B) Déstabilisation de la membrane par Bax ou tBid. (C) Formation de canaux chimériques, comme Bax/VDAC. (D) Ouverture du PTP (qui comprend entre autres VDAC, ANT et la cyclophiline D), par exemple sous l'influence de Bax, ce qui cause un appel d'eau dans la matrice qui conduit à l'éclatement de la membrane externe (Bolduc, Ouellet et al. 2003).

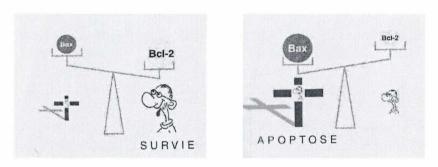


Figure 1.10.: La balance entre les facteurs pro- (BAX) et anti (BCl-2) apoptotiques conditionne la mort cellulaire. Les protéines codées par les gènes de la famille Bcl-2 régulent soit positivement soit négativement l'apoptose. A la suite d'un signal apoptotique, les protéines pro-apoptotiques s'insèrent dans la membrane mitochondriale et induisent sa perméabilisation : ainsi Bax favorise la libération des facteurs mitochondriaux (cytochrome c) dans le cytoplasme .Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 associées aux membranes de la mitochondrie contrôlent leur perméabilité en inhibant le PTP (permeabilité tansition pore). Les niveaux relatifs des protéines pro- et anti-apoptotiques déterminent la sensibilité de la cellule à un stimulus de nature apoptotique . (Moussard, 2005)

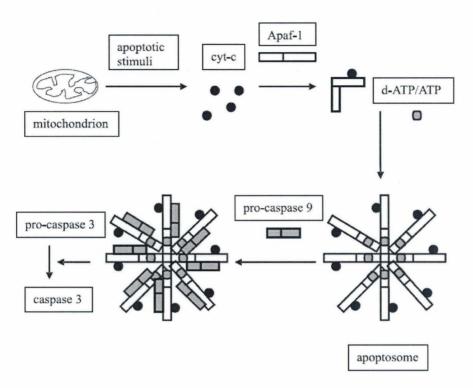


Figure 1.11.: Formation de l'apoptosome. Le cytochrome c libéré de la mitochondrie interagit avec la protéine cytosolique Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) et avec la procaspase-9, en présence de d-ATP pour former «l'apoptosome», complexe multiprotéique à l'origine de l'activation de la caspase-9 (clivage autocatalytique de la procaspase-9) puis de la caspase-3 (N Mohammad and al, 2005).

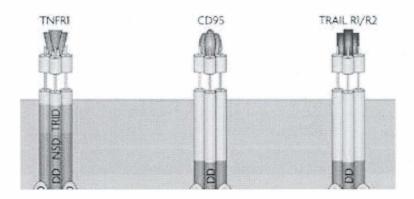


Figure 1.12.: Caractéristiques structurales communes du récepteur au TNF (TNFR1), Fas (CD95), ou le récepteur au TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). 1) une région N-terminale extracellulaire, pourvue du domaine de liaison au ligand et contenant plusieurs domaines riches en résidus cystéine 2) une courte séquence transmembranaire. 3) une région C-terminale intracellulaire, pourvue d'un domaine responsable de la transduction du signal apoptotique appelé domaine de mort" ou DD (Death Domain) qui peut s'associer aux domaines DD équivalents d'autres molécules de signalisation (Wang, 2003).

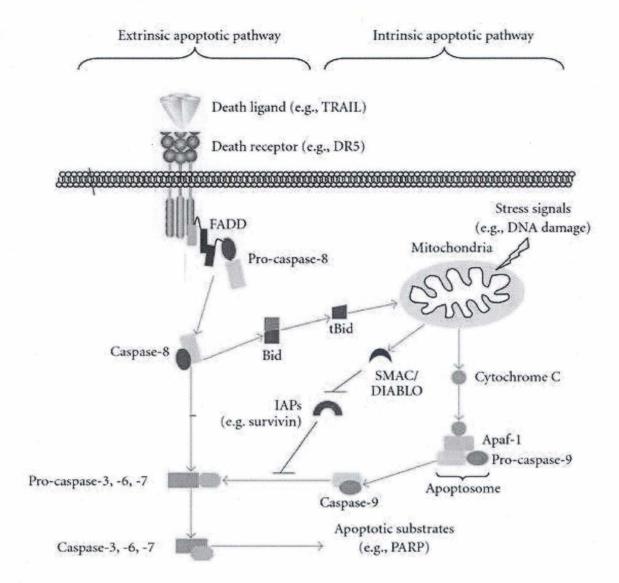


Figure 1.13.: Les différentes voies de l'apoptose canonique. La voie de droite est la voie intrinsèque passant par la perméabilisation de la mitochondrie, qui est initiée suite à un déséquilibre entre facteurs pro- et anti-apoptotiques. Lorsque les facteurs proapoptotiques sont plus abondants que les facteurs anti-apoptotiques, ils oligomérisent et provoquent une augmentation de la perméabilité membranaire suivie d'une libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol tel que le cytochrome c qui participe à la formation de l'apoptosome et Smac/Diablo qui inhibe les inhibiteurs de caspases. La voie de gauche est la voie extrinsèque qui passe par les répecteurs de mort (ex : TRAIL). par son ligand permet l'assemblage d'un complexe L'activation d'un récepteur multiprotéique cytoplasmique (contenant la protéine FADD) appelé DISC (death-inducing signaling complex). Ce complexe enclenche de la cascade apoptotique par activation de la procaspase-8. Au terme de cette cascade, c'est la caspase effectrice 3 qui est activée. Le clivage de la protéine Bid assure un lien entre les voies extrinsèque et intrinsèque. En effet, après translocation, tBid provoque une augmentation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, la libération du cytochrome c et donc l'activation des caspases effectrices permet l'accomplissement de l'apoptose (Elrod, 2008)

L'action principale des membres anti-apoptotiques se situe au niveau de la membrane mitochondriale en empêchant sa perméabilisation. En situation normale, non apoptotique, les facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> se localisent en membrane mitochondriale externe afin d'empêcher la perméabilisation de la mitochondrie en formant des hétérodimères avec des partenaires protéiques pro-apoptotiques comme Bax, et Bak. De par cette interaction, l'oligomérisation de ces facteurs pro-apoptotiques est bloquée, empêchant la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale.

Après un stimulus apoptotique, les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont activés de différentes manières. Par exemple, Bid est activé par clivage protéolytique par la caspase 8 ce qui permettra son insertion dans la membrane externe mitochondriale. La déphosphorylation de Bad entraîne sa dissociation des protéines 14-3-3, ce qui lui permet de se localiser dans la membrane mitochondriale externe et d'inactiver Bcl-2/BclxL. L'augmentation de l'abondance des membres pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale externe et leur oligomérisation, serait à l'origine de l'augmentation de la perméabilité de la mitochondrie par formation de pores (figure 1.10) (Kim, Emi et al. 2006).

La création de ces pores permet une sortie de facteurs apoptogènes intermembranaires mitochondriaux comme le cytochrome c, SMAC/Diablo ou Omi/HtrA2. Comme énoncé précédemment, SMAC/Diablo et Omi/HtrA2 sont des inhibiteurs des IAPs. Lorsque ces facteurs sont libérés dans le cytosol ceux-ci interagissent avec les IAPs et lèvent l'inhibition des caspases exécutrices. Le cytochrome c est une protéine qui joue un rôle dans la chaîne respiratoire de transport des électrons, où il permet le passage des électrons du complexe III au complexe IV (voir point 1.2). Une fois dans le cytosol, le cytochrome c participe à la constitution de l'apoptosome, avec la pro-caspase 9 et Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor). La constitution de l'apoptosome va permettre l'autoactivation des pro-caspases-9 en caspases actives, qui vont à leur tour permettre l'activation des caspases effectrices 3 et 7 qui mèneront à la mort cellulaire (figure 1.11) (Zimmermann, Bonzon et al. 2001).

D'autres protéines peuvent être libérées de la mitochondrie, mais celles-ci sont principalement connues pour avoir une action de dégradation de l'ADN. La première est AIF (apoptosis-inducing factor), qui est une flavoprotéine de 57 kD, peut migrer dans le noyau où elle va exercer son activité de condensation de la chromatine et mener à la dégradation de l'ADN. La deuxième, l'endonucléase G est protéine de 30 kD qui une fois libérée de la mitochondrie et localisée dans le noyau, induit la fragmentation de l'ADN (Broker, Kruyt et al. 2005).

#### 1.3.2.1.2 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est médiée les récepteurs « de mort » qui sont pour la plupart des récepteurs de la superfamille du TNF. Les récepteurs les plus importants de la famille sont le récepteur au TNFα (TNFR1), Fas (CD95), ou le récepteur au TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Ces récepteurs possèdent des caractéristiques structurales communes (**figure 1.12**) La liaison d'un ligand (FasL, TNFα ou TRAIL) spécifique à un de ses récepteurs induit la trimérisation de ce dernier et une modification de conformation du domaine de mort (death domain : DD) qui permet la formation en membrane d'un complexe appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Le complexe DISC comprend la molécule adaptatrice FADD et les pro-caspase-8 ou -10 activés par rapprochement et autoclivage. L'activation de la caspase-8 ou -10 va permettre l'activation de la caspase-8, en plus d'activer la caspase de différents substrats menant à la mort cellulaire. La caspase-8, en plus d'activer la caspase

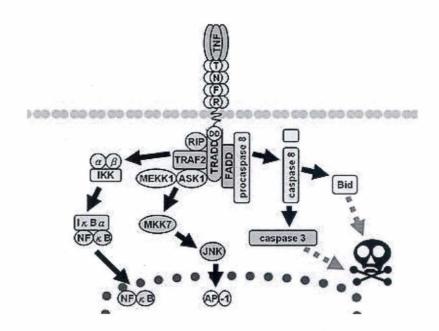


Figure 1.14 : Voies d'activation de du TNFα. 3 voies sont possibles lors de l'activation du récepteur au TNF α. Les deux voies passant par le complexe formé par TRAF2 permettent l'activation de NF $\kappa$ B ou AP1 qui mèneront à la survie de la cellule. La voie passant par le FADD par contre mènera à l'activation de l'apoptose (Hersey et al., 2001).

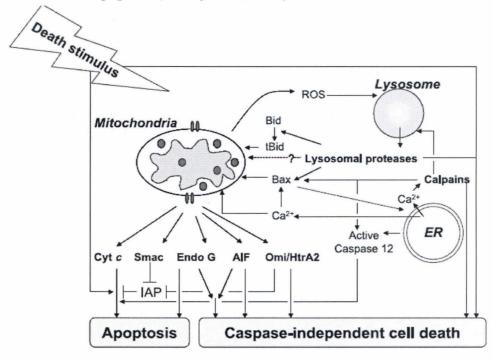


Figure 1.15 : L'apoptose caspase (in)dépendante. A la suite d'un stimulus apoptotique, la cellule peut enclencher différents mécanismes d'apoptose qui peuvent être exécutés via des caspases ou indépendamment des caspases. Les mitochondries, les lysosomes et le réticulum endoplasmique peuvent être impliqués dans les différentes voies. (Broker *et al.*, 2005).

3, peut aussi cliver Bid en tBid, ce qui, comme expliqué précédemment, va engendrer une libération des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux dans le cytosol. De cette manière, l'apoptose médiée par la voie de récepteurs est également reliée à la voie mitochondriale (Mohamad, Gutierrez et al. 2005).

Le récepteur TRAIL, qui nous intéressera dans la suite de ce travail, est capable de déclencher l'apoptose dans une variété de lignées cellulaires tumorales, mais pas dans la plupart des cellules normales, mettant en évidence son potentiel d'application thérapeutique dans le traitement des cancers. Bien que la principale fonction biologique de TRAIL semble être l'induction de l'apoptose, le rôle physiologique complet de ce ligand n'est pas encore pleinement compris. TRAIL induit l'apoptose par le biais de l'interaction avec ses récepteurs. Jusqu'à présent, quatre homologues des récepteurs humains de TRAIL ont été identifiés : DR4, Dr5, TRID/DcR1/TRAIL-R3 et TRAIL-R4/DcR2. Seuls les récepteurs de mort DR4 et Dr5 contiennent un domaine de mort qui permet d'induire l'apoptose. Les trois autres récepteurs semblent agir comme des inhibiteurs des récepteurs DR4 et Dr5. La liaison de TRAIL à son récepteur entraîne donc la trimérisation du récepteur et le regroupement de l'ensemble des domaines de mort, conduisant à la formation du complex DISC et à l'apoptose, comme illustré à la figure 1.13 (Finnberg et El-Deiry 2008).

Le récepteur de TRAIL activé ou le récepteur du TNF $\alpha$  activé peuvent aussi, en fonction des protéines avec lesquelles ils interagissent, déclencher une cascade favorisant la survie cellulaire, par la voie de NF $\kappa$ B. Il est donc possible que TRADD recrutes TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) et RIP (receptor-interacting protein), plutôt que le complexe DISC. Il est amusant de noter que l'interaction entre TRAF2 et RIP est facilitée par cIAP1 ou -2, qui catalysent la poly-ubiquitination non-dégradative de TRAF2. TRAF2 recrute à son tour la protéine kinase IKK (IKB KINASE). IKK va permettre phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ , qui en conditions basales séquestre NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme. Suite à cette phosphorylation, I $\kappa$ B $\alpha$  est dégradé, permettant à NF- $\kappa$ B de migrer dans le noyau (**figure 1.14**). NF $\kappa$ B est un facteur de transcription qui déclenche la transcription d'une vaste gamme de gènes, dont certains impliqués dans la survie cellulaire comme les gènes BIRC2 et BIRC3, codant respectivement pour cIAP1 et 2 (Grivennikov, Kuprash et al. 2006).

#### 1.3.2.2 L'apoptose non-canonique

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases a montré que les caspases ne sont pas nécessairement responsables de la mort cellulaire dans tous les modèles d'apoptose. En effet, la fragmentation internucléosmale de l'ADN peut parfois s'observer en présence d'inhibiteurs de caspases. Les deux familles de protéines impliquées dans une apoptose caspase-indépendante sont les calpaines et les cathepsines (revues dans Broker et al, 2005) (figure 1.15)

Les calpaïnes forment un groupe de cystéine protéases dépendantes du Ca<sup>2+</sup> et localisées au niveau du cytosol. Les deux calpaïnes les plus répandues sont la μ-calpain (ou calpain I) et m-calpain (calpain II). Les calpaïnes sont composées de deux sous-unités, une grande sous-unité catalytique d'environ 80 kDa, et une plus petite sous-unité d'environ 30 kDa. Les grandes sous-unités sont spécifiques à chaque calpaïnes et sont codées par des gènes distincts, tandis que la petite sous-unité est partagée entre les différentes isoformes. L'activité des calpaïnes est influencée par plusieurs facteurs, dont le plus important est la concentration en Ca<sup>2+</sup> (Tagliarino, Pink et al. 2003).

Des études ont montré qu'à l'aide d'inhibiteur de calpaïne I, on pouvait dans certains cas précis bloquer la fragmentation de l'ADN et la perte de viabilité cellulaire (Broker, Kruyt et al. 2005). Bien que les mécanismes par lesquels les calpaïnes puissent déclencher l'apoptose ne soient pas encore complètement élucidés, l'indentification des substrats de ces protéases permet de penser que les calpaïnes ont un rôle important dans la destruction de l'architecture cellulaire. Citons par exemple l'actine, la filamine ou l'intégrine bêta3 qui sont des protéines associées au cytosquelette. D'autres substrats tels que p53, les pro-caspases-3 et -9 et Bax laissent penser que les calpaïnes peuvent jouer un rôle dans l'apoptose. Cependant, l'impact du clivage de ces protéines par les calpaïnes, est encore mal compris. Un certain nombre d'études ont mis en évidence une relation entre les calpaïnes et les caspases. Dans certains cas, l'activation des caspases précède celle des calpaïnes, tandis que dans d'autres cas, le contraire est constaté ; il semble probable que la relation entre les caspases et calpaïnes varie selon le modèle cellulaire (type cellulaire et inducteur apoptotique) (Broker, Kruyt et al. 2005).

Les cathepsines sont une famille de protéases composée d'au moins 12 membres. Celleci peut être subdivisé en trois groupes distincts : (1) sérine protéases (Cathepsines A et G), (2) cystéine protéases (Cathepsines B, C, H, K, L, S et T), et (3) aspartate protéases (Cathepsines D et E). Comme les caspases, les cathepsines sont synthétisées sous forme inactives et leur activation nécessite un processus protéolytique. La participation des cathepsines dans l'apoptose a surtout été démontrée pour les cathepsines B et D, qui se trouvent principalement dans les lysosomes ou les endosomes. Certains stimuli apoptotiques peuvent provoquer la libération dans le cytosol de ces cathepsines, leur permettant de dégrader certains substrats qui mèneront à la mort cellulaire (Chwieralski, Welte et al. 2006).

Enfin, il faut mentionner que des processus de mort cellulaire par apoptose peuvent aussi se dérouler de manière non-canonique tout en impliquant des caspases. Il s'agit de l'apoptose non-canonique caspase-dépendante. Le cas le mieux connu est celui de la caspase 4 humaine, homologue de la caspase 12 murine. Suite à un stress du réticulum endoplasmique, la concentration calcique intracellulaire peut augmenter ce qui permettra l'activation des calpaïnes qui pourront cliver la caspase 4 et donc l'activer. La caspase 4 active est capable de cliver la caspase-3, déclenchant l'apoptose de la cellule sans que la mitochondrie n'ait été perméabilisée (Broker, Kruyt et al. 2005).

Le but de ce travail étant d'étudier le phénomène d'apoptose induite dans le cadre du dysfonctionnement mitochondrial, nous allons poursuivre cette introduction en développant succinctement les différents types de dysfonctionnements mitochondriaux, mais nous détaillerons davantage les deux dysfonctionnements qui ont fait l'objet de ce travail : MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers) et MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis et Stroke-like episodes).

#### 1.4 Les dysfonctionnements mitochondriaux

Au cours des années 60, les premières myopathies mitochondriales ont été décrites chez des patients atteints de faiblesses musculaires qui présentaient une accumulation excessive de mitochondries au niveau des muscles. Cette accumulation a pu être mise en évidence par une coloration au trichrome de Gomori qui est à l'origine du terme de « fibres rouges » (ragged-red fibers ou RRF), qui a par la suite été associé à de nombreuses myopathies mitochondriales

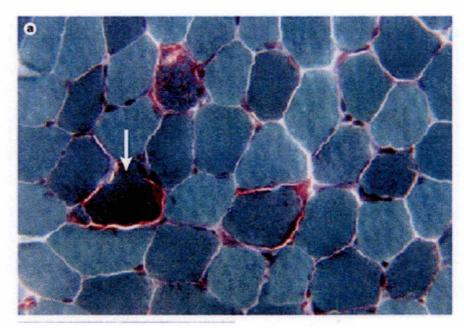


Figure 1.16.: Coupe dans une biopsie musculaire d'un patient atteint d'un dysfonctionnement mitochondrial. Une coloration au trichrome de Gomori révèle la présence de Ragged-red fibres (flèche blanche) (Dimitri P, 2006)

(figure 1.16). Par la suite, il a été montré également que l'absence de RRF dans la biopsie, n'excluait pas une étiologie mitochondriale. L'exemple le plus connu est le syndrome de Leigh, une encéphalomyopathie qui touche les enfants et qui provoque un dysfonctionnement mitochondrial qui n'est presque jamais accompagné de RRF. De manière générale, un dysfonctionnement mitochondrial se définit par un dysfonctionnement du système des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) (Shoubridge 1994; DiMauro 2004).

Ces dysfonctionnements mitochondriaux trouvent leurs sources dans une ou des mutations qui touchent directement ou indirectement les OXPHOS. Les phénotypes et symptômes associés à ces pathologies sont très hétérogènes et peuvent affecter différents tissus et organes. Des mutations différentes peuvent conduire à un même phénotype (convergence) et une même mutation peut provoquer des phénotypes différents (recouvrement). Etant donné la double origine génétique des protéines constituant les complexes des OXPHOS, ces pathologies peuvent donc résulter de mutations ou délétions de gènes nucléaires et / ou mitochondriaux (DiMauro 2004).

Les troubles dus à des mutations dans l'ADN nucléaire (ADNn) sont très nombreux, non seulement parce que la plupart des sous-unités de la chaîne respiratoire sont codées par le noyau, mais aussi et surtout parce que l'assemblage et le fonctionnement de la chaîne respiratoire sont régulés par de nombreuses protéines qui sont codées par l'ADNn. Le syndrome de Leigh est un exemple de maladie mitochondriale provoquée par une mutation dans l'ADNn. Ce syndrome est caractérisé par des lésions neuropathologiques associant en particulier une atteinte du tronc cérébral et des ganglions de la base. Sa prévalence est estimée à une naissance sur 36 000. Les mutations associées au syndrome de Leigh sont multiples ; elles se trouvent sur un gène codant soit une des sous-unités du complexe de la pyruvate déshydrogénase, soit une des sous-unité des complexes respiratoires I ou II. Quelle que soit la mutation, on observe chez ces patients une diminution importante de la production ATP (Finsterer 2008).

Les mutations pathologiques au sein du génome mitochondrial sont classées en fonction du fait qu'elles affectent la synthèse protéique mitochondriale dans son ensemble, en touchant un ARNt ou un ARNr, ou qu'elles affectent un gène codant un peptide mitochondrial en particulier. Un syndrome représentatif de ce type de mutation est NARP (Neuropathy, Ataxia, Retinosis Pigmentosa), associé à la mutation T8993G dans le gène MTATP6, codant la sous-unité 6 de l'ATPase. Cette mutation aboutit au remplacement de la leucine 156 hautement conservée par une arginine (L156R). Ceci entraîne une diminution sévère de la synthèse d'ATP par OXPHOS. Ce syndrome se caractérise par une neuropathie sensorielle, une ataxie cérébelleuse, et une cécité nocturne. (Fong et Craig 1999).

Les délétions de l'ADN mt affectent les ARNt et les gènes codant des peptides de la chaîne respiratoire. Suite à ces délétions, une diminution de l'expression des protéines codées par le génome mitochondrial est observée quelle que soit la taille de la délétion. La délétion la plus connue et appelé déplétion commune, fait 5Kb et est présente chez beaucoup de patients atteints de ces 3 syndromes : syndromes de Pearson, de Kearns-Sayre et de la PEO (Progressive External Ophtalmoplegia). Ces trois syndromes sont caractérisés par des ataxies, des problèmes de conduction cardiaque, de démence et des problèmes rénaux (Wang, Silva et al. 2001).

A l'heure actuelle, on recense de plus en plus de mutations ponctuelles délétères dans l'ADNmt humain. Les pathologies associées les plus décrites sont les syndromes MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers) et MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis et Stroke-like episodes)

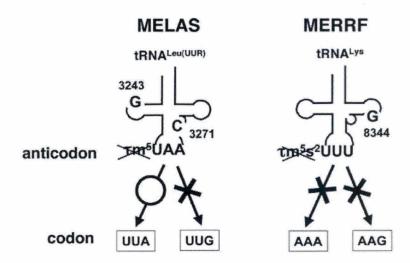


Figure 1.17.: Représentation de l'ARNt leucine et lysine dans le cadre des pathologies MERRF et MELAS. A gauche, l'ARNt mitochondrial portant la leucine touché par la mutation A3243G provoquant le syndrome MELAS et à droite, l'ARNt lysine touché par la mutation A8344G provoquant le syndrome MERRF. Suite à cette mutation, la première uridine de ces deux ARNt ne subit pas de modification post-transcriptionnelle contrairement à la même uridine d'un ARNt sauvage, ce qui engendre des problèmes de reconnaissance codon-anticodon lors de la traduction des protéines mitochondriales (Yasukawa et al. 2001).

#### 1.4.1.1 Le syndrome MERRF

Le syndrome MERRF est caractérisé par la substitution d'une adénine (A) par une guanine (G) en position 8344 dans le gène codant l'ARN de transfert de la lysine (ARN $_t^{Lys}$ ). Cette mutation est maintenant reconnue pour affecter la conformation 3D de la molécule d'ARN $_t^{Lys}$ , en modifiant plus précisément la structure de la boucle  $T\psi C$  (figure 1.17). Des découvertes faites sur la maturation et les modifications post-transcriptionnelles des ARNt mitochondriaux, ont montré que dans le cas de l'ARN $_t^{Lys}$ , l'ajout d'un groupement 5-taurinomethyl2-thiouridine (tm5s2U) sur le premier nucléotide de l'anticodon de l'ARNt paraît essentiel pour sa maturation. L'ajout de ce groupement se fait en 2 étapes : la première est une modification en C5 de la base de l'anticodon et la deuxième est une 2-thiolisation du groupement taurine ajouté. Les enzymes catalysant ces réactions sont respectivement MSS1/MTO1 (mitochondrial translation optimization) et MTU1 (mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase). L'enzyme MSS1/MTO1 modifie l'uridine de l'anticodon afin que le groupement taurine y soit ajouté et l'enzyme MTU1 catalyse le remplacement d'un oxygène en position 2 sur la base par un soufre (Kirino et Suzuki 2005).

Dans le cadre du syndrome MERRF, la mutation en position 8344 altérant la conformation de l'ARNt, les enzymes MUT1 et MTO1 ne peuvent plus interagir avec l'ARNt et la modification post-transcriptionnelle de la première uridine de l'anticodon ne peut être réalisée. Sans cette modification, l'ARNt ne peut plus reconnaître les codons AAA et AAG. (figure 1.17) (Kirino et Suzuki 2005).

Cette mutation altère donc la traduction mitochondriale en entraînant soit des erreurs de lecture dues au changement de phase de lecture, soit en entraînant une terminaison prématurée de la traduction. Un modèle décrit dans une étude de Anne Chomyn (1998), montre qu'à chaque codon correspondant à une lysine, il y a 26% de probabilité que l'allongement de la chaîne peptidique prenne fin. Ainsi, les polypeptides avec un nombre relativement important de résidus lysine, comme par exemple ND2 (la sous-unité 2 de la NADH déshydrogénase), avec 12 lysines, auraient seulement une très faible chance d'être terminés. Par conséquent, la cellule doit faire face à une synthèse de protéines mitochondriales principalement non fonctionnelles et à l'accumulation de peptides tronqués dans la mitochondrie. Suite au défaut de synthèse protéique, l'activité de la chaîne respiratoire est sévèrement touchée (Chomyn 1998). Une diminution de la consommation en oxygène et du potentiel de membrane est constatée dans des modèles in vitro ainsi qu'une augmentation de la production en acide lactique (dû à l'augmentation de l'activité glycolytique). Ces altérations mènent donc à une diminution de la production d'ATP par la mitochondrie (Jacobs 2003). En réponse à une déficience mitochondriale, le nombre de mitochondries augmente dans les cellules porteuses de la mutation et ce plus particulièrement dans les cellules des muscles squelettiques, générant les Ragged Red Fibers (figure 1.16). Ce phénomène est probablement le résultat d'une activation compensatrice de la biogenèse mitochondriale en réponse au dysfonctionnement de l'organite (James, Wei et al. 1996).

Si les Ragged Red Fibers caractérisent au niveau tissulaire les muscles de patients atteints du syndrome MERRF, les symptômes associés à cette maladie sont des épilepsies myocloniques, des ataxies, des myopathies mitochondriales et généralement une perte de l'audition. Puisque la mutation responsable du syndrome se trouve à l'état hétéroplasmique, la proportion d'ADN muté varie non seulement d'une cellule à l'autre, mais également d'un tissu

à l'autre, ce qui peut expliquer pourquoi l'on rencontre des symptômes très variables chez les patients souffrant du syndrome MERRF (Chomyn 1998).

#### 1.4.1.2 Le syndrome MELAS

Le syndrome MELAS est caractérisé par plusieurs mutations bien connues, la plus courante est une substitution d'une adénine (A) par une guanine (G) en position 3243 dans le gène codant pour l'ARN de transfert de la leucine reconnaissant le codon UUR (ARN<sub>t</sub><sup>Leu</sup> (UUR)).

Tout comme dans le cadre du syndrome MERRF, la mutation A3243G est connue pour affecter les modifications post-transcriptionelles de l'ARN<sub>t</sub><sup>Leu</sup> (UUR). En temps normal, cette ARNt se voit greffer un groupement 5- taurinomethyl (tm5U) par une synthétase sur l'uridine de l'anticodon.

Tout comme les ARNt codés par le génome nucléaire, la plupart des ARNt mt sont capables de reconnaître plus d'un codon. Ce phénomène décrit par Francis Crick établit que les 2 premières bases du codon s'apparient selon la règle de Watson-Crick, tandis que la troisième par contre n'obéit pas strictement à cette règle; on dit que la troisième base a une position de flottement (wobble). Sans sa maturation, l'ARN<sub>t</sub><sup>Leu</sup> (UUR) reconnaît toujours le codon UUA mais ne reconnaît plus le codon UUG, puisque le premier nucléotide de l'anticodon a perdu sa flexibilité de reconnaissance des bases qui lui correspondent (**figure 1.17**). Cette mutation altère donc aussi la traduction mitochondriale (Kirino, Goto et al. 2005) caractérisée dans cette pathologie par une diminution de l'incorporation de la leucine dans les protéines qui contiennent cet acide aminé. En effet, il a été montré à l'aide de leucine <sup>3</sup>H, que l'incorporation de leucine dans les protéines synthétisées par la mitochondrie chutait de façon importante, par rapport à des cellules saines. La protéine la plus étudiée dans le cadre de cette pathologie est celle codée par le gène ND6 codant pour une sous-unité du complexe I. Pour cette protéine, c'est le codon UUG qui est préférentiellement utilisé, et il s'agit d'une des protéines dont l'activité est la plus affectée par la mutation (Flierl, Reichmann et al. 1997).

Au niveau biochimique, les complexes des OXPHOS contenant les protéines synthétisées dans les mitochondries porteuses de la mutation A3243G possèdent une activité enzymatique plus faible, entraînant une diminution de la consommation en oxygène, une diminution de la production d'ATP et une augmentation de la production en acide lactique (Jacobs 2003). Tout comme dans le cadre du syndrome MERRF, en réponse à une déficience mitochondriale, le nombre de mitochondries augmente dans les cellules porteuses de la mutation et ce plus particulièrement dans les cellules des muscles squelettiques, générant des RRF. (James, Wei et al. 1996)

Cliniquement, cette maladie est caractérisée par une myopathie, une acidose lactique et des troubles neurologiques aigus ressemblant à des accidents ischémiques cérébraux. Tout comme le syndrome MERRF, la mutation responsable du syndrome MELAS est présente à l'état hétéroplasmique, ce qui pourrait expliquer la diversité des symptômes de cette maladie (Flierl, Reichmann et al. 1997).

#### 1.4.2 Dysfonctionnement mitochondriale et apoptose

L'un des premiers symptômes généralement observés chez les patients atteints de myopathies mitochondriales (telle que MERRF ou MELAS) après une difficulté à fournir à un effort sportif, est la perte progressive de la masse musculaire. Cette perte musculaire pourrait être expliquée par une mortalité excessive des cellules musculaires par nécrose, par atrophie des fibres musculaires ou par apoptose. L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'origine de la perte musculaire observée chez les patients atteints de ce type de maladie sera une apoptose accrue. Cependant, pendant un certain nombre d'années, cette théorie fut fort contreversée car certaines études concluaient à une augmentation de la présence de marqueurs apoptotiques dans les biopsies de patients atteints de différentes myopathies mitochondriales (Mirabella, Di Giovanni et al. 2000; Formichi et Renier 2002; Ikezoe, Nakagawa et al. 2002; Umaki, Mitsui et al. 2002), et d'autres études montraient qu'il n'y avait pas de différence à ce niveau entre des personnes saines et malades (Sciacco, Fagiolari et al. 2001; Fagiolari, Sciacco et al. 2002).

Ces résultats contradictoires ont été conciliés par une étude menée par le groupe d'Anne Lombès qui a analysé plus de 34000 fibres musculaires individuelles provenant de patients atteints de la déplétion commune (5 Kb) ou du syndrome MELAS. Les marqueurs de l'apoptose qui ont été recherchés sont : la caspase 3 active, l'abondance de Bax (membre de la famille Bcl-2) et la fragmentation de l'ADN. Leurs résultats suggèrent que la controverse qui subsistait entre les différentes études était due à l'hétérogénéité des fibres musculaires, notamment en terme de contenu en ADN mt muté, et que l'augmentation des marqueurs apoptotiques était observée uniquement dans les RRF (Aure, Fayet et al. 2006). De plus cette étude nous apprend que la proportion de molécules d'ADN mt mutés est corrélée à la biogenèse mitochondriale et l'apoptose. Une des questions soulevées par ces résultats est de savoir si les traitements sportifs, qui visent à augmenter la masse musculaire chez ces patients, n'augmenteraient pas la biogenèse mitochondriale et donc l'apoptose.

Pour pouvoir documenter le fonctionnement des cellules porteuses de ces mutations mitochondriales et mieux comprendre les dysfonctionnements mitochondriaux, il faut du matériel cellulaire abondant, capable de subir un nombre de passages en culture important, et de préférence homoplasmique afin de garantir la stabilité génétique des cellules. Ces critères ne sont pas rencontrés dans les cellules de type myoblastiques ou fibroblastiques mises en culture à partir de biopsies de patients. Pour ces raisons, d'autres modèles cellulaires ont été générés, l'exemple le plus répandu est les cellules cybrides.

#### 1.5 Le modèle cellulaire

Les cellules cybrides sont obtenues par la fusion de cellules énucléées issues de patients porteurs de la mutation d'intérêt avec des cellules déplétées en ADN mitochondrial (appelées rho<sup>0</sup>). Les cellules rho<sup>0</sup> sont obtenues en 2 étapes. La première consiste en une inhibition de la réplication de l'ADN mitochondrial, grâce à un traitement chronique en présence de faibles concentrations de bromure d'éthidium, connu pour inhiber la polymérase gamma responsable de la réplication de l'ADN mt. Au fil des divisions cellulaires, la proportion de molécules d'ADN mitochondrial va donc diminuer. Cependant, une seule molécule d'ADN mt suffit pour repeupler la cellule en absence de bromure d'éthidium. A cette étape, on considère qu'il existe deux types de cellules au niveau de la population : des cellules rho qui possèdent un faible taux d'ADN mitochondrial et qui doivent donc être

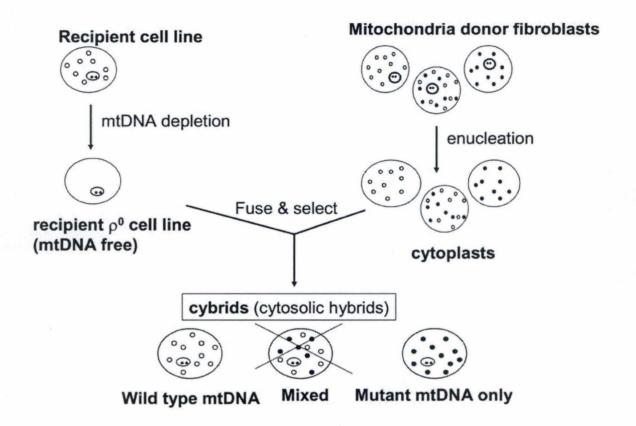


Figure 1.18.: Étapes menant à l'obtention de lignées cellulaires cybrides. Les cellules cybrides sont obtenues par fusion de cellules énucléés possédant la mutation dans l'ADNmt avec une cellule rho<sup>0</sup> déplétée en ADN mitochondrial. Les cellules rho<sup>0</sup> sont obtenues par un traitement au bromure d'éthidium pendant 10 à 30 passagessuivit d'une sélection des cellules sur base de leur capacité à survivre de manière indépendante du processus de phosphorylation oxydative pour la production d'ATP (www.biochemsoctrans.org).

continuellement traitées au bromure d'éthidium et des cellules rho<sup>0</sup> (Swerdlow 2007). Afin de sélectionner les clones qui ne possèdent plus d'ADN mt, deux techniques sont envisageables. La première consiste à cloner les cellules et ensuite rechercher la présence de génome mitochondrial afin de ne sélectionner que les clones dépourvus d'ADN mt. La deuxième solution consiste à incuber les cellules en présence d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale afin de ne conserver que les cellules qui ont subi un « shift glycolytique ».

#### 1.5.1 Les cellules cybrides

Les cellules cybrides résultent de la fusion entre des cellules rho<sup>0</sup> et des cytoplastes contenant des mitochondries, mais dépourvus de noyau (figure 1.18). Alternativement, des mitochondries peuvent être injectées directement dans des cellules rho<sup>0</sup>. Dans le cadre de ce travail, ce sont des cellules cybrides MERRF et MELAS qui ont été utilisées. Ces cellules sont de cellules 143B rho<sup>0</sup>, la lignée 143B dérivant d'un ostéosarcome humain. Les cellules 143B, totalement déplétées en ADN mt, ont été fusionnées avec des myoblastes énucléés de patients atteints du syndrome MERRF (cellules caractérisées par la présence de la mutation A8344G à l'état homoplasmique dans l'ADN mitochondrial) ou du syndrome MELAS (cellules caractérisées par la présence de la mutation A3243G à l'état homoplasmique dans l'ADN mitochondrial).

Des études ont permis de valider ces modèles cellulaires en montrant que les cellules cybrides présentent des caractéristiques comparables à celles observées sur des fibroblastes de patients. Par exemple, la consommation d'oxygène et l'activité de la chaîne respiratoire diminuent également dans les cybrides porteuses d'une mutation par rapport à des cellules contrôles (cellules rho<sup>0</sup> repeuplées avec des mitochondries d'un individu sain) (Masucci, Davidson et al. 1995).

Le but principal de notre travail étant d'étudier la réponse à un stimulus proapoptotique de cellules cybrides présentant une mutation ponctuelle dans le génome mitochondrial, nous allons donc terminer cette introduction en développant les différentes molécules que nous utiliserons dans cette étude afin d'induire l'apoptose.

## 1.5.2 Apoptose induite dans des cellules cybrides porteuses de la mutation associée au syndrome MERRF ou MELAS

#### 1.5.2.1 Staurosporine

La staurosporine est une molécule depuis très longtemps utilisée pour induire l'apoptose ; il s'agit d'un alkaloïde initialement isolé à partir de la bactérie Streptomyces staurosporeus. Sa structure chimique est composée d'un sucre et d'un groupe d'hétérocycles plan et cette molécule est connue pour être un inhibiteur important des protéines kinases (PK).

A ce jour, trois mécanismes du mode de déclenchement de l'apoptose par la staurosporine sont principalement décrits (**figure 1.19**). Premièrement, la staurosporine peut induire l'apoptose en inhibant diverses kinases, dont les Protéines Kinases C (PKC). Ces kinases sont habituellement décrites pour protéger les cellules de l'apoptose en phosphorylant la protéine Bad au niveau de la sérine 112. Sans cette modification post traductionnelle, Bad ne peut être séquestré dans le cytosol par la protéine 14-3-3, et donc Bad peut inhiber Bcl-XL

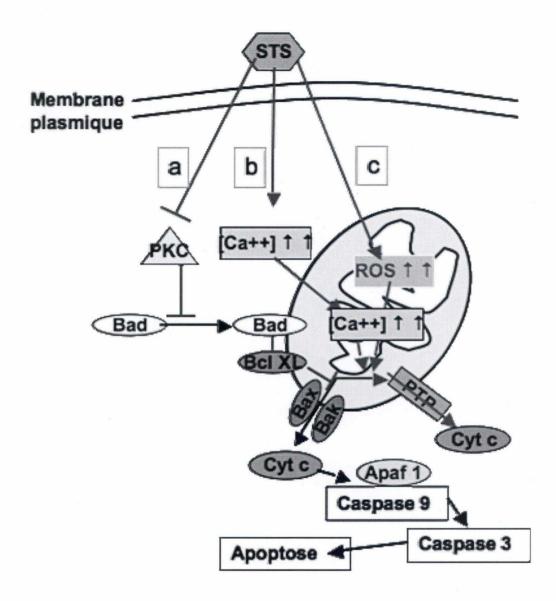


Figure 1.19.: Mécanismes d'induction de l'apoptose par la staurosporine. La staurosporine est un inhibiteur de kinases qui induit l'apoptose par trois voies principales. A) La staurosporine inhibe les PKCs qui en phosphorylant Bad empêchent sa translocation dans la membrane mitochondriale externe. B) Le staurosporine induit une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol, ce qui facilite la libération du cytochrome c dans le cytosol. C) La staurosporine provoque également une augmentation de la production de ROS, ce qui facilite la libération du cytochrome c dans le cytosol (Chun-Yi Liu et al, 2004).

et provoquer la perméabilisation de la MME. Ainsi, la staurosporine en inhibant les PKCs induira l'apoptose.

Deuxièmement, la staurosporine peut induire l'apoptose en augmentant la concentration en calcium cytosolique, ce qui permet une activation des enzymes dépendantes du calcium comme les calpaïnes ou la calcineurine. Celles-ci auront la possibilité de respectivement cliver Bid en tBid et déphosphoryler Bad, ce qui permettra un perméabilisation accrue de la MME et la libération de facteurs pro- apoptotiques comme le cytochrome c dans le cytosol, déclenchant l'apoptose.

Troisièmement, la staurosporine peut entraîner également l'apoptose par l'intermédiaire d'une production accrue des ROS, qui entraînent une augmentation de la concentration cytosolique et mitochondriale, facilitant la libération du cytochrome c.

La staurosporine peut donc être considérée par ces trois modes d'actions comme un inducteur de l'apoptose par la voie intrinsèque pour déclencher l'apoptose (Zimmermann, Bonzon et al. 2001; Liu, Lee et al. 2004).

Dans le cadre d'études sur des maladies liée à des dysfonctionnement mitochondriaux, la staurosporine a déjà été utilisée sur des lignées cellulaires cybrides. Il a été montré sur des cellules cybrides porteuses de la mutation L217R dans le génome mitochondrial, mutation associée au syndrome MILS (Maternally inherited Leigh syndrome), que l'apoptose induite par la staurosporine était plus importante dans les cellules porteuses de la mutation que dans les cellules sauvages (Carrozzo, Rizza et al. 2004). Dans le cadre des syndromes MERRF et MELAS, une étude similaire a été réalisée sur des cellules cybrides porteuses des mutations associées à ces deux syndromes. Après une stimulation de 6 heures en présence de 100 nM de staurosporine, l'activité de la caspase 3 est plus importante dans les cellules porteuses de la mutation que dans les cellules sauvages. De plus, les auteurs de cette étude ont observé une fragmentation de l'ADN plus importante dans des cellules cybrides mutées MELAS. (Liu, Lee et al. 2004).

Dans notre laboratoire, G. Rommelaere dans le cadre de sa thèse a confirmé les données sur l'activité de la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN dans les cellules cybrides MERRF, mais n'a pas pu mettre en évidence de délocalisation du cytochrome c. Ce résultat pose la question de savoir par quel type de mécanisme les cellules porteuses de la mutation A8344G rentrent en apoptose en réponse à la staurosporine, et surtout quels sont les éléments moléculaires qui rendent les cellules mutées plus sensibles à l'apoptose.

#### 1.5.2.2 TNF alpha et TRAIL

Ces deux inducteurs que sont TRAIL et TNF alpha induisent l'apoptose par la voie extrinsèque (voir point 1.3.2.1.2). Pour rappel, ces deux protéines, une fois liées à leurs récepteurs, sont capables d'induire l'apoptose en activant les caspases 8 ou 10, qui pourront à leur tour activer la caspase 3 et dans certains cas, permettre la sortie du cytochrome c par l'intermédiaire du clivage de Bid (Taylor, Cullen et al. 2008).

Dans le cadre d'études sur des maladies liées à des dysfonctionnement mitochondriaux, ces deux inducteurs ont déjà été utilisés sur des lignées cellulaires cybrides issues de la fusion de cellules 143B rho<sup>0</sup> et de cellules de patients atteints de maladies mitochondriales. Tout d'abord, il a été montré dans cellules cybrides porteuses de la mutation L217R dans le génome mitochondrial associée au syndrome MILS (Maternally inherited Leigh syndrome) que l'apoptose induite avec le TNF alpha était plus importante dans les cellules porteuses de la mutation que dans les cellules sauvages (Carrozzo, Rizza et al. 2004).

Une autre étude sur des cellules porteuses de la délétion commune a montré qu'une induction avec la protéine TRAIL, augmentait l'activité de la caspase 3 de façon plus importante que dans les cellules sauvages (Schoeler, Szibor et al. 2005).

#### 1.5.2.3 Etoposide

L'étoposide est une molécule impliquée dans des traitements contre le cancer. L'étoposide peut avoir plusieurs effets; le premier est d'inhiber la kinase p34 de façon irréversible, bloquant la cellule durant la phase G2 du cycle cellulaire. Il peut aussi se lier à la tubuline et inhiber la formation des microtubules, mais son action la plus connue est d'inhiber la topoisomérase II, ce qui a pour effet de provoquer des cassures simples et doubles brins dans d'ADN. Ces lésions de l'ADN peuvent par exemple activer p53. p53 est un facteur de transcription qui, lorsqu'il est activé, induit entre autre l'expression des gènes codant Bax, Puma et NoxA. Ces trois protéines font parti de la famille Bcl-2 et ont une fonction proapoptotique. Par exemple, Bax, en se dimérisant, va perforer la membrane mitochondriale et permettre la libération du cytochrome c ce qui déclenchera l'apoptose par la voie intrinsèque (voir point 1.3.2.1.1) (Meresse, Dechaux et al. 2004).

Nous n'avons pas connaissance de travaux menés sur un modèle cellulaire de dysfonctionnement mitochondrial mis en présence d'étoposide.

# 2. Matériels et méthodes

#### 2 Matériels et méthodes

#### 2.1 Culture cellulaire et traitement avec différents inducteurs de l'apoptose

#### Description:

Durant ce mémoire, nous avons utilisé quatre lignées cellulaires cybrides, deux lignées sauvages (sans mutation dans l'ADN mitochondrial) et deux lignées mutées (porteuses d'une mutation dans l'ADN mitochondrial). Les deux lignées sauvages proviennent d'une fusion de cellules 143B rho<sup>0</sup> (cellules d'ostéosarcome humain totalement déplétées en ADN mitochondrial) avec des myoblastes énucléés provenant de personne saine. Les deux autres lignées cybrides sont issues de la fusion de cellules 143B rho<sup>0</sup> avec des myoblastes énucléés de patients atteints, pour la première lignée du syndrome MERRF (caractérisé par la présence de la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial) et pour la deuxième lignée du syndrome MELAS (caractérisé par la présence de la mutation A3243G dans l'ADN mitochondrial). Les cellules porteuses de la mutation A8344G ont été généreusement offertes par le Professeur Ramon Marti (Neuromuscular Laboratory of Pathology and Mitochondriale Barcelona, Spain) et les cellules porteuses de la mutation A3243G par le Professeur Janssen G.M (Departement of molecular cell biology, Leiden university, Leiden, Pays-Bas). Les quatre lignées cellulaires sont maintenues en culture dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (T75, Corning 3275) et ensemencées trois fois par semaine. Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### Matériels (préchauffés à 37°C) :

- Milieu DHG (Dulbecco Modified Eagle's Medium-High Glucose: 4,5 g/l) + 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco, UK).
- PBS (phosphate buffer saline, Whittacker Belgium)
- Trypsine 0,25 % (Gibco, 25050-014)
- Trypsine + EDTA 0,5% (Gibco, 25300-014)
- Milieu DHG (Dulbecco Modified Eagle's Medium-High Glucose: 4,5 g/l)
- Staurosporine (STS, Sigma S 4400) (concentration stock: 1 mM)
- Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha, RD system 210TA) (concentration stock: 10 μg/ ml)
- Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing-ligand (TRAIL, PeproTech L1807) (concentration stock: 50 μM)
- Etoposide (Sigma E1383) (concentration stock : 50 μM)

#### Méthode:

Les cellules sont rincées une fois avec 7 ml de PBS. Elles sont ensuite détachées à l'aide de 1 ml de trypsine (ou de la trypsine EDTA pour la lignée cellulaire cybride porteuse de la mutation A3243G) et resuspendues dans du milieu DHG + 10 % SVF. Pour le maintien de la culture, la suspension cellulaire est répartie dans de nouvelles boîtes de culture T75 à une dilution de 1/9 pour les deux lignées sauvages, 1/4 pour la lignée porteuse de la mutation A3243G (lignée MELAS) et 1/5 pour la lignée porteuse de la mutation A8344G (lignée MERRF). Le volume est finalement porté à 15 ml avec du milieu DHG + 10% SVF.

117	Type cellulaire	T75	Plaque 6 puit	Plaque 24 puits
	Web 352	(cellules)	(cellules)	(cellules)
Avant induction avec de la	Sauvage	1 000 000	130 000	25000
staurosporine	Muté	1 500 000	196 000	37600
Avant induction avec	Sauvage	1 200 000	157 000	30000
TNF, TRAIL ou étoposide	Muté	1 500 000	196 000	37600

Table 2.1 : Densités cellulaires ensemencées en fonction des lignées cellulaire et des traitements

Avant un traitement en présence d'inducteurs apoptotiques, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture dont les formats conviennent aux dosages effectués. De plus, les densités cellulaires sont dictées par la lignée cellulaire (les cellules sauvages proliférant plus rapidement que les cellules porteuses d'une mutation) et la nature de l'inducteur apoptotique (**Table 2.1**).

Afin de standardiser les réponses cellulaires, l'apoptose est systématiquement déclanchée deux jours après l'ensemencement, lorsque les cellules sont sous confluentes. Pour les incubations en présence de staurosporine, le milieu est remplacé par un milieu DHG + 10% SVF contenant 100, 500 ou 2000 nM de staurosporine. Pour les incubations en présence de l'etoposide, de TNF alpha ou de TRAIL, nous avons pu montrer que la réponse apoptotique ne pouvait être observée que si les cellules avaient été préalablement privées de sérum durant 24 heures. Après l'ensemencement des cellules aux densités cellulaires indiquées à la **table 2.1**, les cellules restent donc 24 heures dans du milieu DHG + 10% SVF, puis 24 heures dans un milieu DHG, avant l'ajouter l'ethnocide, TNF alpha ou TRAIL dans du milieu DHG aux concentrations indiqués dans des légendes des figures.

#### 2.2 Dosage de protéines par la méthode de Bradford

#### Matériel:

- Solution Bradford (Bio-rad Protein Assay 500-0006)
- BSA 2 mg/ml (Bovine Serum Albumin, Sigma)
- H<sub>2</sub>O distillée
- Tampon dans lequel l'échantillon se trouve

#### Méthode:

Pour doser les protéines par la méthode de Bradford, 3 µl d'échantillon sont ajoutés dans 1 ml de solution Bradford diluée 5 fois dans de l'eau et après 5 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec 100 pro UVI visible spectrometer). Un étalon de concentration connue en BSA est également dosé. Pour les tubes destinés à mesurer le blanc de la BSA et la BSA, 2,5 µl d eau sont ajoutés au 1 ml de solution Bradford. La concentration en protéines peut être calculée à l'aide de la formule suivante :

Conc échantillon (
$$\mu g/\mu l$$
) =  $\underbrace{(Abs_{\underline{ech}}-Abs_{\underline{blanc}\,\underline{ech}}) \times Vol_{\underline{ech}} \times Conc_{\underline{etalon}}}_{(Abs_{\underline{etalon}}-Abs_{\underline{blanc}\,\underline{etalon}})}$ 

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

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

#### Principe:

L'activation de la caspase-3 est une étape clé de l'apoptose. Après le déclanchement de l'apoptose par diverses molécules, le précurseur inactif de cette enzyme subit une modification protéolytique à l'issue de laquelle la caspase-3 est activée. C'est sous cette forme active qu'elle déclenche l'apoptose en catalysant le clivage spécifique de certaines protéines intracellulaires qui peuvent mener à l'aboutissement de l'apoptose et plus particulièrement à la fragmentation de l'ADN. Un dosage de l'activité de cette caspase est donc un bon marqueur de l'importance de la réponse apoptotique.

La mise en évidence de l'activité de cette protéase est rendue possible grâce à un substrat fluorogénique (Ac-DEVD-AFC). Le motif DEVD, présent notamment dans la protéine PARP, est reconnu et clivé par la caspase-3, le groupement 7 amino-4-trifluorométhyl coumarine (AFC) est libéré et celui-ci une fois libéré peut être quantifié à l'aide d'un fluorimètre.

#### Matériel:

- Plaque 6 puits (Costar Cornmings, USA)
- PBS: 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/KOH; pH 7,0; 10 % sucrose; 2 mM EDTA; 0,1% CHAPS; 5 mM DTT et 10 μg/ml aprotinine
- Tampon de réaction : 40 mM PIPES ; pH 7,2 ; 200 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 0,2 % CHAPS ; 0,10 % Sucrose ; 10 mM DTT
- Substrat Ac-DEVD-AFC (BD Pharmingen) à une concentration stock de 1,37 mM dans du DMSO.

#### Méthode:

Pour ce test, les cellules sont préalablement ensemencées dans des plaques 6. Au terme du traitement en présence de l'inducteur apoptotique, le milieu de chaque puits est collecté dans un tube de 10 ml. Ensuite, les cellules sont rincées avec 5 ml de PBS qui sont ajoutés au milieu récupéré dans chaque puits. Les tubes de 10 ml sont centrifugés à 1000 rpm à 4°C pendant 10 minutes dans le but de collecter les cellules détachées du support. Pendant ce temps, les puits sont raclés avec 200 µl de PBS froid et chaque suspension est récupérée dans un microtube. Les culots des tubes de 10 ml obtenus par la centrifugation sont resuspendus dans 50 µl de PBS et ajoutés dans les microtubes correspondants. Ceux-ci sont centrifugés à 1000 rpm pendant 10 minutes et le culot ainsi récupéré est suspendu dans 100 µl de tampon de lyse pendant 30 minutes à 4°C. Pour terminer, les lysats sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont aliquotés et stockés à -20°C. Chaque échantillon fera l'objet d'un dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Dans un microtube,  $50~\mu l$  de tampon de réaction sont ajoutés ainsi qu'un volume d'échantillon correspondant à  $10~\mu g$  de protéines. Les échantillons sont mis en présence de  $1~\mu l$  de substrat Ac-DEVD-AFC pendant 60~minutes à  $37~^{\circ}C$  et ensuite la fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Ex : 400~nm et Em : 505~nm). L'échelle de sensibilité du spectrofluorimètre est adaptée à la fluorescence de chaque série d'échantillons. À l'intensité de fluorescence de chaque échantillon est déduite celle du blanc (composé

tampon de réaction + 1 µl de substrat + tampon de lyse en lieu et place de l'échantillon). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence par microgramme de protéines.

#### 2.4 Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale

#### Principe:

Cette technique a pour but de mettre en évidence la présence, l'abondance et/ou la localisation de protéines à l'aide d'un set de deux anticorps. Le premier anticorps a pour fonction de se fixer de façon spécifique à la protéine d'intérêt. Le deuxième anticorps reconnaît spécifiquement l'anticorps primaire et est couplé à un fluorochrome. Celui-ci, une fois excité par une longueur d'onde spécifique, émet de la fluorescence qui peut être visualisée à l'aide d'un microscope confocal.

#### Matériel:

- Plaques 24 puits (Costar Cornmings, USA)
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Germany)
- Lames porte-object de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Germany)
- PBS: 150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4
- PBS-Triton X-100 1% (Sigma)
- PBS-BSA 2 %
- PFA, paraformaldéhyde 4 % (Merck) préparée dans du PBS
- Mowiol: 0,1 g de mowiol (Sigma) par ml d'un tampon Tris 1,5 M; pH 8,8 contenant 22 % de glycérol.
- Anticorps primaires : Anticorps de souris anti-caspase 3 (G7481 Promega) dilué 500 x dans PBS-BSA 2%
- Anticorps secondaire: Anticorps de chèvre anti-souris couplé à une sonde fluorescente Alexa 488 nm (Molecular Probes) dilué 1000 x dans du PBS-BSA 2 %.
- TOPRO-3 : TOPRO-3 (Sigma T-3605) dilué 80 x dans une solution de RNAse à 2 mg/ml dans du PBS.
- Microscope confocal à fluorescence (Leica, Allemagne)

#### Méthode:

Pour ce test, les cellules sont préalablement ensemencées en plaques 24 puits sur des lamelles couvre-objets stérilisées. Une fois l'incubation en présence des inducteurs apoptotiques terminée, les cellules sont directement fixées dans 1 ml de PFA pendant 10 minutes. Après trois rinçages successifs avec 1 ml de PBS, les cellules sont perméabilisées dans du PBS triton X-100 1 % pendant 5 minutes. Les cellules sont rincées trois fois 10 minutes avec du PBS-BSA 2 % et ensuite, elles sont incubées avec 30 µl d'anticorps primaire dilué 500 fois dans une chambre humide durant toute la nuit. Le lendemain, après trois rinçages au PBS-BSA 2 %, les cellules sont incubées durant 1 heure à température ambiante et dans l'obscurité en présence de 30 µl d'anticorps secondaire dilué 1000 fois dans du PBS-BSA 2%. Après 3 rinçages au PBS-BSA 2 % et 1 au PBS, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec du Topro-3 qui est une molécule intercalante qui devient excitable à une longueur d'onde de 642 nm lorsqu'elle s'insère dans de l'ADN double brins. Pour terminer, les cellules sont rincées 3 fois au PBS puis les lamelles couvre-objet sont montées sur lames

	M	L	Р
<u>ml</u>	8000RPM	25000RPM	35000RPM
2	2'24"	2'52"	18'30"
2,1	2'27"	2'54"	
2,2	2'30"	2'56"	, W
2,3	2'33"	2'59"	1
2,4	2'36""	3'02"	
2,5	2'39"	3'04"	
2,6	2'42"	3'06"	
2,7	2'45"	3'09"	
2,8	2'48"	3'11"	
2,9	2'52"	3'13"	
3	2'55"	3'16"	21'40"
3,1	2'59"	3'19"	
3,2	3'03"	3'22"	
3,3	3'07"	3'25"	
3,4	3'11"	3'28"	
3,5	3'15"	3'31"	
3,6	3'19"	3'34"	
3,7	3'23"	3'37"	
3,8	3'27"	3'40"	
3,9	3'31"	3'42"	

Table 2.2 : Temps de centrifugation en fonction du volume pour un rotor 50T

porte-objet avec du Mowiol préchauffé à 60°C. Les lamelles seront ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence.

#### 2.5 Fractionnement cellulaire et préparation des lysats

Afin de rechercher l'abondance de certaines protéines dans les différents compartiments cellulaires par Western Blot, un fractionnement par centrifugation différentielle est réalisé. Il s'agit de fractions enrichies et non hautement purifiées.

#### Matériel:

- PBS: 150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4
- Solution de saccharose 0,25 M
- Homogénéisateur de Dounce avec piston B
- Centrifugeuse (microtube, centrifuge 5810)
- Centrifugeuse (L7 35, Beckman Coulter)
- Rotor T50
- Tubes rigides pour rotor TLA-100.3

#### Méthode:

Les cellules sont préalablement ensemencées en dans des boîtes T75 et le nombre de cellules par boîte est variable en fonction de l'inducteur apoptotique (**Table 2.1**), pour cette manipulation, 4 boîtes T75 par condition expérimenté sont requises. Deux jours après l'ensemencement, les cellules sont traitées ou non avec les molécules mentionnées dans la légende des figures de la partie résultat durant un temps donné. L'ensemble du fractionnement cellulaire s'effectue à 4 °C. Les cellules sont collectées à l'aide d'un racloir directement dans leur milieu de culture et chaque milieu est récupéré dans un tube de 10 ml qui sera centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes. Chaque culot est resuspendu dans 2 ml de PBS et les 4 x 2 ml obtenus par condition expérimentale sont regroupés dans un autre tube de 10 ml. Après une nouvelle centrifugation à 1000 rpm pendant 5 minutes, les culots sont resuspendus dans 3,2 ml de saccharose.

Les suspensions cellulaires sont ensuite transférées dans un homogénéisateur de Dounce. Après 6 passages, la suspension est centrifugée à 2700 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est placé dans un tube de 15 ml noté E (décantation minimale). Le culot correspondant à la fraction nucléaire et aux cellules non homogénéisées, est resuspendu dans 2 ml de saccharose. Après 6 passages dans l'homogénéisateur de Dounce, la suspension est à nouveau centrifugée à 2700 rpm pendant 10 minutes. Le nouveau surnageant (décantation minimale) est transféré dans le tube E. Le culot est resuspendu dans 1,5 ml de saccharose et conservé à -20°C, celui-ci correspond à la fraction nucléaire (N). Ensuite, la fraction E est transférée dans un tube taré et centrifugée à 8000 rpm durant un temps qui est fonction du volume du tube (voir Table 2.2). Le culot est resuspendu avec 100 µl de saccharose (décantation minimale), cette fraction correspond à la fraction mitochondriale (M). Le surnageant est transféré dans un autre tube taré et est centrifugé à 25 000 rpm durant un temps qui est fonction du volume du tube (voir Table 2.2). Ensuite, le culot est resuspendu dans 250 μl de saccharose, il s'agit de la fraction contenant principalement des lysosomes (L). Le surnageant est à nouveau transféré dans un autre tube taré et est centrifugé à 35 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 250 µl de saccharose, ce culot correspond à la fraction riche en

Gel buffer (pour 50 ml)	<ul> <li>9,08 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>0,2 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>pH 8,8</li> <li>Mise à volume avec de l'eau distillée</li> </ul>
Gel séparateur (Running gel) (pour 10 ml)	<ul> <li>2,5 ml de gel buffer</li> <li>4 ml d'acrylamide 30%, Bis 0,8% (Bio-Rad, USA)</li> <li>3 ml d'eau distillée</li> <li>10 III de TEMED (Pharmacia biotech AB, Swedish)</li> <li>1,5 ml d' APS 1 % (Pharmacia biotech AB, Swedish)</li> </ul>
Spacer gel buffer (pour 50 ml)	<ul> <li>3,028 g de TRIS (rCN Biomedicals, USA)</li> <li>0,2 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>pH 6,8</li> <li>Mise à volume avec de l'eau distillée</li> </ul>
Gel concentrateur (Stacking gel) (pour 10 ml)	<ul> <li>1,25 ml de spacer gel buffer</li> <li>0,5 ml d'acrylamdie 30%, Bis 0,8% (Bio-Rad, USA)</li> <li>2,75 ml d'eau distillée</li> <li>5 III de TEMED (Pharmacia biotech AB, Swedish)</li> <li>0,5 ml d'APS 1 % (Pharmacia biotech AB, Swedish)</li> </ul>
Tampon d'électrophorèse (Running Buffer) (pour 11)	<ul> <li>3,028 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>14,4 g de Glycine (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>1 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>Mise à volume avec de l'eau distillée</li> </ul>
Bleu de charge 5x (pour 35 ml)	<ul> <li>10 ml de TRIS 0,5M pH 6,8</li> <li>10 ml de SDS 20% (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>5 ml de ~-Mercapto Ethanol</li> <li>10 ml de Glycérol</li> <li>17,5 mg de bleu de Bromophénol</li> </ul>
Tampon de transfert (Blotting Buffer) pour un gel Tris-Glycine (pour 51)	<ul> <li>24 g de Tris (Merck, Germany)</li> <li>115 g de Glycine (Merck, Germany)</li> <li>1 1 de méthanol (Acros Organics, USA)</li> <li>Mise à volume avec de l'eau distillée</li> </ul>

Table 2.3 : Solutions utilisées lors des analyses par Western Blot SDS PAGE

peroxysomes (P). Le surnageant restant correspond à la fraction cytosolique (S). L'ensemble des échantillons est conservé à -20°C.

#### 2.6 Western Blot

#### Principe:

Le Western Blot est une technique qui permet de détecter de manière semiquantitative des protéines qui ont été séparées par électrophorèse dans un gel. La première étape consiste donc à séparer les protéines sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), un détergent anionique qui dénature les protéines, qui est capable de charger les protéines négativement et donc de les dénaturer. Les protéines pourront donc migrer dans le gel en fonction de leur poids moléculaire. Par la suite, les protéines seront transférées sur une membrane qui sera incubée avec un anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt. Ensuite, la membrane sera mise en présence d'un anticorps secondaire capable de reconnaître l'anticorps primaire. De plus, ce deuxième anticorps est couplé à une peroxydase qui permettra la révélation en chemoluminescence sur film photographique.

#### 2.6.1 Electrophorèse

#### 2.6.1.1 Tris-Glycine:

#### Matériel:

- Acrylamide/Bisacrylamide (Bio Rad 161-01-58)
- Ammonium persulfate (APS) (Amersham, 17-1311-01) 10 %
- TEMED (Amersham, 17-1312-01)
- Tampon du gel de concentration (Table 2.3)
- Gel de concentration (**Table 2.3**)
- Tampon du gel de séparation (Table 2.3)
- Gel de séparation (Table 2.3)
- Tampon d'électrophorèse 10 x (pour 1 l) : (Table 2.3)
- Bleu de charge 5 x (**Table 2.3**)
- Tampon de transfert (Table 2.3)
- TBS 10x (Tris Buffer Saline) (**Table 2.4**)
- ECL blocking Agent (Amersham, RPN 2135)
- Solution de révélation: ECL Western Blot detection Kit (Amersham, RPN 2135)

#### Méthode:

Des gels d'acrylamide à 12 % sont réalisés. Le gel de séparation coulé entre les plaques de montage et couvert par 1 ml d'isobutanol afin que la polymérisation s'effectue à l'abri de l'oxygène. Après 1 heure de polymérisation à température ambiante, l'isobutanol est enlevé et le dessus du gel est rincé abondamment à l'eau distillée. Le gel de concentration est ensuite coulé jusqu'au-dessus des plaques et le peigne est introduit. La polymérisation dure environ 35 minutes. Pendant ce temps, les échantillons sont préparés pour avoir un volume final de +- 50 µl avec 10 µl de bleu de charge et 20 µg de protéines. Une fois la polymérisation terminée, le gel est monté dans une cuve d'électrophorèse, le peigne est enlevé

Tampon de migration		
Tampon MES (pour 1L)	50 ml de solution MES stock	
Tampon MES + anti-oxydants (200ml)	<ul> <li>Mise à volume avec de l'eau distillée</li> </ul>	
	<ul> <li>200 ml de tampon MES</li> </ul>	
	• 500 μl d'anti-oxydants	
Tampon de transfert pour un gel Nu-PAGE (pour 200 ml)	<ul> <li>10 ml de tampon stock Nu-PAGE transfert Buffer</li> </ul>	
	(20x) (Invitrogen, USA)	
	• 40 ml d'éthanol	
	<ul> <li>200 ml d'anti-oxydants (Invitrogen, USA)</li> </ul>	
	<ul> <li>Mise à volume avec de l'eau distillée</li> </ul>	
TBS- Tween 0,1% (pour 11)	• 100 ml de TBS 10x	
	• 1 ml de Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)	
	<ul> <li>Mise à volume avec de l'eau distillée</li> </ul>	
TBS 10x (pour 11)	22,2 g de Tris (Merck, Germany)	
	• 80,06 g de NaCL (Merck, Germany)	
	• pH 7,6	

Table 2.4 : Solutions utilisées lors des analyses par Western Blot Nu-PAGE

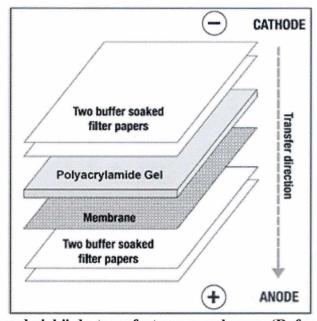


Figure 1: Montage "sandwich" du transfert sur membrane (Ref : www.fermentas.com)

et la cuve est remplie avec du tampon d'électrophorèse. Les échantillons sont alors chargés et la migration des échantillons est réalisé à un ampérage de 35 mA pendant 45 min dans le gel de concentration puis à 45 mA pendant 1h30 heures dans le gel de séparation.

#### 2.6.1.2 Nu-page:

#### Matériel:

- Gels Nu-PAGE 12% (Invitrogen, USA)
- Tampon de migration MES (20x) (Invitrogen, USA)
- Nu-PAGE anti-oxydants (Invitrogen, USA)
- NuPAGE LDS sample buffer (4x) (Invitrogen, USA)
- Tampon de migration (Tableau 2.4)
- Étalon de poids moléculaire See blue plus 2 (Invitrogen, USA)
- Cuve d'électrophorèse (Invitrogen, USA)
- Générateur (Bio-rad power PAC 300)

#### Méthode:

Dans un premier temps, les échantillons sont préparés de manière à ce que chaque échantillon contienne 10 µg de protéines et que 25% du volume total soit constitué de bleu de charge (Nupage LDS sample buffer). Pendant ce temps, le gel précoulé est placé dans la cuve. Ensuite le tampon migration + anti-oxydants (**Table 2.4**) est placé dans le compartiment central et le tampon de migration dans le compartiment extérieur. Après avoir été chauffés à 70 °C pendant 10 minutes, les échantillons sont chargés dans les puits. La migration se fait à 200V, 400mA pendant 35 minutes.

#### 2.6.2 Transfert des échantillons sur une membrane de PVDF

#### Matériel:

- Membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride, Amersham)
- Papiers Whatman (Amersham, USA)
- Tampon de tranfert (Tableau 2.4)
- Appareil de transfert : Hoeffer Semiphor (Amersham, USA)
- Éponges

#### Méthode:

La membrane de PVDF est préalablement réhydratée pendant une minute dans du méthanol 100 % puis 5 minutes dans du tampon de transfert. À la fin de la migration, le gel est démoulé et déposé sur la membrane de PVDF et un montage en « sandwich » est réalisé dans la cuve de transfert avec des papiers Whatman et des éponges imbibées de tampon de transfert (**Figure 2.1**). Il s'agit d'un électro-transfert de type « semi-sec » qui s'effectue pendant 2 heures à 150 mA.

Anticorps	Dilution	Références
Ac de souris contre la tubuline-a (monoclonal)	50000 X	556382 (BD Pharmigen)
Ac de souris contre le cytochrome C (monoclonal)	2500 X	556433 (BD Pharmigen)
Ac de souris contre Smac/diablo (polyclonal)	5000 X	2954 (Cell signaling)
Ac de chèvre contre c-IAP1 (polyclonal)	5000 X	AF 8181 (R&D)
Ac de chèvre contre c-IAP2 (polyclonal)	10000 X	AF 8171 (R&D)
Ac de souris contre XIAP (polyclonal)	2500 X	MO443 (Immuno source)
Ac de lapin contre la caspase 9 (polyclonal)	3000 X	9509S (Cell signaling)
Ac β-actine (monoclonal)	50000 X	A5441 (Sigma)
Ac de lapin contre Tom 40 (polyclonal)	5000 X	Sc 11414 (Santa Cruz)

Table 2.5: anticorps primaires utilisés

Anticorps	Dilution	Références
Ac anti-souris couplé à une peroxydase	300 000 X	Amersham Bioscience, USA
Ac anti-chèvre couplé à une peroxydase	300 000 X	Amersham Bioscience, USA
Ac anti-lapin couplé à une peroxydase	300 000 X	Amersham Bioscience, USA

Table 2.6 : anticorps secondaires utilisés

#### 2.6.3 Incubation et révélation

#### Matériel:

- TBS-T 0,15% (**Table 2.4**)
- Anticorps primaire et secondaire : (Table 2.5 et 2.6)
- Agent Bloquant (Amersham, USA)
- ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham, USA)
- Amersham Hyperfilms ECL (Amersham, USA)
- Appareil de révélation (FMP100A, FujiFilm)

#### Méthode:

Une fois le transfert terminé, le montage est démoulé et la membrane est bloquée pendant deux heures à température ambiante dans du TBS-Tween 0,15 % contenant 2 % d'agent bloquant. La membrane est incubée pendant la nuit avec l'anticorps primaire (Tableau 2.5) dilué dans TBS-Tween 0,15 % contenant 2 % d'agent bloquant. Après trois rinçages avec du TBS-T, la membrane est incubée durant 1 heure avec l'anticorps secondaire (Tableau 2.6) dilué dans TBS-Tween 0,15 % contenant 2 % d'agent bloquant. Après trois autres rinçages avec du TBS-T, la membrane est placée 5 minutes au contact d'une solution de révélation ECL contenant le substrat de la peroxydase et du luminol.

La révélation s'effectue en chambre noire par impression d'un film sensible à l'aide de l'appareil de révélation.

#### 2.7 Dosage de la fragmentation de l'ADN par un kit ELISA

#### Principe:

Le dosage de la fragmentation de l'ADN génomique a été effectué à l'aide du kit : « Cell Death Detection ELISA » (ROCHE), celui-ci est un kit de dosage en colorimétrie de type ELISA. Le kit se base sur la capture à l'aide d'un anticorps spécifique des nucléosomes contenus dans les fragments d'ADN générés au cours du processus d'apoptose. Les puits sont d'abord recouverts d'anticorps anti-histone H1. La présence de ces fragments est ensuite révélée grâce à des anticorps anti-ADN couplés à une peroxydase. Le dosage de l'activité peroxydase est réalisé en présence du substrat ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthizoline sulfonate). Après incubation, le produit de la réaction colorimétrique est dosé à 405 nm au spectrophotomètre (figure 2.2).

#### Matériel:

- Plaques 24 puits (Costar Cornmings, USA)
- Tampon de lyse: 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris; pH 7,4, 4 % PIC (Protéase Inhibitor Cocktail), 4% PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer), 1% Triton X-100
- Ensemble des solutions fournies dans le kit (**figure 2.3**)
- Spectrophotomètre

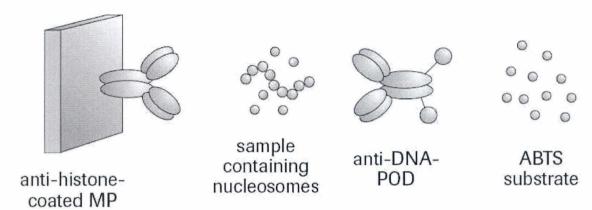


Figure 2.2: Principe du kit Cell Death Detection ELISA (Ref: fiche technique Cell Death Detection ELISA Cat. No. 11 544 675 001, ROCHE)

Vial/ Cap	Label	Contents
1	Anti-histone	lyophilizate, stabilized
white	*	Monoclonal antibody from     Monoclonal H11, 4)
	A .: D. I.A	mouse (clone H11-4)
2	Anti-DNA-	lyophilizate, stabilized
red	POD	Monoclonal antibody from
		mouse (clone MCA-33) conju-
		gated with peroxidase
3	Coating	• 10× conc.
white	buffer	• 2 ml
4	Washing	• 10× conc.
green	buffer	• 40 ml
5	Incubation	• 100 ml
red	buffer	Ready-to-use solution
6	Substrate	Ready-to-use solution
white	buffer	Use 5 ml for one ABTS tablet.
7	ABTS	• 3 × 5 mg tablets
white	substrate	Each sufficient for 5 ml
	tablet	Substrate solution
	Microplate	12 Microplate modules (8 wells,
		each) and frame
	Adhesive	Foils to cover microplates.
	cover foils	

Figure 2.3 : Solution du kit Cell Death Detection ELISA (Ref : fiche technique Cell Death Detection ELISA Cat. No. 11 544 675 001, ROCHE)

## 3. Résultats et discussion

#### 3 Résultats et discussion

Durant ce travail deux modèles d'apoptose induite dans des cellules cybrides ont été mis au point. Le premier est l'induction de l'apoptose dans des cellules cybrides porteuses ou non de la mutation A3243G dans l'ADN mt (cellules cybrides MELAS) à l'aide de la staurosporine (STS). Le second modèle, quant à lui, est un modèle d'induction de l'apoptose à l'aide de TNF $\alpha$ , de TRAIL ou d'étoposide dans des cellules porteuses ou non de la mutation A8344G dans l'ADN mt (cellules cybrides MERRF). Les cellules qui ne sont pas porteuses d'une mutation mitochondriale sont appelées cellules cybrides sauvages et les cellules porteuses d'une mutation sont appelées cellules cybrides mutées.

Au début de ce mémoire, il avait été montré dans notre laboratoire et par Liu et ses collaborateurs (Liu, Lee et al. 2004) une hypersensibilité des cellules cybrides présentant la mutation A8344G à l'apoptose induite par la staurosporine (100 ou 500 nM). Pour arriver à cette conclusion, plusieurs marqueurs de l'apoptose ont été étudiés dont l'activité de la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN. Ces deux marqueurs se sont avérés plus importants dans les cellules porteuses de la mutation incubées avec de la staurosporine que dans les cellules sauvages. De plus, d'autres marqueurs de l'apoptose, tel que le cytochrome c, ont été étudiés au sein de notre laboratoire et ont révélé que sa libération dans le cytosol suite à un traitement par la staurosporine, ne pouvait être observée. Ceci suggérerait que le mécanisme par lequel l'apoptose est déclenchée par la staurosporine dans ces cellules n'est pas classique.

Dans ce contexte, le but de notre travail est de déterminer, si l'hypersensibilité à l'apoptose des cellules cybrides MERRF traitées par la staurosporine est un cas particulier, ou s'il peut être généralisé a) à d'autres types de dysfonctionnements mitochondriaux et/ou b) à des inducteurs de l'apoptose qui déclenchent des mécanismes différents de la staurosporine.

Nous avons donc dans un premier temps évalué la réponse apoptotique à la staurosporine de cellules cybrides porteuses d'une autre mutation dans l'ADN mt, la mutation ponctuelle A3243G dans le gène codant l'ARNt<sup>leu</sup>, responsable du syndrome MELAS. Dans un deuxième temps, nous avons traité les cellules cybrides MERRF avec 3 différents inducteurs de l'apoptose, afin de mesurer si les marqueurs de l'apoptose sont plus abondants dans les cellules mutées que dans les cellules sauvages. Les marqueurs étudiés sont l'activité de la caspase-3 et la fragmentation internucléosomale de l'ADN. Ces données constituent la première partie des résultats. Dans une seconde partie, nous avons commencé à rechercher le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) à cette hypersensibilité à l'apoptose des cellules mutées.

- 3.1 Étude de la sensibilité à l'apoptose induite dans des cellules porteuses ou non d'une mutation dans l'ADN mitochondrial.
- 3.1.1 Étude de la sensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine dans des cellules porteuses de la mutation A3243G (MELAS).
- 3.1.1.1 Dosage de l'activité caspase 3 dans les cellules cybrides MELAS en réponse à la staurosporine.

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre au point le modèle d'apoptose induite qui nous permettrait de visualiser au mieux une réponse différentielle entre les cellules

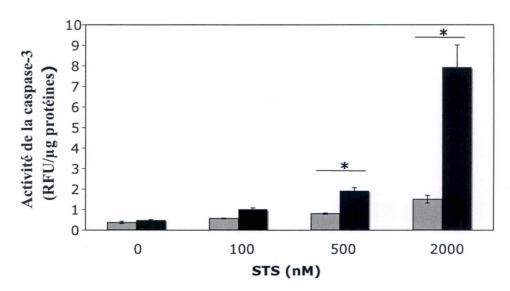


Figure 3.1 : Effet de la staurosporine sur l'activité de la caspase-3 dans des cellules cybrides MELAS sauvages et mutées. Les cellules cybrides sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires) ont été incubées durant 6 heures avec de la staurosporine à 100 nM, 500 nM ou 2000 nM. Les cellules sont rincées, lysées et le dosage de l'activité caspase-3 est effectué en présence d'un substrat fuorogène de l'enzyme (Ac-DEVD-AFC). Les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines engagées dans le test, sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence /  $\mu$ g de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D pour n=3. \* = P<0.05

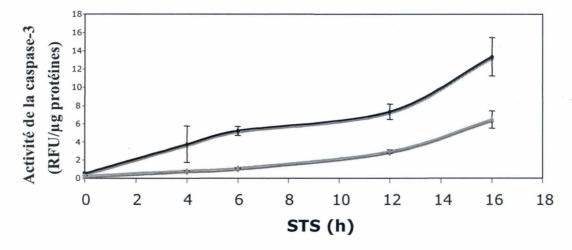


Figure 3.2 : Effet de la staurosporine sur l'activité de la caspase-3 au cours du temps dans des cellules cybrides MELAS sauvages et mutées. Le cellules cybrides sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires) ont été incubées durant 4, 6, 12 et 16 heures avec de la staurosporine à 500 nM. Les cellules sont rincées, lysées et le dosage de l'activité caspase-3 est effectué en présence d'un substrat fluorogène de l'enzyme (Ac-DEVD-AFC). Les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines engagées dans le test, sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence / μg de protéines et représentent la moyenne ± 1 S.D pour n=3.

sauvages et mutées, c'est pourquoi nous avons réalisé une mesure de l'activité de la caspase-3 en fonction de concentrations croissantes en staurosporine et ensuite en fonction du temps d'incubation.

Les cellules cybrides sauvages et mutées MELAS ont été ensemencées dans des plaques 6 puits et ensuite stimulées avec de la staurosporine à une concentration de 100, 500 ou 2000 nM pendant 6 heures ou stimulées avec de la staurosporine 500 nM pendant 4, 6, 12 et 16 heures. Par la suite, les cellules sont lysées, et le dosage de l'activité de la caspase-3 est mesuré à l'aide d'un tampon de réaction contenant du Ac-DEVD-AFC qui est un substrat synthétique de la caspase 3. Lorsque ce substrat est clivé, celui-ci devient fluorescent et cette fluorescence est mesurée grâce à un spectrofluorimètre. Ces mesures d'intensités de fluorescence sont donc directement proportionnelles à l'activité de la caspase 3 et ces résultats sont normalisés par la quantité de protéines engagées dans le test.

Sur la **figure 3.1**, on peut observer qu'en présence de staurosporine, l'activité de la caspase 3 augmente dans les cellules cybrides MELAS sauvages et mutées. De plus, l'activité de cette caspase en réponse à la staurosporine est significativement plus importante dans les cellules mutées que dans les cellules sauvages pour les concentrations de 500 nM et 2  $\mu$ M en staurosporine. La réponse des cellules mutées dépend donc de la concentration en staurosporine. De plus, sur la **figure 3.2**, on peut voir une augmentation de l'activité de la caspase 3 au cours du temps, plus importante dans les cellules MELAS mutées que dans les cellules sauvages, avec 500 nM de staurosporine. Pour la suite des tests, nous avons décidé de garder la concentration de 500 nM de staurosporine et un temps de 6 heures pour induire l'apoptose.

## 3.1.1.2 Étude de l'abondance de la caspase 3 active dans les cellules cybrides MELAS en réponse à la staurosporine.

Afin de confirmer les résultats du dosage de l'activité de la caspase 3 et d'estimer la distribution de l'activité de cette enzyme dans la population des cellules cybrides, nous avons réalisé un marquage immunocytochimique de la caspase 3 active dans les différentes conditions expérimentales. Les cellules cybrides sauvages et mutées MELAS ont été incubées ou non avec 500 nM de staurosporine pendant 6 heures avant d'être fixées à l'aide de paraformaldéhyde et marquées grâce à un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme clivée active de la caspase 3.

Les micrographies présentées à la **figure 3.3** montrent que le marquage de la caspase 3 est plus important dans les cellules traitées à la staurosporine que dans les cellules contrôles. De plus, nous pouvons constater que le nombre de cellules présentant un marquage positif est plus important dans les cellules mutées incubées pendant 6 heures avec de la staurosporine **(figure 3.3 D)** que dans les cellules sauvages dans la même condition **(figure 3.3 B)**, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par le dosage de l'activité de la caspase 3 **(figure 3.1)**. Cependant si l'activité de la caspase 3 est effectivement plus importante dans les cellules mutées en réponse à la staurosporine, le marquage immunocytochimique indique clairement que la réponse à la staurosporine est hétérogène dans la population cellulaire.

Afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide du marqueur de l'apoptose qu'est la caspase 3 dans ces deux modèles, nous avons décidé d'étudier une réponse qui intervient tardivement dans un processus apoptotique : la fragmentation internucléosomale de l'ADN.

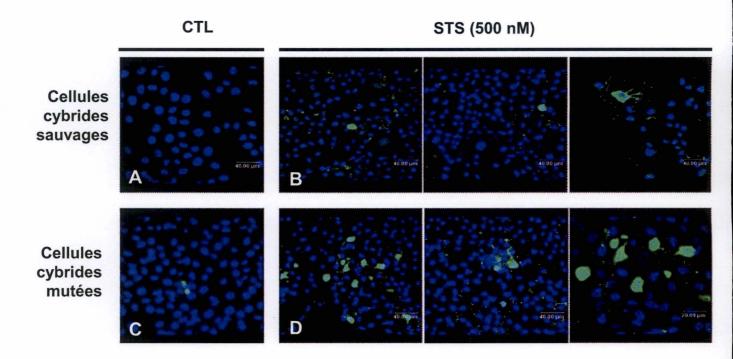


Figure 3.3.: Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocal de la protéine caspase-3 active dans des cellules cybrides MELAS sauvages (A et B) et mutées (C et D). Les cellules cybrides cultivées sur des lames porte-objets sont incubées ou non (A, C) pendant 6 heures en présence de 500 nM (B et D) de staurosporine et sont ensuite fixées à la paraformaldéhyde et perméabilisées au Triton X-100 avant le marquage avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme clivée et active de la caspase-3 (marquage vert). Les noyau sont révélés à l'aide du TOPRO-3 (marquage bleu)

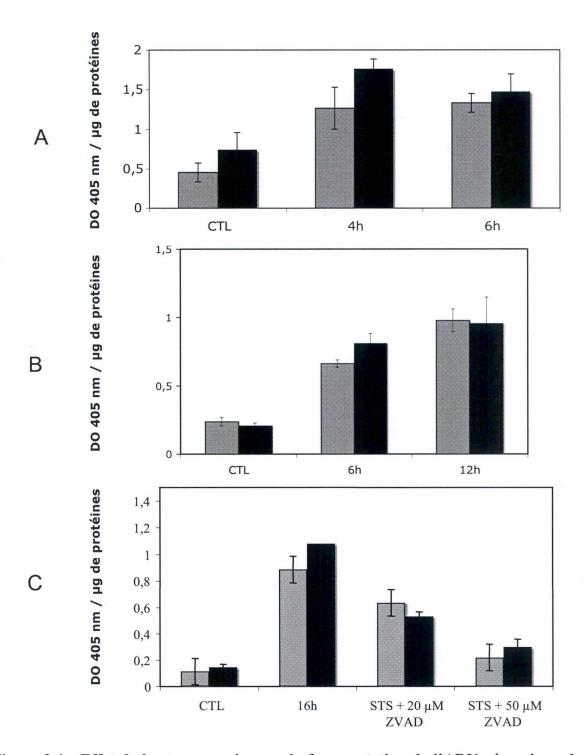


Figure 3.4 : Effet de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN génomique dans des cellules cybrides MELAS sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires). A et B) Les cellules ont été incubées ou non (CTL) en présence de 500 nM de staurosporine (STS) pendant 4, 6 ou 12 heures.

C) Les cellules ont été incubées durant 16 heures en absence (CTL) ou en présence de 500 nM de staurosporine, additionnée ou non de  $20\mu M$  ou  $50~\mu M$  de z-VAD-fmk. Le dosage de la fragmentation est ensuite effectué grâce au kit « Cell Death Detection Elisa » (voir matériel et méthodes). Les résultats représentant les valeurs d'absorbance obtenues, normalisées par les quantités de protéines engagées dans le test, sont exprimés en D.O. /  $\mu g$  de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n=3.

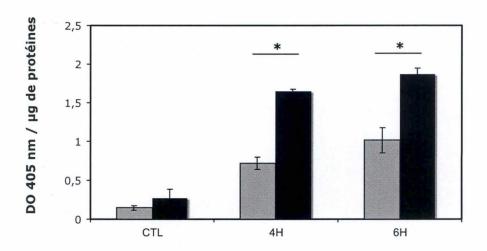


Figure 3.5 : Effet de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN génomique dans des cellules cybrides MELAS sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires). Les cellules ont été incubées ou non (CTL) en présence de 2  $\mu$ M de staurosporine (STS) pendant 4 ou 6 heures. Le dosage de la fragmentation de l'ADN est ensuite effectué grâce au kit « Cell Death Detection Elisa » (voir matériel et méthodes). Les résultats représentant les valeurs d'absorbance obtenues, normalisées par les quantités de protéines engagées dans le test, sont exprimés en D.O. /  $\mu$ g de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n=3. \* = P<0.05

## 3.1.1.3 Etude de la fragmentation de l'ADN génomique dans les cellules cybrides MELAS en réponse à la staurosporine.

L'apoptose est caractérisé tardivement par un processus de fragmentation de l'ADN génomique entre les nucléosomes, générant des fragments d'ADN de 180 paires de bases ou d'un multiple de 180 paires de bases. Les nucléases à l'origine de ce processus sont connues pour être activées par les caspases. Ce phénomène de fragmentation internucléosomale de l'ADN est quantifiable à l'aide d'un test ELISA dans lequel les fragments de l'ADN sont capturés grâce à des anticorps anti-histones. Ensuite, la présence de ces fragments est révélée grâce à des anticorps anti-ADN couplés à une peroxydase.

Le dosage est effectué sur des échantillons préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées MELAS préalablement incubées durant 0, 4 et 6 heures en présence de staurosporine à une concentration de 500 nM. Les résultats de ces dosages (figure 3.4.A) montrent que la staurosporine induit effectivement une fragmentation internucléosomale de l'ADN dans les deux lignées cellulaires à 4 et 6 heures. Cependant, contrairement à ce que nous avons observé dans les résultats de l'activité de la caspase 3, il n'y aucune différence significative de fragmentation entre les cellules sauvages et les cellules mutées MELAS avec 500 nM de staurosporine durant 4 et 6 heures. Ces résultats sont en contradiction avec des expériences similaires qui ont été réalisées par Liu et ses collaborateurs (Liu, Lee et al. 2004) et qui montrent une fragmentation de l'ADN (DNA ladder par électrophorèse) plus importante dans les cellules porteuses de la mutation MELAS à l'apoptose induite par 100 nM de staurosporine ou par les UV. C'est pourquoi nous avons décidé d'augmenter le temps d'incubation afin de voir si une réponse différentielle pouvait être observée après une plus longue incubation avec la staurosporine. Les résultats à 12 et 16 heures sont représentés respectivement à la figure 3.4.B et figure 3.4.C : ces résultats ne montrent pas de différences entre les lignées de cellules cybrides sauvages et mutées.

De plus, afin d'évaluer l'implication des caspases dans le processus de fragmentation de l'ADN, nous avons aussi incubé les cellules durant 16 heures avec un inhibiteur de pancaspases qui agit en se fixant au site actif de ces protéases, le z-VAD-fmk (20 ou 50  $\mu$ M) en plus de 500 nM de staurosporine. Ces résultats (**figure 3.4.C**) générés avec l'inhibiteur de pan-caspases, montrent que plus la dose de cet inhibiteur est importante, plus la fragmentation diminue. Ce résultat suggère donc une implication importante des caspases dans le processus de fragmentation.

Afin de chercher une réponse différentielle entre les 2 lignées cellulaires, nous avons mesuré la fragmentation de l'ADN induite par des concentrations de staurosporine plus élevées. En effet, les résultats de la **figure 3.1** indiquent que la réponse différentielle de l'activité de la caspase 3 est beaucoup plus importante à 2  $\mu$ M. Les cellules cybrides MELAS ont donc été incubées avec 2  $\mu$ M de staurosporine durant 4 ou 6 heures. Les résultats de la **figure 3.5** indiquent que la fragmentation de l'ADN induite par un traitement de 4 ou 6 heures en présence de 2  $\mu$ M de staurosporine est plus importante dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages. De plus, la fragmentation de l'ADN induite par 2  $\mu$ M de staurosporine dépend également des caspases puisqu'elle est totalement inhibée en présence de 50  $\mu$ M de z-VAD-fmk (données non montrées). Ces données montrent que la mutation A3243G (MELAS) est responsable d'une augmentation de la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par la staurosporine. De plus l'utilisation d'inhibiteur de pan-caspase à forte concentration nous permet d'établir que ce phénomène dépend des caspases.

#### 3.1.1.4 Conclusion

En conclusion, dans les cellules cybrides mutées MELAS, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'apoptose induite par la staurosporine par rapport à des cellules sauvages. Ceci confirme l'étude similaire menée par Liu et ses collaborateurs, décrite précédemment (Liu, 2004).

De plus, d'autres modèles de cellules cybrides porteuses d'une mutation dans l'ADN mitochondrial montrent des résultats similaires. Une étude similaire a été réalisée sur une autre maladie mitochondriale qui implique deux mutations (L217R et L156R) dans le génome mitochondrial, sur le gène codant la sous-unité 6 de l'ATPase (maternally-inherited Leigh syndrome). Dans cette étude, les auteurs ont travaillé avec des cellules cybrides issues de la fusion de fibroblastes énucléés de patients atteints d'une des deux mutations et de cellules 143B rho<sup>+</sup>. Ils ont pu montrer une augmentation de l'apoptose induite dans les cellules porteuses des mutations incubées en présence de 100 nM de staurosporine pendant 6 heures. Ces résultats ont été obtenus en évaluant la fragmentation de l'ADN et le flip-flop de la phosphatidylsérine, mis en évidence par un double marquage à l'annexinV/Iodure de propidium. Ce marquage permet par cytométrie de flux de différencier les cellules qui sont en apoptose et les cellules qui sont en nécrose : en phase précoce de l'apoptose, on observe la translocation de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane plasmique. Celle-ci est mise en évidence par fixation spécifique de l'annexine V couplée à un fluorophore. L'iodure de propidium quant à lui est un agent intercalant de l'ADN incapable de traverser la membrane plasmique et qui marque l'ADN en cas de nécrose, lorsque l'intégrité de la membrane est perdue, tandis qu'il n'y a pas de marquage en cas d'apoptose (Moore, Donahue et al. 1998).

Dans d'autres modèles de dysfonctionnement mitochondrial comme les cellules déplétées en ADN mt, la question de la sensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine reste controversée, certains groupes indiquant que la perte de l'ADN mt sensibilise les cellules à l'apoptose induite par la staurosporine, alors que d'autres groupes suggèrent que des cellules rho<sup>0</sup> sont plus résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine. Par exemple, les myoblastes C2C12 murins partiellement déplétés en ADN mt (rho ) se sont avérés plus résistants à un traitement de 4 h en présence de staurosporine, ce qui est à mettre en relation avec la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans ces cellules rho (Biswas, Anandatheerthavarada et al. 2005). L'effet de la staurosporine a été analysé sur plusieurs paramètres dont le potentiel de membrane mitochondrial et sur les niveaux de radicaux libres. Les résultats ont montré que les cellules parentales présentaient une perte de potentiel de membrane beaucoup plus importante que les cellules rho<sup>0</sup> en présence de 1 µM de staurosporine pendant 6 heures (Ferraresi, Troiano et al. 2008). Il faut toutefois mentionner que notre groupe a démontré des résultats opposés à ceux-ci sur le même type cellulaire, mais avec une concentration de 2 µM de staurosporine pendant 6 heures (Rommelaere et al, en révision).

## 3.1.2 Étude de la sensibilité à l'apoptose induite par le TNFα, TRAIL ou l'étoposide dans des cellules porteuses de la mutation A8344G (MERRF).

3.1.2.1 Dosage de l'activité caspase 3 dans les cellules cybrides MERRF en réponse au TNFa, TRAIL ou l'étoposide.

Il a déjà été montré que les cellules cybrides mutées MERRF sont plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine que leur équivalent sauvage (voir point 1.5.2.1 de l'introduction), mais cela ne signifie pas que la mutation MERRF sensibilise les cellules à

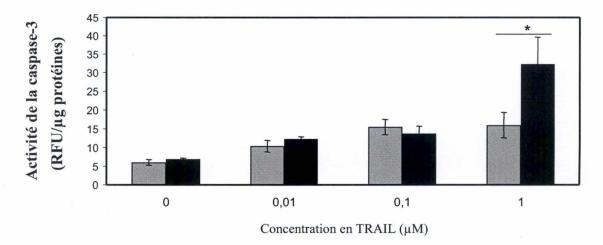


Figure 3.6 : Effet de la protéine TRAIL sur l'activité de la caspase-3 dans des cellules cybrides MERRF sauvages et mutées. Les cellules cybrides sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires) ont été incubées durant 24 heures avec de la protéine TRAIL à 0; 0,01; 0,1 ou 1 μM. Les cellules sont rincées, lysées et le dosage de l'activité caspase-3 est effectué en présence d'un substrat fluorogène de l'enzyme (Ac-DEVD-AFC). Les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines engagées dans le test, sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence / μg de protéines et représentent la moyenne ± 1 S.D pour n=3. \* = P<0.05

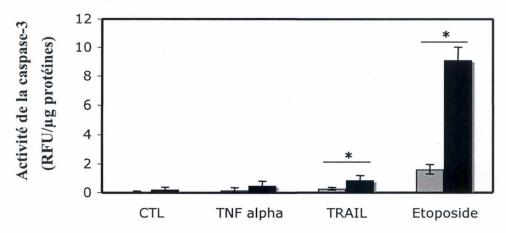


Figure 3.7 : Effet de l'étoposide, de la protéine TRAIL et du TNF alpha sur l'activité de la caspase-3 dans des cellules cybrides MERRF sauvages et mutées. Les cellules cybrides sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires) ont été incubées durant 24 heures avec 100 nM d'étoposide, 1 μM de TRAIL et 50 μg/ml de TNF alpha à. Les cellules sont rincées, lysées et le dosage de l'activité caspase-3 est effectué en présence d'un substrat fluorogène de l'enzyme (Ac-DEVD-AFC). Les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines engagées dans le test, sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence / μg de protéines et représentent la moyenne ± 1 S.D pour n=3. \* = P<0.05

d'autres types de stress cellulaires. C'est pourquoi nous avons décidé de déclencher l'apoptose avec d'autres molécules afin de réaliser une étude complémentaire comparative qui permettrait de mieux comprendre la réponse apoptotique des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. La staurosporine étant connue pour cibler la mitochondrie (voir point 1.5.2.3 de l'introduction) notre choix s'est porté sur des molécules qui n'affectaient pas directement la mitochondrie, c'est-à-dire deux cytokines capables d'activer la voie extrinsèque, et une molécule entraînant des dommages à l'ADN. Nous avons tout d'abord choisi le TNFa parce que son récepteur est surexprimé en surface des cellules musculaires provenant des biopsies de patients atteints du syndrome MERRF (Mirabella, Di Giovanni et al. 2000). La cytokine TRAIL nous a également semblé être un bon candidat, d'une part parce que son récepteur est exprimé sur les cellules 143B (Shabobo, Aixi et al. 2007) que nous utilisons, et d'autre part parce que cette molécule provoque une apoptose accrue dans des cellules porteuses de la délétion commune de 5 Kb, (Schoeler, Szibor et al. 2005). Le troisième inducteur que nous avons choisi est l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II, responsable de la formation de cassures dans l'ADN. Ces dommages à l'ADN peuvent activer le facteur de transcription p53, provoquant l'expression de gènes codant des protéines pro-apoptotiques (voir point 1.3.2.1.2 de l'introduction).

Nous avons tout d'abord recherché les conditions de concentration et de durée d'incubation en présence des inducteurs apoptotiques permettant de détecter une activité de la caspase 3 différentielle entre les cellules mutées et les cellules sauvages. Les premiers essais réalisés se sont révélés infructueux (données non montrées), puisque nous ne mesurions pas d'activité caspase 3. En cherchant à comprendre pourquoi les cellules ne réagissaient pas à trois inducteurs de l'apoptose, nous avons lu que la plupart des études réalisées avec ces molécules s'effectuent dans des milieux sans sérum. D'une part, les constituants sériques peuvent adsorber une partie des molécules pro-apoptotiques ajoutées dans le milieu, et d'autre part certains constituants du sérum peuvent interférer avec les voies d'activation déclenchées par les inducteurs apoptotiques. Ainsi, le sérum peut interférer avec les réponses cellulaires déclencher par la protéine TRAIL: le sérum peut contenir de l'IGF-1 (insuline-like growth factor 1) et le récepteur à l'IGF-1 inhiberait le récepteur Apo2L (récepteur de la protéine TRAIL) par un mécanisme encore non décrit (Mitsiades, 2002).

Nous avons donc effectué un dosage d'activité caspase 3 sur des cellules privées de sérum durant 24 heures avant l'induction de l'apoptose, puis stimulées ou non avec 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ou 1  $\mu$ M de TRAIL pendant 24 heures. Ces conditions de stimulation sont similaires à celles qui sont utilisées par Schoeler et ses collaborateurs sur des cellules cybrides porteuses de la délétion commune (Schoeler, Szibor et al. 2005). On peut observer sur la figure 3.6 que même de faibles concentrations de TRAIL peuvent induire une légère activation de la caspase 3. Néanmoins, c'est seulement à partir d'une concentration de 1  $\mu$ M de TRAIL que l'on peut observer une différence significative entre les cellules sauvages et les cellules mutées.

L'activité de la caspase 3 a ensuite été mesurée dans les cellules mutées MERRF privées de sérum durant 24h puis incubées en présence des deux autres inducteurs : le TNFa et l'étoposide. L'activité de la caspase 3 a été mesurée sur des cellules cybrides MERRF stimulées ou non avec 50 ng/μl TNFα, 1 μM TRAIL ou 100 nM d'étoposide pendant 24 heures. La différence d'activité de la caspase 3 entre les cellules cybrides mutées et sauvages incubées en présence de TRAIL observée dans la figure 3.6 se confirme dans la figure 3.7. La figure 3.7 indique également que le TNFα n'active que très peu la caspase 3. Par contre, l'activité de la caspase 3 en réponse à l'étoposide est beaucoup plus importante que dans le cas du TNFα ou même de TRAIL. De plus, l'activité de la caspase 3 induite par l'étoposide est significativement plus importante dans les cellules MERRF mutées que chez les sauvages.

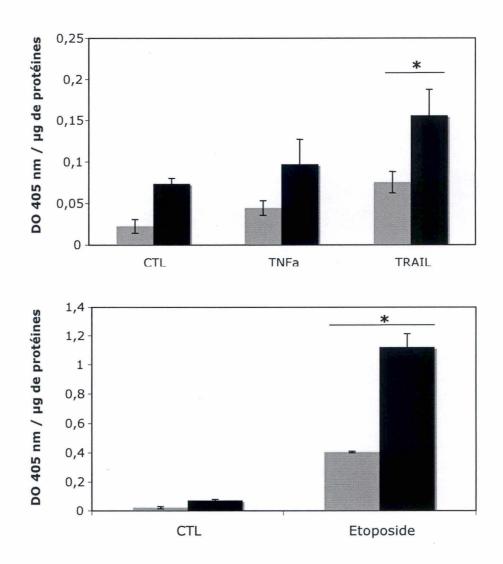


Figure 3.8 : Effet de l'étoposide, de la protéine TRAIL et du TNF alpha sur la fragmentation de l'ADN génomique dans des cellules cybrides MERRF sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires). Les cellules ont été incubées ou non (CTL) durant 24 heures en présence de 100 nM d'étoposide, de 1  $\mu$ M de la protéine TRAIL et de 50  $\mu$ g/ml de TNF alpha. Le dosage de la fragmentation est ensuite effectué grâce au kit « Cell Death Detection Elisa » (voir matériel et méthodes). Les résultats représentant les valeurs d'absorbance obtenues, normalisées par les quantités de protéines engagées dans le test, sont exprimés en D.O. /  $\mu$ g de protéines comme la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n=3. \* = P<0.05

Tout comme pour les cellules cybrides MELAS, nous avons voulu confirmer les résultats du dosage de l'activité de la caspase 3 et estimer la distribution de l'activité de cette caspase dans la population des cellules cybrides en effectuant un marquage immunocytochimique. Cette expérience n'a cependant pas abouti car les cellules ne sont pas restées adhérentes lors des manipulations d'immunocytochimie car elles ont été surement fragilisées par 24h de privation de sérum et suivies de 24h de traitement en présence d'un inducteur apoptotique.

### 3.1.2.2 Etude de la fragmentation de l'ADN génomique dans les cybrides MERRF en réponse au TNFα, TRAIL ou l'étoposide.

La réponse des cellules cybrides MERRF aux 3 inducteurs apoptotiques a par la suite été caractérisée au niveau de la fragmentation de l'ADN, qui est une réponse tardive dans un processus apoptotique. La fragmentation de l'ADN dans des cellules cybrides sauvages et mutées MERRF stimulées ou non avec 50 ng/µl TNFα, 1 µM TRAIL ou 100 nM d'étoposide pendant 24 heures a été évaluée par ELISA (voir point 2.7 du matériels et méthodes). Les résultats de ces dosages sont présentés sur la **figure 3.8** et les résultats de la condition étoposide sont dissociés des autres pour des raisons de clarté et d'échelle.

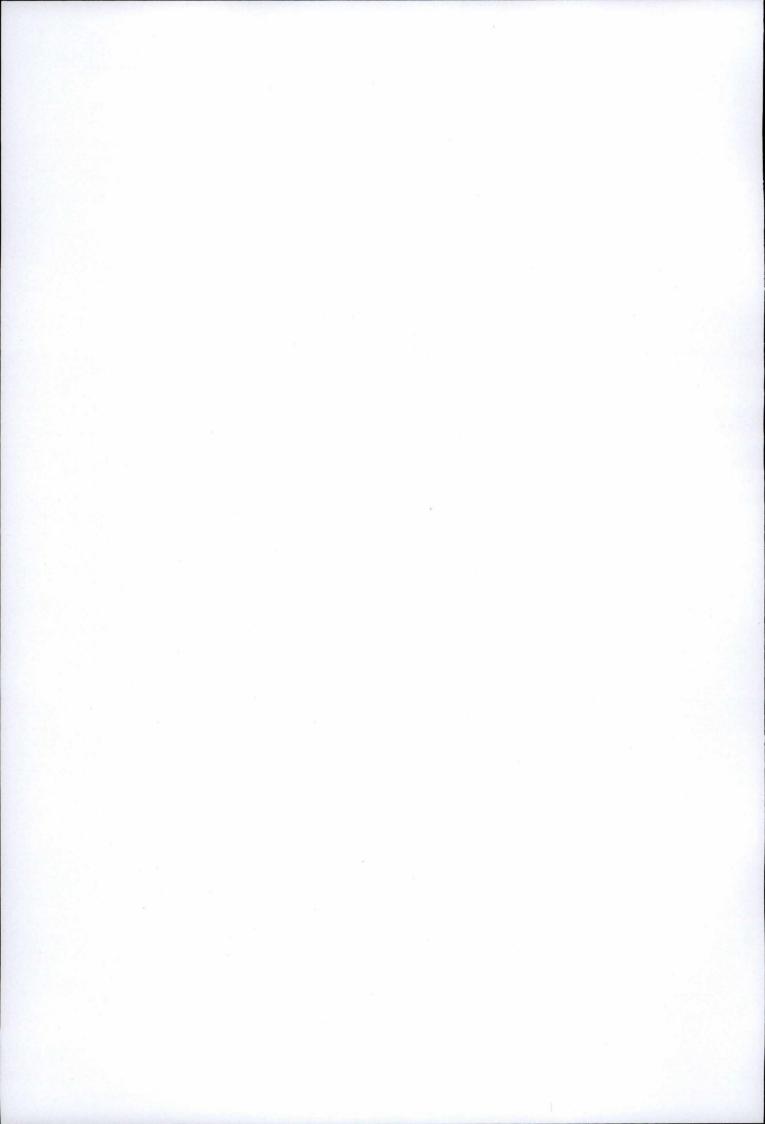
Nous pouvons tout d'abord constater que le TNFα n'induit pas une fragmentation significativement plus importante que celle observée dans les conditions contrôles. Par contre, à la fois TRAIL et l'étoposide entraînent une fragmentation de l'ADN, celle-ci étant beaucoup moins prononcée en présence de TRAIL qu'en présence d'étoposide. Dans les deux cas, la fragmentation de l'ADN observée est significativement plus importante dans les cellules mutées que dans les cellules sauvages. Ces résultats, joints aux résultats de l'activité de la caspase 3, confirment donc que les cellules cybrides mutées MERRF sont plus sensibles à l'apoptose induite par TRAIL et l'étoposide que les cellules sauvages. Étant donné que les cellules cybrides mutées MERRF sont également plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine, ces résultats confirment donc que les cellules cybrides mutées MERRF sont hypersensibles à l'apoptose déclenchée par différents inducteurs de la mort cellulaire programmée agissant par des mécanismes très différents.

#### 3.1.2.3 Conclusion

En conclusion, après les mises au point détaillées dans le point 2.1 du matériel et méthode, qui consistent à priver les cellules de sérum 1 jour avant le traitement avec les différents inducteurs, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'apoptose induite par rapport à des cellules sauvages.

Ces résultats vont dans le sens d'une étude réalisée avec la protéine TRAIL sur un autre modèle de dysfonctionnement mitochondrial (Schoeler, Szibor et al. 2005) : dans des cellules 143B contenant des mitochondries dont le génome présente la délétion commune de 5Kb, la mort cellulaire induite avec 25 ng/ml de TRAIL est plus importante que dans des cellules sauvages. Ceci a été réalisé à l'aide d'un test de survie (MTT) qui permet d'évaluer la mort cellulaire grâce à un dosage de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale qui transforme le tétrazolium (jaune) en formazan (bleu-violacé) (Sargent 2003).

Pour la suite de ce mémoire, nous n'utiliserons plus le TNF $\alpha$  comme inducteur, puisque celui-ci ne déclenche que très peu l'apparition des marqueurs de l'apoptose comme la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN. De plus les incubations en présence de TNF $\alpha$  n'ont pas permis de démontrer de réponse différentielle. Le fait que le TNF $\alpha$  n'induise pas



l'apoptose peut s'expliquer par le mécanisme d'action double de son récepteur, qui peut soit permettre la survie de la cellule, soit déclencher l'apoptose. En effet, le TNFα peut induire l'activation du facteur de transcription NFκB et donc la transcription et la traduction de protéines intervenant dans la survie de la cellule (voir le point 1.3.2.1.2 de l'introduction). D'autres études menées sur l'apoptose induite dans des cellules porteuses d'autres mutations mitochondriales ont permis de montrer une hypersensibilité des cellules mutées à l'apoptose induite par le TNFα (Wang, 2000; Carrozzo, 2004). Par exemple, Carrozzo et son équipe ont montré à l'aide de mesure de fragmentation de l'ADN et d'un double marquage à l'annexinV/Iodure de propidium que des cellules cybrides issues de la fusion de fibroblastes énucléés de patients atteints de MILS (maternally inherited Leigh's syndrome) et de cellules 143B rho étaient plus sensibles à l'apoptose induite par 50 UI/ml de TNFα durant 4 heures. Cependant les auteurs incubaient leurs cellules avec le TNFα en présence d'actinomycine D, un inhibiteur de la machinerie de transcription. Dans ces conditions, la voie pro-survie dépendante du facteur NFκB est inhibée, permettant de déclencher l'apoptose.

## 3.2 Recherche des mécanismes de l'hypersensibilité à l'apoptose induite dans des cellules porteuses d'une mutation dans l'ADN mitochondrial.

## 3.2.1 Recherche des mécanismes sous-tendant l'hypersensibilité à l'apoptose induite dans des cellules cybrides MELAS.

Après avoir montré un effet différentiel de différents inducteurs de l'apoptose sur les cellules cybrides mutées MERRF ou MELAS, nous avons voulu rechercher les mécanismes potentiellement impliqués dans la réponse apoptotique en recherchant une perméabilisation de la membrane mitochondriale interne permettant la libération des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c ou SMAC/DIABLO. La recherche de ces facteurs se justifie par le fait puisqu'il s'agit d'un point de convergence possible des processus apoptotiques induits classiquement par un inducteur de la voie extrinsèque (TRAIL), une molécule qui induit des dommages à l'ADN (l'étoposide) et la staurosporine (voir point 1.5.2 de l'introduction).

## 3.2.1.1 Étude de la localisation et de l'abondance du cytochrome c et de SMAC/DIABLO dans les cellules cybrides sauvages et mutées MELAS en réponse à la staurosporine.

La délocalisation de protéines apoptogènes telles que le cytochrome c ou SMAC/DIABLO de la mitochondrie vers le cytosol est un point de non retour dans le déclenchement de l'apoptose suivant la voie canonique (point 1.3.2.1 de l'introduction). Nous avons donc recherché l'abondance et la localisation de ces protéines dans les fractions cytosoliques et mitochondriales de cellules cybrides sauvages et mutées MELAS traitées ou non avec de la staurosporine.

Les cellules MELAS ont été incubées ou non pendant 6 heures avec de la staurosporine à une concentration de 2 µM. Un fractionnement par centrifugations différentielles a ensuite permis de préparer des fractions enrichies en cytosol (fraction S) ou en mitochondries (fraction M). 10 µg d'extraits protéiques des fractions cytosoliques et mitochondriales ont été résolus par électrophorèse à l'aide d'un gel Nu-PAGE 3-12%. Après électrophorèse et transfert des protéines sur une membrane de PVDF, l'abondance et la

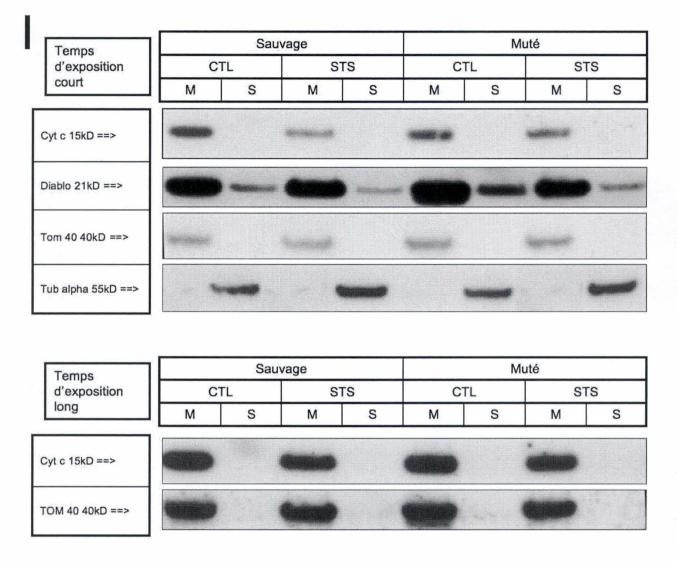


Figure 3.9 : Analyse de l'abondance du cytochrome c (cyt c) et de Smac/Diablo (Diablo) en Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugation différentielle à partir de cellules cybrides MELAS sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (2  $\mu$ M) pendant 6 heures. Les cellules ont été incubées (STS) ou non (CTL) avec 2  $\mu$ M de staurosporine durant 6 heures avant la préparation des fractions mitochondriales (M) et cytosoliques (S). 6  $\mu$ g de protéines pour les fractions mitochondriales ou cytosoliques ont été résolus par électrophorèse suivie d'un immunoblotting pour le cytochrome c, SMAC/DIABLO, TOM 40 (contrôle de charge mitochondriale) ou tubuline alpha (contrôle de charge cytosolique).

localisation des protéines dans les différentes fractions ont été révélées à l'aide d'un set d'anticorps spécifiques.

Les Western blots présentés à la **figure 3.9** montrent que le cytochrome c est détecté uniquement dans les fractions mitochondriales, et que son abondance est comparable entre les cellules cybrides traitées ou non par la staurosporine. Même après un temps d'exposition long (30 minutes), le cytochrome c n'est pas détecté dans les fractions cytosoliques. Ces résultats indiquent clairement qu'un traitement de 6 heures en présence de 2  $\mu$ M de staurosporine ne provoque pas de libération de cytochrome c hors de la mitochondrie des cellules cybrides MELAS. Ceci est à mettre en relation avec les données obtenues précédemment au laboratoire (voir point 1.5.2 de l'introduction) indiquant qu'un traitement avec 500 nM de staurosporine ne déclenche pas non plus de libération de cytochrome c dans le cytosol dans les cellules cybrides MERRF.

Ces résultats peuvent paraître surprenants, puisque la staurosporine est connue pour provoquer la libération du cytochrome c dans des cellules d'ostéosarcome traitées avec 1 µM de staurosporine pendant 6 heures rho<sup>0</sup> (Jiang, Cai et al. 1999; Duan, Hajek et al. 2003). Ce phénomène est aussi constaté dans des cellules cybrides porteuses de la mutation MILS après une incubation avec 100 nM de staurosporine pendant 6 heures (Carrozzo, Rizza et al. 2004).

Nous avons vu dans le point 1.3.2.1.1 de l'introduction que dans des processus apoptotiques, la libération du cytochrome c dans le cytosol entraînait la formation de l'apoptosome et l'activation de caspases effectrices comme la caspase 3. Dans les conditions expérimentales utilisées, les cellules présentent une forte activation de la caspase 3. En absence de libération de cytochrome c, on peut donc se demander par quel processus la caspase 3 est activée suite à un traitement à la staurosporine.

D'autres facteurs apoptogènes sont séquestrés dans la mitochondrie et peuvent éventuellement en être libérés indépendamment du cytochrome c. Dans des cellules d'ostéosarcome, on a montré une libération de SMAC/DIABLO indépendamment du cytochrome c, lorsque l'apoptose était induite par S100A8/A9, des molécules libérées par phagocytes activés et exerçant une activité antimicrobienne et cytotoxique vis-à-vis de différentes cellules tumorales (Ghavami, Kerkhoff et al. 2008). SMAC/DIABLO est une protéine mitochondriale qui peut être libérée, tout comme le cytochrome c, lors de l'apoptose. Cette protéine une fois dans le cytosol agit comme un inhibiteur des IAPs et donc permet de lever l'inhibition des IAPs sur les caspases. C'est pourquoi nous avons cherché la présence de SMAC/DIABLO dans des fractions mitochondriales et cytosoliques en utilisant les mêmes membranes de Western Blot que celles qui ont servi à la détection du cytochrome c. La figure 3.9 nous montre qu'il n'y a pas d'augmentation de l'abondance de SMAC/DIABLO dans les fractions cytosoliques des différentes conditions en présence ou non de staurosporine. Le processus d'hypersensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine ne fait pas par conséquence intervenir cet inhibiteur IAPs.

Chose étonnante, nous observons une présence basale de SMAC/DIABLO dans le cytoplasme de nos cellules sauvages et mutées que nous ne pouvons pas expliquer et qui n'est pas décrit dans la littérature.

D'autres facteurs comme l'endonucléase G (Endo G) et apoptosis inducing factor (AIF) pourrait être des candidats intéressants car ils interviennent dans la fragmentation de l'ADN. En effet dans des cellules cybrides issues de la fusion de cellules 143B rho<sup>0</sup> avec des cytoplastes de patients atteints de la maladie de LHON, l'équipe du professeur Rugolo a pu montrer qu'en remplaçant le glucose par du galactose dans le milieu de culture, on pouvait déclencher une apoptose plus importante dans les cellules mutées sans qu'il y ait libération de cytochrome c, mais avec la libération de deux autres protéines mitochondriales que sont Endo

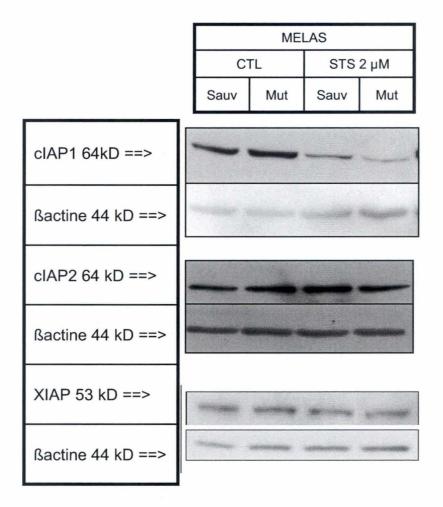


Figure 3.10 : Analyse de l'abondance des protéines cIAP-1, cIAP-2 et XIAP par Western blot dans des extraits totaux préparés à partir de cellules cybrides MELAS sauvages (Sauv) et mutées (Mut) traitées ou non à la staurosporine (2 μM) pendant 6 heures. Les cellules ont été incubées ou non (CTL) avec 2 μM de staurosporine pendant 6 heures avant la préparation des extraits. 20 μg de protéines ont été résolus par électrophorèse suivie d'un immunoblotting pour cIAP-1, cIAP-2 et XIAP ou β-actine (contrôle de charge cytosolique).

G et AIF (Zanna, Ghelli et al. 2005). Cependant, les conditions permettant de mettre en évidence ces deux protéines par Western Blot ne sont pas encore au point au laboratoire.

En résumé, la délocalisation du cytochrome c n'a pas pu être mise en évidence dans les cellules MELAS en présence ou non de staurosporine. Ceci diffère des résultats obtenus dans plusieurs autres modèles de maladies mitochondriales, qui montrent une libération de cytochrome c dans le cytosol (Carrozzo, 2004; Liu, 2004). Étant donné que des cas de perméabilisation sélective ont été décrits, nous avons également cherché à mettre en évidence la délocalisation d'une autre protéine mitochondriale apoptogène, SMAC/DIABLO, mais l'abondance de celle-ci n'augmente pas suite à l'incubation en présence de staurosporine. La recherche de la libération d'autres protéines apoptogènes telles que EndoG et AIF devrait être poursuivie.

## 3.2.1.2 Étude des inhibiteurs de caspases (IAPs) dans les cellules cybrides sauvages et mutées MELAS en réponse à la staurosporine.

À la recherche d'autres effecteurs de l'apoptose qui pourraient être communs aux différents inducteurs apoptotiques utilisés, nous avons caractérisé l'abondance des protéines inhibitrices de caspases (IAPs). Les IAPs sont une famille de protéines inhibitrices des caspases. Dans notre laboratoire, il a déjà été montré que la staurosporine provoque une diminution de l'abondance protéique de cIAP1 et ne modifie pas l'abondance de cIAP2 dans les cellules cybrides MERRF (G. Rommelaere, thèse en cours). Afin de visualiser l'abondance des protéines de la famille des IAPs dans les cellules cybrides MELAS, des extraits totaux cellulaires ont été préparés à partir de cellules MELAS qui ont été incubées ou non pendant 6 heures avec 2 µM de staurosporine. L'abondance des principaux membres de la famille des IAPs (cIAP1, cIAP2 et XIAP) a été recherchée par Western Blot.

La figure 3.10 montre le western blot obtenu pour la protéine cIAP1, où l'on peut observer tout d'abord que les cellules non-traitées présentent un niveau de cIAP1 légèrement plus élevé dans les cellules mutées que dans les cellules sauvages. Ensuite, le traitement à la staurosporine déclenche une dégradation de cIAP-1, dégradation qui est plus marquée dans les cellules cybrides mutées. Les deux autres IAPs mises en évidence à la figure 3.10, XIAP et cIAP-2 ne montrent pas de variation d'abondance en fonction de la lignée ou du traitement.

Ces résultats indiquent une réponse nettement différente entre les membres de la famille de IAPs. Suite au traitement à la staurosporine, seul cIAP1 voit son niveau d'abondance modifié. Rappelons que cIAP1 est connue pour se lier à la caspase-3 active, entraînant la poly-ubiquitination de celle-ci, et la dégradation du complexe caspase-3-cIAP par le protéasome (voir point 1.3.1 de l'introduction). De plus, cIAP1 en cas de stress apoptotique est capable de s'autoubiquitiner, comme cela a été observé sur des thymocytes traités avec glucocorticoïdes et étoposide (Yang, Fang et al. 2000). On sait aussi maintenant que c-IAP1 peut ubiquitiner c-IAP2, conduisant à la dégradation via le protéasome de c-IAP2. Ceci explique que des niveaux élevés de c-IAP2 aient été observés dans des cellules KO pour le gène BIRC2. En outre, on se rend compte que les IAPs peuvent former entre eux des hétérodimères suggérant que leur stabilité serait fonction du complexe qu'ils forment. Le fonctionnement des IAPs est donc clairement plus complexe qu'il n'y paraissait au départ lorsque leur activité d'ubiquitination de la caspase-3 a été mise en évidence, mais ces éléments n'expliquent en rien, pourquoi seul cIAP-1 est dégradé et pas les autres membres de la famille (Varfolomeev and Vucic 2008). Néanmoins ce résultat a déjà été observé dans des hépatocytes fœtaux de rats incubés en présence de TGF-\u03b3, ceux-ci présentaient uniquement

1	MELAS				MERRF			
	CTL		STS		CTL		STS	
	Sauv	Mut	Sauv	Mut	Sauv	Mut	Sauv	Mut
Pro caspase 9 47 kD ==>			• (4)				***	
Caspase 9 active 37 kD =>			call Value					
Tub alpha 55 kD								

Figure 3.11 : Analyse de l'abondance de la protéine caspase 9 par Western blot dans des extraits totaux préparés à partir de cellules cybrides MELAS ou MERRF sauvages (Sauv) et mutées (Mut) traitées ou non à la staurosporine (500 ou 2 μM) pendant 6 heures. Les cellules ont été incubées ou non (CTL) avec 500 ou 2 μM de staurosporine pendant 6 heures avant la préparation des extraits. 20 μg de protéines ont été résolus par électrophorèse suivie d'un immunoblotting pour révéler la caspase 9 ou la tubuline alpha (contrôle de charge cytosolique).

une diminution d'abondance de cIAP-1 et pas de XIAP ou cIAP2 (Herrera, Fernandez et al. 2002)

3.2.1.3 Recherche de l'activation des caspases initiatrices dans les cellules cybrides sauvages et mutées MELAS en réponse à la staurosporine.

Comme nous avons pu le constater, la fragmentation de l'ADN est fortement dépendante de l'activité des caspases (**résultats 3.1.3**) et est cohérente avec la cinétique d'activation de la caspase 3 souvent considérée comme la principale caspase effectrice. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et de libération de facteurs apoptogènes (voir point 3.2.1.1). On peut donc s'interroger sur l'origine de l'activation de la caspase 3 dans les cellules cybrides incubées en présence de staurosporine. C'est pourquoi nous avons voulu mesurer l'activation d'autres caspases, activatrices cette fois : il s'agit des caspase 2, 8 et 9. Cependant, les mises au point des Western Blot permettant de visualiser les fragments clivés correspondant aux caspases 2 et 8 activées n'ont pas pu être terminées avant la fin de ce mémoire. Nous ne présenterons donc que les données concernant la caspase 9 sur des cellules cybrides MELAS stimulées avec 2 µM de staurosporine et sur des cellules cybrides MERRF stimulées avec 500 nM de staurosporine, l'activation de la caspase-9 n'ayant pas encore été documentée dans ces cellules.

Le Western Blot de la **figure 3.11** montre la pro-caspase 9 et la grande sous-unité clivée de cette pro-caspase 9. Ce clivage témoigne de l'activation de la caspase-9. Dans les cellules non-traitées, on n'observe pas de forme clivée (active) de cette caspase. Par contre, lorsque les cellules sont mises en présence de staurosporine, on peut détecter la forme clivée dans les cellules mutées MELAS, ainsi que dans les cellules MERRF, dans une moindre mesure.

Bien que ce résultat demande à être reproduit, il est néanmoins intéressant car il suggère que la caspase 9 pourrait être à l'origine de l'activation différentielle de la caspase 3. Néanmoins, le processus d'activation de la caspase 9 est généralement décrit pour dépendre de la formation de l'apoptosome. Or la présence de cytochrome c dans le cytosol est requise pour former l'apoptosome et le cytochrome c n'est pas délocalisé dans les cellules cybrides stimulées. La question se pose donc de savoir quel type de mécanisme peut activer la caspase 9, sans la formation de l'apoptosome. Dans des modèles de cellules fibroblastes embryonnaires murines (MEF) traitées au TNF $\alpha$ , deux équipes ont pu montrer que la caspase 9 pouvait être activée par des cathepsines, qui sont des protéases lysosomales, à l'aide d'inhibiteurs de cathepsines et de caspases (McDonnell, Wang et al. 2003; Gyrd-Hansen, Farkas et al. 2006). Bien que ces modèles cellulaires murins soient éloignés des cellules cybrides traitées à la staurosporine, un lien peut être établi avec des données obtenues dans notre laboratoire avec des cellules 143B rho<sup>0</sup> incubées en présence de 2 μM de staurosporine pendant 6 heures. En effet, l'implication de la cathepsine B a pu être mis en évidence dans l'induction de l'apoptose dans des cellules 143B rho<sup>0</sup> en utilisant un inhibiteur spécifique de cette protéine lysosomales (Rommelaere et al, soumis). L'utilisation d'inhibiteurs de cathepsines suggère que celles-ci jouent un rôle dans l'hypersensibilité des cellules rho<sup>0</sup> à l'apoptose induite par la staurosporine. Ces éléments indiquent qu'il serait possible que la staurosporine provoque dans les cellules cybrides MELAS mutées une perméabilisation accrue du lysosome permettant la libération de cathepsines elles-mêmes susceptibles d'activer la caspase 3 par l'intermédiaire de la caspase 9. Cette hypothèse pourrait être testée dans le futur.

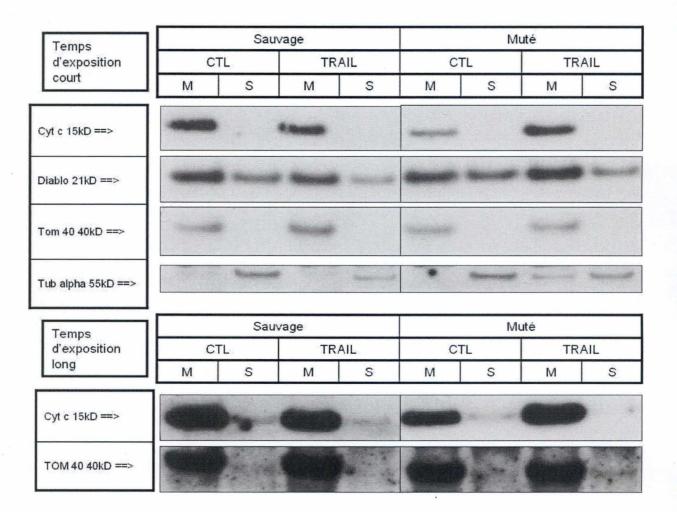


Figure 3.12.: Analyse de l'abondance du cytochrome c (cyt c) et de Smac/Diablo (Diablo) en Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugation différentielle à partir de cellules cybrides MERRF sauvages et mutées traitées ou non avec à la protéine TRAIL (1 μM) pendant 24 heures. Les cellules ont été incubées (TRAIL) ou non (CTL) avec 1 μM de TRAIL durant 24 heures avant la préparation des fractions mitochondriales (M) et cytosoliques (S). 6 μg de protéines pour les fractions mitochondriales ou cytosoliques ont été résolus par électrophorèse suivie d'un immunoblotting pour le cytochrome c, SMAC/DIABLO, TOM 40 (contrôle de charge mitochondriale) ou la tubuline alpha (contrôle de charge cytosolique).

### 3.2.2 Recherche des mécanismes de l'hypersensibilité à l'apoptose induite dans des cellules cybrides MERRF.

Après avoir montré un effet différentiel de TRAIL et l'étoposide sur l'apoptose des cellules cybrides mutées MERRF (point 3.1.1), nous avons voulu rechercher les mécanismes potentiellement impliqués dans la réponse apoptotique induite par ces deux molécules. Tout comme pour les cellules cybrides MELAS, nous avons recherché une perméabilisation de la membrane mitochondriale qui permettrait la libération des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c ou SMAC/DIABLO. Une éventuelle libération de ces facteurs fournirait un point de convergence possible entre les différentes voies activées.

## 3.2.2.1 Étude de la localisation et de l'abondance du cytochrome c et de SMAC/DIABLO dans les cellules cybrides sauvages et mutées MERRF en réponse à TRAIL et à l'étoposide.

Nous avons tout d'abord recherché la délocalisation du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol à l'aide de fractions cytosoliques et mitochondriales de cellules cybrides sauvages et mutées MERRF traitées ou non avec 1  $\mu$ M TRAIL ou 100 nM d'étoposide pendant 24 heures. L'abondance et la localisation du cytochrome c ont été recherchées par Western Blot.

Les Western blots de cette expérience sont repris sur la figure 3.12 pour les conditions TRAIL et sur la figure 3.13 pour les conditions étoposide. Sur la figure 3.12, on peut voir que pour les cellules MERRF traitées ou non, on ne détecte pas de cytochrome c dans les fractions cytosoliques, pour lorsque le film est révélé normalement (temps d'exposition courts). Lorsque le film est surexposé, une trace de cytochrome c est visible dans les fractions cytosoliques des cellules sauvages, traitées ou non. Il s'agit d'une quantité minime de cytochrome c, que l'on peut expliquer par une très légère contamination des fractions cytosoliques par des protéines mitochondriales, comme l'indique le contrôle de charge mitochondrial TOM40. Le fait que même lorsque le film est surexposé nous n'observions pas du tout de cytochrome c dans les fractions cytosoliques des cellules mutées traitées avec TRAIL, qui est la condition correspondant à la plus forte activation de la caspase-3, indique qu'il n'y a pas de libération de cytochrome c provoquée par TRAIL dans les cellules cybrides MERRF.

Sur la **figure 3.13**, on peut estimer qu'il n'y a pas de cytochrome c dans les fractions cytosoliques des cellules cybrides non-traitées, qu'il s'agisse des sauvages ou des mutées. Par contre, on peut observer la présence du cytochrome c dans la fraction cytosolique des cellules mutées stimulées à l'étoposide et celle-ci se visualise mieux, lorsque le film d'autoradiographie est exposé longtemps (30 min). De plus, lorsque l'exposition est plus longue, on peut discerner une faible quantité de cytochrome c dans les cellules sauvages stimulées, mais qui est bien moins importante que dans les cellules mutées stimulées. Ces résultats signifieraient bien que le mécanisme d'induction de l'apoptose par l'étoposide dans ce modèle, pourrait passer par une voie classique de perméabilisation de la membrane mitochondriale, permettant une libération partielle du cytochrome c.

Ensuite, nous avons comme pour les cellules cybrides MELAS recherché la localisation et l'abondance de SMAC/DIABLO dans les différentes conditions en utilisant les mêmes membranes que celles qui ont servi à la détection du cytochrome c. Le niveau de SMAC/DIABLO dans les fractions cytosoliques n'augmente pas dans les cellules traitées par l'étoposide, indiquant que SMAC/DIABLO n'est pas responsable de l'activation de la caspase-3 dans ces conditions. De plus, nous observons une diminution de SMAC/DIABLO

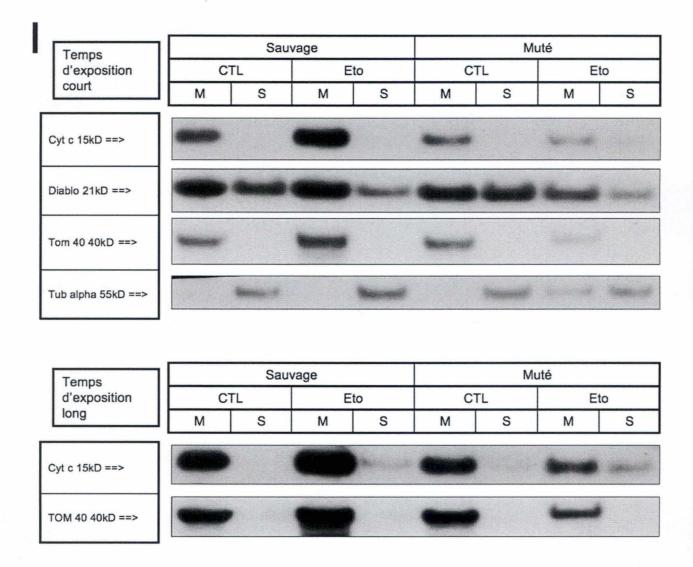


Figure 3.13 : Analyse de l'abondance du cytochrome c (cyt c) et de Smac/Diablo (Diablo) en Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugation différentielle à partir de cellules cybrides MERRF sauvages et mutées traitées ou non en présence de 100 nM d'étoposide pendant 24 heures. Les cellules ont été incubées (Eto) ou non (CTL) avec de 100 nM de l'étoposide durant 24 heures avant la préparation des fractions mitochondriales (M) et cytosoliques (S). 6 µg de protéines pour les fractions mitochondriales ou cytosoliques ont été résolus par électrophorèse suivie d'un immunoblotting pour le cytochrome c, SMAC/DIABLO, TOM 40 (contrôle de charge mitochondriale) ou la tubuline alpha (contrôle de charge cytosolique).

dans les fractions cytosoliques lors d'un traitement à l'étoposide qui apparemment n'a pas été décrit dans la littérature.

En résumé, nous n'avons pas pu mettre en évidence de libération de la protéine SMAC/DIABLO en réponse à un traitement par TRAIL ou par l'étoposide.

Dans le cas des cellules traitées en présence de TRAIL, la délocalisation du cytochrome c n'a pas non plus pu être mise en évidence. Si la recherche des autres protéines mitochondriales apoptogènes telles que Endo G et AIF ne permet pas non plus de détecter ces protéines dans des fractions cytosoliques, cela signifierait que seule la voie extrinsèque, indépendante de la mitochondrie, est activée dans ces conditions. La recherche du clivage de Bid en tBid permettrait d'étayer cette hypothèse. En effet, Bid est la protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 qui fait le lien entre les deux voies décrites de l'apoptose induite par TRAIL (figure 1.13).

Par contre, il est intéressant d'observer que la libération du cytochrome c dans les cellules mutées stimulées à l'étoposide et que nous sommes donc dans un processus apoptotique canonique. De plus, des résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire montrent qu'en présence de 500 nM de staurosporine pendant 6 heures des cellules cybrides MERRF qu'il existe un déséquilibre dans la balance entre protéines pro- et anti-apoptotiques, en faveur de pro-apoptotiques. En effet, G. Rommelaere a recherché par Western Blot l'abondance des protéines anti-apoptotiques Mcl-l, et Bcl-XL, ainsi que des protéines proapoptotiques Bax et Bak. Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'abondance des protéines Bcl-XL et Mcl-1 diminue en réponse à la staurosporine et ce de manière plus marquée dans les cellules cybrides mutées MERRF. Quant aux protéines pro-apoptotiques, Bak est plus abondant dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages, et Bax est plus abondant dans des fractions mitochondriales de cellules cybrides mutées en cas de stimulation à la staurosporine. L'augmentation d'abondance de ces deux protéines pro-apoptotiques et la diminution des protéines anti-apoptotiques comme Mcl-1 et Bcl-XL sont des facteurs qui devraient augmenter la perméabilité de la membrane et par conséquent la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol comme le cytochrome c ou SMAC/DIABLO.

Cette délocalisation du cytochrome c reste cependant faible, suggérant qu'il n'est pas exclu que la cellule puisse aussi déclencher simultanément des voies non canoniques d'apoptose. Il a été montré dans des cellules 143B rho<sup>0</sup> que l'apoptose induite par un agent chémothérapeutique qui provoque des lésions dans l'ADN (cisplatine) pouvait être régulé par un processus qui mêlait une apoptose dépendante et indépendante de la libération du cytochrome c (Yen, Tang et al. 2005). Afin de compléter cette étude, il serait intéressant comme dans le cas des cellules cybrides stimulées à l'étoposide d'étudier la localisation des protéines Omi, Endo G et AIF qui sont des protéines connues pour leur effet pro-apoptotique.

## 3.2.2.2 Étude des inhibiteurs de caspases (IAPs) dans les cellules cybrides sauvages et mutées MERRF en réponse à TRAIL et à l'étoposide.

Toujours dans l'optique de trouver des acteurs potentiels pour expliquer la différence de sensibilité à l'apoptose induite dans les cellules cybrides mutées MERRF, nous avons étudié les IAPs, comme nous l'avons fait pour les cellules MELAS. L'abondance de ces protéines a été recherchée par Western Blot; nous nous sommes concentrés sur cIAP1 et cIAP2, mais pas sur XIAP pour des raisons techniques.

La figure 3.15 montre le western blot obtenu pour la protéine cIAP1 (A) et la quantification des résultats obtenus en intégrant la densité optique (IOD) des différentes

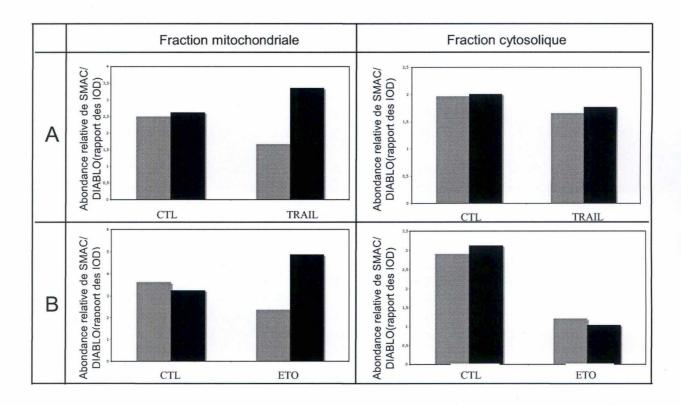


Figure 3.14 : Histogrammes représentant l'abondance relative de la protéine Smac/Diablo dans des cellules cybrides MERRF ou MELAS sauvages (colonnes grises) et mutées (colonnes noires).

Quantification des résultats obtenus à la figure 3.12 (A) et 3.13 (B). Les DO des bandes correspondant à SMAC/DIABLO, à TOM 40 et à la tubuline aplha ont été intégrées (IOD). Les IOD correspondant aux bandes SMAC/DIABLO des fractions mitochondriales ont été rapportées aux IOD mesurées pour TOM 40 et les IOD correspondant aux protéines SMAC/DIABLO des fractions cytosolique ont été rapportées aux IOD mesurées pour la tubuline alpha . Les 3 graphiques de gauche représentent l'abondance relative de la protéine Smac/Diablo pour des fractions mitochondriales et ceux de droites représentent cette abondance pour des fractions cytosoliques.

bandes d'intérêt (B). Le traitement à l'étoposide déclenche une dégradation de cIAP-1, dégradation qui est plus marquée dans les cellules cybrides mutées. Par contre la protéine TRAIL, ne fait pas varier l'abondance de cIAP-1. Quant à cIAP-2, elle est mise en évidence à la **figure 3.15** et ne montre pas de variation d'abondance en fonction de la lignée cellulaire ou du traitement.

Tout comme pour les cellules cybrides MELAS traitées à la staurosporine, ces résultas montrent une réponse nettement différente entre les membres de la famille de IAPs. Suite au traitement à l'étoposide, seul cIAP1 voit son niveau d'abondance être modifié, ce qui pourrait être expliqué par la transcription d'une protéase dépendante de p53. En effet dans une étude sur des cellules HELA incubées pendant 9 heures avec 20  $\mu$ M d'étoposide a montré que c-IAP1 était clivé par une sérine protéase codée par le gène HTRA2 dépendant de p53 (Jin, Kalkum et al. 2003). Il est donc intéressant de noter que la différence constatée de réponse entre les cellules traitées avec TRAIL et avec étoposide pourrait être due à la diminution de c-IAP1 et que par conséquent c-IAP1 protégerait en partie du déclenchement de l'apoptose induite par TRAIL.

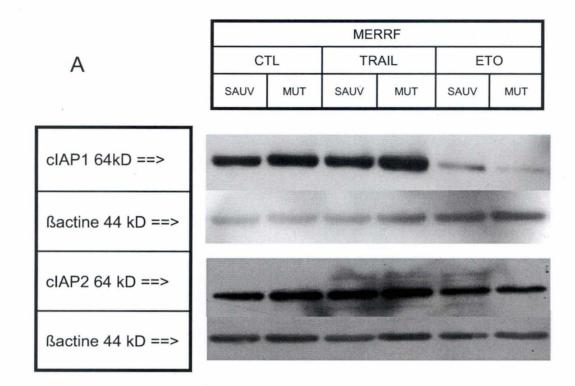


Figure 3.15 : Analyse de l'abondance des protéines cIAP-1, cIAP-2 et XIAP par Western blot dans des extraits totaux préparées à partir de cellules cybrides MERRF sauvages (Sauv) et mutées (Mut) traitées ou non avec 100 nM d'étoposide ou 1 $\mu$ M de TRAIL pendant 24h . Les cellules ont été incubées ou non (CTL) avec 100 nM d'étoposide ou 1 $\mu$ M de la protéine TRAIL pendant 24h avant la préparation des extraits. 20  $\mu$ g de protéines ont été résolus par électrophorèse suivie d'un immunoblotting pour cIAP-1, cIAP-2 et XIAP ou  $\beta$ -actine (contrôle de charge cytosolique).

# 4. Conclusion et perspectives

### 4 Conclusion et perspectives

Les maladies liées à un dysfonctionnement mitochondrial sont caractérisées par un défaut de l'OXPHOS; ce type de maladie peut toucher jusqu'à une personne sur 7634 (Thorburn 2004). Ces maladies ont pour origine des mutation(s) ou réarrangement(s) dans le génome mitochondrial ou nucléaire. Suite à ce dysfonctionnement mitochondrial, une chute de la production d'ATP est observée, ce qui affecte particulièrement les cellules fortement consommatrices d'énergie comme les cellules musculaires ou neuronales. Ceci se traduit généralement chez les patients par des troubles du système nerveux et/ou par une myopathie. Plusieurs études suggèrent que cette perte musculaire aurait pour origine un processus apoptotique. En effet des études sur des biopsies musculaires de patients atteints de différentes pathologies mitochondriales ont permis d'observer une augmentation de plusieurs marqueurs de l'apoptose comme l'activation de la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN.

C'est dans ce contexte que dans notre laboratoire, nous nous intéressons au syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers) provoqué par la mutation A8344G dans l'ADN mt, localisée dans le gène codant l'ARNt<sup>Lys</sup>. Ce syndrome est caractérisé par des symptômes tels que des ataxies cérébrales et des myopathies (Wallace, Zheng et al. 1988). Afin d'étudier les processus apoptotiques propres aux cellules possédant cette mutation, nous utilisons des cellules cybrides obtenues par la fusion de cellules d'ostéosarcome humain 143B rho<sup>0</sup> avec des myoblastes énucléés provenant de patients atteints par la mutation A8344G ou avec des myoblastes énucléés provenant de personnes saines. Précédemment, des résultats obtenus avec les cellules cybrides mutées MERRF ont montré une augmentation des marqueurs de l'apoptose suite à un traitement à la staurosporine (activité de la caspase 3 et fragmentation de l'ADN, Liu et al, 2004; Résultats de Guillaume Rommelaere, thèse de doctorat en cours). La staurosporine est un alcaloïde connu pour induire l'apoptose de 3 manières différentes: a) en inhibant plusieurs protéines kinases dont les protéines kinases C, b) en augmentant la concentration en calcium cytosolique qui entraîne probablement une modification de la concentration de l'ion dans la matrice mitochondriale et c) une augmentation de la production mitochondriale de ROS. Dans le cadre de sa thèse, G. Rommelaere cherche à comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'hypersensibilité à l'apoptose des cellules cybrides mutées MERRF. Il a montré que les caspases n'intervenaient que partiellement dans la fragmentation dans l'ADN génomique et il n'a pas pu démontrer la libération du cytochrome c dans le cytosol. Ces résultats suggèrent donc que l'apoptose induite dans ce modèle passerait par une voie non-canonique (voir point 1.3.2.2 de l'introduction).

Le but de ce mémoire était dans un premier temps de déterminer si le fait que les cellules mutées étaient plus sensibles à l'apoptose était propre à la mutation A8344G ou s'il pouvait être élargi à un dysfonctionnement mitochondrial causé par une autre mutation, à savoir la mutation A3243G associée au syndrome MELAS. De la même façon, nous avons voulu de déterminer si les cellules cybrides MERRF étaient également plus sensibles à l'apoptose déclenchée par des processus différents de la staurosporine et plus proches des événements qui pourraient affecter les cellules des patients. Les trois inducteurs que nous avons utilisés sont TRAIL, TNFα et l'étoposide. TRAIL et TNFα sont des molécules connues pour activer la voie extrinsèque de l'apoptose suite à leur liaison avec leur récepteur. L'étoposide est capable d'induire des dommages dans l'ADN en inhibant la topoisomérase et ce type de dommage est connu pour activer la voie intrinsèque de l'apoptose (figure 1.13 de l'introduction). Dans un deuxième temps, nous avons voulu comprendre les mécanismes qui

sous-tendent l'hypersensibilité à l'apoptose induite en caractérisant l'abondance de différentes protéines intervenant dans l'apoptose.

Premièrement, nous avons pu montrer que les cellules cybrides mutées MELAS étaient plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine, tant au niveau de la caspase 3 que de la fragmentation de l'ADN, avec une incubation de 6 heures avec 2 µM de staurosporine. Nous avons également montré que la fragmentation dépendait fortement des caspases en utilisant un inhibiteur de pan-caspase (z-VAD-fmk). Néanmoins, le z-VAD-fmk est connu pour inhiber de façon plus ou moins efficace les différentes caspases. Par exemple, la caspase 3 est inhibée de façon très importante par cette molécule au contraire de la caspase 2 (Garcia-Calvo, Peterson et al. 1998). Il serait donc intéressant d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces protéases à cystéines (par exemple le Ac-DVED-CHO pour la caspase 3) ou des ARN interférents afin de mesurer l'impact des différentes caspases sur la fragmentation de l'ADN.

Les résultats d'hypersensibilité que nous avons obtenu, sont en accord avec l'étude de Liu et de ses collaborateurs (Liu et al., 2004) qui montrent que dans les cybrides mutées MELAS, l'activité de la caspase-3 est supérieure en réponse aux UV et à la staurosporine. De plus, que ce soit dans nos résultats ou dans l'étude de Liu et ses collaborateurs (Liu, Lee et al. 2004) ont peut constater que les cellules mutées MERRF incubées avec 100 ou 500 nM de staurosporine pendant 6 heures présentent une activité plus importante de la caspase 3 que les cellules cybrides mutées MELAS. Cette différence pourrait être expliqué par le fait que la mutation A3243G est une mutation qui provoque un dysfonctionnement mitochondrial moins important que la mutation A8344G. En effet les cellules porteuses de la mutation A3243G présentent une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (James, Wei et al. 1996) et de la production d'ATP (Wallace, Zheng et al. 1988) plus importante que les cellules porteuses de la mutation A8344G, ce qui témoignerait d'un dysfonctionnement mitochondrial moins important chez les cellules porteuses de la mutation A3243G et donc d'un phénomène apoptotique qui en découlerait moins prononcé.

Ensuite, nous avons voulu chercher des éléments susceptibles d'expliquer la sensibilité accrue à la staurosporine observée dans les cellules portant la mutation A3243G responsable du syndrome MELAS. Nous avons étudié tout d'abord la localisation du cytochrome c dans des fractions mitochondriales et cytosoliques afin d'observer une éventuelle délocalisation du cytochrome c. La délocalisation du cytochrome c n'a pu être observée dans ces conditions, tout comme dans le cas des cellules cybrides MERRF incubées en présence de staurosporine. Deux hypothèses peuvent être formulées quant au résultat pour les cellules cybrides MELAS traitées à la staurosporine. La première serait que la technique du Western blot pourrait ne pas être suffisamment sensible que pour pouvoir détecter une faible libération du cytochrome c. Cependant, ceci semble peu probable car même en surexposant fortement les films du western blot, aucun signal correspondant au cytochrome c n'apparaît dans les fractions cytosoliques des cellules alors que le signal est largement saturé dans les fractions mitochondriales. La deuxième hypothèse serait que le cytochrome c reste à l'intérieur de la mitochondrie tandis qu'un processus d'apoptose non-canonique mais dépendant des caspases serait déclenché. Un modèle non-canonique a déjà été décrit dans le cadre d'un dysfonctionnement mitochondrial dans des cellules cybrides issues de la fusion de cellules 143B rho0 avec des cytoplastes de patients atteints de la maladie de LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy). On a pu montrer dans ces cellules qu'en remplaçant le glucose par du galactose dans le milieu de culture, on pouvait observer une apoptose plus importante chez les cellules mutées sans intervention du cytochrome c, mais avec l'intervention de deux autres protéines mitochondriales que sont Endo G et AIF (Zanna, Ghelli et al. 2005). Il serait donc intéressant pour la suite de cette étude, de comparer les abondances de protéines telles que Endo G et AIF

qui sont deux protéines mitochondriales qui peuvent intervenir dans la fragmentation de l'ADN en se localisant dans le noyau suite à une perméabilisation de la mitochondrie.

Enfin, nous avons commencé à rechercher l'abondance de la caspase 9 active et les résultats préliminaires montrent que la caspase 9 est activée en présence de staurosporine, de manière nettement plus importante dans les cellules cybrides mutées MELAS. L'activation de cette caspase effectrice est surtout connue pour être dépendante du cytochrome c et de la formation de l'apoptosome. Néanmoins, il existe des mécanismes d'activation de la caspase 9 indépendants du cytochrome c (McDonnell, Wang et al. 2003; Gyrd-Hansen, Farkas et al. 2006). Dans plusieurs modèles de cellules murines traitées au TNFα, on peut mettre en évidence que la caspase 9 est activée par des cathepsines, qui sont des protéases lysosomales. Bien qu'il s'agisse de cas particuliers éloignés de notre modèle, l'étude de l'impact des cathepsines sur notre modèle serait intéressante à réaliser à l'aide par exemple d'inhibiteurs de cathepsines (Roberts 2005). Le lien avec les cathepsines peut être renforcé par le fait que plusieurs études démontrent que la staurosporine peut permettre à certaines cathepsines d'être libéré du lysosome. Par exemple dans fibroblastes humains incubés avec 1 µM de staurosporine pendant 6 heures, la libération de la cathepsine B dans le cytosol a pu être observée par immunocytochimie (Johansson, Steen et al. 2003; Kagedal, Johansson et al. 2005) De plus, une récente étude dans notre laboratoire par Ludovic Mercy, a permis de montrer l'implication de la cathepsine B dans l'induction de l'apoptose par 2 µM de staurosporine pendant 6 heures dans des cellules 143B rho<sup>0</sup> qu'on ne retrouve pas chez les cellules parentales. Ces différents résultats nous laissent donc penser que les cathepsines et plus particulièrement la cathepsine B, pourraient intervenir dans la réponse d'hypersensibilité chez les cellules cybrides mutées.

Afin de vérifier le rôle de ces cathepsines, des études d'immunocytochimies pourraient être pratiquées, pour localiser ces protéases dans la cellule et avoir une idée de leur distribution dans la population cellulaire (???). De plus, un co-marquage de cathepsine candidate et de la caspase 3 active pourrait être réalisé pour voir si au sein de la population l'activation d'une cathepsine et liée à l'activation de la caspase 3. De plus, nous pourrions aussi utiliser des inhibiteurs spécifiques des cathepsines, comme le CA-074Me pour la cathepsine B (Buttle et al.,1992) et mesurer l'activité des caspasse 3 et 9 et la fragmentation de l'ADN, pour déterminer si cette cathepsine intervient dans ce processus apoptotique.

Ensuite, nous avons étudié d'autres effecteurs de l'apoptose qui pourraient être communs aux différentes molécules utilisées, c'est pourquoi nous avons observé l'abondance des protéines inhibitrices de caspases (IAPs) par Western Blot. Les IAPs sont des protéines dotées d'activité ubiquitine ligase qui inhibent l'apoptose en se liant aux caspases et en provoquant leur dégradation par le protéasome. Guillaume Rommelaere a montré dans les cellules cybrides sauvages MERRF traitées à la staurosporine une surexpression des gènes BIRC2 et BIRC3, codant respectivement cIAP-1 et c-IAP2, et pas dans les cellules mutées. La surexpression de ces deux gènes dans les cellules cybrides sauvages pourrait être un des éléments qui permettrait de comprendre la résistance que présentent les cellules cybrides sauvages à la staurosporine, par rapport aux cellules cybrides mutées. De plus des résultats préliminaires obtenus par Western blot montraient la diminution de l'abondance de cIAP-1 et c-IAP2 en présence de staurosporine. Les résultats que nous avons obtenus pour cIAP-1 et c-IAP2 sont différents. Dans les cellules cybrides MELAS incubées avec de la staurosporine, on peut voir une diminution de l'abondance de cIAP-1, plus marquée dans les cellules cybrides mutées. Par contre pour c-IAP2 ou XIAP, on n'observe pas de différence d'abondance entre les différentes conditions expérimentales. Ces résultats suggèrent que seule une diminution de cIAP-1 interviendrait dans les cellules cybrides et que cette diminution plus importante chez les cellules cybrides mutées pourrait avoir une influence sur la différence de sensibilité observée chez les cellules porteuses de la mutation A3243G. Cette diminution de cIAP-1

pourrait s'expliquer par le fait que cette protéine est un substrat des caspases. Ceci a déjà été montré dans des hépatocytes fœtaux de rats incubés en présence de TGF-β, présentant uniquement une diminution d'abondance de cIAP-1 et pas de XIAP ou cIAP2 (Herrera, Fernandez et al. 2002). En effet, lorsque les auteurs incubent leurs cellules avec le z-VADfmk (inhibiteur de pan-caspase), ils n'observent plus de diminution de cIAP-1. Il serait donc intéressant de confirmer cette hypothèse en utilisant une approche similaire. Cette diminution de cIAP1 pourrait être aussi expliquée par le fait que cIAP1 est capable de s'autoubiquitiner lors de l'apoptose. Ce processus a déjà été observé sur des thymocytes traités avec glucocorticoïdes et étoposide (10 µg/ml) (Yang, Fang et al. 2000). De plus, on sait maintenant que cIAP-1 peut ubiquitiner c-IAP2, conduisant à la dégradation via le protéasome de c-IAP2, et des niveaux élevés de c-IAP2 ont été observés dans des cellules K.O pour le gène BIRC2 (Conze, Albert et al. 2005). Il serait donc intéressant d'une part de constater si la diminution d'abondance de cIAP-1 précède ou non l'activation de la caspase 3 à l'aide d'une cinétique serrée (30 min, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 heures) afin de caractériser l'abondance de cIAP-1 et de la caspase 3 active. Cette cinétique permettrait de savoir si cIAP-1 est d'abord dégradé suite à notre stimulus apoptotique, ce qui permettrait une activation plus facile de la caspase 3 ou si c'est suite à l'activation de la caspase 3 que cIAP-1 est dégradé. D'autre part, dans le cas où cIAP-1 serait dégradé avant que la caspase 3 ne soit active, il serait aussi intéressant de vérifier si, dans les conditions expérimentales staurosporine et étoposide, cIAP-1 est capable de s'autoubiquitiner tout comme Yang et ses collaborateurs l'ont observé dans leurs thymocytes traitées au TNFα (Yang, Fang et al. 2000).

En conclusion, nous pouvons dire que les cellules cybrides mutées MELAS sont plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine que ne le sont les cellules cybrides sauvages. La staurosporine agit sur ces cellules notamment en provoquant une dégradation de cIAP1 qui est plus importante dans les cellules cybrides mutées et une activation de la caspase 9 qui semble indépendante de la libération du cytochrome c, mais pourrait dépendre d'une libération de cathepsines. Celle-ci pourrait être à l'origine de l'hypersensibilité observée, tout comme dans le modèle des cellules rho0 stimulées ave 2 µM de staurosporine (Rommeleare et al. soumis).

Deuxièmement, nous avons montré que les cellules cybrides mutées MERRF étaient aussi plus sensibles à l'apoptose induite par TRAIL et l'étoposide mais pas par le TNFα. Les cellules cybrides mutées MERRF présentaient après 24 heures d'incubation de 1 µM TRAIL et de 100 nM l'étoposide une augmentation de l'activité de la caspase 3 et une augmentation de la fragmentation internucléosomale de l'ADN. Cette hypersensibilité de cellules possédant la mutation est beaucoup plus marquée dans les conditions étoposide. Par contre, les cellules incubées avec 50 ng/ml de TNFα ne présentaient pas d'augmentation significative de l'apoptose. Ceci peut paraître curieux quand on sait que l'induction de l'apoptose par le TNFα et par TRAIL est fort similaire. Ces deux protéines peuvent toutes les deux, une fois liées à leur récepteur, induire une voie de survie cellulaire par l'intermédiaire de NFkB ou une voie apoptotique par le complexe DISC et l'activation des caspases. Il est donc intéressant de se demander pourquoi, le récepteur au TRAIL induite la mort cellulaire et pas TRAIL. L'exemple contraire est rencontré dans les cellules cybrides porteuses de mutations associées au syndrome MILS (Maternally Inherited Leight Syndrome), lorsque celles-ci sont incubées avec 50 UI/ml de TNFα + actinomicine D pendant 4 heures, on observe une mortalité cellulaire importante alors qu'on n'en observe peu dans les cellules traitées avec 100 nM de TRAIL + actinomycine D pendant 48 heures (l'actinomycine D est inhibiteur de la transcription utilisé pour inhiber l'expression des gènes contrôlés par NFkB) (Carrozzo, Rizza et al. 2004). Les raisons pour lesquelles ces deux récepteurs enclenchent des réponses différentes, tiendraient dans le fait que les protéines adaptatrices sont différentes; l'activation

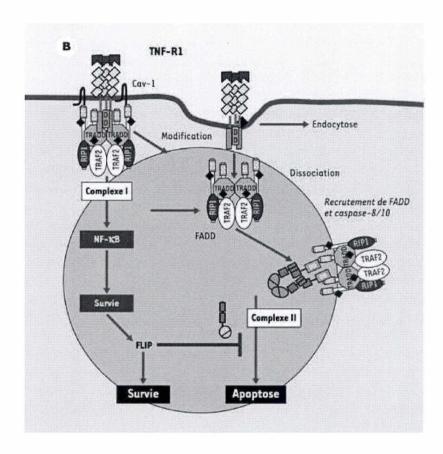


Figure 4.1: Modèle d'activation des récepteurs de la famille du TNF (tumor necrosis factor). L'activation de l'apoptose par TNF-R1 requiert la formation de deux complexes distincts. Le complexe (I), membranaire, est responsable de l'activation de la voie de survie induite par NF-kB. Le complexe (II), pro-apoptotique, se forme dans un second temps, après modification du complexe (I) et dissociation de ces composants du récepteur du TNF, permettant le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et des caspases activatrices (-8 et -10). Ce complexe, cytosolique, équivaut au DISC de Fas ou de TRAIL et est capable d'activer l'apoptose lorsque la voie NF-kB est inactive. Dans le cas contraire, la molécule anti-apoptotique, FLIP, réglée positivement par le complexe (I), bloque l'activation de l'apoptose.

de l'apoptose par TNF-R1 (récepteur du TNF $\alpha$ ) requiert la formation de deux complexes distincts, alors qu'il n'y en aurait qu'un seul pour le récepteur TRAIL (figure 4.1) (Micheau 2004). Ceci serait donc un moyen d'expliquer pourquoi les cellules cybrides entrent en apoptose en présence de TRAIL et pas de TNF $\alpha$ .

En outre, il ne faut pas perdre de vue qu'afin d'induire l'apoptose, nous étions obligés de priver les cellules de sérum pendant 24 heures. Cette privation a pour effet de déclencher un mécanisme de plus en plus connu qui est l'autophagie. Des résultats obtenus dans notre laboratoire nous montrent que quand les cellules sont privées de sérum pendant 24 heures, on a une augmentation de l'activité de mTOR (marqueur de l'autophagie) et une augmentation du nombre d'autophagosomes (observés en microscopie électronique).

Après avoir démontré l'hypersensibilité des cellules cybrides mutées MERRF, nous avons voulu trouver des mécanismes susceptibles d'expliquer la sensibilité accrue à l'apoptose induite par TRAIL et l'étoposide dans les cellules portant la mutation A8344G responsable du syndrome MERRF. Le premier candidat que nous avons analysé est le cytochrome c puisque l'absence de libération de cytochrome c semble être une particularité de l'apoptose induite par la staurosporine chez les cellules cybrides MERRF. La délocalisation du cytochrome c n'a pu être constatée que faiblement dans les cellules cybrides MERRF stimulées avec de l'étoposide. Cette observation n'a été possible qu'après une exposition longue lors de la révélation, ce qui pourrait suggérer un mécanism, comprenant des voies cytochrome c-dépendantes et cytochrome c-indépendantes, comme cela a déjà été constaté dans des cellules 143B rho<sup>0</sup> traitées avec un agent chémothérapeutique qui provoque des lésions dans l'ADN tout comme l'étoposide (cisplatine) (Yen, Tang et al. 2005). Pour la suite de cette étude, il serait donc intéressant de caractériser l'importance de la perméabilité membranaire mitochondriale en recherchant dans la condition étoposide la présence des trois protéines pro-apoptotiques (Bax, PUMA, NOXA) classiquement impliquées dans des processus d'apoptose provoqués par des dommages à l'ADN (DiMauro 2004) et ensuite d'évaluer l'abondance et la localisation de Endo G et AIF, puisque ces deux protéines comme expliqué précédemment pourraient intervenir dans des processus d'apoptose indépendants du cytochrome c dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial (Zanna, Ghelli et al. 2005)

Dans la condition TRAIL, il ne semble pas qu'il y ait relocalisation du cytochrome c dans le cytosol. Ce qui voudrait dire que l'apoptose induite par TRAIL passerait par l'activation de la caspase 3 via la caspase 8 sans intervention d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant tout d'abord d'observer l'abondance de la caspase 8 active et de réaliser une cinétique de l'activation des 3 et 8 pour s'assurer que c'est la caspase 8 qui active la 3. La suite de l'étude de cet inducteur pourrait également porter sur l'expression et l'abondance en membrane du récepteur de la protéine TRAIL afin d'observer, si l'abondance du récepteur ne pourrait pas jouer un rôle dans l'hypersensibilité à l'apoptose.

Ensuite, nous nous sommes intéressés, tout comme pour les cellules cybrides MELAS à d'autres molécules intervenant dans l'apoptose, les protéines inhibitrices de caspases (IAPs), qui pourraient avoir un effet commun dans les différentes conditions expérimentales. Nous avons caractérisé par Western Blot l'abondance des protéines cIAP-1 et c-IAP2. Dans les cellules cybrides MERRF incubées avec TRAIL, on ne peut voir aucune variation de l'abondance de cIAP-1 et de c-IAP2. Par contre dans les cellules incubées avec l'étoposide, on peut constater une diminution de l'abondance de cIAP-1 mais pas de c-IAP2. De plus, la diminution de cIAP-1 est plus importante dans les cellules cybrides mutées MERRF. Cette diminution spécifique pourrait être expliquée par la transcription d'une protéase dépendante de p53. En effet dans une étude sur des cellules HeLa incubées pendant 9 heures avec 20 μM

d'étoposide, on a montré que l'étoposide pouvait induire l'activation de p53 et que cIAP-1 était clivé par une sérine protéase codée par le gène *HTRA2*, dont l'expression dépend de p53 (Jin, Kalkum et al. 2003). La protéine HTRA2 est une protéine pro-apoptogène qui est connue pour être séquestrée dans la mitochondrie et pour en être libérée lors de l'augmentation de la perméabilité de cet organite (Suzuki, Imai et al. 2001). Néanmoins, dans cette étude, les auteurs ne semblent pas avoir testé cIAP-2

Il serait donc intéressant de vérifier si dans ces conditions, les cellules activent p53 à l'aide d'un gène rapporteur et ensuite de vérifier la transcription du gène *HTRA2* et l'expression de la protéine correspondante par Western Blot. D'autres explications de cette dégradation seraient la dégradation de cIAP-1 par les caspases ou son auto-ubiquitination comme mentionné précédemment pour les cellules cybrides MELAS. Il serait donc intéressant de pratiquer aussi une cinétique de l'abondance de cIAP-1 et de la caspase 3 comme pour les cellules MELAS afin confirmer ou non ces hypothèses.

En conclusion, nous pouvons dire que les cellules cybrides mutées MERRF sont également plus sensibles à l'apoptose induite par l'étoposide et par TRAIL que ne le sont les cellules cybrides sauvages. L'étoposide pourrait agir sur ces cellules en activant p53 qui provoquerait une dégradation de cIAP1 par l'intermédiaire de la transcription du gène codant la protéase HTRA2. De plus, p53 pourrait être à l'origine de la sortie du cytochrome c en permettant l'activation de la transcription de Noxa, Puma et Bax qui sont des membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 et qui peuvent induire une perméabilisation accrue de la membrane mitochondriale.

Pour cet agent chimiothérapeutique, il serait intéressant en plus de vérifier l'abondance et la balance des différents membres pro- et anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (Noxa, Puma et Bax), afin de vérifier si l'hypersensibilité observée dans ces cellules ne trouverait pas son origine dans la perméabilité de la membrane mitochondriale puisque le niveau de Bax dans les cellules cybrides mutées en condition basale est beaucoup plus important que dans les cellules sauvages (données non montrées).

TRAIL quant à lui agirait de manière classique en activant la caspase 3 par la caspase 8 sans intervention de la mitochondrie. Il serait donc intéressant de comprendre si la sensibilité accrue des cellules traitées avec TRAIL, provient d'une activation plus importante de la caspase 8, par le récepteur de TRAIL, qui pourrait être éventuellement surexprimé dans les cellules porteuses de la mutation.

Ce travail contribue à l'étude en cours concernant l'hypersensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine dans des cellules cybrides mutées MERRF, en montrant que d'autres inducteurs apoptotiques sont également capables de provoquer une hypersensibilité à l'apoptose, mesurée par une fragmentation de l'ADN et une activation de la caspase-3 plus importantes dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules sauvages. De plus, nous avons pu montrer que dans des cellules porteuses d'une mutation ponctuelle dans l'ADN mitochondrial, on observait toujours une hypersensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine. Nous avons présenté les ébauches des mécanismes potentiels qui seraient impliqués dans cette sensibilité :

- a) pour les cellules traitées à la staurosporine, il s'agirait d'une apoptose non canonique qui ferait intervenir les caspases,
- b) pour les cellules traitées avec TRAIL, nous aurions une activation classique de la voie extrinsèque sans passer par une perméabilisation de la mitochondrie,
- c) pour les cellules incubées avec de l'étoposide, il pourrait y avoir 2 voies parallèles déclenchées, l'une dépendante et l'autre indépendante du cytochrome c Pour la suite de ce

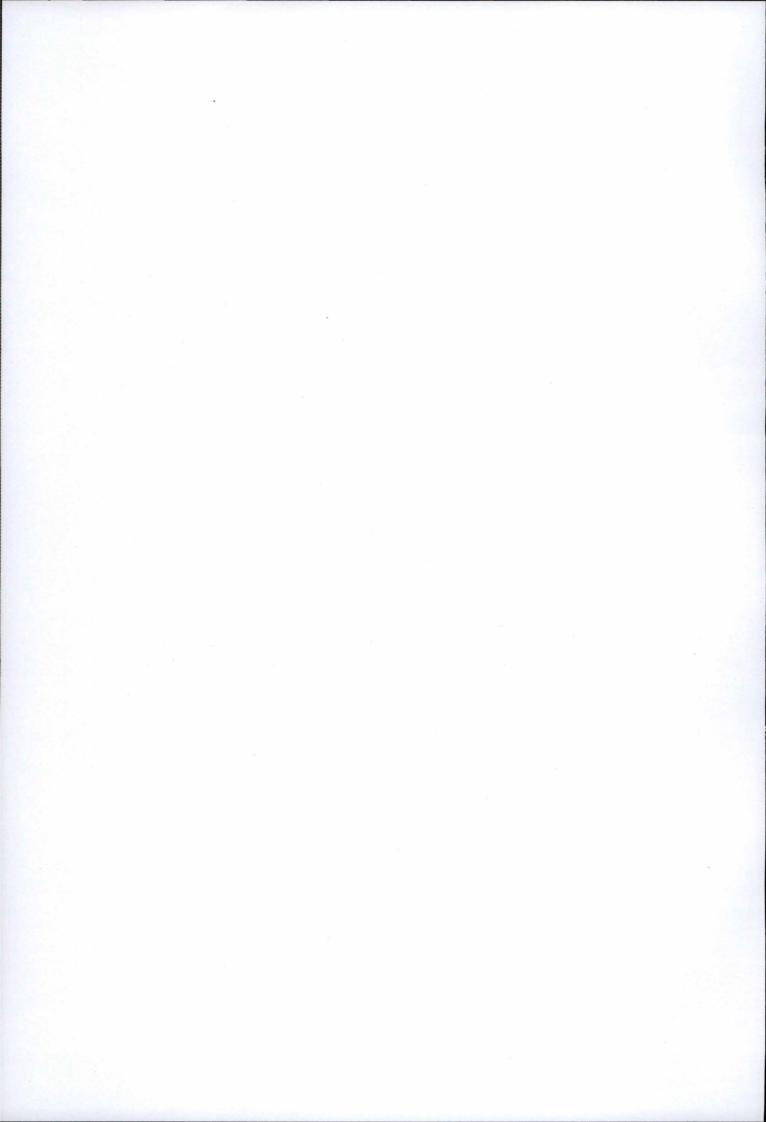
travail, il serait intéressant de continuer l'étude comparative MERRF vs MELAS et staurosporine vs TRAIL ou étoposide, afin de trouver peut être un dénominateur commun à cette hypersensibilité

Les conclusions de ces études devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial sont susceptibles de subir l'apoptose dans ce type de maladie.

# 5. Bibliographie

### 5 Bibliographie

- Aure, K., G. Fayet, et al. (2006). "Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation." Brain 129(Pt 5): 1249-59.
- Balaban, R. S. (1990). "Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell." <u>Am</u> <u>J Physiol</u> **258**(3 Pt 1): C377-89.
- Ballard, J. W. and M. C. Whitlock (2004). "The incomplete natural history of mitochondria." <u>Mol Ecol</u> **13**(4): 729-44.
- Birky, C. W., Jr. (2001). "The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models." <u>Annu Rev Genet</u> **35**: 125-48.
- Biswas, G., H. K. Anandatheerthavarada, et al. (2005). "Mechanism of mitochondrial stress-induced resistance to apoptosis in mitochondrial DNA-depleted C2C12 myocytes." Cell Death Differ **12**(3): 266-78.
- Bohr, V. A. and R. M. Anson (1999). "Mitochondrial DNA repair pathways." <u>J Bioenerg</u> Biomembr **31**(4): 391-8.
- Bolduc, N., M. Ouellet, et al. (2003). "Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells." <u>Planta</u> **216**(3): 377-86.
- Broker, L. E., F. A. Kruyt, et al. (2005). "Cell death independent of caspases: a review." <u>Clin Cancer Res</u> **11**(9): 3155-62.
- Brown, M. D. and D. C. Wallace (1994). "Molecular basis of mitochondrial DNA disease." <u>J</u>
  <u>Bioenerg Biomembr</u> **26**(3): 273-89.
- Campbell, N. A., et al. (2004). <u>Biologie revision scientifique [de la 6e ed. americaine] de</u> Richard Mathieu. Bruxelles [Paris], De Boeck.
- Carrozzo, R., T. Rizza, et al. (2004). "Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis." J Neurochem **90**(2): 490-501.
- Chaturvedi, S., K. Bala, et al. (2005). "Mitochondrial encephalomyopathies: advances in understanding." Med Sci Monit 11(7): RA238-46.
- Chinnery, P. F., N. Howell, et al. (1997). "Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes." <u>Brain</u> **120 ( Pt 10)**: 1713-21.
- Chinnery, P. F. and E. A. Schon (2003). "Mitochondria." <u>J Neurol Neurosurg Psychiatry</u> **74**(9): 1188-99.
- Chomyn, A. (1998). "The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics." Am J Hum Genet 62(4): 745-51.
- Chwieralski, C. E., T. Welte, et al. (2006). "Cathepsin-regulated apoptosis." <u>Apoptosis</u> 11(2): 143-9.
- Conze, D. B., L. Albert, et al. (2005). "Posttranscriptional downregulation of c-IAP2 by the ubiquitin protein ligase c-IAP1 in vivo." Mol Cell Biol 25(8): 3348-56.
- DiMauro, S. (2004). "Mitochondrial diseases." Biochim Biophys Acta 1658(1-2): 80-8.
- Duan, S., P. Hajek, et al. (2003). "Mitochondrial outer membrane permeability change and hypersensitivity to digitonin early in staurosporine-induced apoptosis." <u>J Biol Chem</u> **278**(2): 1346-53.
- Dunbar, D. R., P. A. Moonie, et al. (1996). "Complex I deficiency is associated with 3243G:C mitochondrial DNA in osteosarcoma cell cybrids." Hum Mol Genet 5(1): 123-29.
- Enriquez, J. A., A. Chomyn, et al. (1995). "MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination." <u>Nat Genet</u> **10**(1): 47-55.



- Fagiolari, G., M. Sciacco, et al. (2002). "Lack of apoptosis in patients with progressive external ophthalmoplegia and mutated adenine nucleotide translocator-1 gene." Muscle Nerve **26**(2): 265-9.
- Finnberg, N. and W. S. El-Deiry (2008). "TRAIL death receptors as tumor suppressors and drug targets." Cell Cycle 7(11): 1525-8.
- Finsterer, J. (2008). "Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults." <u>Pediatr Neurol</u> **39**(4): 223-35.
- Flierl, A., H. Reichmann, et al. (1997). "Pathophysiology of the MELAS 3243 transition mutation." J Biol Chem 272(43): 27189-96.
- Fong, D. K. and A. M. Craig (1999). "The Narp hypothesis?" Neuron 23(2): 195-7.
- Formichi, M. and J. F. Renier (2002). "A laparoscopic approach to the abdominal aorta for thoracic stent-graft deployment: evaluation in a porcine model." <u>J Endovasc Ther</u> **9**(3): 344-9.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, et al. (1998). "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors." J Biol Chem **273**(49): 32608-13.
- Geromel, V., N. Kadhom, et al. (2001). "Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA." <u>Hum Mol Genet</u> **10**(11): 1221-8.
- Ghavami, S., C. Kerkhoff, et al. (2008). "S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1783**(2): 297-311.
- Grivennikov, S. I., D. V. Kuprash, et al. (2006). "Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms." Int Rev Cytol 252: 129-61.
- Gyrd-Hansen, M., T. Farkas, et al. (2006). "Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9." Mol Cell Biol **26**(21): 7880-91.
- Hashimoto, Y. (1996). "A brief overview of apoptosis." Hum Cell 9(3): 194-6.
- Hayashi, J., S. Ohta, et al. (1993). "Accumulation of mtDNA with a mutation at position 3271 in tRNA(Leu)(UUR) gene introduced from a MELAS patient to HeLa cells lacking mtDNA results in progressive inhibition of mitochondrial respiratory function."

  <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **197**(3): 1049-55.
- Herrera, B., M. Fernandez, et al. (2002). "cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes." <u>FEBS Lett</u> **520**(1-3): 93-6.
- Hetz, C. (2008). "Apoptosis, necrosis and autophagy: from mechanisms to biomedical applications." <u>Curr Mol Med</u> **8**(2): 76-7.
- Ikezoe, K., M. Nakagawa, et al. (2002). "Apoptosis is suspended in muscle of mitochondrial encephalomyopathies." <u>Acta Neuropathol</u> **103**(6): 531-40.
- Jacobs, H. T. (2003). "Disorders of mitochondrial protein synthesis." <u>Hum Mol Genet</u> **12 Spec No 2**: R293-301.
- James, A. M., Y. H. Wei, et al. (1996). "Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations." <u>Biochem J</u> 318 ( Pt 2): 401-7.
- Jiang, S., J. Cai, et al. (1999). "Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved." J Biol Chem 274(42): 29905-11.
- Jin, S., M. Kalkum, et al. (2003). "CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals." Genes Dev 17(3): 359-67.

- Johansson, A. C., H. Steen, et al. (2003). "Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine." <u>Cell Death Differ</u> **10**(11): 1253-9.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2006). "Role of mitochondria as the gardens of cell death." <u>Cancer Chemother Pharmacol</u> **57**(5): 545-53.
- King, M. P. and G. Attardi (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." <u>Science</u> **246**(4929): 500-3.
- King, M. P., Y. Koga, et al. (1992). "Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes." Mol Cell Biol 12(2): 480-90.
- Kirino, Y., Y. Goto, et al. (2005). "Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease." Proc Natl Acad Sci U S A 102(20): 7127-32.
- Kirino, Y. and T. Suzuki (2005). "Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency." RNA Biol 2(2): 41-4.
- Kroemer, G. and J. C. Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death." Nat Med 6(5): 513-9
- Kruman, I., Q. Guo, et al. (1998). "Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells." <u>J Neurosci Res</u> **51**(3): 293-308.
- Kujoth, G. C., A. Hiona, et al. (2005). "Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging." <u>Science</u> **309**(5733): 481-4.
- Liang, B. C. and E. Ullyatt (1998). "Increased sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis with mitochondrial DNA depletion." Cell Death Differ 5(8): 694-701.
- Lin, C. S., Y. L. Sun, et al. (2003). "Structural and biochemical evidence of mitochondrial depletion in pigs with hypertrophic cardiomyopathy." Res Vet Sci 74(3): 219-26.
- 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.
- M. Bleumink, Ann Na Tan, et al. (2008). "Apoptosis sensitivity and resistance in cancers." German cancer research center.
- Mashima, T., M. Naito, et al. (1995). "Aspartate-based inhibitor of interleukin-1 beta-converting enzyme prevents antitumor agent-induced apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells." Biochem Biophys Res Commun **209**(3): 907-15.
- 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.
- McDonnell, M. A., D. Wang, et al. (2003). "Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNFalpha-induced apoptosis in murine cells." <u>Cell Death Differ</u> **10**(9): 1005-15.
- Meresse, P., E. Dechaux, et al. (2004). "Etoposide: discovery and medicinal chemistry." <u>Curr Med Chem</u> **11**(18): 2443-66.
- Micheau, O. (2004). "[To die or not to die? Towards the understanding of TNF-R1 signaling dichotomy]." Med Sci (Paris) **20**(2): 153-5.
- Mirabella, M., S. Di Giovanni, et al. (2000). "Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism." <u>Brain</u> **123** ( **Pt 1**): 93-104.
- Mohamad, N., A. Gutierrez, et al. (2005). "Mitochondrial apoptotic pathways." <u>Biocell</u> **29**(2): 149-61.

- Moore, A., C. J. Donahue, et al. (1998). "Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death." Methods Cell Biol 57: 265-78.
- Nakayama, J., M. Ohtsuki, et al. (2007). "Caspase-independent cell death by Fas ligation in human thymus-derived T cell line, HPB-ALL cells." <u>Microbiol Immunol</u> **51**(10): 1029-37.
- Puccio, H. and M. Koenig (2002). "Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases." Curr Opin Genet Dev 12(3): 272-7.
- Rabkin, S. W. (2001). "Prevention of staurosporine-induced cell death in embryonic chick cardiomyocyte is more dependent on caspase-2 than caspase-3 inhibition and is independent of sphingomyelinase activation and ceramide generation." <u>Arch Biochem Biophys</u> **390**(1): 119-27.
- Roberts, R. (2005). "Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins." <u>Drug News Perspect</u> **18**(10): 605-14.
- Rommelaere, G. (2005). "Etude de la réponse apoptotique de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial."
- Roy, N., Q. L. Deveraux, et al. (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." <u>EMBO J 16(23)</u>: 6914-25.
- Sargent, J. M. (2003). "The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples." Recent Results Cancer Res 161: 13-25.
- Schoeler, S., R. Szibor, et al. (2005). "Mitochondrial DNA deletions sensitize cells to apoptosis at low heteroplasmy levels." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **332**(1): 43-9.
- Schon, E. A., Y. Koga, et al. (1992). "The mitochondrial tRNA(Leu)(UUR)) mutation in MELAS: a model for pathogenesis." Biochim Biophys Acta **1101**(2): 206-9.
- Sciacco, M., G. Fagiolari, et al. (2001). "Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies." Neurology **56**(8): 1070-4.
- Shabobo, Z., Y. Aixi, et al. (2007). "Human soluble TRAIL Protein indcing apoptosis in osteosarcoma cell." WUJNS 12: 1148-1152.
- Shoffner, J. M., M. T. Lott, et al. (1990). "Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation." Cell 61(6): 931-7.
- Shoubridge, E. A. (1994). "Mitochondrial DNA diseases: histological and cellular studies." <u>J</u> Bioenerg Biomembr **26**(3): 301-10.
- Slee, E. A., H. Zhu, et al. (1996). "Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32." <u>Biochem J</u> **315 ( Pt 1)**: 21-4.
- Smeitink, J., L. van den Heuvel, et al. (2001). "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation." Nat Rev Genet **2**(5): 342-52.
- Srinivasula, S. M. and J. D. Ashwell (2008). "IAPs: what's in a name?" Mol Cell **30**(2): 123-35.
- Suzuki, Y., Y. Imai, et al. (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell 8(3): 613-21.
- Swerdlow, R. H. (2007). "Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondriopathies." J Neurosci Res **85**(15): 3416-28.
- Tagliarino, C., J. J. Pink, et al. (2003). "Mu-calpain activation in beta-lapachone-mediated apoptosis." <u>Cancer Biol Ther</u> **2**(2): 141-52.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol 9(3): 231-41.
- Thorburn, D. R. (2004). "Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances." <u>J Inherit</u> Metab Dis **27**(3): 349-62.

- Umaki, Y., T. Mitsui, et al. (2002). "Apoptosis-related changes in skeletal muscles of patients with mitochondrial diseases." Acta Neuropathol **103**(2): 163-70.
- Varfolomeev, E. and D. Vucic (2008). "(Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways." Cell Cycle 7(11): 1511-21.
- Wallace, Brown, et al. (1997). "Mitochondrial genetics. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeriz RE, Emery AEH (Eds) Emory and Rimoin's principles and practise of medical genetics." Churchill Livingstone: 277-332.
- Wallace, D. C. (1982). "Structure and evolution of organelle genomes." <u>Microbiol Rev</u> **46**(2): 208-40.
- Wallace, D. C., X. X. Zheng, et al. (1988). "Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease." Cell 55(4): 601-10.
- Wang, J., J. P. Silva, et al. (2001). "Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A 98(7): 4038-43.
- Wang, S. and W. S. El-Deiry (2003). "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." Oncogene **22**(53): 8628-33.
- Wei, Y., T. Fan, et al. (2008). "Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis." <u>Acta Biochim</u> Biophys Sin (Shanghai) **40**(4): 278-88.
- Westermann, B. (2008). "Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission." <u>J Biol Chem</u> **283**(20): 13501-5.
- Yang, Y., S. Fang, et al. (2000). "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli." Science **288**(5467): 874-7.
- Yarian, C., H. Townsend, et al. (2002). "Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides." J Biol Chem 277(19): 16391-5.
- Yasukawa, T., T. Suzuki, et al. (2000). "Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes." <u>J Biol Chem</u> **275**(6): 4251-7.
- Yen, H. C., Y. C. Tang, et al. (2005). "Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line." Ann N Y Acad Sci 1042: 516-22.
- Yin, D., N. Tamaki, et al. (2000). "Wild-type p53-dependent etoposide-induced apoptosis mediated by caspase-3 activation in human glioma cells." J Neurosurg 93(2): 289-97.
- Yuan, X. W., X. F. Zhu, et al. (2007). "Interferon-alpha enhances sensitivity of human osteosarcoma U2OS cells to doxorubicin by p53-dependent apoptosis." <u>Acta Pharmacol Sin</u> **28**(11): 1835-41.
- Zanna, C., A. Ghelli, et al. (2005). "Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G." <u>Apoptosis</u> **10**(5): 997-1007.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." <a href="Pharmacol Ther">Pharmacol Ther</a> **92**(1): 57-70.