

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Essais de purification des mitochondries de fibroblastes WI-38 et effet de microinjection de mitochondries sur la dégénérescence cellulaire

Corbisier, Philippe

Award date:
1984

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

1984



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ESSAIS DE PURIFICATION DE MITOCHONDRIES DE
FIBROBLASTES WI-38 ET EFFET DE LA MICROINJECTION
DE MITOCHONDRIES SUR LA DÉGÉNÉRESCECE CELLULAIRE

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

PHILIPPE CORBISIER

T A B L E D E S M A T I E R E S
=====

- I. Introduction
- II. Travail expérimental
 - 2.1. Essais de purification de mitochondries de fibroblastes WI-38
 - 2.1.1. Introduction
 - 2.1.2. Matériels et méthodes
 - 2.1.2.1. La culture de cellules
 - 2.1.2.2. Dosages enzymatiques
 - 2.1.2.3. Fractionnement cellulaire
 - 2.1.2.4. Centrifugation différentielle
 - Résultats et discussion
 - 2.1.2.5. Gradients discontinus
 - 2.1.2.6. Effet du triton WR-1339
 - 2.1.2.7. Gradients discontinus .
 - 2.1.2.8. Gradients continus
 - Résultats
 - Conclusions
 - 2.2. Microinjection de mitochondries de foie de rat couplées et découplées dans des fibroblastes WI-38
 - 2.2.1. Matériel et méthodes
 - 2.2.1.1. Préparation d'une fraction mitochondriale de foie
 - 2.2.1.2. Oxypolarigraphie
 - Résultats
 - 2.2.1.3. Technique de microinjection
 - A. Figure 10
 - B. La fabrication des micropipettes
 - C. Etirement des capillaires
 - D. Transfert des cellules
 - E. Technique d'injection proprement dite
 - Résultats
 - Conclusion
 - 2.2.2. Mesure de la production d'O₂·(-)
 - Conclusion

I. INTRODUCTION

Le vieillissement cellulaire fait l'objet actuellement d'une série impressionnante d'études qui vont de la génétique moléculaire à la cytologie en passant par la biochimie et toutes les branches annexes. Les résultats de ces travaux ont été suscités ou au contraire ont servi d'argument à plusieurs hypothèses sur les origines et les mécanismes du vieillissement. On peut classer ces hypothèses en deux grands groupes ; d'abord celles qui soutiennent que le vieillissement est un phénomène programmé et donc inscrit d'une manière ou d'une autre dans notre information génétique et les autres qui considèrent le vieillissement comme étant le résultat de phénomènes stochastiques introduisant des erreurs ou des modifications de fonctionnement qui entraînent progressivement un déséquilibre dans le fonctionnement de la cellule et finalement sa mort.

C'est dans cette seconde catégorie que l'on rencontre les défenseurs de l'idée que c'est le mauvais fonctionnement ou le " vieillissement " des mitochondries qui serait à l'origine du vieillissement de la cellule (9).

Ils envisagent la suite des évènements de la manière suivante :

La production des radicaux libres et notamment de superoxyde par la chaîne de transporteurs d'électrons de la mitochondrie ne serait pas neutralisé complètement par la superoxyde dismutase matricielle ; l'excès de radicaux conduirait à une production continue de lipoperoxydes et de malonaldéhyde dans les mitochondries (15) et à une accumulation intramitochondriale de lipofuschine (16).

Plusieurs de ces intermédiaires étant très réactionnels, ils pourraient réagir avec le DNA mitochondrial

(DNA mt), qui est en contact physique proche avec la membrane interne (4) produisant une lésion du DNA mt que la mitochondrie pourrait difficilement réparer du fait du manque apparent de mécanismes de réparation (30), (4), (21), (3). Par exemple les produits de la peroxidation de lipides insaturés pourraient réagir avec les groupements aminés des acides nucléiques (7) avec une augmentation concomitante de mutations (31).

L'accumulation de lésions non réparées dans le génôme mitochondrial provoquerait une synthèse inadéquate de protéines de la membrane interne.

En effet, le génôme mitochondrial est semi-autonome, ribosomes et DNA mt étant impliqués dans la synthèse de sous-unités protéiniques hydrophobes pour au moins trois complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire de la membrane interne (26).

Suite aux lésions du DNA mt la division mitochondriale serait inhibée, ce qui provoquerait une réduction du nombre de mitochondries avec l'âge, une diminution de la synthèse de protéines, une détérioration des performances physiologiques en relation aux variations de l'environnement et par conséquence des performances de l'organisme.

Cette suite d'évènements a été proposée à la suite de travaux dans lesquels des modifications morphométriques et biochimiques ont été observées en relation avec l'âge des individus. On observe en effet :

- une diminution du nombre des mitochondries (24). (25), (21).
- une diminution du nombre de crêtes mitochondriales (24).
- une augmentation de la densification mitochondriale par accumulation de lipofuschine (16).
- une diminution du contrôle respiratoire par l'accepteur (RCR) (11).

- une augmentation de 25 % de la production de superoxyde (32).

Nous avons cru qu'il serait intéressant de soumettre l'hypothèse de l'implication des mitochondries dans le processus de vieillissement cellulaire à un test d'expérimentation le plus direct possible. Nous avons choisi de réaliser la microinjection de mitochondries dans une cellule vivante et d'examiner les effets que cette incorporation peut avoir. Cette technique nous permet de suivre le comportement mitochondrial et cellulaire tout en tenant compte des facteurs intracellulaires tels que la présence d'activateur ou d'inhibiteur ou une déficience en substrat. De plus, à la fois l'environnement cellulaire par la culture de cellules et mitochondrial par le choix des cellules injectées peut être contrôlé.

Francis { L'expérience que nous voulions réaliser était d'injecter des mitochondries isolées de jeunes cellules dans de vieilles cellules et réciproquement. Il fallait donc d'abord obtenir des mitochondries isolées de fibroblastes et en très bon état afin de ne pas fausser l'expérience. On verra les problèmes que cette purification a pu poser et devant les difficultés de cette tâche, nous avons décidé d'utiliser des mitochondries de foie et de comparer l'effet de la microinjection de mitochondries couplées et non couplées sur le comportement des cellules.

II. TRAVAIL EXPERIMENTAL

2-1. Essais de purification de mitochondries de fibroblastes WI-38

2-1-1. Introduction

Le but de ce travail étant d'étudier l'effet des mitochondries sur le comportement des cellules, il nous fallait tout d'abord obtenir une fraction contenant des mitochondries purifiées et en bon état de fonctionnement. Différents schémas de fractionnement subcellulaire utilisant la centrifugation différentielle et la centrifugation en gradient de saccharose ont été réalisés. Les différentes étapes de la purification ont été contrôlées en suivant l'activité enzymatique d'enzymes de référence associés spécifiquement à certains compartiments cellulaires.

2-1-2. Matériels et méthodes

2-1-2-1. La culture de cellules

Des fibroblastes humains WI-38 sont cultivés dans des boîtes en plastique de 75 cm² et divisés en quatre après confluence. Les fibroblastes sont ensuite mis en culture dans des " rollers " de 600 cm² à une vitesse de 0,25 rpm dans les mêmes conditions décrites par Remacle et al. (20). Après 8 jours, les cultures sont confluentes et les cellules prêtes pour les expériences de fractionnement cellulaire. Le nombre de cellules lorsque les cellules sont jeunes est estimé à $32 \cdot 10^6$ par roller, ce qui représente 5 à 6 mgr en quantité de protéines.

2-1-2-2. Dosages enzymatiques

La mesure de l'activité des enzymes de référence des structures subcellulaires permet d'estimer la proportion

de ces structures dans chaque fraction obtenue. Les enzymes de référence et les conditions expérimentales des dosages sont repris dans le tableau I.

Les résultats des dosages enzymatiques sont représentés selon le schéma classique de de Duve et al. (8) en donnant pour chaque enzyme son rendement et son activité spécifique relative (A.S.R.).

2-1-2-3. Fractionnement cellulaire

Les cellules sont récoltées selon une méthode modifiée de Tulkens et al. (34).

Les cellules provenant de 6 rollers sont lavées deux fois avec 10 ml de tampon phosphate salin et une fois avec du saccharose 0,25 M contenant 3 mM de tampon imidazole à pH 7,4. Elles sont détachées de la paroi à l'aide d'un racleur en plastique souple dans du sucrose 0,25 M contenant de l'imidazole 3mM à pH 7,4. La suspension cellulaire est centrifugée à 600 g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse de table. Les surnageants sont prélevés par aspiration et le culot est resuspendu dans 4 ml de sucrose à froid.

Toutes les opérations suivantes sont effectuées à froid. Les cellules resuspendues sont homogénéisées à l'homogénéisateur de Dounce et rompues par 20 passages du piston " tight ". Les opérations ci-dessus sont les mêmes quel que soit le fractionnement ultérieur.

2-1-2-4. Centrifugation différentielle

Les fractionnement par centrifugation différentielle ont été réalisés d'après Amar-Costesec et al (1). Les fractions (N,M,L,PS) sont séparées par centrifugations successives. Les temps de centrifugation ont été calculés d'après la

Tableau I : Dosages enzymatiques sur des fibroblastes WI-38 d'après Remacle et al (24).

NOMS	SUBSTRAT	CONCENTRATION	pH	TAMPON	AUTRES COMPOSANTS	T°C	TEMPS D'INCUBATION	PRODUIT	MESURE
Cytochrome Oxydase	Cytochrome C réduit	20.6 μ M	7.4	30 mM sodium phosphate	0.02% Triton X-100 EDTA 0.05 mM	25	3 minutes	Cytochrome C restant	
N-Acetyl-B-D-Glucosaminidase	Méthylumbelliferylacétamido-2-déoxy-B-D-Glucopyranoside	1mM	3.5	50 mM sodium phosphate	0.2% Triton X-100 albumine 1mg/ml	37	1 heure	4-méthylumbelliférone	
Catalase	H ₂ O ₂	1.3 mM	8	25 mM imidazol-HCl	0.04% Triton X-100	25	45 minutes	H ₂ O ₂	
Protéines	selon la méthode de Lowry et al (13).								

valeur de W et des distances entre l'axe du rotor, le haut et le bas de la colonne de liquide. Les différences de temps de centrifugation sont particulièrement importantes pour des petits volumes de solution ; elles sont calculées d'après les résultats de de Duve et al. (8).

Chaque fraction est resuspendue, homogénéisée avec un homogénéisateur de Dounce et relavée. Les surnageants sont combinés pour les fractionnements suivants.

Le fractionnement est représenté de façon schématique dans la fig. 1.

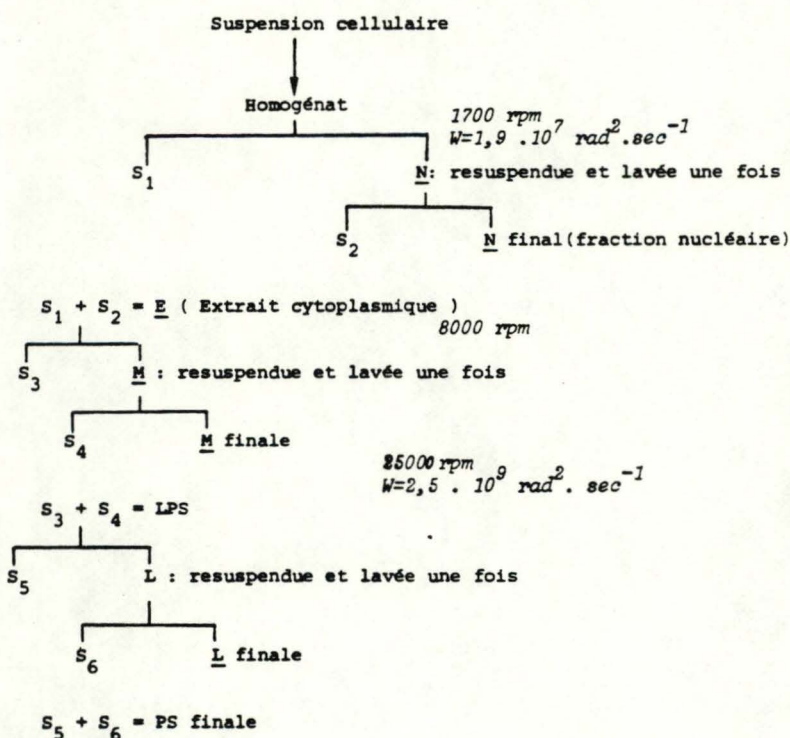


Fig 1 : Fractionnement par centrifugation différentielle.

Les fractionnements se font dans des tubes Beckman dans un rotor N°40 sauf pour la fraction nucléaire (N) qui est préparée dans une centrifugeuse International PR-J.

Résultats et discussion

Tableau II

Distribution des enzymes après centrifugation différentielle. Les valeurs représentent la moyenne de deux expériences \pm S.D.

Les pourcentages de récupération sont compris entre 85 et 110 %

Constituant	N	M	L	PS
% de l'homogénat				
Protéines	10.9 \pm 0.34	9.89 \pm 0.53	13.8 \pm 1.42	65.4 \pm 5.08
A.S.R.				
Cytochrome Oxydase	0.35 \pm 0.08	1.94 \pm 0.17	2.42 \pm 0.07	0.66 \pm 0.11
N-Acétyle- β -D-Glucosaminidase	0.49 \pm 0.12	0.94 \pm 0.10	2.37 \pm 0.13	0.80 \pm 0.06

Comme le montre le tableau II, la fraction mitochondriale légère (M) est enrichie deux fois en mitochondries (ASR de la cytochrome oxydase = 1,94) mais la fraction mitochondriale lourde (L) est enrichie 2,5 fois en mitochondries de même qu'en lysosomes. Il est donc impossible par cette seule technique de centrifugation différentielle classique de purifier une fraction mitochondriale, sans avoir de contamination lysosomiale importante.

Nous avons alors décidé de préparer une fraction ML et de réaliser une étape supplémentaire de purification par équilibration isopycnique sur un gradient discontinu de saccharose.

2-1-2-5. Gradients discontinus

Les caractéristiques des gradients ont été déterminées sur base de données établies au laboratoire de biochimie cellulaire à Namur. Les limites de densités utilisées ont été choisies d'après les densités moyennes de la cytochrome oxydase et la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (Fig. 2). Le principe de l'expérience était d'étudier l'enrichissement en mitochondries des fractions situées aux interfaces 1.16-1.18 ; 1.16-1.19 ; 1.16-1.20 de trois gradients discontinus.

La fraction ML préparée par centrifugation différentielle est déposée sur trois gradients discontinus, dans des tubes Beckman du rotor SW 65. La composition des gradients est représentée dans la fig. 3.

Les gradients sont centrifugés à 40 000 rpm pendant 2 h. 30 dans l'ultracentrifugeuse Beckman L5-65. Après centrifugation, 3 bandes apparaissent aux interfaces de densités. Le contenu des tubes est divisé en 3 fractions :

- la fraction A située au dessous de la bande supérieure
- la fraction B située au niveau des interfaces de densité 1.16 et de la solution la plus dense, contient la bande médiane.
- la fraction C, contient la bande inférieure située au niveau de l'interface de la solution de densité 1.25.

Les protéines et autres enzymes sont dosés pour chaque fraction et représentés dans le tableau III.

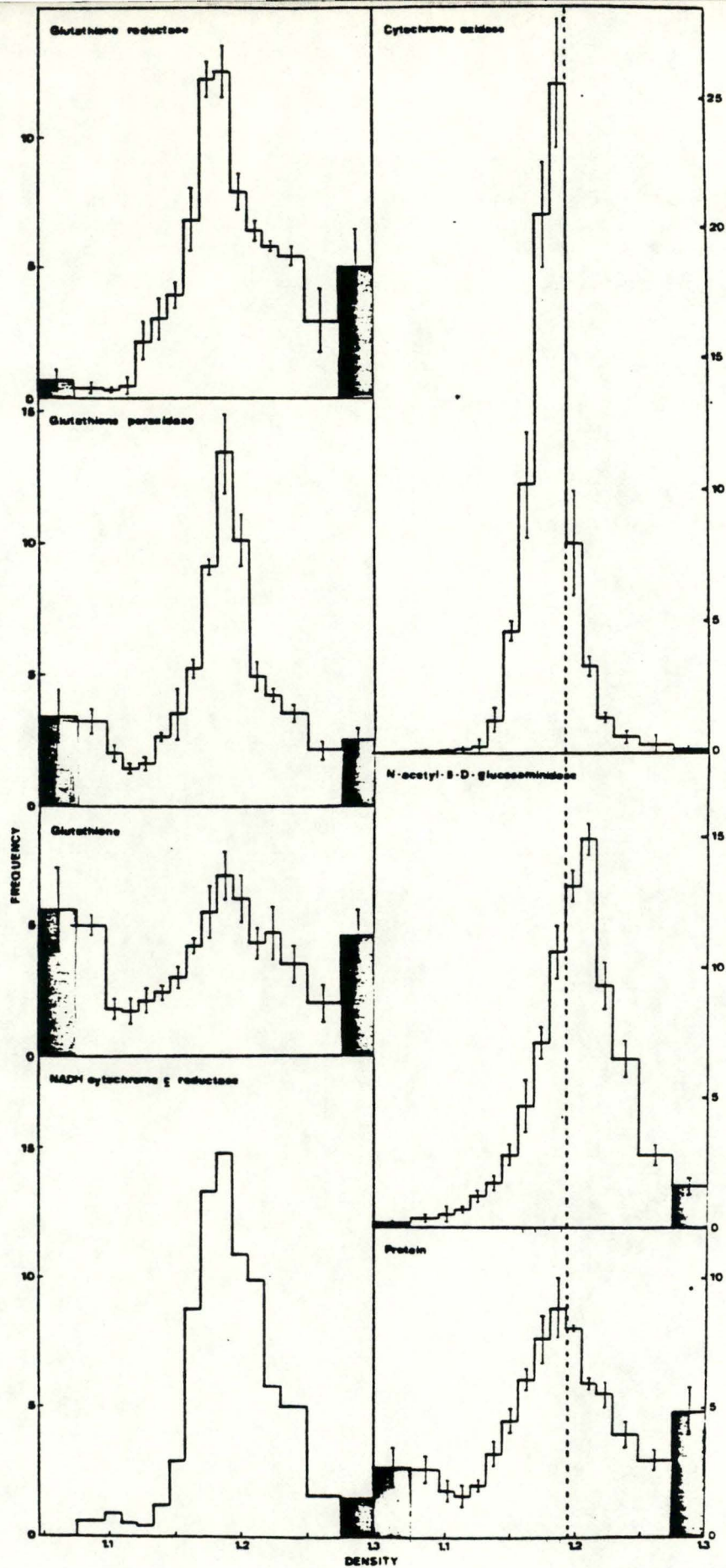


Fig 2: Distribution des enzymes après équilibration isopycnique d'une fraction 100 000 g de fibroblastes WI-38 dans des gradients linéaires de saccharose. La ligne en pointillé correspond à une densité de 1.19, limite de densité du gradient (2).

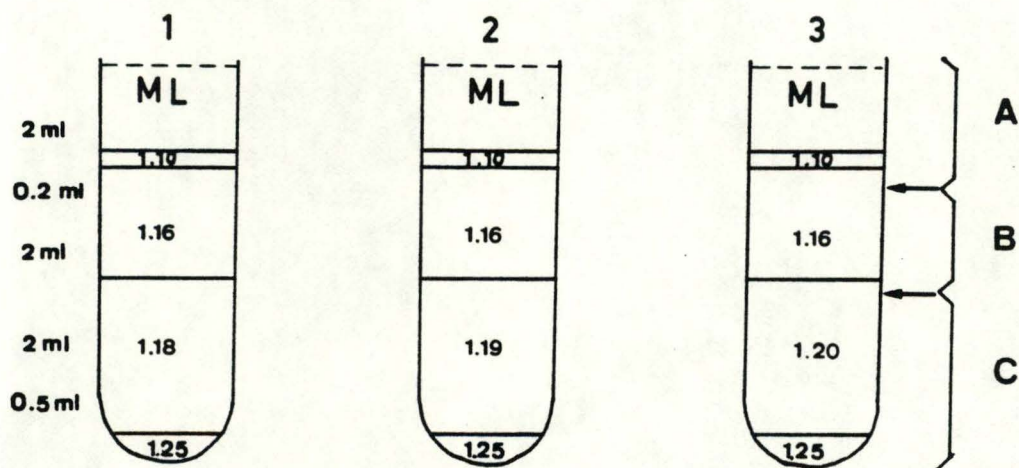


Fig 3: La fraction ML préparée par centrifugation différentielle est déposée sur 3 gradients discontinus de saccharose dont les caractéristiques sont reprises, les flèches représentent les limites des fractions A,B,C examinées.

Tableau III

Propriétés biochimiques des différentes fractions :

12.

	mg protéine	u Cytochrome Oxydase	u N-Acétyle-β-D- Glucosaminidase
1B	0.047	2.86	60.02
% Corr	21.4	19.8	16.9
2B	0.072	8.27	189.7
% Corr	28.0	54.0	51.8
3B	0.088	9.26	266.7
% Corr	48.3	60.7	69.6
<i>% Activité par rapport à l'homogénat</i>			
1B	5.70	12.3	3.50
2B	7.50	33.6	10.7
3B	11.3	37.7	14.4
<i>A.S.R. (Activité Spécifique Relative)</i>			
ML		2.33	0.775
1B		2.16	0.613
2B		4.50	1.43
3B		3.34	1.28

On constate que

- plus la densité de la fraction B augmente, plus on arrête de protéines dans cette fraction.
- l'activité de la cytochrome oxydase ainsi que de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase augmente avec la densité de la fraction B.
- la purification des mitochondries dans la fraction 2B est deux fois plus grande que dans la fraction ML mais l'on purifie également deux fois les lysosomes.

Ces résultats montrent qu'il paraît difficile de purifier les mitochondries par des procédés classiques de centrifugation, la fraction obtenue restant contaminée par les lysosomes. Les populations mitochondriales et lysosomiales paraissent donc proches en ce qui concerne leur coefficient de Svelberg et ont des densités d'équilibration qui se chevauchent de telle manière qu'il est difficile de les séparer l'une de l'autre même en jouant sur ces deux paramètres.

Nous avons alors pensé qu'il serait possible de modifier sélectivement le comportement des lysosomes en changeant leur densité ce qui permettrait alors d'isoler les mitochondries sur un gradient de densité. L'accumulation de TRITON WR-1339, détergent non-ionic, dans les lysosomes du foie de rat est une méthode (27,28) de purification des lysosomes qui permet de les alléger par rapport aux mitochondries, leurs principaux contaminants.

2-1-2-6. Effet du TRITON WR-1339

Nous avons adopté cette méthode de purification par traitement au TRITON WR-1339 (27,28) à la culture de fibroblastes. Une étude préliminaire nous a permis de

déterminer sur base d'observations en microscopie phototonique le temps d'incubation nécessaire, ainsi que la quantité de triton WR-1339 adéquate.

Les fibroblastes à confluence dans des boîtes de 75 cm² ont été incubés pendant des temps variables dans du milieu contenant des concentrations croissantes en triton WR-1339 allant de 0,5 mg/ml de milieu à 5 mg/ml de milieu. D'une manière générale, une concentration supérieure à 1 mg/ml de milieu provoque après 12 heures une absence de confluence, des détachements cellulaires ainsi que quelques pycnoses.

Une incubation au-delà de 24 heures est d'autant plus traumatizante que la concentration de triton WR-1339 est élevée.

D'après ces résultats, nous avons décidé d'incuber les fibroblastes pendant 24 heures à 37° C avec deux concentrations de 1 mg/ml et de 0,5 mg/ml de triton WR-1339. Les cultures cellulaires se faisaient toujours dans des rollers et étaient lavées après incubation pendant 12 heures avec du milieu frais. Il est à noter que la rotation des rollers en présence de triton WR-1339 n'affecte pas la culture de cellules en augmentant l'effet détergent du triton WR-1339.

2-1-2-7. Gradients discontinus

Le processus de centrifugation est le même qu'auparavant. Les tubes du rotor SW-65 sont successivement remplis par

- (a) 0,5 ml de solution de sucrose, densité 1,25
- (b) 2 ml de solution de sucrose, densité 1,20
- (c) 1,5 ml de solution de sucrose, densité 1,14 (tube 1)
1,15 (tube 2)
1,16 (tube 3)

- (d) 0,5 ml de solution de sucrose, densité 1,10
- (e) 1,20 ml de fraction ML.

La composition est reprise dans la fig 4.
Le gradient est centrifugé à 40000 rpm pendant 2 h 30 (avec $W = 1,5 \cdot 10^{11} \text{ rad}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).
Les fractions A,B,C correspondent aux échantillons délimités par des flèches de la fig 4.
Les résultats des dosages sont repris dans les tableaux IV et V.

Les fractions A et B sont toutes deux enrichies en mitochondries et en lysosomes dans des proportions différentes selon le type de gradient et la quantité de triton WR-1339 dans le milieu de culture.

Le triton WR-1339 allège une partie de la population lysosomiale qui se retrouve à des densités de l'ordre de 1,15 et 1,16. On retrouve cependant des ASR élevées pour la N-Acétyle- β -D-glucosaminidase dans la fraction B, ce qui montre que tous les lysosomes ne sont pas affectés dans une même proportion par le triton WR-1339. On constate aussi que les mitochondries sont allégées par ce traitement au triton. En effet, les ASR de la cytochrome oxydase sont importantes dans la fraction A. Cet allègement, pour le moins surprenant, a aussi été observé par Paul Tulkens (communication personnelle). Une explication possible serait la fixation du triton sur les mitochondries qui provoquerait ainsi un allègement de celles-ci.

Dans le but d'éviter une fixation éventuelle du triton sur les membranes mitochondriales, nous avons décidé de laver la culture cellulaire pendant 12 heures avec du milieu contenant 1 % de serum albumine bovine.

Pour mieux comprendre le comportement lysosomal et mitochondrial, nous avons réalisé une série de gradients

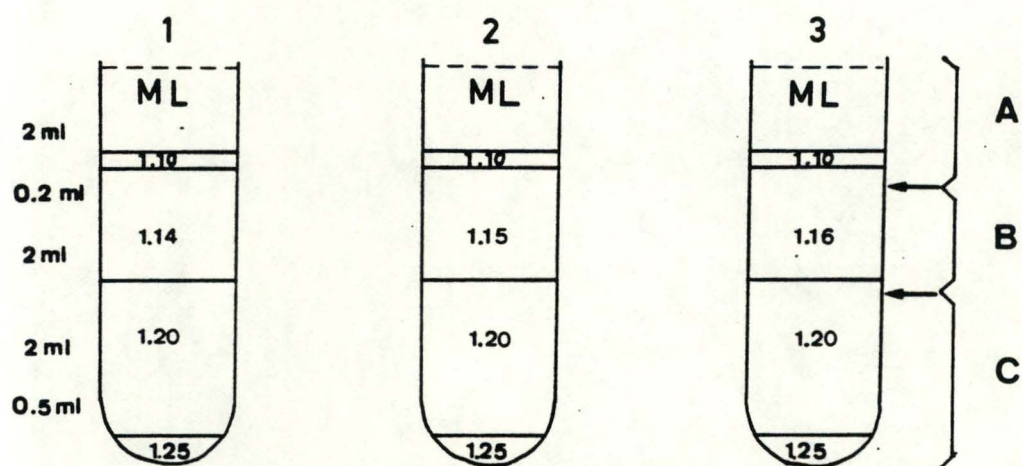


Fig 4: La fraction ML est déposée sur 3 gradients discontinus de saccharose.

Les volumes, densités et les trois fractions (A,B,C) examinées sont représentées sur le schéma.

Tableau IV : Propriétés biochimiques des différentes fractions obtenues après centrifugation en gradient^e de saccharose d'une fraction ML provenant de cellules incubées en présence de TRITON WR-1339 à raison de 0,5mg/ml de milieu.

Le schéma des gradients est donné à la fig 4.

Constituant	N	ML	PS	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
Protéines (% homogénat)	4,74	11,71	83,54	5,28	4,76	2,77	6,92	1,93	4,03	7,69	2,45	2,77
Cytochrome Oxydase (ASR)	3,14	3,95	0,46	8,02	1,54	0,43	4,66	1,94	0,71	4,90	3,56	1,58
N-Acétyle-β-D- Glucosaminidase (ASR)	1,36	5,52	6,35	5,63	6,73	3,26	6,35	11,0	1,77	5,96	5,63	3,97
Catalase (ASR)	1,90	3,20	0,64	-	-	-	-	-	-	2,27	6,05	3,30

Tableau IV : Propriétés biochimiques des différentes fractions obtenues après centrifugation en gradient^e de saccharose d'une fraction ML provenant de cellules incubées en présence de TRITON WR-1339 à raison de 1 mg/ml de milieu.

Le schéma des gradients est donné à la fig 4.

Constituant	N	ML	PS	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
Protéines (% homogénat)	9,51	7,77	82,72	2,46	1,99	1,64	3,40	1,05	2,11	3,98	4,10	1,99
Cytochrome Oxydase (ASR)	0,13	1,88	1,01	3,40	1,24	0,38	2,63	2,76	0,26	3,72	0,83	0,39
N-Acétyle-β-D- Glucosaminidase (ASR)	0,18	5,56	0,66	1,50	12,4	3,34	7,28	7,51	1,86	7,73	4,95	3,89
Catalase (ASR)	0,27	2,15	0,97	2,56	2,75	0,80	1,76	3,89	1,91	-	-	-

de saccharose analytiques

Remarque :

Une autre explication qui pourrait être envisagée est le fait que les mitochondries sont sensibles à la pression hydrostatique. Les conditions de centrifugation dans lesquelles nous avons travaillé pour réaliser les séparations en gradients discontinus sont à la limite des conditions de rupture des mitochondries déterminées par Wattiaux (29). Ainsi un allègement de la cytochrome oxydase aurait pu aussi se produire par rupture de certaines mitochondries. Dans les gradients analytiques suivants, nous avons volontairement diminué la vitesse de rotation à 29000 rpm afin d'éviter une interférence éventuelle de la pression hydrostatique sur les résultats.

2-1-2-8 Gradients continus

Trois gradients continus ont été réalisés :

- un premier gradient contrôle sans incubation de TRITON WR-1339 et un lavage avec de la serum albumine bovine (SAB)
- un second gradient avec une incubation de TRITON WR-1339 et un lavage avec de la SAB
- et un troisième gradient avec une incubation de TRITON WR-1339 sans lavage avec de la SAB.

Une fraction ML préparée par centrifugation différentielle est déposée sur un gradient continu de saccharose dans les tube Beckman du rotor SW 41 Ti. Les tubes sont remplis successivement par :

- (a) 0,5 ml d'une solution de saccharose de densité 1,30.
- (b) 8,6 ml d'un gradient de saccharose dont la densité augmente linéairement de 1,10 à 1,25.
- (c) 2,5 ml de la solution ML.

Les gradients sont centrifugés pendant 16 heures à 29.000 rpm ($\omega=5,3 \cdot 10^{11} \text{ rad}^2 \text{ sec}^{-1}$). Dans de telles conditions, les particules subcellulaires sont proches de leur équilibre de densité (1). Le tube est coupé en 14 sous fractions, qui sont pesées et chaque échantillon est soumis aux dosages enzymatiques.

Les résultats des trois gradients sont repris respectivement sur les fig 5 , 6 , 7 qui représentent la fréquence de chaque enzyme en fonction des incréments de densité.

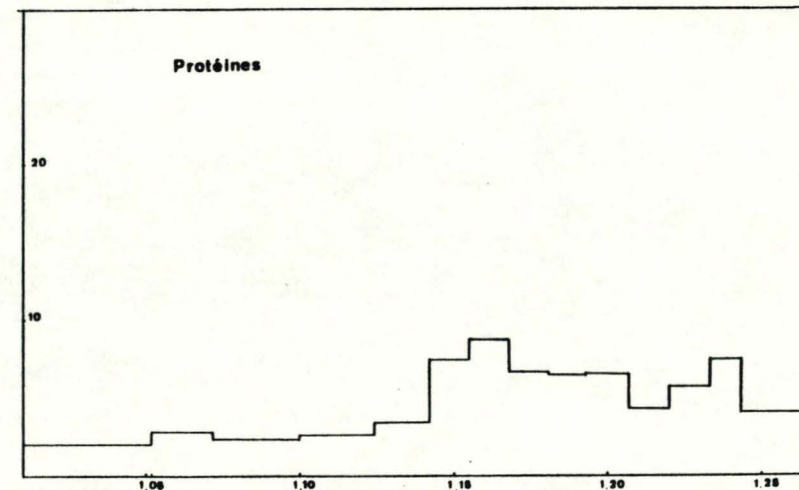
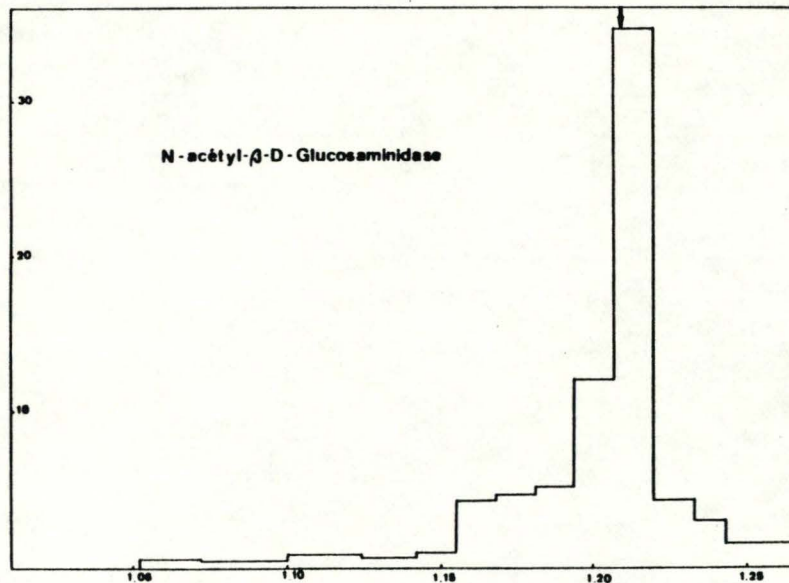
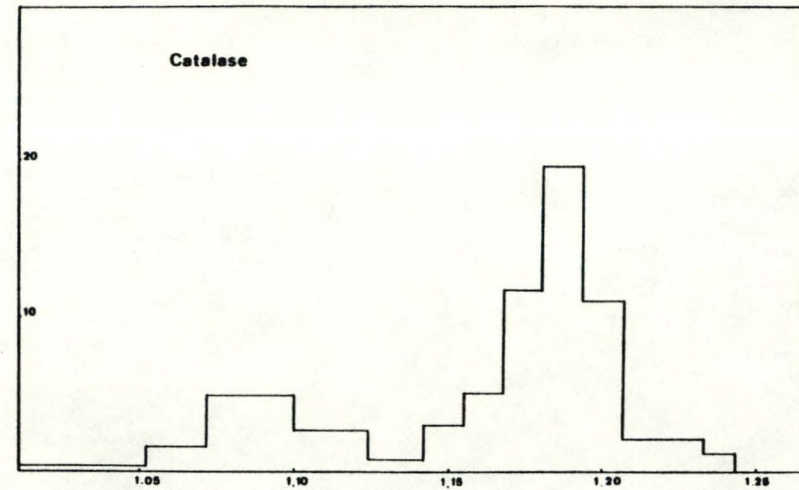
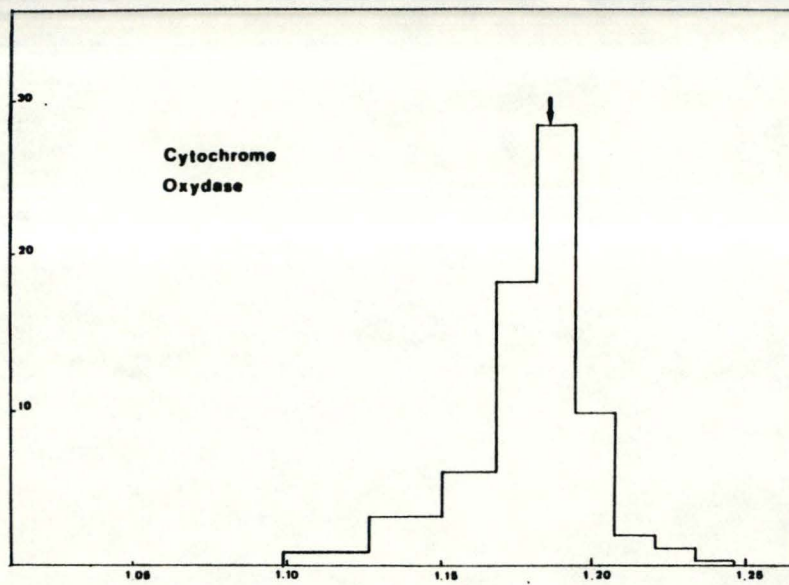


Fig 5: Histogramme de la distribution fréquence- densité des enzymes marqueurs après analyse en gradient de saccharose d'une fraction ML obtenue à partir de cellules cultivées en présence d'albumine. L'aire de chaque section du diagramme donne la quantité des constituants présent dans la section. La surface totale de l'histogramme est égale à 1.

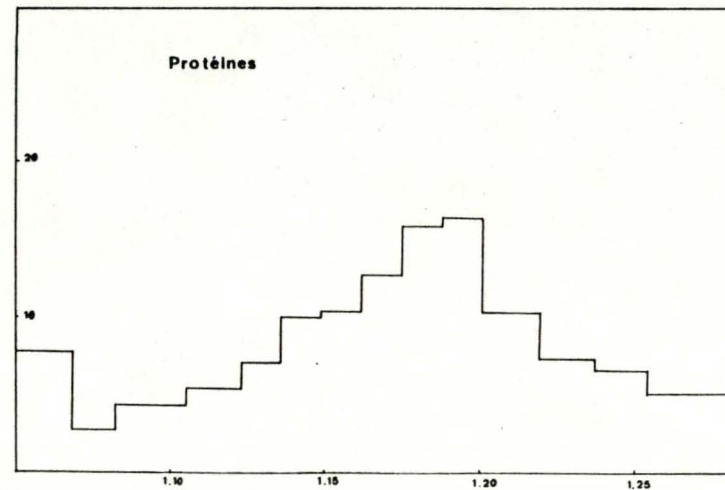
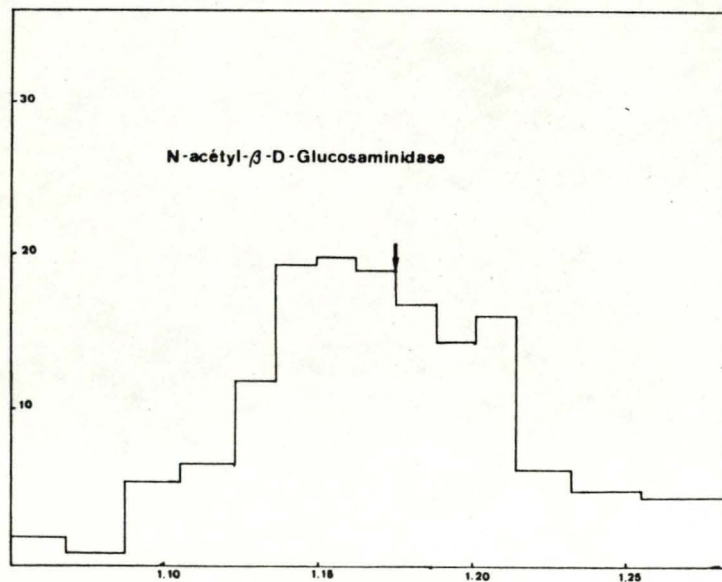
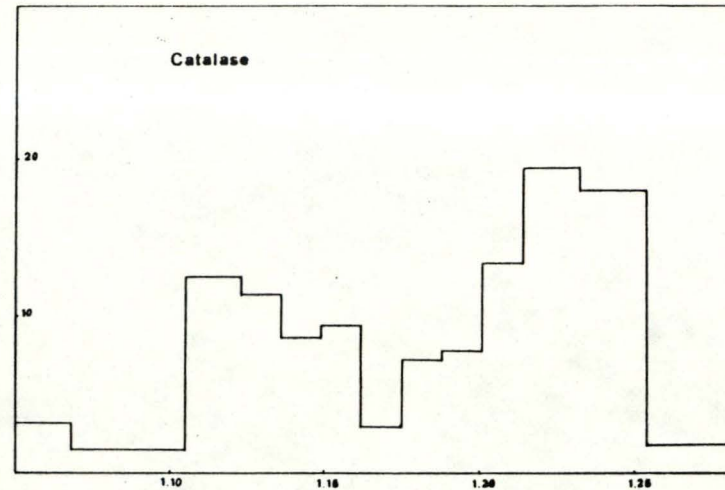
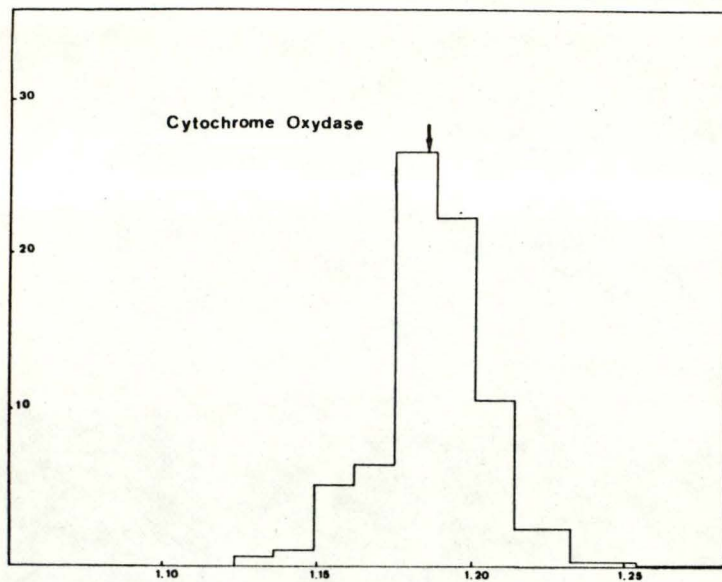


Fig 6: Histogramme de la distribution fréquence-densité des enzymes marqueurs après analyse en gradient de saccharose d'une fraction ML obtenue à partir de cellules cultivées en présence de TRITON WR-1339 et d'albumine.

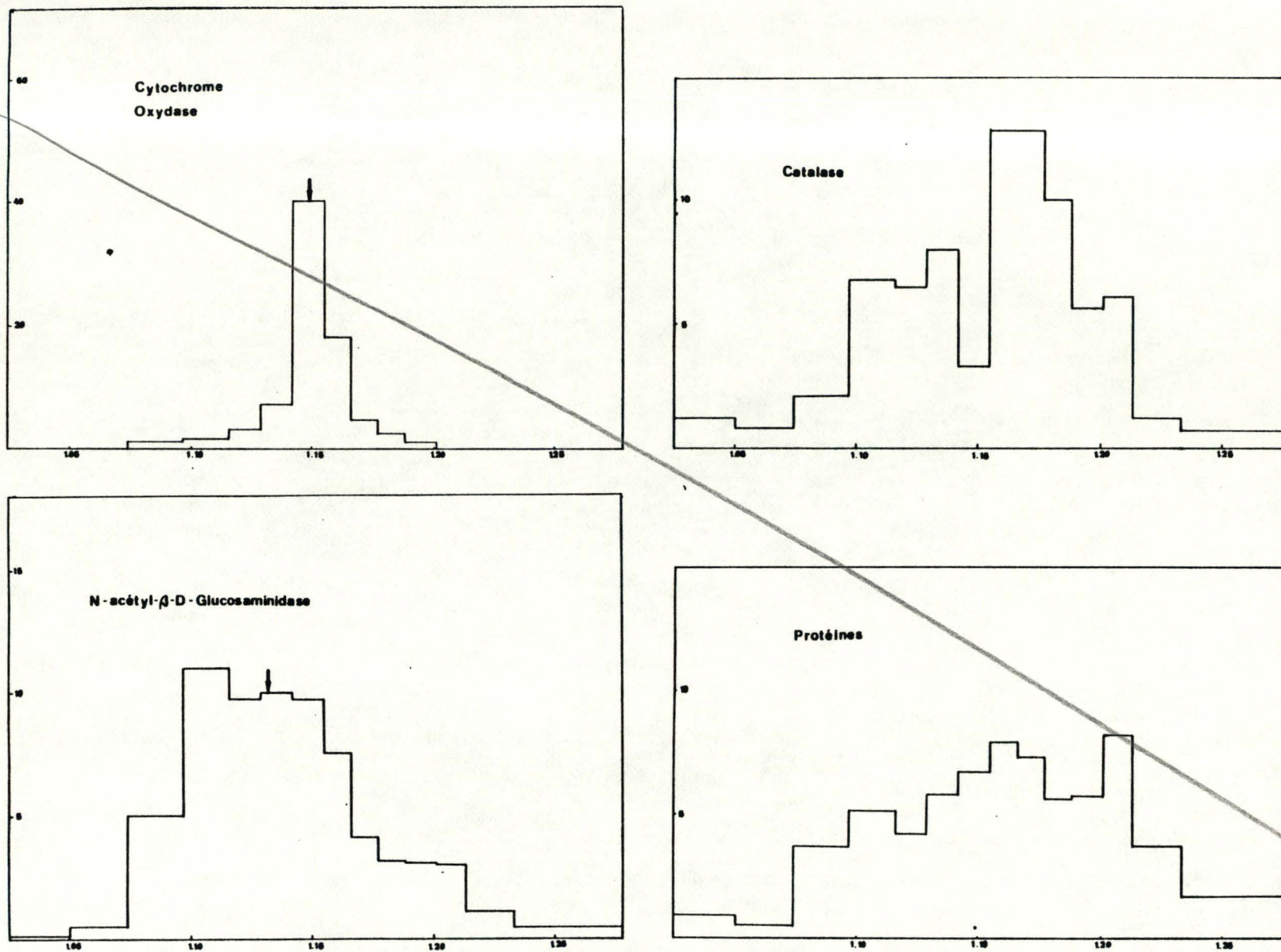


Fig 6: Histogramme de la distribution fréquence-densité des enzymes marqueurs après analyse en gradient de saccharose d'une fraction ML obtenue à partir de cellules cultivées en présence de TRITON WR-1339 et d'albumine.

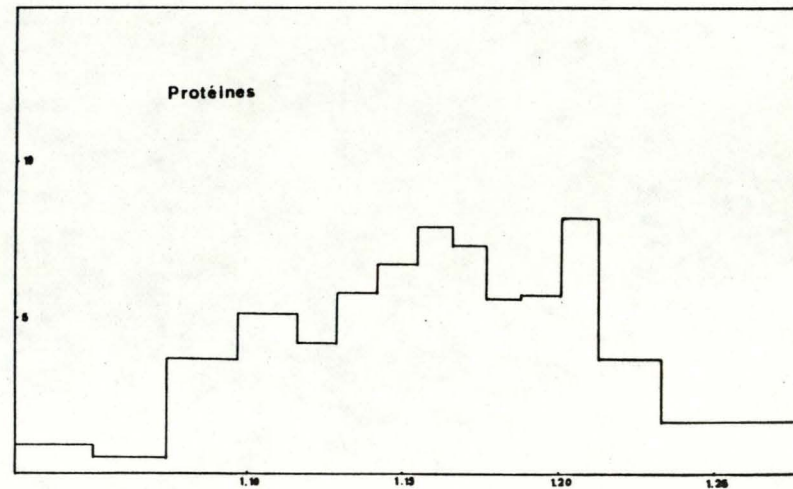
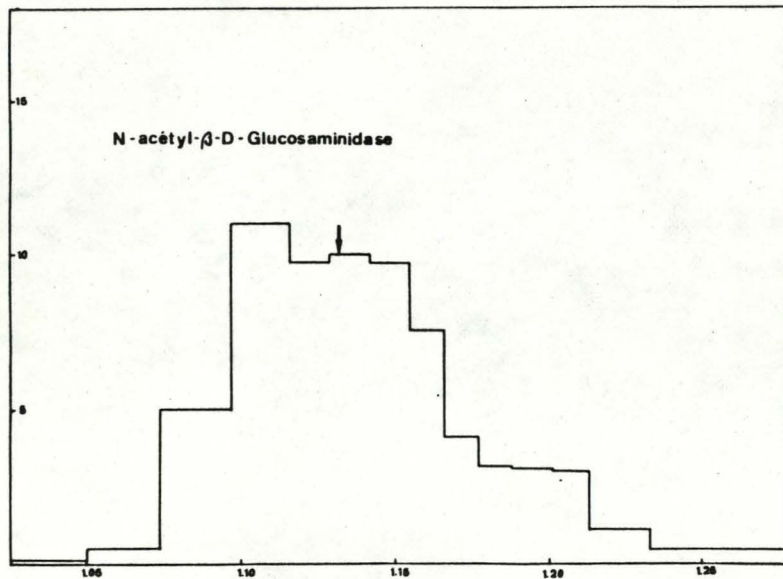
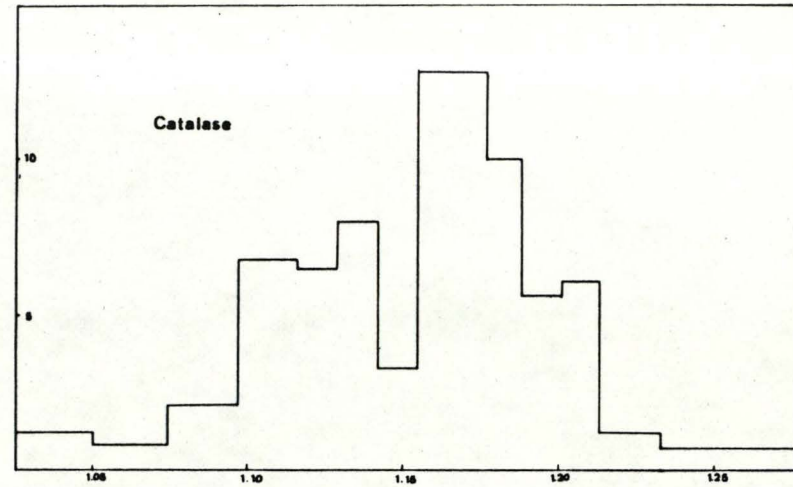
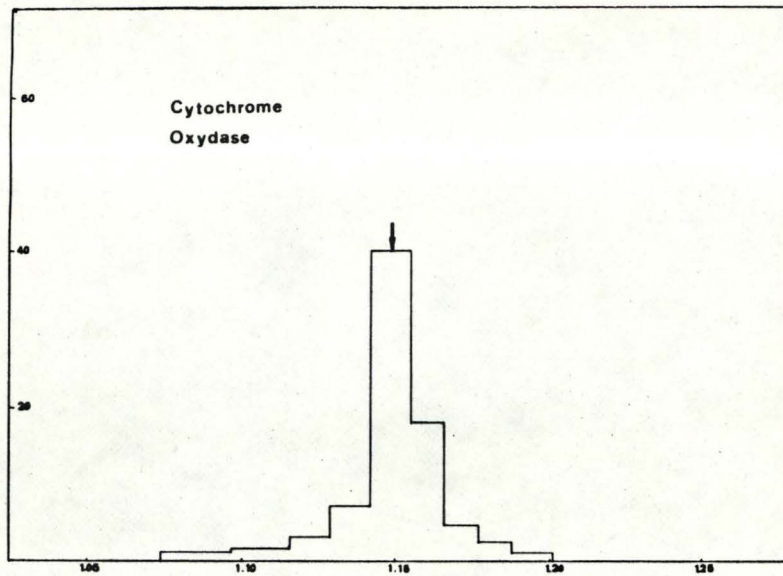


Fig 7: Histogramme de la distribution fréquence-densité des enzymes marqueurs après analyse en gradient de saccharose d'une fraction ML obtenue à partir de cellules cultivées en présence de TRITON WR-1339 sans lavage avec de l'albumine.

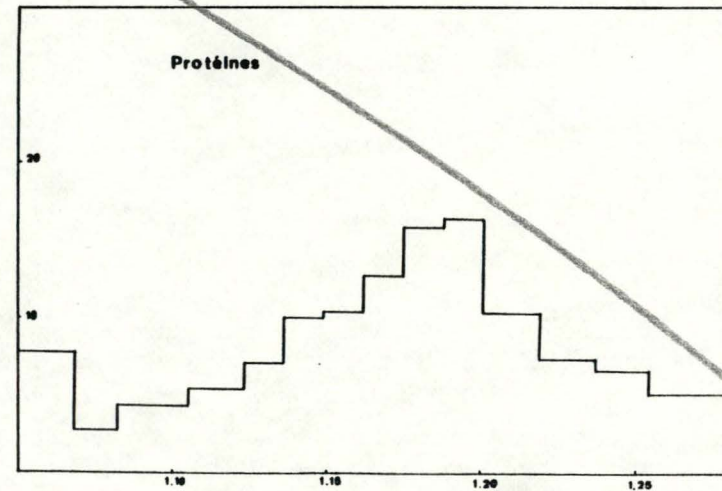
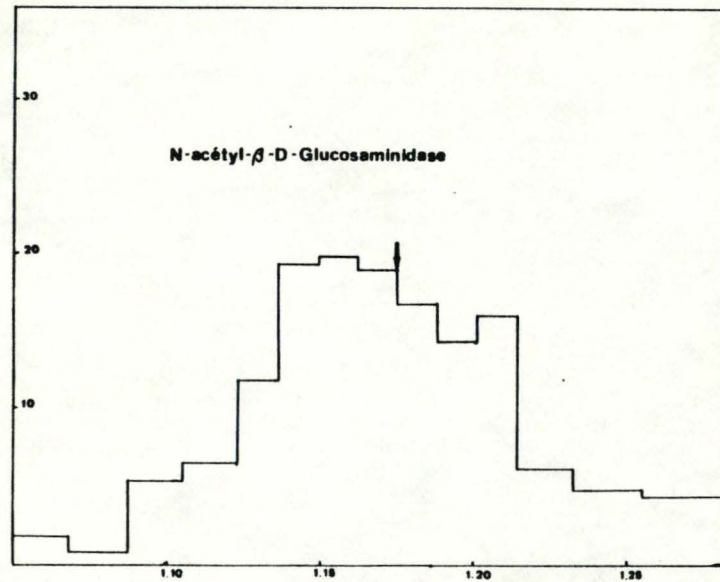
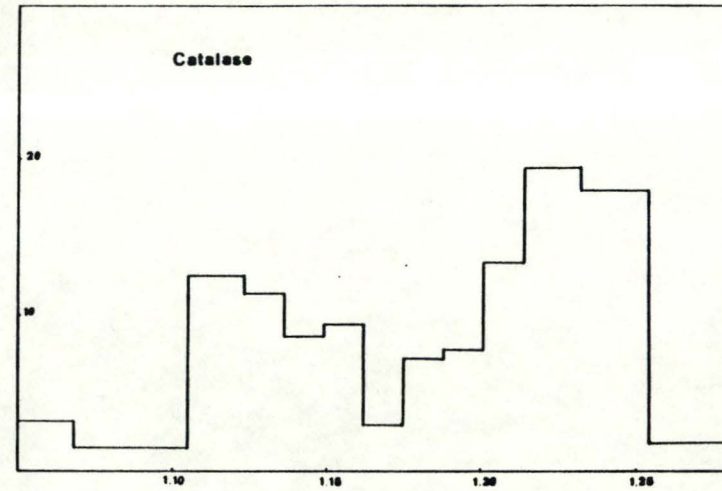
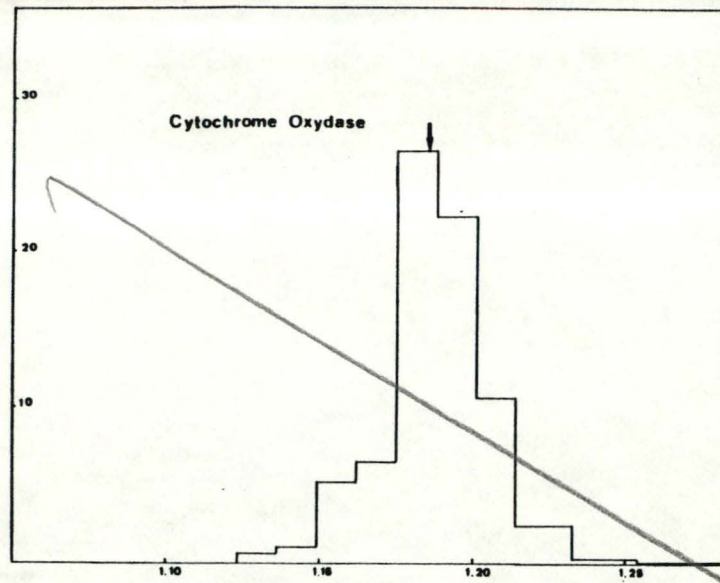


Fig 7: Histogramme de la distribution fréquence-densité des enzymes marqueurs après analyse en gradient de saccharose d'une fraction ML obtenue à partir de cellules cultivées en présence de TRITON WR-1339 sans lavage avec de l'albumine.

Résultats

Le tableau VI reprend les médianes de densité d'équilibration d'une fraction, ML correspondant aux divers traitements des cellules.

Tableau VI

Constituant	sans TRITON +albumine	avec TRITON +albumine	avec TRITON sans albumine
Cytochrome Oxydase	1.1860	1.1800	1.1496
N-Acétyle- β -D-glucosaminidase	1.2092	1.1754	1.1350

L'étalement de la distribution de la N-acétyle- β -D-glucosaminidase après traitement des cellules au TRITON WR-1339 indique un allègement d'une partie seulement de la population lysosomiale. On comprend ainsi les recouvrements d'activité enzymatique avec la cytochrome oxydase obtenus dans les fractions B des gradients discontinus. Sur base des résultats obtenus sur le foie, nous nous attendions à un allègement plus marqué et plus uniforme des lysosomes dans une fourchette de densité de 1,14 à 1,16.

La population lysosomiale est donc composée d'hétérophagolysosomes à différents stades de phagocytose. Cette hétérogénéité des lysosomes de fibroblastes WI-38 pourrait peut-être s'expliquer par l'existence de sous-populations lysosomiales différentes.

Une hétérogénéité biochimique au sein de la population lysosomiale de fibroblastes d'embryon de rat a aussi été observée (35).

gradients discontinus au reseau.

On retrouve le maximum d'activité de la cytochrome oxydase à la densité 1,18, cette valeur est un peu plus faible que celle observée pour le foie de rat mais comparable aux densités d'équilibration de mitochondries de la rate (6), des muscles squelettiques (23) ou des fibroblastes d'ovaire de hamsters chinois (17).

La distribution de la cytochrome oxydase est déplacée vers la gauche par le triton WR-1339 en absence de SAB. L'allégement des mitochondries observé précédemment lors des gradients discontinus est donc confirmé ! La densité médiane d'équilibration est de 1,1496. Or les gradients discontinus avaient comme densité limite 1,14, 1,15, 1,16. Il est donc logique de trouver des mitochondries dans la fraction A.

De plus, on note une nette protection des mitochondries par la SAB. Cette protection va dans le sens de l'hypothèse d'une fixation de triton sur les mitochondries plutôt qu'une rupture de celles-ci pendant le processus de centrifugation. En effet dans ce dernier cas, on aurait dû obtenir une distribution hétérogène de la cytochrome oxydase pour les mitochondries non protégées.

La distribution de la catalase est bimodale, ce qui pourrait être dû à un relargage partiel du contenu des peroxyosomes.

Conclusions

L'utilisation du triton WR-1339 utilisé dans le but d'affecter sélectivement les lysosomes de fibroblastes et de pouvoir ainsi purifier les mitochondries n'est pas indiquée. Nous avons réussi à éviter un allégement des mitochondries par l'utilisation de SAB dans le milieu de lavage mais la distribution des lysosomes reste trop étalée.

D'autres techniques auraient pû être envisagées notamment l'utilisation du dextran (5), du plomb (2) ou de l'or colloïdal (36) qui allourdissent les lysosomes de foie de rat. Mais comme nous avons pû le constater, les organites de fibroblastes ne se comportent pas toujours comme ceux du foie.

L'isolation des mitochondries aurait peut-être pû se faire par centrifugation isopycnique sur un gradient de métrizamide (2-(3-acétamido-5-N-méthylacétamido-2,4,6-tri-iodobenzamido)-2-dioxy-D-glucose), milieu qui permet de purifier les lysosomes (37).

Nous n'avons pas utilisé la métrizamide car une décomposition éventuelle de celle-ci en iode et des modifications éventuelles des mitochondries auraient pû interférer dans l'interprétation des résultats de la microinjection.

Une observation de mitochondries de foie de rat isolées par un gradient de métrizamide en microscopie électronique ne montre toutefois pas de changement de celle-ci, par contre les peroxysomes sont détruites partiellement.

Le but premier du mémoire étant l'étude de l'effet de mitochondries injectées sur le comportement de la cellule, nous n'avons pas voulu continuer les expériences de purification de mitochondries de fibroblastes en culture qui constituerait certainement une recherche en soi et nous avons décidé de travailler avec des mitochondries de foie de rat.

2-2. Microinjection de mitochondries de foie de rat couplées et découplées dans des fibroblastes WI-38

2-2-1. Matériel et méthodes

2-2-1-1. Préparation d'une fraction mitochondriale de foie

Un rat Wistar femelle (1 mois) mis à jeun pendant 20 heures est décapité. Le foie est prélevé, refroidi dans une solution de sucrose froid 0,25 M et homogénéisé dans le même milieu par le passage d'un piston en teflon tournant à 3000 rpm dans un tube en verre.

L'homogénat est soumis au schéma expérimental fig (8)

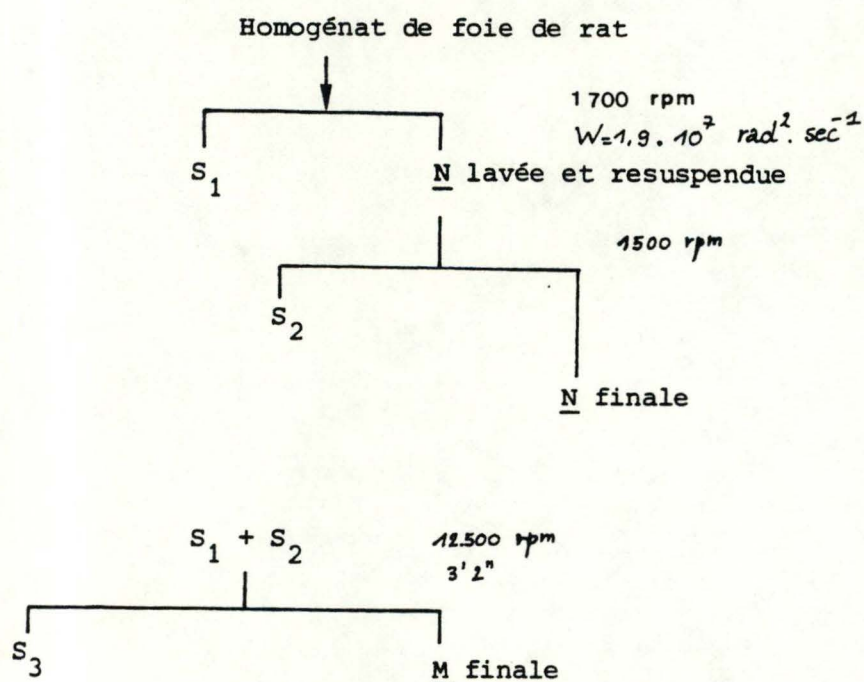


Fig 8: Centrifugation différentielle.

La fraction N est préparée dans un rotor 253 de l'International PR-J (tube JA 20). La fraction M est préparée dans un rotor N° 40 Beckman.

Les surnageants S1 et S2 sont décantés à la pompe mécanique à environ 2 cm du culot formé par les noyaux afin d'éviter absolument le prélèvement de noyaux ou de matériel nucléaire qui viendrait boucher les micropipettes d'injection.

Le surnageant S3 est décanté au maximum pour éviter la présence de lysosomes dans la fraction M.

Le culot M final est resuspendu délicatement dans un tampon d'injection pH 7,2 avec 0,1 % d'albumine.

Le tampon d'injection (KH_2PO_4 4,55 mM ; K_2HPO_4 5,45 mM ; KCl 70,50 mM ; NaCl 7,05 mM) est porté à 350 milliosmoles à l'aide de KCl, ce qui évite une destruction des mitochondries par choc osmotique et prévient ainsi un découplage immédiat des mitochondries.

La suspension mitochondriale est resuspendue dans un homogénéisateur de Dounce par un passage lent du piston " light " et portée à une dilution finale de 1/2 en ml/gr de foie. L'analyse biochimique d'une telle préparation a été effectuée au laboratoire sur base des enzymes marqueurs : on peut estimer qu'elle contient au moins 20 % de mitochondries.

2-2-1-2. Oxypolarigraphie

Le couplage des mitochondries est vérifié par oxypolarigraphie. La consommation d'oxygène est mesurée par une électrode à oxygène de Clark insérée dans une chambre d'incubation de 2 ml remplie du milieu de réaction et maintenue sous agitateur magnétique.

Le milieu de réaction est composé de 20 mg de protéines mitochondriales par ml, de saccharose 0,25 M et de SAB 0,1 %. Le milieu d'incubation est composé de Na_2HPO_4 13 mM, KH_2PO_4 3 mM, MgCl_2 6 mM, NaF 12 mM, NaCl 13 mM et KCl 84 mM.

Le stade 4 de la respiration est initié par addition de 0,05 ml de succinate 0,25 M est mesuré après que la consommation d'oxygène soit constante. Le stade 3 est mesuré après addition de 0,04 ml d'ADP 10 mM. Le contrôle par l'accepteur (RCR) est calculé par le rapport du taux de consommation d'O₂ du stade 3 et du stade 4 (38).

Le RCR est un indicateur plus sensible d'un mauvais fonctionnement de la respiration mitochondriale que le rapport ADP/O car il est affecté par des changements soit du stade 3 (présence d'ADP) soit du stade 4 (absence d'ADP).

Le succinate a été choisi comme substrat car il produit des taux respiratoires maxima et est donc un révélateur plus sensible des changements dans le taux de phosphorylation et de transport d'électrons. Le succinate entre dans la chaîne des transporteurs d'électrons par l'intermédiaire d'une flavoprotéine au niveau de l'ubiquinone entre le site 1 et le site 2.

Il est à noter qu'il est à noter que cela n'intervienne pas directement dans les expériences qui suivent que l'activité de la succinate déshydrogénase et de la succinate oxydase ne varient pas avec l'âge.

Résultats

Le RCR donne une indication précise de l'état physique de la membrane mitochondriale interne. La diminution du RCR à partir d'une fraction M fraîchement préparée provenant d'une rate de 1 mois est linéaire au cours du temps. Cette diminution est due à la valeur de la respiration du stade 3 de plus en plus faible (fig 9). Les mitochondries sont totalement découplées après 16 heures à 4° C.

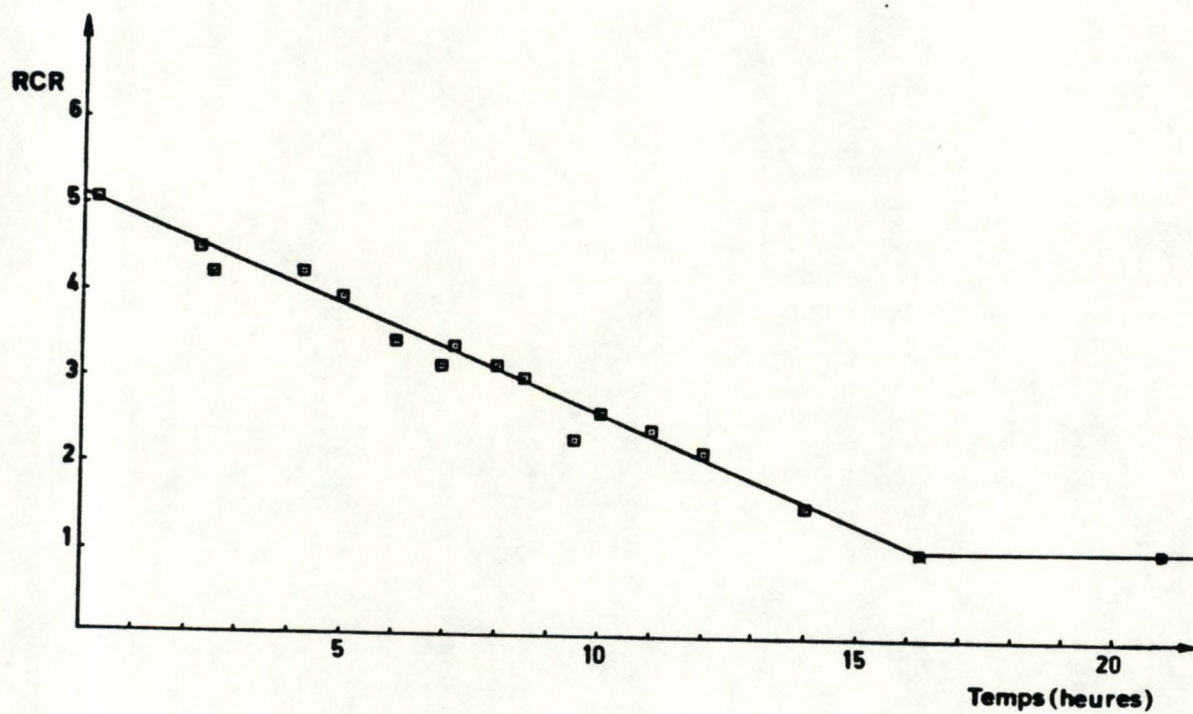


Fig 9: Diminution du contrôle respiratoire par l'accepteur (RCR) en fonction du temps (détails dans le texte).

Par la suite, les mitochondries ont été resuspendues dans le tampon d'injection. Les résultats avec ce tampon comme milieu d'incubation sont les mêmes que ceux obtenus avec le tampon précédent.

Une diminution du RCR de mitochondries de foie de rat avait déjà été soulignée chez des mitochondries provenant de rats âgés comparés à des animaux jeunes (11). Cette diminution in vivo est donc accélérée lorsque les mitochondries sont gardées in vitro à 4° C.

Ayant à notre disposition des mitochondries couplées et découplées, nous pouvions les utiliser afin de les injecter dans des fibroblastes WI-38 et comparer l'effet de cette injection au cours du temps.

2-2-1-3. Technique de microinjection

La technique de microinjection d'une solution dans des fibroblastes a été mise au point par V. Henin (10). Cette technique a dû être adaptée à la microinjection d'organites comme les mitochondries du fait de leur taille.

A- Le système d'injection représenté à la fig. 10 est composé d'un microscope inversé DIAVERT Leitz d'une unité de micromanipulation comprenant un manipulateur démultiplié, et un bras d'injection. La pression d'injection se commande par l'unité d'injection reliée aux bombones d'azote. Une pression de maintien empêche le reflux dans la micropipette, la pression d'injection permettant l'injection se commande à partir un interrupteur on-off.

B- La fabrication des micropipettes

Les capillaires d'injection sont d'abord siliconisés dans une solution filtrée de Repelcote (Hoping & Williams)

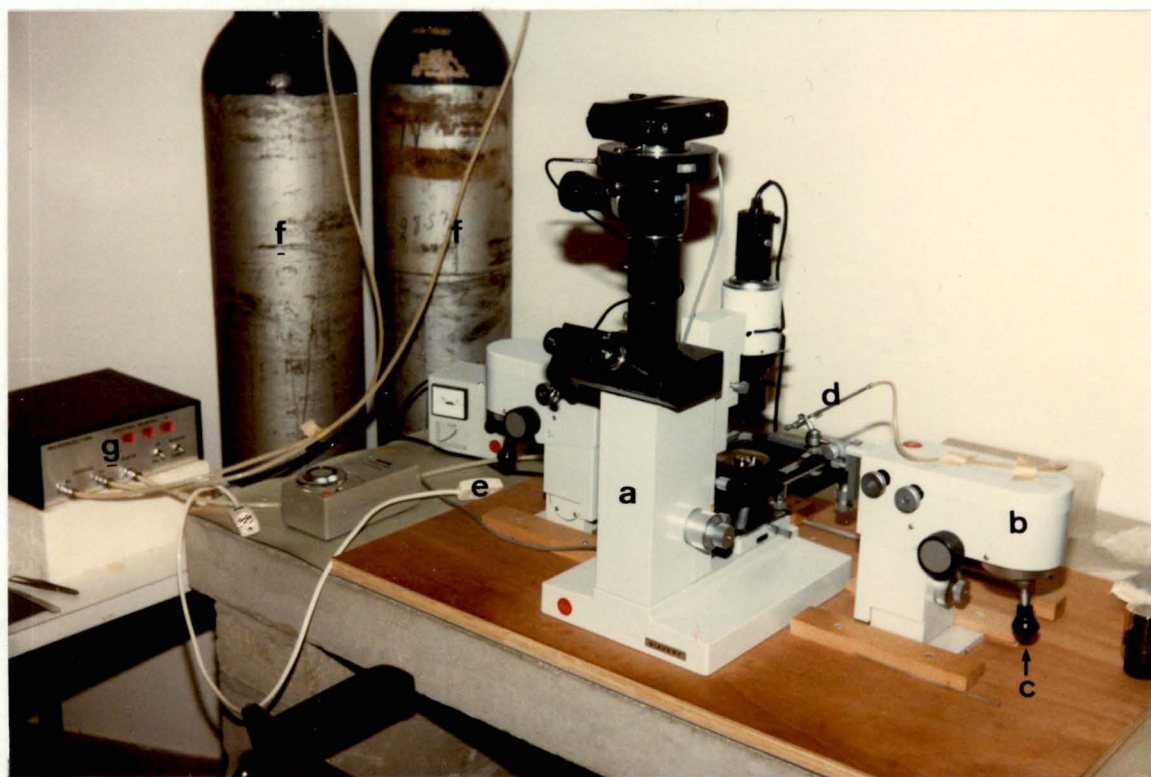
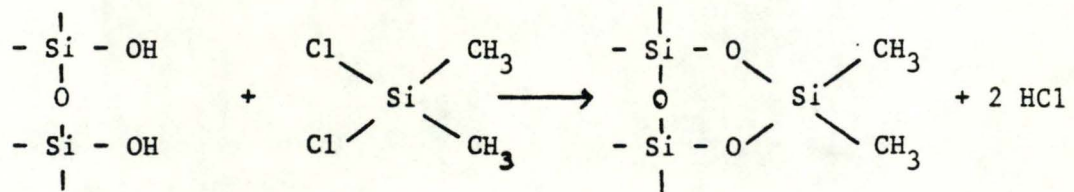


Fig 10: Ensemble de microinjection

- (a) microscope inversé DIAVERT Leitz
- (b) micromanipulateur Leitz
- (c) démultiplicateur de mouvement
- (d) support de la micropipette reliée à l'unité de pression
- (e) interrupteur d'injection (ON-OFF)
- (f) bombone d'azote
- (g) unité de pression à 3 sélections - pression de maintient
- pression d'injection
- haute pression

pendant 10 minutes puis lavées dans trois bains successifs d'eau de ville, d'eau désionisée et distillée pour enfin être étuvées à 120° C. Le verre est rendu hydrophobe par addition de groupements silicones.



Ce traitement a été rendu nécessaire pour diminuer les bouchons de mitochondries à la sortie de la micropipette qui empêcheraient l'injection.

C- Étiréement des capillaires

Nous avons étalonné l'appareil d'étiréement des capillaires afin d'obtenir un diamètre interne à l'extrémité de l'ordre de $1 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$. Il fallait d'une part permettre le passage des mitochondries mais d'autre part éviter de faire des trous trop importants dans la membrane, ce qui aurait pu être fatal pour les fibroblastes.

Les diamètres internes et externes ont été calculés d'après les photographies obtenues en microscopie à balayage (voir fig 11).

D- Les cellules proviennent du repiquage de boîte de culture à la génération G 23 ; elles sont transférées dans une boîte de Pétri (Falcon) et injectées 3 jours plus tard.

E- Technique d'injection proprement dite

La technique développée par V. Henin a été modifiée pour la microinjection de mitochondries.

La micropipette d'injection est remplie à l'aide d'un

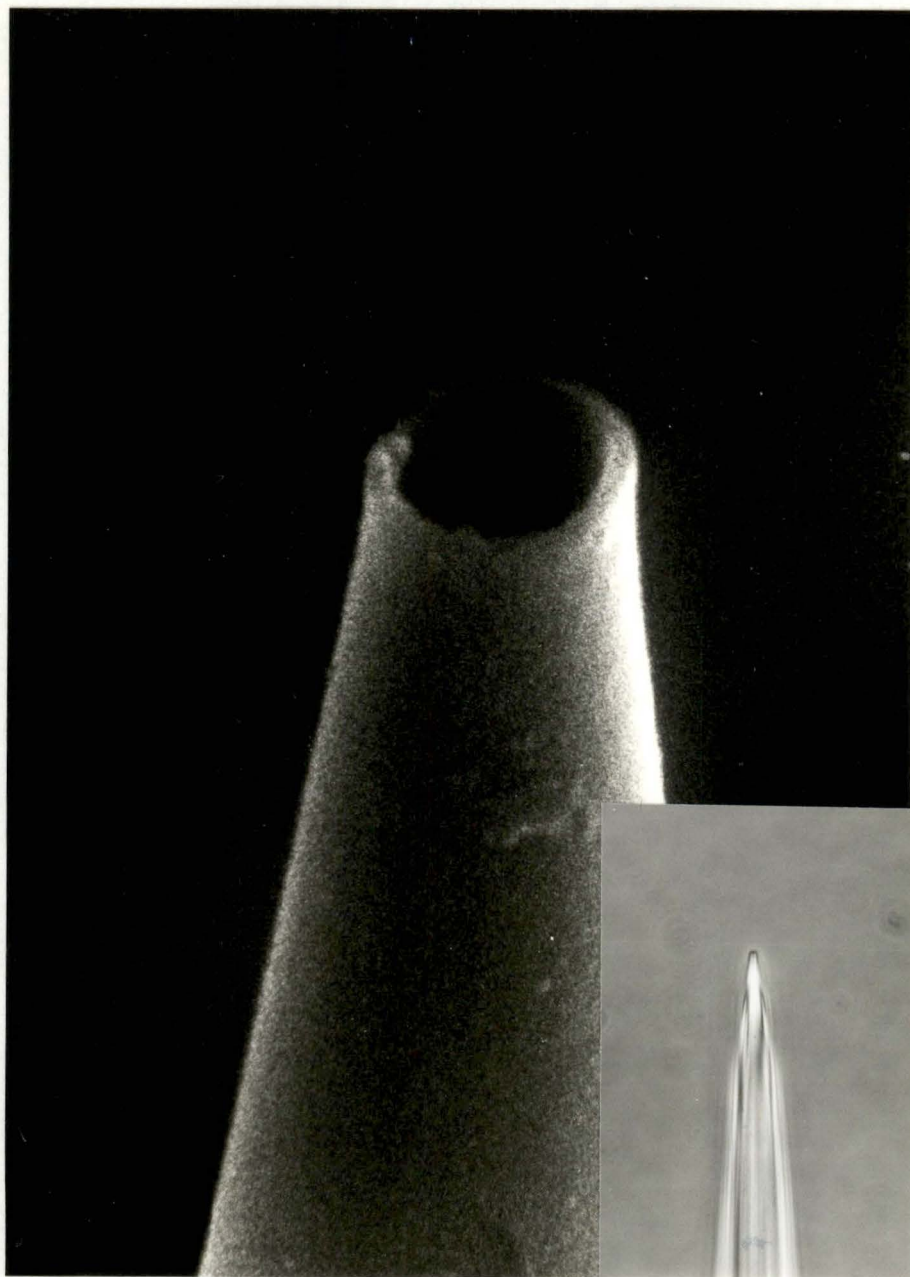


Fig 11: Extrémité d'une micropipette en microscopie à balayage (G x 25 000) et en microscopie photonique en contraste de phase.

Le diamètre interne est d'environ $1 \mu\text{m}$.

fin capillaire, de la fraction mitochondriale diluée (1/2) pour former une colonne de liquide de 3 cm. Cette colonne de liquide crée une pression hydrostatique qui comprime les bulles d'air éventuelles, diminue leur diamètre et facilite leur remontée dans la micropipette. La micropipette est fixée sur le bras du manipulateur et amenée dans le plan de la cellule.

La pression de maintien est choisie de façon adéquate. La cellule est injectée à proximité du noyau.

Les cellules injectées sont entourées d'une marque réalisée dans le plastique sur la face inférieure à l'aide d'un diamant et à la face supérieure à l'aide d'une micropipette à bout arrondi. Cette dernière marque est nécessaire pour retrouver la cellule injectée lors de la préparation en microscopie électronique et empêche les fibroblastes injectés de migrer sur le fond de la boîte de Pétri.

Le PBS est remplacé par du milieu de culture et la boîte est remise dans une étuve à CO₂.

La dilution finale de 1/2 de la préparation mitochondriale a été choisie sur base de calcul de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase par mg de protéines dans une cellule de fibroblaste.

La quantité de mitochondries injectée dépend fortement du volume d'injection surtout du fait de l'utilisation de micropipettes à extrémité assez large. Nous avons veillé à ne pas injecter de trop grands volumes qui provoquent une dégénérescence cellulaire de suite après l'injection.

On peut évaluer approximativement le nombre de mitochondries injectées à une cinquantaine, soit un nombre du même ordre de grandeur que celui initialement présent dans la cellule (12).

Résultats

Dans un premier temps, nous avons mis en présence des mitochondries découplées et couplées en très grand nombre (> 10000) avec des fibroblastes sans les injecter (fig 12).

Nous n'avons pas observé pendant une période de 48 heures de modifications cellulaires quelles que soient les mitochondries couplées ou non utilisées.

couplés

On note cependant une accumulation de mitochondries au niveau de la membrane plasmique des cellules. Cet attachement des mitochondries sur la membrane cellulaire pourrait être dû à une adhésion de l'albumine contenue dans le liquide d'injection et liée aux mitochondries et à la membrane plasmique.

Une première série d'expériences de microinjection a alors été réalisée afin de mettre ou non en évidence une dégénérescence cellulaire après injection de mitochondries découplées ou couplées.

Ces cellules étaient mises ensuite dans une étuve à CO₂ et photographiées au cours du temps.

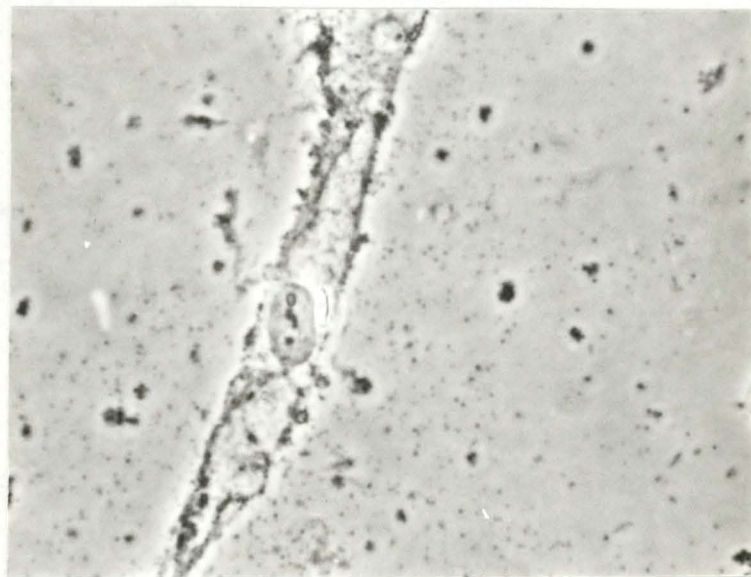
Au total, 7 fibroblastes ont été injectés avec des mitochondries couplées à 94 %. Après 24 heures, une seule était dégénérée.

Pour 8 autres fibroblastes injectés avec des mitochondries découplées (RDR = 1), toutes présentaient des signes de dégénérescence à différents stades après 24 heures et mouraient après 48 heures. Les deux types d'injection se sont faits dans des conditions expérimentales identiques. Des cellules injectées avec du tampon d'injection ne présentent aucun changements, de même que les cellules non injectées.

La dégénérescence de la cellule injectée avec des mitochondries couplées peut être causée par une lésion



Fig 12: Mitochondries (*mt*) dans le milieu cellulaire.
(G x 140)



Fixation préférentielle des mitochondries au niveau de la membrane plasmique après 48 heures. Par la suite les cellules injectées avec des mitochondries couplées ne dégèrent pas.

(G x 460)

mécanique de la micropipette d'injection, bien que celle-ci ne soit pas apparue lors de l'injection. Au moment de l'injection, on évalue assez correctement la précision de l'injection par l'observation suivante : la membrane plasmique d'une cellule correctement injectée se referme avec le retrait de la micropipette, ce qui s'explique par la propriété fluide de celle-ci. Une cellule mal injectée garde un point blanc à l'endroit d'injection. L'observation de ce point constitue le signe d'une lésion mécanique.

Morphologiquement, nous avons fait les observations suivantes après injection :

Lorsque ce sont des mitochondries découplées qui sont injectées, on observe dans certains cas une dégénérescence cellulaire rapide ; après 4 heures, la membrane plasmique est rompue à plusieurs endroits et le fibroblaste perd progressivement sa forme allongée pour s'arrondir, finalement la cellule disparaît sous forme de débris cellulaires (fig 13).

Dans d'autres cas, on observe dans un premier temps la formation d'agrégats qui pourraient être des mitochondries situées aux extrémités des prolongements cytoplasmiques et qui semblent être éliminés bien que ce phénomène n'ait pas pu être observé comme tel. Par la suite, la cellule dégénère et meurt (fig 14).

Il s'agissait d'une sorte de phénomène de protection cellulaire contre l'inclusion de matériel étranger en grande quantité. Une telle observation peut aussi être faite après injection de mitochondries couplées mais sans dégénérescence future de la cellule et elle a également été faite par V. Henin au laboratoire de Biochimie après injection du cytochrome b5 marqué à la peroxydase (non publiés). Elle pourrait être confirmée en réalisant l'autoradiographie après injection de mitochondries marquées au [3H].

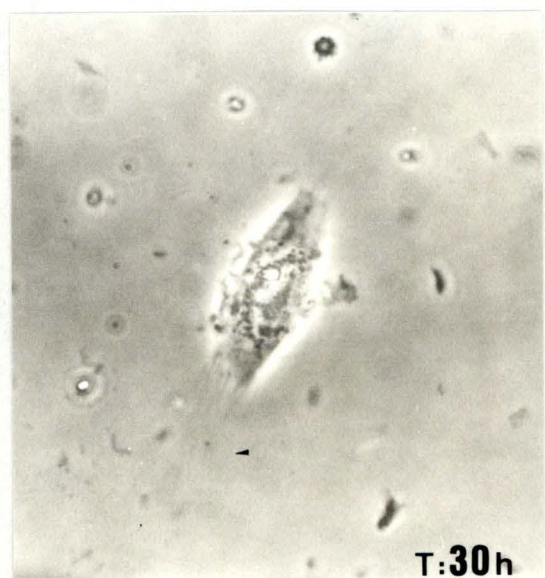
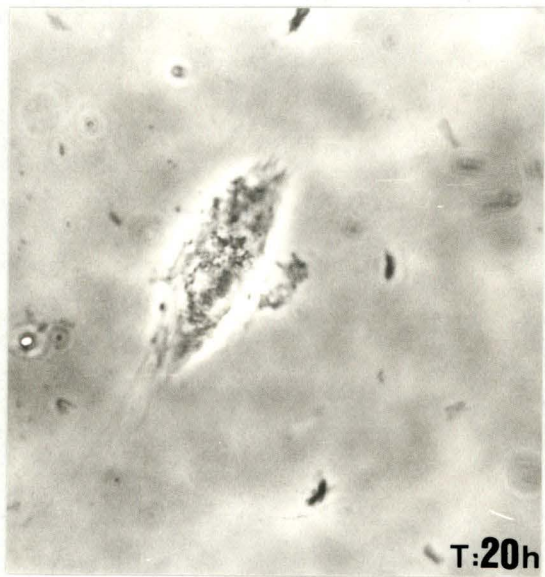
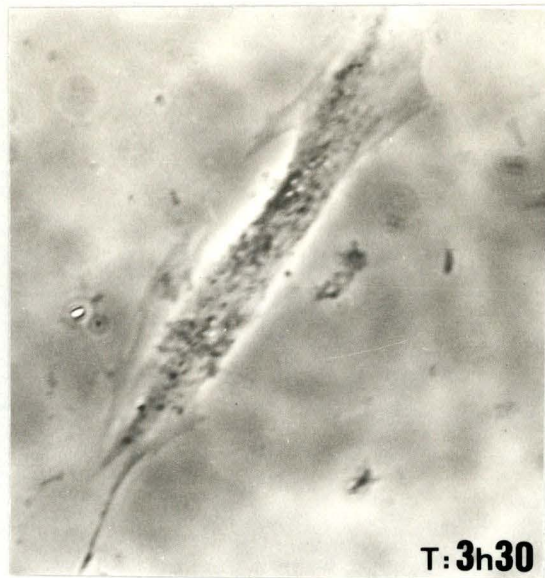
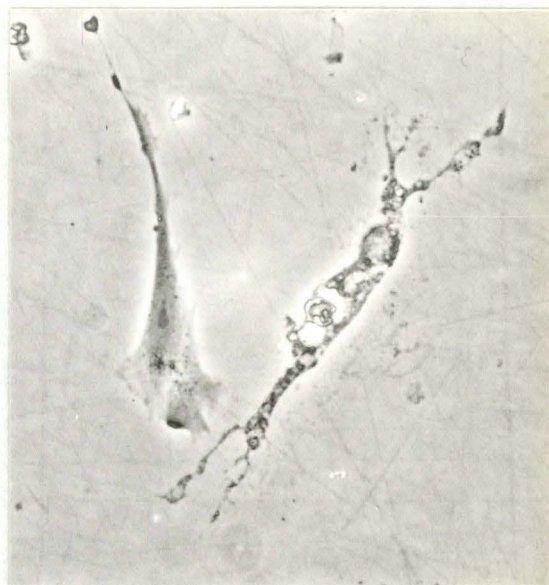


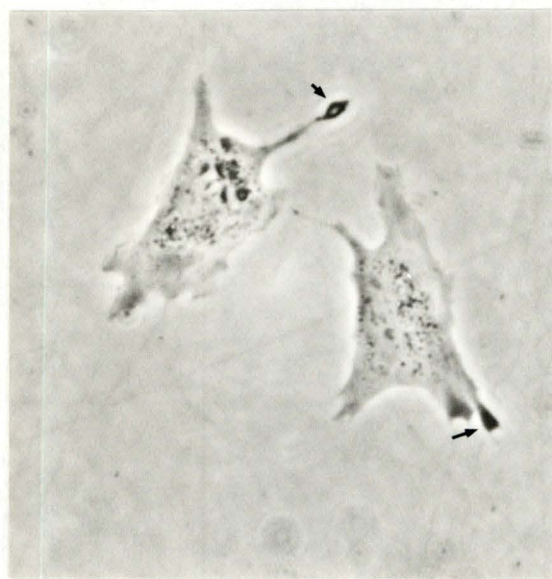
Fig 13: Evolution d'un fibroblaste WI-38 injectés avec des mitochondries découplées (détails dans le texte).



Fig 14: Fibroblaste injecté avec des mitochondries couplées après 24 heures. (La flèche indique l'endroit d'injection et les mitochondries). (G x 460)



Fibroblaste injecté avec des mitochondries découplées après 24 heures (à droite). Fibroblaste non injecté (à gauche).



Les flèches indiquent une accumulation de matériel foncé qui pourrait être les mitochondries injectées.



Dans une deuxième série d'expériences, nous avons voulu étudier d'un point de vue qualitatif l'évolution de cellules injectées.

Plusieurs boîtes de cellules ont été injectées à différents temps puis placées dans une étuve à CO₂ à 37° C. Après divers temps d'incubation, les boîtes sont prélevées, les cellules fixées et enrobées afin d'être observées en microscopie électronique, d'après la technique de M. Raes et al (19).

Nous pouvons donc comparer des cellules injectées présentant des temps d'incubation différents.

Au total, 35 cellules ont été injectées. Les résultats observés dans l'expérience précédente sont ici confirmés pour un nombre plus élevé de cellules injectées quoi que les temps d'incubation étaient moins longs.

Les cellules injectées avec des mitochondries couplées et fixées après 5 heures ne présentent pas en microscopie électronique de changement visible. Les cellules observées ont un aspect morphologique normal (fig 15, 16). On observe des mitochondries allongées typiques des fibroblastes et des mitochondries plus arrondies qui pourraient provenir de la microinjection. L'autoradiographie pourrait confirmer de manière plus formelle cette assertion.

Certaines cellules injectées avec des mitochondries découplées présentent après 8 heures une dégénérescence très marquée. On distingue très nettement le détachement et le gonflement des membranes nucléaires, une dissolution du matériel nucléaire, des gonflements du RE avec par endroits, formation de vacuoles, les mitochondries sont gonflées et on note une réduction des crêtes mitochondriales, la membrane plasmique, enfin, est rompue.

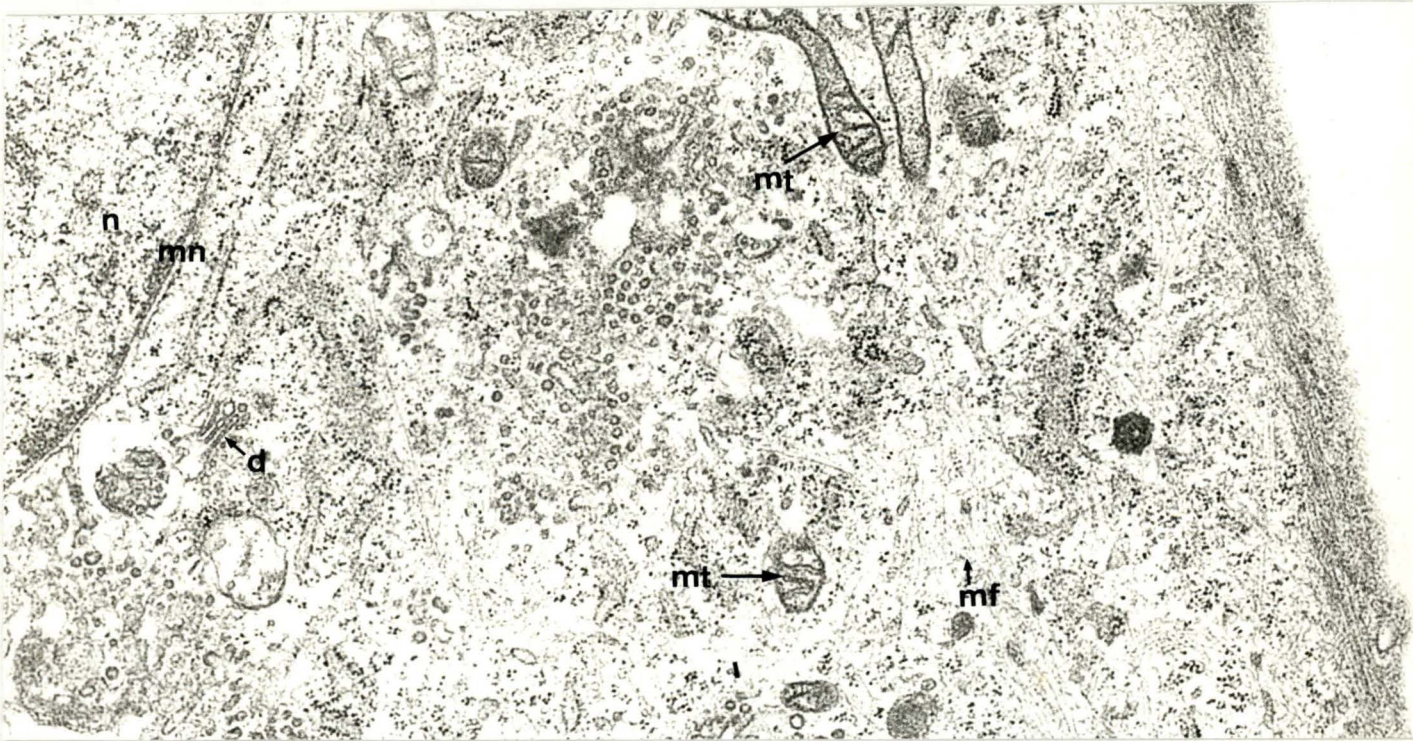


Fig 15: Vue d'ensemble d'un fibroblaste injecté avec des mitochondries couplées. On distingue le noyau (*n*) et les deux membranes nucléaires (*mn*); des mitochondries de tailles différentes (*mt*); des microfilaments (*mf*); des dyctiosomes (*d*) ainsi du RER. (G x 2300)



Fig 16: Détails de la micrographie ci-dessus. Les mitochondries ne présentent pas de modifications morphologiques; les crêtes mitochondriales ainsi que la membrane externe sont intactes. (G x 23000)

Toutes ces caractéristiques sont la preuve d'une dégénérescence cellulaire avancée. Nous montrons aux fig 17 et 18 des photos montrant le caractère final de la dégénérescence.

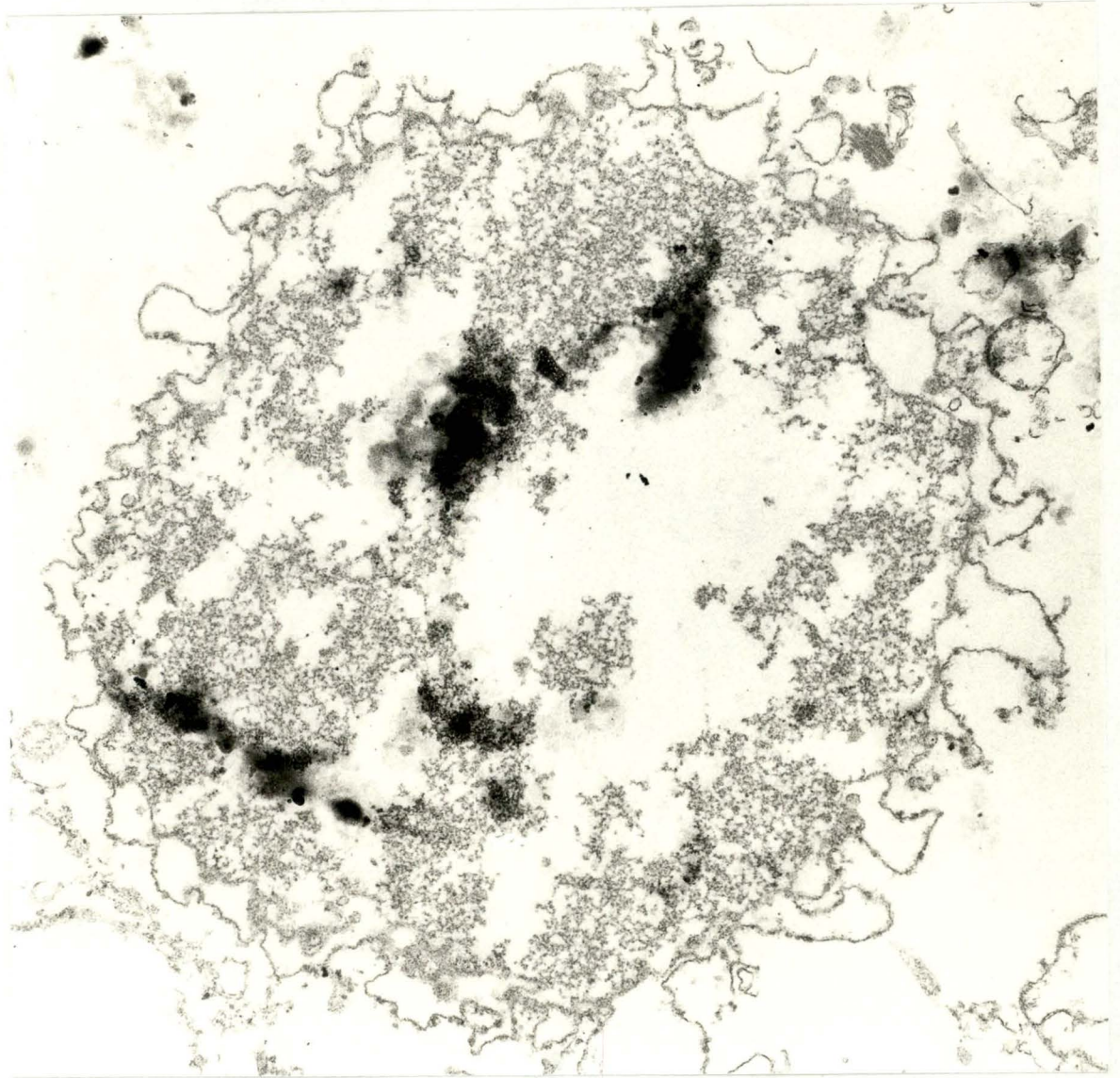
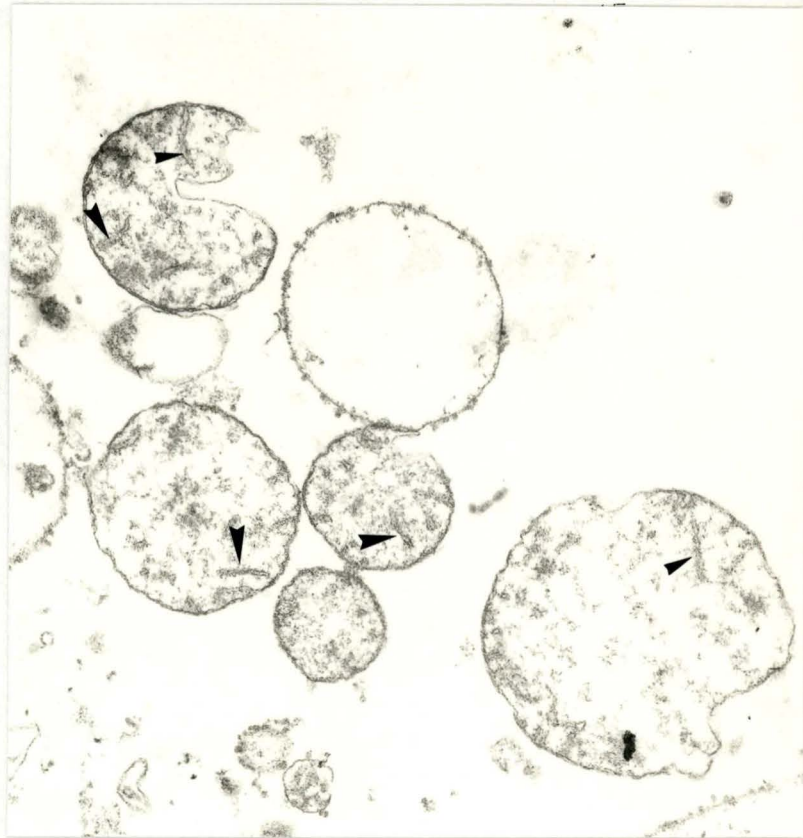


Fig 17: Noyau d'un fibroblaste dégénéré. Les deux membranes nucléaires sont séparées par endroit et forment des poches. Le matériel nucléaire est lysé en partie.

Cette micrographie est typique d'un noyau en dégénérescence avancée.

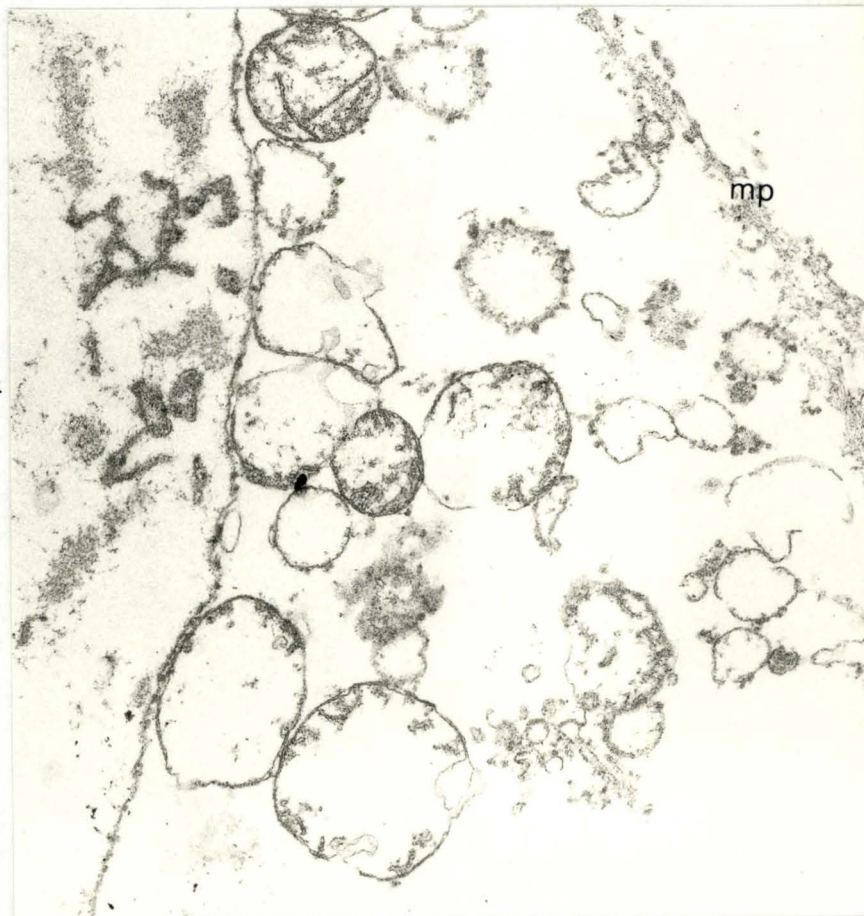
($\times 23000$)

Fig 18: Aspect gonflé des mitochondries dans un fibroblaste injecté avec des mitochondries découplés. On note une diminution du nombre de crêtes.



Les membranes mitochondriales sont fragmentées à certains endroits. Le matériel matriciel est lysé et on note la membrane plasmique (mp) discontinue.

(G x 23000)



Conclusion.

La microinjection de mitochondries découplées provoque une dégénérescence cellulaire. Il serait intéressant de noter que cette dégénérescence est morphologiquement identique à celle provoquée par une exposition à une haute pression d' O_2 générant des radicaux libres Plainchamp (18).

Nous pensons que la dégénérescence observée pourrait s'expliquer de deux manières.

D'abord l'incapacité pour les mitochondries injectées de phosphoryler l'ADP en ATP entraînerait un déficit ATPasique et une consommation continue de NADH qui dépasserait le point de non-retour de l'homéostasie cellulaire.

De plus, les mitochondries abimées pourraient produire des radicaux libres toxiques pour la cellule.

On a déjà signalé que le vieillissement cellulaire augmentait la quantité de radicaux superoxydes de l'ordre de 25 % pour des mitochondries de coeur de rat, et que le RCR diminue chez les animaux âgés (11). Afin de vérifier si cette explication était valable, nous avons voulu savoir si le découplage mitochondrial pouvait provoquer une augmentation de la production de radicaux libres générés par les mitochondries. L'inverse a été montré par H. Nohl (33), à savoir que le système générant des radicaux libres entraînait des changements de la phosphorylation oxydative et de la respiration comparables à ceux observés chez de vieux animaux. Ces effets étaient complètement inhibés en présence de superoxyde dismutase et de catalase indiquant une participation des radicaux libres et de H_2O_2 dans les changements observés. Ainsi le découplage mitochondrial pourrait être causé par une production de radicaux libres qui à leur tour diminueraient le couplage, créant un cercle vicieux conduisant

à une dégénérescence accélérée.

La technique de mesure des radicaux libres par bioluminescence de la lucigénine (14) étant très sensible, nous l'avons choisie afin de mettre en évidence une production éventuelle de radicaux libres par les mitochondries.

2-2-2. Mesure de la production d' $O_2 \cdot (-)$

La consommation d'oxygène par oxypolarigraphie et la production d' $O_2 \cdot (-)$ par bioluminescence ont été mesurées simultanément sur deux échantillons de mitochondries provenant d'un même fractionnement. Les résultats reportés en graphique sont repris à la fig (19) ainsi que les détails expérimentaux.

Le profil de consommation d' O_2 par les mitochondries est normal, on constate une phosphorylation de l'ADP avec une consommation d' O_2 qui s'accélère et une chute de la vitesse d'utilisation de l' O_2 lorsque tout l'ADP a été phosphorylé. L'oligomycine est un inhibiteur de la consommation d' O_2 et de la phosphorylation. Cet agent n'inhibe pas directement les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire, mais empêche la phosphorylation ou régénération de l'ATP. Cette inhibition a cependant comme conséquence d'interrompre le transport des électrons tant que l'énergie potentielle de la mitochondrie n'est pas utilisée. Cette inhibition est levée par le 2,4- di-nitrophénol qui dissipe cette énergie.

Parallèlement à cette évolution, on a mesuré la quantité relative d' $O_2 \cdot (-)$ produits et l'on constate que l'addition d'ADP diminue fortement la production d' $O_2 \cdot (-)$, les électrons sont captés normalement par l' O_2 comme dernier accepteur. L'addition d'oligomycine qui interrompt

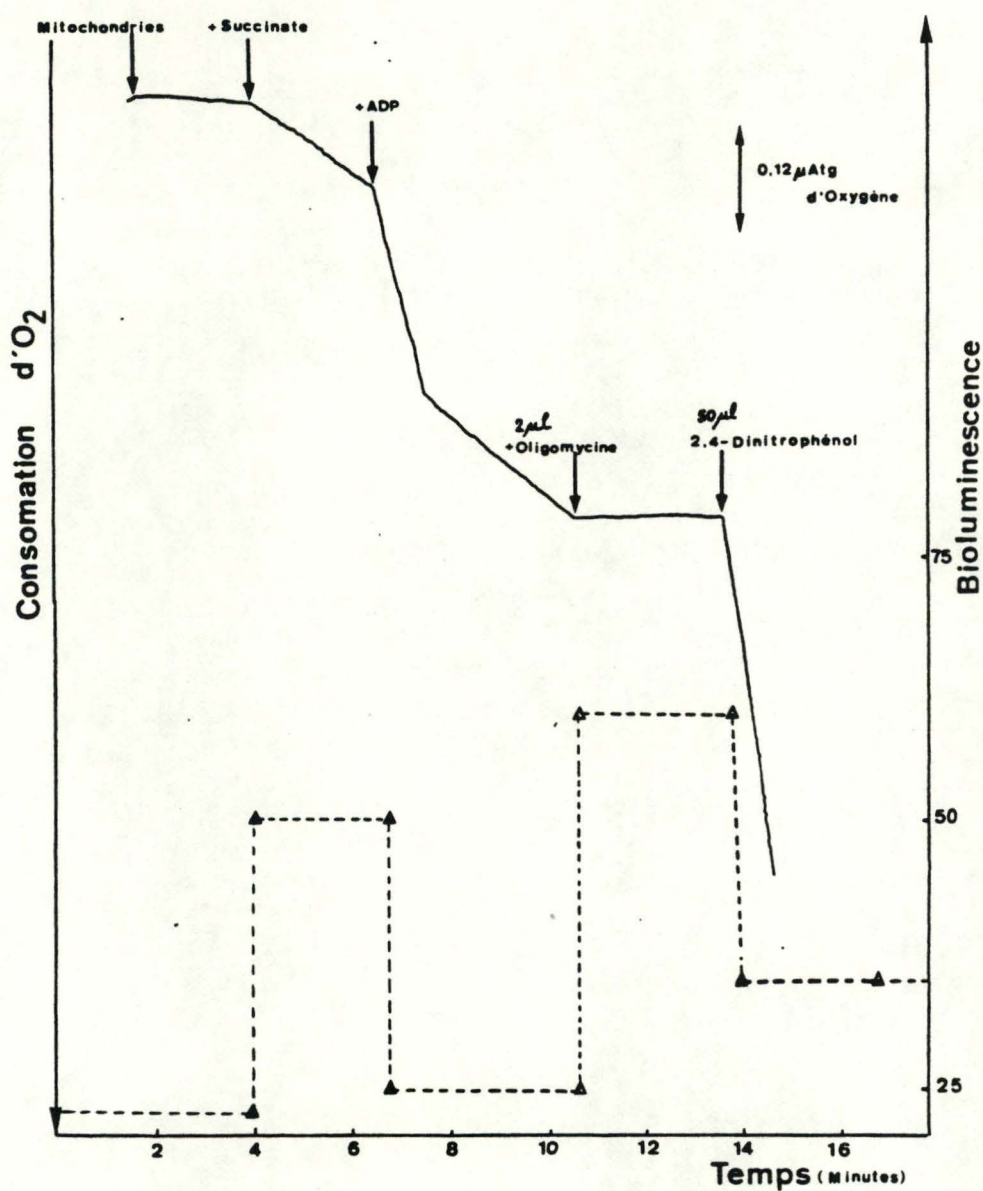


Fig 19 : Evolution de la consommation d'oxygène et de la bioluminescence en fonction du temps.

(Succinate 0,25 M ; ADP 10 mM ; oligomycine 1mg/ml dans l'éthanol ; 2,4-DNP 0,31 mM)

Sont ajoutés pour le test de bioluminescence successivement : 0,4 ml de mitochondries diluées 1/2

0,1 ml de succinate

0,1 ml de lucigénine

50 µl d'ADP puis 2 µl d'oligomycine puis

50 µl de 2.4-DNP.

le transport des électrons, produit des électrons supplémentaires qui réduisent de manière monovalente l'oxygène et créent des radicaux libres. la production est à nouveau réduite en présence de 2,4-dinitrophénol qui active la consommation d'oxygène avec dissipation de l'énergie.

On s'aperçoit que l'état dans lequel se trouve la mitochondrie influence la production de radical $O_2 \cdot^{(-)}$. Les premiers résultats sur l'effet du couplage sur la production d' $O_2 \cdot^{(-)}$ indiquent qu'il n'y a pas de relation immédiate entre le découplage et la production des radicaux $O_2 \cdot^{(-)}$. Ces résultats étant préliminaires, nous avons préféré ne pas les inclure ici.

Conclusion

Ainsi donc les mitochondries sont productrices de radical $O_2 \cdot^{(-)}$. Cette production dépendant fortement de l'état de la mitochondrie, il n'est pas exclu que ces radicaux puissent servir de base à la dégénérescence cellulaire observée après microinjection de mitochondries découplées. Dans ce cas, l'hypothèse de l'implication des mitochondries dans la dégénérescence liée au vieillissement serait renforcé (fig 20).

Ces résultats demandent évidemment à être vérifiés sur un plus grand nombre d'injections et à être suivis d'expériences complémentaires en utilisant comme déjà signalé des mitochondries marquées [3H] mais aussi des injections simultanées de superoxyde dismutase ou autres agents trappeurs de radicaux.

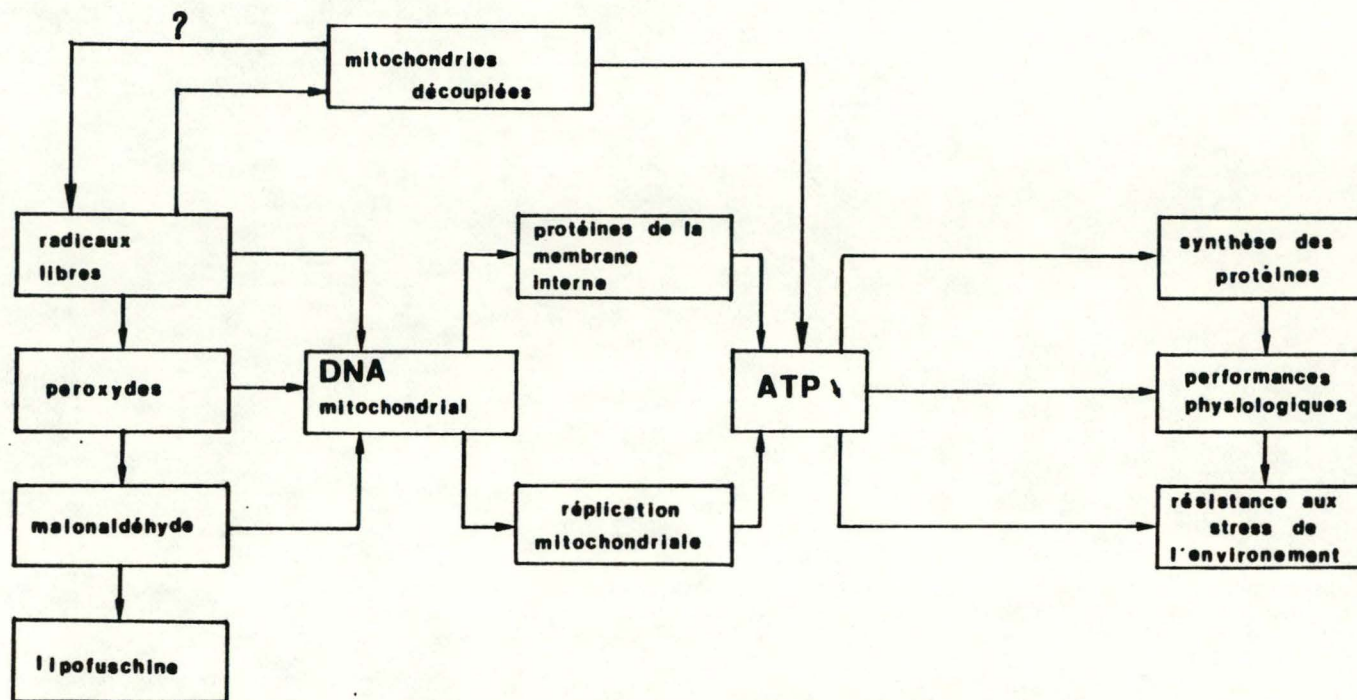


Fig 20: Hypothèse du "vieillissement" mitochondrial comme origine d'un vieillissement cellulaire. La production de radicaux libres par les mitochondries découplées n'a pu être démontrée de façon reproductible.

B I B L I O G R A P H I E

=====

- (1) - Amar Costesec, Beaufay, H. , Wibo, M. , Thines-Sempoux, D. , Feytmans, E. , Robbi, M. , Berthet, J. (1974)
J. Cell. Bio. 61, 201-212.
- (2) - Arborgh, B. , Ericsson, J. L. E. , Glausmann, H. (1975)
Method for the isolation of iron loaded lysosomes
from rat liver. FEBS Lett. 32, 190-194.
- (3) - Backer, J. M. , Weinstein, I.B. (1972): Mitochondrial
and nuclear genes specifying the mitochondria
genetic apparatus in neurospora crassa. Proc.
Natur. Sci. USA, 69, 1371-1374.
- (4) - Bauer, W. , Vinograd, J. (1968) : The interaction of
closed circular DNA with intercalating dyer.
J. molec. Biol. 33, 141-171.
- (5) - Beaufay, H. (1969) : Methods for the isolation of
lysosomes. Lysosome in Biology and Pathology.
North-Holland Publishing Co, Amsterdam. 2, 516-546.
- (6) - Bowers, W.E. , Finkenstaedt, J. T. , de Duve, C. (1967)
Lysosomes in lymphoid tissues. J. Cell. Biol.
32, 325-337.
- (7) - Chio, K. S. , Tappel, A. L. (1969) : Synthesis and
characterization of the fluorescent products
derived from malonaldehyde and amino acids.
Biochemistry, N.Y. 8, 2821-2827.
- (8) - de Duve, C. , Pressmann, B.C. , Gianetto, R. , Wattiaux,
R. , Appelmans, F. (1955) : Tissue fraction studies.
Intracellular distribution patterns of enzymes in
rat liver tissue. Biochem. J. 60, 604-617.

- (9) - Fleming, J.E. , Miguel, J. , Cottrel, S.F. , Yengoyan, L.S. , Economos, A.C. (1982) : Is cell ageing caused by respiration-dependant injury to the mitochondrial genome ? Gerontology. 28, 44-53.
- (10) - Henin, V. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences Zoologiques. (FNDP) 1982 (non publié).
- (11) - Horton, A. , Spencer, A.J. (1981) : Decline in respiratory control ratio of rat liver mitochondria in old age. Mechanism of Aging and Dvlpt. 17, 253-259.
- (12) - Lipetz, J. , Cristofalo, V.J. (1972) : Ultrastructural changes accompanying the aging of human diploid cells in culture. J. Ultrastructure Res. 39, 43-57.
- (13) - Lowry, O. , Rosebrough, N. , Farr , Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- (14) - Marbaix, J. (1984) : Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences Zoologiques. (FNDP) non publié.
- (15) - Miguel, J. , Lundgren, P.R. , Johnson, J.E. (1978) Spectrophotofluorometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. J. Geront. 33, 5-19.
- (16) - Miguel, J. , Economos, A.C. , Fleming, J. , Johnson, J.E. (1980) : Mitochondrial role in cell aging. Exp. Gerontol. 15, 575-591.
- (17) - Mumo, T.R. , Daniel, M.R. , Dingle, J.T. (1964) Lysosomes in chinese hamster fibroblasts in culture. Exp. Cell. Res. 35, 515-530.

- (18) - Plainchamp D. (1984) : Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en Sciences Zoologiques.
(FNDP) non publié.
- (19) - Raes, M. , Remacle, J. (1983) : Aging of Hamster embryo-fibroblasts as the result of both differentiation and stochastic mechanisms. *Exp. Geront.* 18, 223-240.
- (20) - Remacle, J. , Houbion, A. , Houben, A. (1980)
Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts.
Comparaison between young and old cells. *Bioch. Biophys. Acta.* 630, 57-70.
- (21) - Samorajski, T. , Friede, R.L. , Ordy. (1971) : *J. Geront.* 26, 542.
- (22) - Slonimski, D.P. , Perrodin, G. , Croft, J.H. (1968)
Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria : complete transformation of cells into respiratory deficient non chromosomal "petites".
Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 232-235.
- (23) - Stagni, W. , de Bernard, B. (1968) : Lysosomal enzyme activity in rat and beef skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* 170, 129-139.
- (24) - Tate, E.L. , Herberner, H.G. (1976) *J. Gerontol.* 31, 129.
- (25) - Tonna, E.A. , Severson, A.R. (1971) *J. Gerontol.* 26, 186.
- (26) - Tzagoloff, A. , Mancino, G. , Sebald, W. (1976)
Mitochondrial genes and translation products.
A. rev. Biochem. 48, 419-444.
- (27) - Wattiaux, R. (1963) : Influence of the injection of Triton WR-1339 on the properties of rat-liver lysosomes.

- (28) - Wattiaux, R. (1966) : Etude expérimentale de la surcharge de lysosomes. Thèse d'agrégation de l'Enseignement supérieur. U.C.L.
- (29) - Wattiaux, R. (1974) : Behaviour of rat-liver mitochondria during centrifugation in a sucrose gradient. *Mol. Cell. Biochem.* 4, 21-29.
- (30) - Wunderlich, V. (1972) : Studies on nitrosodiumméthylamine preferential methylation of mt DNA in rats and hamsters. *Chem. Biol. Interactions.* 4, 81-89.
- (31) - Yace, T.M. (1979) : Mutagenicity and cytotoxicity of malonaldehyde in mammalian cells. *Res. Ag. Dev.* 11, 137-144.
- (32) - Nohl, H. , (1978) : Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo ? *Eur. J. Biochem.* 82, 563-567.
- (33) - Nohl, H. , Breuninger, V. , Hegner, D. (1978) : Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration. *Eur. J. Biochem.* 90, 385-390.
- (34) - Tulkens, P. , Beaufay, H. , Trouet, A. (1974) *J. Cell. Biol.* 63, 383-401.
- (35) - Wattiaux, R. , Wattiaux-de Coninck, S. , Ronveaux-Dupal, M-F. , Dubois, F. (1978) : Isolation of rat-liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J. Cell. Biol.* 78, 349-368.